

**PROTEÍNA PRION CELULAR EM DOENÇAS
HUMANAS NÃO-PRIÔNICAS:
ASPECTOS MOLECULARES E CELULARES**

ROSA MARIA RODRIGUES PINTO SANTOS CASTRO

**Tese apresentada à Fundação Antonio Prudente
para a obtenção do Grau de Doutor**

Área de concentração: Oncologia

Orientadora: Dra. Vilma Regina Martins

Co-Orientadores: Dr. Roger Walz e Dr. Carlos G. Carlotti Junior

**São Paulo
2004**



Fundação Antonio Prudente
Ana Maria Rodrigues Alves Kuninari
Coordenadora Pós-Graduação

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do Centro de Tratamento e Pesquisa
Hospital do Câncer A.C. Camargo

Castro, Rosa Maria Rodrigues Pinto Santos

Proteína prion celular em doenças humanas não-priônicas: aspectos moleculares e celulares / Rosa Maria Rodrigues Pinto Santos Castro. -- São Paulo, 2004.

163p.

Tese (doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências-Área de concentração: Oncologia.

Orientadora: Vilma Regina Martins.

Descritores: 1.PRÍONS/expressão/genética. 2.EPILEPSIA/genética.
3.TUMORES CEREBRAIS/genética/patologia. 4.NEOPLASIAS. 5.
MARCADORES TUMORAIS/análises.

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, pela formação, orientação
e exemplo de trabalho e dedicação.*

*Ao Rui, Diana e Diogo,
por todo o apoio e carinho.
E, principalmente,
por iluminarem minha vida.*

AGRADECIMENTOS

À **Dra. Vilma Regina Martins**, pela orientação, oportunidade e confiança que me foram dadas;

Ao **Dr. Roger Walz**, pela valiosa co-orientação e incentivo, transmitindo sua inesgotável energia;

Ao **Dr. Carlos Gilberto Carlotti Jr.**, pela co-orientação e apoio, sempre solicito tanto na obtenção dos tecidos como no esclarecimento de minhas dúvidas;

Ao **Dr. Ricardo Renzo Brentani**, pelo exemplo de cientista, conquistando meu respeito e admiração;

Ao **Dr. Humberto Torloni**, a quem considero um mestre e amigo, pelo apoio constante;

Ao **Dr. Luiz Fernando Lima Reis**, pela excelência na direção desta pós graduação;

Ao **Dr. Fernando Augusto Soares**, por me auxiliar em minhas incursões pela patologia dos tumores;

À **Dr. Maria Betânia M. Araújo**, sempre interessada em me auxiliar na leitura e interpretação das imunohistologias;

Ao **Dr. Antônio Hugo J. F. M. Campos**, que me ajudou não só na confecção dos TMAs, mas tirando minhas inúmeras dúvidas "patológicas";

À **Dra. Otávia Caballero**, sempre disponível tanto para me auxiliar na padronização do DHPLC, como para me ensinar os traquejos na biologia molecular;

À **Dra. Anamaria Camargo**, pela ajuda com a realização e interpretação dos seqüenciamentos;

Às **Dras. Adriana R. O. Freitas e Kil Sun Lee**, cientistas brilhantes, por serem verdadeiras amigas em todos estes anos;

À **Dra. Inês Nobuko Nishimoto** do Centro de Estudos, que me auxiliou na confecção das fichas epidemiológicas e na análise estatística dos dados;

Ao **Carlinhos, Miyuki, Severino e Suely**, pela paciência e perfeição nos cortes e confecções histológicas;

À **Valeria Paixão**, pela impecável organização do Banco de Tumores desta instituição e por me ajudar na coleta de sangue para a composição de um banco de DNA normal;

Aos funcionários do **Arquivo Médico**, pela organização dos prontuários e pela presteza e auxílio na disponibilização dos mesmos;

À **Ana Maria e Marcia** da secretaria da pós graduação, pela dedicação;

À todo os funcionários da **Biblioteca do Hospital do Câncer**, pela paciência e auxílio constante e em especial á **Sueli** pelo carinho e atenção com que me ajudou na formatação final deste trabalho;

À todas as pessoas do hospital e **colegas da pós graduação** pelo carinho, incentivo, apoio e oportunidades que me foram dadas, como representante discente;

À todos do **Laboratório de Biologia Molecular e Celular do Instituto Ludwig**, **Angelita, Camila, Cintia, Cleiton, Fernanda, Flávia, Glaucia, Marilene, Michele e Tatiana**, por compartilharem todos os momentos, bons e ruins, "de flores e cobras", tornando o dia a dia bem criativo e divertido;

À todos do **Instituto Ludwig - cientistas, estudantes, administração e manutenção**, que além do companheirismo, simpatia e amizade, fazem parte deste trabalho, já que deram literalmente o sangue para que ele se realizasse.

RESUMO

Castro RMRPS. **Proteína prion celular em doenças humanas não-priônicas: aspectos moleculares e celulares.** São Paulo; 2004. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente]

Encefalopatias espongiformes são doenças priônicas que afetam humanos e animais. O agente infeccioso, PrP^{sc}, é uma isoforma anormal de uma proteína celular, PrP^c, que é expressa em todas as células e altamente conservada entre as espécies. As funções até então conhecidas da proteína normal PrP^c, a relacionam com neuroplasticidade, neuritogênese, neuroproteção, além de participação na proteção ao estresse oxidativo.

Este trabalho abordou algumas destas características avaliando a proteína PrP^c em algumas doenças humanas não priônicas.

Baseado em dados obtidos em camundongos que não expressam a proteína PrP^c, onde várias alterações foram descritas como hiperexcitabilidade neuronal, além de alta sensibilidade a agentes convulsivantes, investigamos o envolvimento de PrP^c com síndromes epiléticas humanas. Analisamos a seqüência do gene que codifica PrP^c (*Prnp*) em indivíduos com epilepsia refratária ao tratamento farmacológico portadores de epilepsia de lobo temporal mesial associada à esclerose hipocampal (ELTM-EH, n = 100) e epilepsias focais associadas a anormalidades do desenvolvimento cortical (ADC, n = 68), que foram comparadas com um grupo controle (n = 180). O alelo polimórfico N171S do gene *Prnp*, que é muito raro na população normal, mostrou-se altamente prevalente em pacientes com ELTM-EH e diferentes formas de ADC, estando ainda associado a uma pior resposta ao tratamento cirúrgico dos pacientes com ELTM-EH.

Visto que é descrita uma associação de epilepsias em pacientes portadores de gliomas, a segunda parte deste trabalho consistiu na avaliação da presença de mutações e polimorfismos em *Prnp* em pacientes com estes tumores (n = 49). Nossos resultados mostraram que não há variantes alélicas prevalentes nestes pacientes.

Investigamos então, a expressão da proteína PrP^c por método imunoistoquímico, nos gliomas mais prevalentes, os astrocitomas. A expressão da proteína PrP^c nestes tumores (n = 109) teve como resultado um aumento,

estatisticamente significativo, da expressão de PrPc em glioblastomas (astrocitomas grau IV) quando comparada a astrocitomas graus II e III. Em contraste, observamos uma diminuição de expressão da proteína PrPc em astrocitomas graus II e III, em relação ao tecido normal cerebral. Acrescentamos ao estudo a pesquisa da expressão de STI-1 (*stress inducible protein-1*), ligante de PrPc associado a neuroproteção, n-NOS (neuronal nitric oxide sintase) e i-NOS (inducible nitric oxide sintase), enzimas de síntese de óxido nítrico, que estão relacionadas a função de proteção a estresse oxidativo descrito para a proteína PrPc. Visualizamos que a expressão de STI-1 estava diminuída, quando comparada a expressão no astrócito, na maioria dos astrocitomas graus II e III, acompanhando a expressão de PrPc. Já n-NOS tinha forte expressão na maioria dos glioblastomas e i-NOS mostrava-se altamente expresso na maioria das células tumorais independente do grau tumoral.

O próximo passo foi investigar se esta maior expressão encontrada nos astrocitomas, repetia-se em outros tumores sólidos. Foram então feitas lâminas de *tissue microarray*, de 8 tipos de tumores sólidos, com 25 amostras cada, que incluíam neuroblastomas, retinoblastoma, tumor carcinóide, adenocarcinoma de pâncreas e próstata, carcinoma ductal invasivo de mama, melanoma e carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, além de amostras dos respectivos tecidos normais. PrPc mostrou-se altamente expresso em todos os casos de carcinoma ductal invasivo de mama em comparação ao tecido normal, que não expressa a proteína, acompanhando a expressão de i-NOS. Além disso, STI-1 parece ter sua expressão diminuindo com a menor diferenciação em retinoblastomas. PrPc mostrou também uma tendência à diminuição de expressão em tumores invasivos e metástases, principalmente em neuroblastomas.

Nossos dados mostram, portanto que variações na proteína PrPc podem contribuir para uma maior predisposição a epilepsia e também como fator preditivo da resposta na cirurgia destas doenças. Além disso, mostramos uma alteração na expressão de PrPc e seu ligante STI1 em astrocitomas, retinoblastomas e em carcinomas ductais invasivos de mama, sugerindo uma participação de PrPc no processo tumoral. Novas abordagens experimentais serão necessárias para que se esclareça os mecanismos celulares e moleculares relacionados a esta observação.

SUMMARY

Castro RMRPS. **Cellular prion protein in non prionic human diseases: molecular and cellular aspects**. São Paulo; 2004. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente]

Prions are the infectious agents that cause neurodegenerative diseases, called Transmissible Spongiform Encephalopathies, both in humans and animals. In fact, they are a counterpart of the cellular prion protein (PrPc) which is expressed in most cell types and is conserved among species, suggesting its important role in the cellular physiology. PrPc has a pivotal role in protection against oxidative stress, neuritogenesis, neuroplasticity and neuroprotection.

Therefore, the present work aimed to evaluate the PrPc participation in human maladies other than prion diseases based on these functions of the normal protein.

Mice with the PrPc gene (*Prnp*) ablated show neuronal hiperexcitability and enhanced sensitivity to seizures, indicating that PrPc might be related to epilepsy. Herein, we evaluated the genetic contribution of *Prnp* to the human medically untreatable Mesial Temporal Lobe Epilepsy related to Hippocampal Sclerosis (MTLE-HS) and in Malformations of Cortical Development (MCD). DNA obtained from peripheral blood cells was used to evaluate *Prnp* coding sequence from 100 patients with surgically treated MTLE-HS and 68 patients with different forms of (MCD). These data were further compared with a control healthy group with similar demographic characteristics (n=180). A *Prnp* variant allele at codon 171, Asn171Ser, which was absent in the control group, was highly prevalent in patients with MTLE-HS (23%) and MCD (13%). This rare polymorphism was also associated with the worst surgical outcome in MTLE-HS.

Seizure history has been associated with some brain tumors and our next approach was evaluate *Prnp* variant alleles in patients with gliomas (n = 49). Some of the *Prnp* polymorphisms were present, however their frequency was similar to that found in the normal population.

PrPc has been associated to protection against oxidative stress and its binding to the Stress Inducible protein 1 (STI1) mediates neuroprotection. Then, we investigated PrPc, STI-1 and two oxidative enzymes: i-NOS and n-NOS, expression in astrocytomas (n = 109), using immunohistochemistry. Our data shows that astrocytomas grade II and III have lower PrPc, STI-1 and n-NOS levels when compared with normal brain tissues. However, glioblastomas showed higher PrPc and n-NOS expression than astrocytomas II and III. These results indicate that PrPc expression could be related to tumor malignancy.

We further performed the same expression analysis using a tissue microarray constructed with 25 different human tumors: neuroblastoma, retinoblastoma, pancreatic and prostatic adenocarcinoma, invasive ductal breast cancer, carcinoid tumor, malignant melanoma and head and neck squamous cell carcinoma. The correspondent normal tissue was also included in this construction.

PrPc and i-NOS presented a high expression in invasive ductal breast cancer in contrast with normal breast tissue where no stain was observed in ductal cells. In retinoblastomas, STI-1 expression was lower in non differentiated tumors than in differentiated ones. On the other hand, PrPc tends to decrease in invasive and metastatic tumors particularly in neuroblastomas.

Finally, our data points that PrPc polymorphisms contribute to a higher predisposition to epilepsies and is also a predictive factor for surgery outcome. Furthermore, we observed an alteration on PrPc and its ligand STI1 expression pattern in human tumors such as astrocytomas, retinoblastomas and ductal invasive breast carcinoma, suggesting that these proteins can be implicated in the tumor process. Further investigations will be necessary to delineate the cellular and molecular mechanisms involved with these observations.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema de distribuição dos tecidos no tissue microarray	49
Figura 2 - Imunoistoquímica de PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS no SNC	65
Figura 3 - Distribuição dos escores encontrados para a expressão das proteínas PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS nos astrocitomas grau I	70
Figura 4 - Fotomicrografia representativa da expressão de PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS em astrocitomas grau I	71
Figura 5 - Distribuição dos escores encontrados para a expressão das proteínas PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS nos astrocitomas grau II	72
Figura 6 - Fotomicrografia representativa da expressão de PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS em astrocitomas grau II	73
Figura 7 - Distribuição dos escores encontrados para a expressão das proteínas PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS nos astrocitomas grau III	74
Figura 8 - Fotomicrografia representativa da expressão de PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS em astrocitomas grau III	75
Figura 9 - Distribuição dos escores encontrados para a expressão das proteínas PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS nos astrocitomas grau IV	76
Figura 10 - Fotomicrografia representativa da expressão de PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS em astrocitomas grau IV	77
Figura 11 - Distribuição da expressão das proteínas PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS encontrada nos neuroblastomas e nos neurônios normais	82
Figura 12 - Fotomicrografia representativa da expressão de PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS em neuroblastomas e nos neurônios normais	83
Figura 13 - Distribuição da expressão das proteínas PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS encontrada nos retinoblastomas e na retina normal	86
Figura 14 - Fotomicrografia representativa da expressão de PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS em retinoblastomas	87
Figura 15 - Fotomicrografia representativa da expressão de PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS em tumores carcinóides	91
Figura 16 - Distribuição da expressão das proteínas PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS encontrada em tumores carcinóides	90

Figura 17 - Fotomicrografia representativa da expressão de PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS em carcinomas ductais invasivos de mama	94
Figura 18 - Distribuição da expressão das proteínas PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS encontrada em carcinomas ductais invasivos de mama	93
Figura 19 - Distribuição da expressão das proteínas PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS encontrada em adenocarcinomas de pâncreas	97
Figura 20 - Fotomicrografia representativa da expressão de PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS em adenocarcinomas de pâncreas	98
Figura 21 - Distribuição da expressão das proteínas PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS encontrada em adenocarcinomas de próstata	101
Figura 22 - Fotomicrografia representativa da expressão de PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS em adenocarcinomas de próstata	102
Figura 23 - Distribuição da expressão das proteínas PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS encontrada em melanoma	104
Figura 24 - Fotomicrografia representativa da expressão de PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS em melanoma	105
Figura 25 - Distribuição da expressão das proteínas PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS encontrada em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço	108
Figura 26 - Fotomicrografia representativa da expressão de PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resumo dos principais polimorfismos descritos no gene de PrPc.	7
Tabela 2 - Algumas das mutações descritas no gene do PrPc	8
Tabela 3 - Cálculo dos escores para a análise da expressão das proteínas por imunistoquímica	52
Tabela 4 - Distribuição quanto a faixa etária, sexo e sintomas dos pacientes com gliomas estudados, separados pelo grau de malignidade tumoral.	54
Tabela 5 - Distribuição quanto aos sintomas ou não de crises epiléticas de pacientes com gliomas, separados pelo grau de malignidade tumoral	56
Tabela 6 - Distribuição dos polimorfismos encontrados no gene <i>Prnp</i> nos pacientes com gliomas e no grupo controle separados pelo tipo tumoral	58
Tabela 7 - Distribuição dos polimorfismos no gene <i>Prnp</i> encontrados nos pacientes com gliomas, agrupados pelo grau de malignidade e presença de crises epiléticas	60
Tabela 8 - Distribuição do polimorfismo no códon 129 do gene <i>Prnp</i> encontrados nos pacientes com gliomas, agrupados pelo grau de malignidade e presença de crises epiléticas	61
Tabela 9 - Distribuição quanto a idade, sexo, tipo tumoral, presença de epilepsia e localização tumoral, de cada paciente	63
Tabela 10 - Alguns dados de cada uma das amostras utilizadas e os respectivos resultados das imunistoquímicas	67
Tabela 11 - Distribuição da expressão de PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS nos astrocitomas estudados, separados pelo grau tumoral	69
Tabela 12 - Distribuição da expressão PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS nos astrocitomas em relação a expressão do astrócito normal, separados pelos graus de malignidade	79
Tabela 13 - Distribuição da expressão de PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS nos tumores analisados no <i>tissue microarray</i> (TMA)	81
Tabela 14 - Distribuição da expressão de PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS nos neuroblastomas com e sem metástases	85

Tabela 15 - Distribuição da expressão de PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS nos retinoblastomas separados pelo grau de diferenciação tumoral ou invasão	89
Tabela 16 - Distribuição da expressão de PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS em tumores carcinóides quanto a ausência e presença de metástase	92
Tabela 17 - Distribuição da expressão de PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS quanto ao grau histológico dos carcinomas ductais invasivos de mama	96
Tabela 18 - Distribuição da expressão de PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS nos adenocarcinomas de pâncreas de acordo com o grau de diferenciação tumoral e a metástases	100
Tabela 19 - Distribuição da expressão de PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS nos adenocarcinomas de próstata separados pela classificação de Gleason	103
Tabela 20 - Distribuição da expressão de PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS em melanomas avaliados pelo local onde se apresentaram	107
Tabela 21 - Distribuição da expressão de PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS nos carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço separados pelo grau de diferenciação tumoral	111
Tabela 22 - Avaliação estatística de comparação de expressão de <i>Prnp</i> e <i>STIP1</i> entre as amostras depositadas no banco de dados de SAGE.	113

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADC = epilepsias focais associadas a anormalidades do desenvolvimento cortical
- ATP = adenosina trifosfatada
- Bax = *Bcl2 associated protein*, oncogene anti-apoptótico
- Bcl-2 = *B cell linfoma 2*, oncogene anti-apoptótico
- BIP = *Binding immunoglobulin heavy chain protein*, GRP78, HSP-A5
- BSE = encefalopatia espongiforme bovina
- cAMP = adenosina 3,5-cíclica monofosfatada
- CDK = *cyclin dependent kinase*
- cDNA = DNA complementar
- CJD = doença de Creutzfeldt-Jakob
- COX-IV = Ciclo oxigenase IV, citocromo-c oxidase nuclear
- CpG = *cytosine plus guanine*
- C terminal = terminal CH₂ da cadeia polipeptídica
- Cu/Zn SOD = enzima superóxido desmutase ligada a cobre e zinco
- CWD = *Chronic Wasting disease*
- Dpl = proteína Doppel
- DHPLC = Denaturing High-performance liquid chromatography
- E-8 = embriões de 8 dias
- EGFR = *epidermal growth factor receptor*
- ELTM-EH = epilepsia de lobo temporal mesial associada à esclerose hipocampal
- e-NOS (NOS-3) = óxido nítrico sintase constitutiva endotelial
- ERK = *Extra cellular signal-regulated kinase*
- GABA = aminoácido gama aminobutírico
- GAG = glicosaminoglicanos
- GPI = glicosilfosfatidil-inositol
- GSS = síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker
- HOP = *heat shock protein 70/90 - organizing protein*, STIP-1
- H-ras = *harvey-rat sarcoma viral oncogene homolog*
- HSP90 = proteína de choque térmico de 90 Kilodaltons

IFF = insônia familiar fatal

i-NOS (NOS-2) = óxido nítrico sintase induzida

KAI1 = *kangai 1*, antígeno leucocitário R2, gene supressor de metástase

KDa = kilodalton

ki67/ MIB-1 = antígeno nuclear relacionado a proliferação celular

KISS1 = gene supressor de metástase, metastina

MAPK = *mitogen activated protein kinase*

MDM2 = *mouse double minute 2, p53 binding protein*

N-CAM = *neural cell adhesion molecules*

NF-Kappa B = *nuclear factor - kappa light chain gene enhancer in B cells*

NG2 = *non-mature glial chondroitin sulfate proteoglycon*

nm23 = *non-metastatic protein 23*

NO = óxido nítrico

n-NOS (NOS-1) = óxido nítrico sintase constitutiva neuronal

N terminal = terminal NH₂ da cadeia polipeptídica

nvCJD = nova variante de CJD

p53 = proteína de 53 kiloDaltons

pb = pares de base

PDGF α R = receptor α de fator de crescimento derivado de plaqueta

PKA = *phospho-kinase A*

PrP^{-/-} = que não expressa a proteína PrPc

PrPc^{+/+} = que expressa a proteína PrPc

PrPc = prion celular

PrP^{res} = prion parcialmente resistente á proteases

Prnp = gene de PrPc

PrPsc = prion *scrapie*

PrP^{sen} = prion protease sensível

PTEN = *phosphatase and tensin homology protein*

PTZ = *pentilenotetrazol*

RB = gene retinoblastoma

SNC = sistema nervoso central

SNP = sistema nervoso periférico

STI-1 = *Stress inducible protein 1*

STIP1 = *Stress inducible protein phosphorileted 1*

TNF-alfa = fator de necrose tumoral alfa

TMA = *tissue microarray*

TPA = ativador de plasminogênio tecidual

TP53 = gene da proteína p53

TSE = encefalopatias espongiformes transmissíveis

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	
1.1	Prion	
1.1.1	Conceito de prion	1
1.1.2	Doenças priônicas	1
1.1.3	Doenças priônicas humanas	5
1.2	Proteína Prion Celular	
1.2.1	O Gene <i>Prnp</i> e a estrutura da proteína	11
1.2.2	Expressão de PrPc	12
1.2.3	Funções de PrPc	15
1.2.3.1	Cobre e estresse oxidativo	17
1.2.3.2	Neuritogênese, neuroplasticidade, adesão e migração celular	18
1.2.3.3	Neuroproteção	20
2	OBJETIVOS	
2.1	Objetivos Gerais	22
3	PRIMEIRA PARTE - A proteína prion celular nas Epilepsias	
3.1	Introdução	
3.1.1	Epilepsias	23
3.1.2	Epilepsia - sincronia e excitabilidade	24
3.1.3	Epilepsia e PrPc	27
3.2	Objetivos Específicos	29
3.3	Artigos Publicados	30
3.4	Resultados e Discussão	31
3.5	Conclusões	34
3.6	Perspectivas do Estudo	35
4	SEGUNDA PARTE - A proteína prion celular no Câncer	
4.1	Introdução	
4.1.1	Tumorigênese	36
4.1.2	Gliomas	38
4.1.3	Justificativa do Estudo	43

4.2	Objetivos Específicos	45
4.3	Materiais e Métodos	
4.3.1	Análise de mutações e polimorfismos no gene de PrPc em amostras de gliomas	46
4.3.2	Avaliação da expressão de PrPc, STI-1, NOS-1 e NOS-2 em tumores sólidos por imunohistoquímica	47
4.3.3	Análise computacional da expressão diferencial de PrPc e STI-1	52
4.3.4	Questões Éticas	53
4.4	Resultados	
4.4.1	Análise de mutações e polimorfismos no gene <i>Prnp</i> em gliomas	54
4.4.2	Expressão das proteínas PrPc, STI-1, iNOS e nNOS em astrocitomas	64
4.4.3	Expressão das proteínas PrPc, STI-1, iNOS e nNOS em outros tumores - <i>tissue microarray</i> (TMA)	80
4.4.4	Análise computacional da expressão diferencial de PrPc e STI-1	112
4.5	Discussão	114
4.6	Conclusões	129
4.7	Perspectivas do Estudo	131
4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	132

ANEXOS

Anexo 1 - Neurology. 2003;61(9):1204-10.	A-1
Anexo 2 - Neurology 2004.	A-2
Anexo 3 - J Neurosci Meth 2004.	A-3
Anexo 4 - Ficha utilizada para a coleta de dados dos prontuários.	A-4
Anexo 5 - Alguns dados de cada uma das amostras utilizadas nos tumores estudados e constantes do TMA e os respectivos resultados das imunohistoquímicas.	A-6

***PROTEÍNA PRION CELULAR EM DOENÇAS
HUMANAS NÃO-PRIÔNICAS:
ASPECTOS MOLECULARES E CELULARES***

ROSA MARIA RODRIGUES PINTO SANTOS CASTRO

2004

1 INTRODUÇÃO

1.1 PRION

1.1.1 Conceito de prion

O termo prion foi proposto por PRUSINER (1982) para designar um agente infeccioso composto unicamente de proteína que é independente de ácidos nucleicos para sua infectividade.

A partícula proteica infecciosa foi identificada em experimentos onde se procurava o agente responsável por doenças neurodegenerativas transmissíveis denominadas encefalopatias espongiformes (TSE) e foi denominada prion ou PrPsc (*prion scrapie*). É uma isoforma de uma proteína constitutiva, PrPc (prion celular), da qual difere apenas na estrutura protéica. A molécula de PrPsc tem em sua estrutura uma maior quantidade de folhas beta, é insolúvel, tem tendência a formar agregados e sua estrutura alterada serve de molde na conversão da proteína normal, catalisando sua própria formação. A infecção é produtiva porque novas moléculas de PrPsc são geradas a partir de PrPc, de uma maneira exponencial. Portanto, é na conformação alterada que está a informação necessária para a propagação do agente infeccioso (PRUSINER 1998).

1.1.2 Doenças priônicas

Os primeiros relatos da existência de uma doença infecciosa que trazia grandes prejuízos para a economia, afetando os rebanhos de carneiros na Inglaterra, datam do século XVIII. Iniciava-se com sintomas de agitação e prurido intenso que levava a perda da lã, pois a ovelha se debatia contra muros e árvores e por esse motivo levou o nome de “scrapie”. A idéia era que a doença seria causada por um vírus lento, devido ao longo período de incubação e a transmissão de um animal para o outro. Cuillé e Chelle comprovaram a natureza infecciosa do *scrapie*, através da transmissão experimental, em 1939 (PARRY 1983).

Entre 1920 e 1921, dois autores relataram os primeiros casos de doenças neurodegenerativas humanas, com características espongiformes. Hans-Gerhard

Creutzfeldt publicou o relato do caso de um paciente que havia morrido após um quadro progressivo de ataxia e demência. O artigo incluía o relatório histopatológico da necropsia de cérebro deste paciente, onde o autor verificava uma grande perda neuronal e espongirose. Alfons Jakob descreveu mais 3 casos e definiu a doença como hereditária, denominando-a de encefalopatia espongiiforme. A doença ficou conhecida como doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD) (AGUZZI e POLYMENIDOU 2004).

Em 1957, GAJDUSEK e ZIGAS publicaram um artigo com a descrição de uma doença degenerativa do sistema nervoso central que afetava vários indivíduos (114 neste primeiro estudo) de uma tribo isolada, em Papua, Nova Guiné. A população local denominou-a Kuru, que significava tremer na linguagem nativa. Estudos histológicos mostravam grande perda neuronal que parecia ser devido a ação tóxica de alguma substância, mas os esforços para isolar o agente causal falharam. Os principais sintomas eram ataxia e tremores, evoluindo em menos de um ano para a morte. Gadjusek propôs que a doença estaria envolvida com o canibalismo e com o abandono dessa prática pelos integrantes da tribo, a incidência da doença declinou rapidamente. Outro pesquisador do grupo, W. Hadlow, verificou que o aspecto histopatológico do cérebro dos mortos por Kuru era muito semelhante ao aspecto do cérebro das ovelhas que morriam por scrapie e com a descrição de CJD. Nos anos seguintes, a comparação da scrapie com as doenças humanas e a transmissão experimental do kuru e CJD para chimpanzés, contribuíram para a versão do fator viral na transmissão das doenças neurodegenerativas espongiiformes (AGUZZI e POLYMENIDOU 2004).

Experimentos que revelaram a infecciosidade do extrato cerebral de animais doentes submetidos a altas doses de UV e raios ionizantes (ALPERS et al. 1967), além da sensibilidade a digestão por proteases (MCKINLEY et al. 1983), confirmaram a natureza proteica do agente infeccioso, proposta primeiramente pelo matemático GRIFFITH (1967), baseando-se em argumentos teóricos.

Logo depois, o gene que codifica esta proteína foi clonado e a molécula de PrPc foi identificada como constitutiva das células animais (OESCH et al. 1985; KRETZSCHMAR et al. 1986). Apesar das seqüências de aminoácidos das duas proteínas serem idênticas, suas conformações estruturais são bastante diferentes: a

proteína celular, PrP^c, contém em sua estrutura secundária 43% de alfa hélices e 3% de folhas beta, enquanto sua isoforma, a proteína prion scrapie (PrP^{sc}) contém 34% de alfa hélices e 43% de folhas beta. Este tipo de estrutura favorece a formação dos agregados normalmente vistos nas doenças priônicas (amilóides). A proteína anormal é insolúvel e parcialmente resistente á proteases (PrP^{res}), enquanto a proteína celular normal é solúvel e protease sensível (PrP^{sen}) (ZHAN 1999).

A molécula de prion só ganhou evidência mundial devido ao impacto econômico e na saúde pública causado pela encefalite espongiforme bovina (BSE) na Inglaterra no início de 1990. A contaminação do gado inglês teria ocorrido devido ao aproveitamento de carcaças de ovelhas contaminadas na preparação de ração, indicando que a scrapie tinha passado das ovelhas para o gado. Estas evidencias são reforçadas pelo fato de que, assim que esse tipo de ração deixou de ser usada e que os restos de animais afetados foram queimados, a incidência de BSE na Inglaterra declinou.

As doenças priônicas humanas eram doenças raras, quando em 1996 começaram a aparecer na Inglaterra casos de CJD afetando pessoas jovens e com algumas características diferentes da doença anteriormente descrita. Foi levantada a hipótese da carne bovina de animais com BSE estar transmitindo a doença para humanos, pois todos os casos dessa nova variante vinham dos mesmos lugares dos relatos de BSE. Não se sabe o número total de humanos infectados, mas novos casos surgem a cada ano e no início de 2004 já haviam sido confirmados 140 casos da nova variante de CJD (AGUZZI e POLYMENIDOU 2004).

Surgiram também formas de doença priônica em animais domésticos e de zoológico com suspeita de contaminação pela carne de gado e ração contaminada com BSE. Uma doença semelhante (CWD - *Chronic Wasting disease*), já confirmada como uma doença priônica, tem afetado os cervos da América do Norte nos últimos anos, mas o mecanismo de transmissão ainda não foi esclarecido (HEPPNER e AGUZZI, 2001; MILLER e WILLIAMS 2004).

Um dos pontos chaves na descrição do mecanismo de infecção por prions foi a construção de um camundongo nocaute para PrP^c (PrP^{-/-}). Experimentos com estes animais mostraram que a molécula PrP^c é absolutamente necessária para a

infecção, uma vez que estes animais não contraíam a doença após a injeção de extratos cerebrais de animais doentes (BUELER et al.1992).

A importância da proteína prion celular na propagação da doença está demonstrada, mas a maneira pela qual a proteína infecciosa chega ao cérebro ainda hoje é hipotética. Alguns estudos com camundongos imuno deficientes mostraram a importância do sistema imune no mecanismo de infecção e na propagação da molécula de PrPsc a partir do trato digestivo até o sistema nervoso central. A proteína PrPsc uma vez ingerida seria absorvida pelas placas de Peyer, na mucosa intestinal, sendo processada pelos macrófagos e células dendríticas que a apresentariam para as células linfóides B, principalmente. Foi demonstrado que o sistema linforeticular é importante para a propagação e desenvolvimento da infecção. Há indícios de que ocorre replicação da molécula de PrPsc no baço e uma participação do sistema linfático no transporte das proteínas infecciosas até as regiões do cérebro, onde os danos celulares acontecem. A participação do sistema nervoso periférico também parece ser importante na infecção, como rota por onde a proteína alterada alcançaria o cérebro, através do nervo vago (AGUZZI e POLYMENIDOU 2004).

Uma vez alcançada as células do SNC, as moléculas de PrPsc vão se agregar, causando morte neuronal, ativação das células da glia e dano nas sinapses. A agregação só aconteceria após a conversão da estrutura de PrPc, gerando mais PrPsc e a propagação da infecção. Alguns modelos foram propostos para esta conversão. Um primeiro, sugere uma nucleação, como a que ocorre nos processos de cristalização, um mecanismo de polimerização nucleada onde as moléculas de PrPsc internalizadas agiriam como um núcleo de agregação, recrutando e arrastando moléculas semelhantes (JARRETT e LANSBURY 1993). Outro modelo chamado de estruturação direcionada por um molde, proposto por WEISSMANN (1994), sugere que PrPc, ancorado na superfície da célula se ligaria a molécula de PrPsc exógena e se internalizaria, carregando a molécula infecciosa. No interior de vesículas endocíticas, PrPc converteria parte de suas alfa hélices, de locais específicos da moléculas, em folhas beta, usando PrPsc como molde, iniciando o processo de modificação conformacional, onde novas moléculas de PrPc seriam convertidas a partir destas. Este modelo se baseia no fato de que uma estrutura mais estável

quimicamente induz a outra a se converter estruturalmente, após a ligação das duas. Uma terceira teoria sugere que moléculas de PrPc com conformação alterada normalmente são aprisionadas em lisossomos para reciclagem ou degradação pelos proteassomas. Quando a quantidade de proteína com conformação alterada é maior que o poder de captura dos lisossomos, formam agregados e estes acumulam-se no interior da célula. Isto poderia ocorrer mesmo na ausência de PrPsc, num processo de inibição proteassômica, por exemplo (MA e LINDQUIST 2002).

1.1.3 Doenças priônicas humanas

Em humanos, além da doença de Kuru, Creutzfeldt-Jakob (CJD) e a nova variante de CJD (nvCJD), a síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS) e a insônia familiar fatal (IFF) são reconhecidas como doenças priônicas. Podem ser classificadas como de transmissão hereditárias, adquiridas ou esporádicas.

As doenças priônicas adquiridas incluem os casos provenientes da contaminação por carne bovina, mas são na sua maioria, devido a contaminações que ocorreram durante a fase pré DNA recombinante, por administração de hormônios de crescimento e gonadotrofina extraídos de cadáveres humanos. No Brasil foram descritos dois casos de pacientes que adquiriram a doença por uso de hormônio de crescimento contaminado (MACARIO et al. 1992; CABOCLO et al. 2002). A contaminação por instrumental cirúrgico também já foi descrita, além de casos em transplantes de dura mater e de córnea (HEPPNER e AGUZZI 2001). Recentemente, uma pesquisa em bancos de sangue no Reino Unido levantou a possibilidade de transmissão de CJD por hemoderivados contaminados (LLEWELYN et al. 2004).

As doenças priônicas esporádicas são também chamadas de espontâneas pois acredita-se que a transformação de uma molécula em outra ocorra espontaneamente. Na verdade, não consegue-se associa-las a uma mutação genética, exposição ao agente, área geográfica ou outro fator que indique sua causa. Vários estudos estão sendo feitos para tentar identificar os mecanismos envolvidos nestas formas de doenças, como a associação com outras proteínas e os polimorfismos da molécula (PUOTI et al. 2004), além de variantes encontradas em sítios não transcritos do gene da proteína (MEAD et al. 2001).

Nas formas hereditárias das doenças priônicas mutações no gene de PrPc levam a transmissão da doença em caráter mendeliano autossômico dominante. Mais de 20 pontos de troca de uma base nucleotídica levando a troca de aminoácidos, além de inserções de grandes pedaços redundantes do gene estão envolvidas em CJD, GSS e IFF (MASTRIANNI e ROOS 2000).

Alguns polimorfismos no gene de PrPc também estão relacionados com predisposição ou fator de proteção em algumas das encefalopatias espongiformes. Entre eles um polimorfismo importante é o encontrado no códon 129, onde o aminoácido metionina é encontrado em homozigidade em quase metade da população. Sua influência ainda não está esclarecida, mas sabe-se por exemplo que quando acompanhado da mesma mutação no códon 178, pode predispor para CJD quando codificado para valina no códon 129 (M129V ou V129V) (GOLDFARB et al. 1991) ou IFF quando codificado para metionina em homozigidade (M129M) (MEDORI et al. 1992). Ainda com relação a esse polimorfismo, a presença de valina parece ter um papel protetor em CJD esporádica (SHIBUYA et al. 1999) e estudos estatísticos demonstraram que todos os infectados pela carne bovina contaminada com BSE que adquiriram a nova variante de CJD possuíam os dois alelos do códon 129 codificando metionina (MEAD et al. 2003). Além disso, este mesmo códon em heterozigidade (M129V) foi identificado nas pessoas que sobreviveram a epidemia de kuru na Nova Guiné, sugerindo que a presença de uma valina neste códon seja um fator protetor e seletivo na evolução da espécie, já que a porcentagem de metionina em homozigidade estava bem abaixo da encontrada na população (MEAD et al. 2003). Curiosamente, esse mesmo códon codificando metionina já foi demonstrado ser prevalente em pacientes com miosite por corpos de inclusão (LAMPE et al. 1999). Já outros autores mostram uma associação entre a presença de valina no códon 129 de PrPc com uma diminuição na cognição em idosos (BERR et al. 1998; RUJESCU et al. 2003; CROES et al. 2003), um desenvolvimento precoce de doença de Alzheimer (DERMAUT et al. 2003) e declínio de habilidade intelectual em síndrome de Down (DEL BO et al. 2003). O significado biológico destas associações ainda não foi esclarecido.

Todos os polimorfismos já identificados no gene de prion celular (*Prnp*), em diferentes populações humanas estão depositados no "Gene Bank" ([www.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)

ncbi.nlm.nih.gov) e os mais importantes foram reunidos na tabela 1. Há também depositadas neste mesmo banco de dados, as várias mutações que foram relacionadas às doenças neurodegenerativas hereditárias associadas a molécula de PrPsc, compiladas na tabela 2.

As doenças priônicas humanas incluem um largo espectro de manifestações clínicas: demência, ataxia, insônia, parestesias, mioclonias e desordens de comportamento. As mudanças histopatológicas das doenças priônicas humanas incluem diferentes graus de espongiose, vacuolização neuronal e gliose e em diferentes regiões do cérebro, com presença ou não de placas de depósitos amilóides. Foi descrita a presença de PrPsc no baço (BLATTLER et al. 1997; KLEIN et al. 1997), no sistema nervoso simpático (HAIK et al. 2003) e em tecidos musculares (BOSQUE et al. 2002; KOVACS et al. 2004). Os depósitos de PrPsc podem apresentar-se sob vários aspectos no parênquima cerebral com depósitos difusos ou granular, intra e pericelular. Nos depósitos intracelulares sua localização é principalmente em lisossomos sinápticos dos neurônios e glia, incluindo microglia (FOURNIER 2000).

Tabela 1- Resumo dos principais polimorfismos descritos no gene de PrPc. As frequências mostradas são as descritas na literatura (WINDL et al. 1999; LAMPE et al. 1999). As referências são as dos autores que citaram esses polimorfismos pela primeira vez.

Códon	Polimorfismo	Frequências na população	Referência
51-91	Deleção 24pb	9%	PERRY et al. (1995)
51-91	Inserção 24pb	~1%	CERVENAKOVA et al. (1994)
114	Deleção triplete	45%	SALVATORE et al. (1994)
117	Silenciosa	5.4%	HSIAO et al. (1989)
124	Silenciosa	~1%	PRUSINER et al. (1997)
129	Met / Val	M/V 50%; V/V 10%	DOH-URA et al. (1989)
188	Thr /Arg	~1%	WINDLT et al. (1999)
219	Glu / Lys	12%	BARBANTI et al. (1996)

Fonte: Adaptado de www.ncbi.nlm.nih.gov

Tabela 2- Algumas das mutações descritas no gene do Prion, associadas a doenças. Abreviações: GSS = Gerstmann-Straussler-Scheinker ; CJD = Doença de Creutzfeldt-Jakob; IFF = Insônia Familiar Fatal. As referências são as dos autores que citaram as mutações em associação com as doenças, pela primeira vez.

Códon	Mutação	Patologia associada	Referência
51-91	Inserção 48 a 216 pb	CJD /GSS	GOLDFARB et al. (1993)
102	Pro / Leu	GSS	DOH-URA et al.. (1989)
105	Pro / Leu	GSS	YAMADA et al. (1993)
117	Ala / Val	GSS	DOH-URA et al. (1989)
131	Gly / Val	GSS	PANEGYRES et al. (2001)
145	Tyr / STOP	GSS	GHETTI et al. (1996)
171*	Asn / Ser	Esquizofrenia	SAMAIA et al.(1997)
178	Asp / Asn	IFF/CJD	MEDORI et al. (1992);
180	Val / Ile	CJD	KITAMOTO et al. (1993)
183	Thr / Ala	CJD	NITRINI et al. (1997)
187	His / Arg	GSS	CERVENAKOVA et al. (1999)
188	Trh / Lys	Demência	FINCKH et al. (2000)
196	Glu / Lys	CJD	PEOC'H et al. (2000)
198	Phe / Ser	GSS	HSIAO et al. (1992)
200	Glu / Lys	CJD/IFF	INOUE et al. (1994)
202	Asp / Asn	GSS	PICCARDO et al. (1998)
208	Arg / His	CJD	MASTRIANNI et al. (1996)
210	Val / Ile	CJD	POCCHIARI et al. (1993)
211	Glu / Gln	CJD	PEOC'H et al. (2000)
212	Gln / Pro	GSS	PICCARDO et al. (1998)
217	Gln / Arg	GSS	HSIAO et al. (1992)
232	Met / Arg	CJD	KITAMOTO et al. (1993)

* Foi demonstrado que o códon 171 N/S pode ser um polimorfismo raro, pois existe em uma proporção de 5 a 8% em populações da Jamaica e Camarões (MEAD et al. 2003).

Fonte: Adaptado de www.ncbi.nlm.nih.gov

As diferentes apresentações das doenças priônicas, quanto aos sinais, sintomas e período de evolução, sugerem um mecanismo complexo de patogênese. Essas variações podem estar relacionadas a existência de diferentes cepas da molécula de prion. É sabido que a molécula de PrPc apresenta-se com diferentes níveis de glicosilação e diferentes clivagens, nas várias regiões do cérebro (BERINGUE et al. 2003). Assim, cada forma de PrPc de diferentes níveis de glicosilação e tamanho teria características estruturais diferentes e funções específicas em cada uma das regiões do cérebro. Foi sugerido que, quando uma molécula de PrPsc, com um tipo de glicosilação e uma conformação particular, entra no organismo esta se associa a uma PrPc idêntica, apresentando um tropismo para a célula ou região do cérebro onde esse tipo estivesse mais expresso, alterando este local preferencialmente (BERINGUE et al. 2003).

Alterações nos períodos de incubação e na localização cerebral parecem estar relacionadas com alguns polimorfismos da proteína que trariam esta influência sozinhos ou associados a polimorfismos encontrados fora da região codificante da molécula, num processo de associação gênica (CROES et al. 2004).

Uma classificação das doenças priônicas esporádicas baseada no nível de glicosilação encontrado, em associação com as alterações polimórficas do códon 129, tem sido útil na separação e identificação destas cepas, que apresentariam-se com diferentes sinais, sintomas, achados histopatológicos e diferentes prognósticos (HILL et al. 2003).

Ainda não está totalmente claro como as mutações encontradas nas doenças hereditárias desencadeiam os eventos descritos. Uma vez que alterações na seqüência de uma proteína podem gerar estruturas proteicas anômalas, acredita-se que as mutações que ocorrem nas formas hereditárias podem favorecer essa mudança de conformação. Isto pode estar ocorrendo na CJD familiar pela adição de octapeptídeos (repetições de 8 aminoácidos na região N-terminal da molécula), pois a adição de uma seqüência grande na molécula de PrPc provoca desestabilizações termodinâmicas na molécula, levando a formação de estruturas fibrilares e agregados (PRIOLA e CHESEBRO 1998). Mas, nas mutações com alteração de um aminoácido, essa desestabilização não foi totalmente comprovada. Por outro lado sabe-se que alguns pontos de mutação alteram o endereçamento celular da proteína,

como a do códon 117 associada a GSS, onde nenhum depósito amilóide é encontrado e a transmissão a animais de laboratório não acontece. Foi demonstrado que esta mutação impede a clivagem normal do peptídeo sinal e a molécula se apresenta nos neurônios como uma forma transmembrânica (HEGDE et al. 1998). Outro exemplo é a mutação no códon 145 que leva a um códon de parada de leitura, associados a GSS, culminando na formação de uma proteína truncada que é direcionada para o núcleo da célula (LORENZ et al. 2002). Estes resultados indicam que pelo menos para algumas mutações, a doença hereditária pode não estar relacionada a mudança conformacional clássica.

Ainda não está esclarecido como a modificação da molécula leva à morte neuronal, já que o acúmulo de depósitos amilóides, que é comprovadamente tóxico, não é visto em todas as encefalopatias espongiformes. A alteração do tráfego da proteína normal na célula, que por não se ancorar na membrana celular ou por ser alvo de clivagens anormais, causaria o acúmulo de proteína no citosol, podendo provocar o dano celular. Além disso, alterações nas propriedades da superfície celular e sua interação com outras proteínas, poderiam estar sinalizando para a morte celular (ZHAN 1999).

Estudos em necrópsias cerebrais humanas demonstraram a existência, em pacientes com CJD hereditária, de depósitos amilóides compostos principalmente por resíduos de aproximadamente 17 KDa, da região C-terminal da molécula, provenientes de uma clivagem proteolítica na região do aminoácido 110. Este fragmento, que é altamente resistente a digestão por proteinase K, seria o responsável pela conversão estrutural da proteína prion celular, formando grandes agregados no citosol, induzindo a apoptose. Outros fragmentos de tamanho e local de clivagem diferentes foram mostrados em outras formas da doença, mas as correlações com a formação do depósito e a morte neuronal são ainda especulativas (CHEN et al. 1995; SHAKED et al. 1999; ZOU et al. 2003).

Além destas, várias outras associações e mecanismos já foram propostos. Estudos de genotipagem, estruturais, de tráfego e de sinalização das variantes da molécula de PrPc estão sendo feitos por vários pesquisadores em todo mundo no intuito de esclarecer estes pontos. Por enquanto, não existem dados concretos para afirmar se os achados patológicos das doenças priônicas são devidos a toxicidade da

molécula de PrP^{sc}, a perda de função normal de PrP^c ou a ambos (MARTINS et al. 2002; HETZ et al. 2003; SOTO 2003).

1.2 PROTEÍNA PRION CELULAR

1.2.1 O Gene *Prnp* e a Estrutura da proteína

O gene de PrP^c em humanos está localizado no braço curto do cromossomo 20 e é composto por 2 exons. É no segundo exon que está contida toda a fase aberta de leitura, que é altamente conservada entre os mamíferos (PUCKETT et al. 1991).

PrP^c possui 253 aminoácidos, sendo que os primeiros 22 resíduos da seqüência N-terminal endereçam a proteína para o retículo endoplasmático, onde este peptídeo é removido. Na extremidade C-terminal, os 23 resíduos hidrofóbicos são a seqüência sinal para a ligação da âncora de GPI (glicosilfosfatidil-inositol) na superfície da membrana plasmática e são também clivados para que esta modificação pós traducional possa ocorrer. No complexo de Golgi, a âncora de GPI de PrP^c é modificada pela adição de um resíduo de ácido siálico. Além da adição de GPI, PrP^c pode sofrer também outras modificações pós-traducionais como a adição de 1 ou 2 açúcares N-ligados em regiões consenso (asparagina 181 e 197) e a formação de uma ponte de dissulfeto intramolecular entre os resíduos de cisteína 179 e 214 (KIM et al., 2001).

Estudos da seqüência de aminoácidos da proteína mostraram a presença de uma região repetitiva entre os aminoácidos 51 a 91, com 4 octapeptídeos PHGGGWGQ adjacentes precedidos de um nonapeptídeo análogo (região de *octarepeat*). Através de estudos de modelagem molecular foi possível identificar a presença de três estruturas em α -hélice nos peptídeos 144 a 155, 173 a 194 e 200 a 228, além de uma região hidrofóbica central (aminoácidos 106 a 126) e duas pequenas estruturas em folhas beta nos resíduos 128 a 131 e 161 a 164 (HARRIS 1999).

Alguns estudos indicam que outras modificações pós traducionais são feitas além da clivagem dos peptídeos N e C terminais, a formação da ponte dissulfeto e a adição dos resíduos de açúcar nas 3 formas de glicosilação (nenhuma, 1 ou 2). Já foi

demonstrada a existência de PrPc em formas truncadas ocorrendo naturalmente nas células, resultado de clivagens na região hidrofóbica e alterações nos glicanos ligados a proteína que podem diferir tanto na estrutura como no tamanho (PAN et al. 2002). Além disso, foi demonstrado que PrPc é hidroxilado (prolina 44) de uma maneira tipo-celular específica, podendo influenciar a estrutura da região N-terminal que normalmente é desestruturada (GILL et al. 2000).

1.2.2 Expressão de PrPc

A proteína PrPc é constitutivamente expressa em vários tipos celulares. A ativação do promotor do gene de PrPc (*Prnp*) é dependente da estrutura da cromatina e pode ser ativado por histona deacetilase, indicando que a transcrição de *Prnp* pode ser regulada por fatores de transcrição específicos (CABRAL et al. 2002). Outro aspecto importante, relatado por vários autores é a disparidade entre a expressão da proteína e a quantidade de mRNA transcrito, normalmente maior, sugerindo uma alta degradação e reciclagem da proteína (FORD et al. 2002a). Outros autores sugerem que estas diferenças de expressão entre mRNA e proteína seja resultado de uma ineficiência na tradução, que seriam moduladas por seqüências na região não traduzida (HORIUCHI et al. 1997; GOLDMANN et al. 1999; SCHRODER et al. 2002).

Apesar disso, com estudos abrangendo quantificação de mRNA, Western blot, hibridização *in situ*, imunistoquímica, microscopia confocal e eletrônica, a expressão de PrPc em vários tecidos e em algumas situações fisiológicas e patológicas já foram estabelecidas.

Sabe-se que a proteína prion celular é detectada em quase todas as células do organismo, mas em maiores concentrações no sistema nervoso central. É expressa em altas concentrações nos neurônios e em células da glia, onde é expressa principalmente em astrócitos e em menor quantidade em oligodendrócitos (VERGHESE-NIKOLAKAKI et al. 1999). No sistema nervoso periférico é altamente expressa nas células de Schwann (FOLLET et al. 2002).

A expressão de PrPc é altamente regulada durante o desenvolvimento, sendo que os tecidos fetais e placenta expressam altas quantidades da proteína (OESCH et al. 1985; MANSON et al. 1992). No cérebro há uma alta expressão ao longo da

embriogênese e em estruturas como hipocampo, onde há plasticidade, mantém-se alta mesmo após o nascimento. Já em áreas do cérebro onde a estrutura é estabelecida durante o desenvolvimento, a expressão diminui, mas ainda é observada com alta expressão em todas as áreas do cérebro adulto (SALES et al. 2002).

PrPc está presente no baço e em praticamente todos os tecidos, incluindo músculos, trato digestivo, testículo, útero, fígado, língua, pele, glândulas adrenais e parótida, tiróide, pulmão e esperma, porém em menor quantidade da apresentada no sistema nervoso (FORD et al. 2002b).

A expressão de PrPc nos linfócitos foi bastante estudada devido as suas implicações com a rota de transmissão das TSEs. Alguns autores demonstraram que a maioria dos linfócitos dos tecidos linfóides primários não apresentam expressão de PrPc detectável por imunistoquímica, mas linfócitos circulantes ou que estão extravasados nos tecidos apresentam alta expressão (FORD et al. 2002b). Células B, células dendríticas, bem como monócitos e plaquetas tem alta expressão da proteína (BARCLAY et al. 1999; FORD et al. 2002b). Células precursoras e *stem cells* da medula óssea apresentam alta expressão de PrPc, principalmente as células precursoras eritróides e da linhagem granulocítica, embora eritrócitos e granulócitos maduros do sangue percam esta expressão (DODELET e CASHMAN 1998), sugerindo uma atividade no desenvolvimento e diferenciação celular.

Células endoteliais podem ser negativas em alguns vasos sangüíneos (FORD et al. 2002b), porém alguns autores descreveram altas concentrações de PrPc nos capilares sangüíneos do intestino, cordão umbilical e coração de adulto, principalmente na aorta (SIMAK et al. 2002). Em estudos usando a tecnologia de cDNA *microarrays* para detecção de genes diferencialmente expressos em ratos induzidos a hipertensão, OKUDA et al. (2002) encontraram PrPc superexpresso. Síndromes coronarianas agudas, púrpura trombocitopênica trombótica e pacientes com lupus que recebem anticoagulante, mostram no plasma micropartículas carregando PrPc em altas quantidades, derivadas de vasos e artérias rompidas (SIMAK et al. 2002).

Em quase todos os tipos celulares estudados a expressão de PrPc parece aumentar em inflamações e regeneração. Macrófagos tem expressão maior de PrPc em resposta a inflamações (ESIRI et al. 2002), enquanto que linfócitos T, quando

ativados superexpressam PrPc e em células T CD4+ e CD8+, PrPc é expresso em 50% e 90% das células, respectivamente (LI et al. 2001). Nos músculos a expressão de PrPc aumenta em miosites e miopatias inflamatórias (ZANUSSO et al. 2001). Células epiteliais da derme e da membrana mucosa de diferentes locais têm expressão de PrPc. No epitélio escamoso (membrana mucosa) PrPc é visto com uma pequena expressão nos queratinócitos da membrana basal, mas não nos queratinócitos suprabasais. Em contraste, a expressão é fortemente aumentada em dermatite de contato e psoríase, inclusive com expressão na camada supra basal (PAMMER et al. 1998). Em gastrite por *H. pylori*, as células epiteliais da mucosa mostram PrPc aumentado. Um contraste é observado em desordens inflamatórias do intestino grosso onde PrPc está diminuído, enquanto que se mantém igual ao normal em inflamações do intestino delgado (PAMMER e cols, 2000). No pulmão PrPc é expresso nas células claras (epiteliais não ciliadas), tendo um aumento de expressão em fibroses (KADOYA et al. 2001). PrPc é pouco expresso no fígado, inclusive no fígado fetal, mas sua expressão encontra-se aumentada, em pacientes com doenças crônicas do fígado, como hepatite crônica e hepatite alcoólica, correlacionando-se com inflamação ativa e fibrogenese (KITADA et al. 2000).

Na análise histológica, a proteína prion celular é encontrada principalmente na membrana da célula e em menor concentração no citoplasma. Nos neurônios aparece em altas concentrações nas sinapses nervosas, particularmente em domínios pré-sinápticos, sugerindo um papel importante na transmissão nervosa e excitabilidade neuronal (COLLINGE et al. 1994; COLLING et al. 1996; FOURNIER et al. 2000). Alguns autores verificaram uma localização nas membranas pré e pós sinápticas dos neurônios e células da glia da região cerebelar, sugerindo uma função mais abrangente nesta região (LAINE et al. 2001).

Em células polarizadas, como as células epiteliais, tem uma localização na membrana basolateral (SARNATARO et al. 2002), com algumas exceções já descritas, como em células de estômago onde se apresenta no citoplasma, em grânulos de secreção (FOURNIER et al. 1998).

Estudos em microscopia eletrônica mostram PrPc associado a organelas citoplasmáticas nas sinapses do sistema nervoso central e do sistema nervoso periférico que enervam os músculos, além de uma localização em grânulos

secretórios de células epiteliais, sugerindo um envolvimento da proteína nestes processos (FOURNIER 2000). Em diferentes tecidos foi observada sua localização na membrana plasmática, no complexo de Golgi, em endossomos recém formados e em endossomos maduros, em vesículas e grânulos perinucleares (MAGALHÃES et al. 2002) sugerindo uma função na formação da estrutura e/ou manutenção de tecidos, ainda a ser esclarecida (YAMAZAKI et al. 2003).

A presença de uma hélice anfipática próxima ao centro da molécula sugere, a exemplo de outras proteínas, uma região de interação proteína-proteína. Em queratinócitos e enterócitos esta interação é sugerida já que foi demonstrada sua localização nas junções entre as células (*gap junctions*) (MOREL et al. 2004).

Alguns autores também associam a sua expressão como sendo característica de células em divisão ou com alto *turnover* de membrana (FORD et al. 2002b). A microscopia mostra a aparência de coloração tipo pontual na membrana da célula o que denota que PrPc está associado em domínios da membrana. Estudos demonstraram que PrPc é endocitado da membrana e reciclado de volta para a superfície celular (SHYNG et al. 1993). O mecanismo dessa internalização poderia ser feito através de vesículas de clatrina (SHYNG et al. 1995) ou por cavéolas (VEY et al. 1996), pois PrPc pode ser encontrado em domínios lipídicos da membrana (*rafts*). Interessante notar que *rafts* concentram proteínas sinalizadoras, sugerindo uma função celular sinalizadora para a proteína (ROUCOU et al. 2004).

1.2.3 Funções de PrPc

Dada a conservação evolutiva de PrPc acredita-se que tenha uma função celular relevante. Como visto, os estudos da expressão e de sua localização subcelular deram muitos indícios da função normal da proteína: o aumento no desenvolvimento com a função na diferenciação celular, o aumento em processos inflamatórios com a participação da proteína em complexos anti inflamatórios, sua localização em sinapses com seu envolvimento em neurotransmissão, localização em *gap junctions* e adesão célula - célula, localização em *rafts* e sinalização.

A geração de animais nocautes tem contribuído para a explicação de várias das funções de PrPc. Diferentes linhagens foram geradas com diferentes construções para a deleção da proteína, a partir de camundongos geneticamente diferentes, onde

era feita a manipulação genética. A maioria desses animais não apresentava alterações de crescimento e desenvolvimento, nem alterações fenotípicas (ROESSLER et al. 1999).

Na verdade, com uma abordagem mais crítica, verificou-se algumas disfunções de sono e do ritmo circadiano (TOBLER et al. 1997), alterações bioquímicas e de sensibilidade a estresse oxidativo (BROWN et al. 2002), além de hiperexcitabilidade neuronal com desorganização das fibras musgosas do hipocampo semelhantes aquelas vistas na epilepsia do lobo temporal (COLLING et al. 1997) e uma maior sensibilidade a crise convulsivas induzidas farmacologicamente "*in vivo*" (WALZ et al. 1999).

Além disso, três destes transgênicos para PrPc (Prnp^{-/-} Nagasaki, Rmc0 e Prnp0/0 Zurick II), apresentaram degeneração cerebral e sintomas semelhantes aqueles vistos nas TSEs. Na elucidação desse fenômeno, foi descoberta uma proteína semelhante ao PrPc, a proteína Doppel (Dpl) (MOORE et al. 1999). Dpl é codificada pelo gene *Prnd* localizado 16 Kb a 5' de *Prnp*, possui 179 aminoácidos e tem a seqüência e a estrutura muito semelhantes a PrPc, incluindo a âncora de GPI e os sítios de glicosilação. Como a proteína prion celular, Dpl é mais expressa durante a embriogênese, mas em contraste com PrPc é minimamente expressa no sistema nervoso adulto. Na construção desses animais, após a deleção do gene de PrPc, o gene *Prnd* ficou sob controle do promotor de *Prnp*. Assim, a proteína Doppel se apresentou superexpressa no SNC. Esta superexpressão foi demonstrada como sendo tóxica para o cérebro e induzir apoptose neuronal. Muitos estudos vêm sendo feitos em torno da função normal desta proteína e na sua relação com as doenças priônicas humanas. Verificou-se que Dpl não está relacionada às TSEs, pois animais nocautes para Dpl são susceptíveis a infecção por PrPsc e a expressão da proteína não se apresenta alterada nos doentes. Na tentativa de explicar esses fatos, alguns autores sugerem que PrPc possa antagonizar a atividade de Dpl, sendo portanto, uma proteína antiapoptótica (HETZ et al. 2003).

Estudos de ligantes da proteína PrPc também contribuíram para esclarecer algumas das funções da proteína normal e as interações da molécula envolvidas com a internalização da proteína infecciosa. Diversos grupos de pesquisa mostraram a interação da proteína PrPc com uma série de moléculas *in vitro* (MARTINS et al.

2001). Entre elas estão proteínas associadas a membrana celular como GAG (*glicosaminoglicans*) e N-CAM (*neural cell adhesion molecules*); proteínas pró e anti apoptóticas como Bcl-2; chaperonas como HSP60 e BIP (*Binding immunoglobulin heavy chain protein*), embora não esteja clara a relevância celular da maioria dessas interações (LEE et al. 2003). Recentemente, WATARAI et al. (2003) mostraram a interação de HSP60 de *Brucella abortus* com PrPc de macrófagos, mediando a internalização da bactéria, sugerindo que vários desses ligantes podem estar em outros organismos e que PrPc poderia estar envolvido em processos de tráfego de patógenos, num processo similar ao que ocorre com a proteína infecciosa.

1.2.3.1 Cobre e Estresse Oxidativo

A região amino terminal da proteína PrPc, através dos resíduos de histidina contidos nas regiões repetidas de oito aminoácidos, liga-se a íons cobre. Diversas abordagens experimentais apontam para um envolvimento dessa ligação com proteção celular ao estresse oxidativo (BROWN et al. 1997; BROWN e SASSOON 2002).

Em resposta a cobre, PrPc é internalizado (PAULY e HARRIS 1998) acumulando-se na região perinuclear, no complexo de Golgi (LEE et al. 2001). Esta capacidade da proteína PrPc ligar íons Cu^{2+} tem gerado inúmeros trabalhos associando PrPc à homeostase deste metal. De fato, cobre é um metal essencial, que desempenha um papel fundamental tanto na bioquímica de organismos aeróbicos, como também é requisitado para a atividade catalítica de várias enzimas de interesse em neurobiologia. A quantidade de cobre presente em preparações de membrana celulares obtidas de cérebro de animais $\text{PrP}^{-/-}$ é menor que aquelas de animais do tipo selvagem (BROWN et al. 1997). Quando cobre é adicionado a neurônios $\text{PrP}^{+/+}$ em cultura estes expressam uma quantidade muito maior de PrPc (HIJAZI et al. 2003) e rápida endocitose da proteína (BROWN e MOHN 1999; LEE et al. 2001). Foi também demonstrado que PrPc presente nos astrócitos influencia a resistência neuronal à toxicidade de cobre no meio, ligando-se a ele e internalizando as partículas do metal, que serão estocadas associadas a metalotioneínas (BROWN 2004). Porém, o mecanismo exato pelo qual PrPc e Cu^{2+} estão funcionalmente relacionados ainda está sendo discutido.

Foi sugerido que PrPc poderia ser um sensor de estresse celular que iniciaria um processo de sinalização ativando os sistemas antioxidantes e as defesas celulares (RACHIDI et al. 2003). Observou-se que o início da expressão de PrPc ocorre durante um período da embriogenese (E-8 em murinos) onde há a transição do metabolismo anaeróbico para o aeróbico com aumento de produção de espécies reativas de oxigênio, potencialmente danosas para as células. Além disso, há um aumento da expressão de PrPc em cultura de células em resposta à exposição a radicais superóxido e peróxido de maneira dose dependente, sugerindo que PrPc faça parte do mecanismo antioxidante das células (MIELE et al. 2003).

BROWN et al. (1999; 2001) demonstraram a similaridade na atividade de PrPc e a enzima superóxido dismutase (SOD) em ensaios *in vitro* e *in vivo* de resistência celular ao estresse oxidativo. Camundongos que não expressam a proteína PrPc apresentam uma atividade diminuída de Cu/Zn SOD citosólica e glutathione redutase, com mais danos neurológicos causados pela toxicidade de espécies reativas de oxigênio, quando comparados a camundongos selvagens (WHITE et al. 1999; WONG et al. 2001; KLAMT et al. 2001). Análises bioquímicas mostraram que animais nocautes para PrPc apresentavam diminuição da expressão da enzima Cu/Zn SOD, diminuição de COX-IV e p53 e aumento de expressão de Bcl-2, Bax, ERK fosforilada, NF-Kappa B e Mn-SOD em comparação a animais selvagens (BROWN et al. 2002), sugerindo que PrPc participa de eventos que sinalizam para a proteção da célula da apoptose.

Por outro lado, alguns autores mostraram a associação funcional de PrPc e enzimas oxidantes. KESHET et al. (1999), verificaram que o cérebro de camundongos que não expressam a proteína PrPc tem uma expressão diminuída de NOS (óxido nítrico sintase) neuronal. Além disso, cérebros de camundongos infectados com PrPsc apresentam grandes quantidades de TNF-alfa e NOS induzida (i-NOS) (WILLIAMS et al. 1997).

1.2.3.2 Neuritogenese, Neuroplasticidade, Adesão e Migração celular

Nosso grupo demonstrou a interação de alta afinidade e especificidade entre PrPc e laminina, mediando a formação, extensão e manutenção de neuritos *in vitro* (GRANER et al. 2000a e b). Essa interação apresenta alta especificidade entre o

Foi demonstrado também pelo nosso grupo que a proteína PrPc se liga com alta afinidade ($K_d = 1,2 \times 10^{-8}$ M) a outra proteína de matriz, vitronectina, não ligando outros componentes, como colágeno tipo IV e fibronectina (HAJJ et al. - em preparação).

1.2.3.3 Neuroproteção

Nosso grupo caracterizou um ligante de PrPc (MARTINS et al. 1997), baseado na teoria da hidropaticidade complementar, que foi identificado como a proteína STI1 (Stress inducible protein 1), uma proteína de 66 KDa (ZANATA et al. 2002). Vários experimentos confirmaram a ligação específica e de alta afinidade de STI-1 com a proteína prion celular. A interação é feita através de uma região altamente conservada no domínio hidrofóbico de PrPc, entre os aminoácidos 113-128 e os aminoácidos 230-245 de STI-1 de camundongo. Esta interação ocorre na superfície celular induzindo sinais de neuroproteção contra apoptose (CHIARINI et al. 2002; ZANATA et al. 2002). A caracterização dessa interação revelou que a ligação de STI1 à PrPc desencadeia sinais via cAMP/PKA que induzem neuroproteção a apoptose induzida por anisomicina, em células da retina em desenvolvimento. Este fenômeno não ocorre em retina de animais que não expressam PrPc e é revertido pelo bloqueio de PrPc com anticorpos antagonistas.

A proteína STI-1 foi pouco estudada até o momento, mas sabe-se que ela interage com actina e está associada a formação de pseudopódios em células M27, originárias de carcinoma de pulmão de camundongo (BLATCH et al. 1995; LASSLE et al. 1997). Em humanos é encontrada em bancos de dados como HOP (*heat shock protein 70/90 - organizing protein*) (BLATCH et al. 1997) e STIP1 (*Stress inducible protein phosphorilated 1*). Foi inicialmente descrita por estar aumentada em células transformadas por vírus SV-40 podendo, portanto, estar envolvida no descontrole da proliferação celular (HONORÉ et al. 1992). STI-1 é uma chaperonina que atua como um cofator no complexo HSP70/HSP90 (SMITH et al. 1993), modulando a atividade dessas duas chaperonas (JOHNSON et al. 1998). Curiosamente, as HSPs (*heat shock proteins*) são ativadas por diversos tipos de estresses, protegendo a célula e acelerando a recuperação do dano, onde HSP70 e HSP90 foram descritas com

atividade anti apoptótica, regulando a atividade e a expressão de moléculas sinalizadoras de apoptose (BEERE e GREEN 2001).

Outros autores descreveram o papel anti apoptótico de PrPc. Recentemente vários trabalhos ligam PrPc a neuroproteção, associando a ausência da proteína normal com a maciça perda neuronal verificada nas doenças priônicas (SOLFORSI et al. 2004; MALLUCCI et al. 2003).

Foi verificado que PrPc protege neurônios em cultura da apoptose mediada por Bax (BOUNHAR et al. 2001). Foi descrito também um aumento de enzimas relacionadas a apoptose como p53, Bax, caspase-3 e citocromo c em cultura de células de animais nocautes para PrPc submetidas a privação de soro e indução de apoptose. Nestas mesmas culturas houve um aumento das concentrações de cálcio na mitocôndria com diminuição do potencial de membrana (KIM et al. 2004).

Em experimentos com cultura de células verificou-se que PrPc pode ser pró apoptótico quando superexpresso devido a uma ativação de caspase 3 e p53 (PAITEL et al. 2001 e 2003). Alguns autores sugerem que um grande aumento da expressão de PrPc na célula poderia ser tóxica devido ao acúmulo citosólico da proteína, o que explicaria o fato de seu mRNA sofrer regulação pós transcricional ou a alta degradação da proteína intracelular (DIMCHEFF et al. 2003).

Como outras proteínas envolvidas em sinalização para eventos de apoptose, PrPc pode ser pró ou anti apoptótico dependendo de sua interação com um ou outro ligante, das substâncias presentes no meio e na célula.

Desta forma o complexo formado entre STI1 e PrPc e desta última com laminina pode ter um papel importante, mediando o controle da apoptose, em resposta especialmente a estímulos oxidantes (VASSALLO e HERMS 2003), além de modular a interação da célula com a matriz extracelular e processos de diferenciação celular.

Dada a sua distribuição em vários tecidos, alterações de expressão vista em processos inflamatórios, sua interação com várias proteínas, além dos fenótipos encontrados em animais que não expressam PrPc, resolvemos investigar qual a participação de PrPc em algumas patologias não priônicas, principalmente aquelas que envolvem alterações em processos celulares de resposta a estresse oxidativo, interações com a matriz extracelular, apoptose e diferenciação celular.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

- Estudar a participação da proteína PrPc em epilepsias humanas

- Estudar a participação de proteína PrPc no câncer

3 PRIMEIRA PARTE - A Proteína Prion Celular na Epilepsia

3.1 INTRODUÇÃO

3.1.1 Epilepsias

O córtex cerebral e o hipocampo são particularmente propensos a geração de grandes descargas sincronizadas que são a base de muitos tipos de crises e resultam da fisiologia intrínseca de alguns de seus neurônios, de sua rede neural e de suas características de neuroplasticidade. Essas alterações são responsáveis por uma diversidade de desordens com mais de 40 tipos reconhecidos, justificando o emprego da terminologia “as epilepsias”. As epilepsias são caracterizadas por eventos recorrentes resultantes de hiperexcitabilidade e hipersincronia anormais de neurônios de estruturas neocorticais e límbicas (ENGEL 1996).

Epilepsias são doenças crônicas e representam um sério problema de saúde com uma prevalência de 5 a 10 casos por 1000 habitantes em países desenvolvidos, números que podem ser maiores em países em desenvolvimento, afetando pessoas de todas as idades e raças (HAUSER 1998).

Postula-se que o processo de epileptogênese seja decorrente de modificações herdadas ou adquiridas na fisiologia intrínseca dos neurônios e da rede neural da qual fazem parte (WALZ et al. 2002).

Muitas patologias adquiridas são fatores de risco para epilepsia, incluindo traumatismos, infecções, tumores cerebrais e crises epiléticas prolongadas na infância (ENGEL 1996). Acredita-se que após a injúria ocorram mecanismos adaptativos envolvendo neuroplasticidade, que em última análise podem contribuir para o processo de epileptogênese. Embora alterações genéticas tenham sido descritas em formas familiares de epilepsia (STEINLEIN 2001), estas são causadas por uma interação de fatores genéticos e ambientais (BERKOVIC e JACKSON 2000).

Vinte por cento das epilepsias são refratárias a tratamento farmacológico e a epilepsia mesial do lobo temporal, particularmente a esclerose hipocampal (EH) corresponde em média a 70% do volume de casos tratados cirurgicamente nos

centros de cirurgia de epilepsia. A literatura sobre os fatores prognósticos para o resultado cirúrgico é contraditória justificando o empenho nesta linha de investigação médica (MCINTOSH et al. 2001).

Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da esclerose hipocampal ainda não foram totalmente elucidados, embora crises convulsivas febris prolongadas, hipóxia perinatal e alterações em alguns genes tenham algum papel no desenvolvimento da doença (SCHEFFER e BERKOVIC 2003). Foi sugerido o envolvimento de um polimorfismo no gene da interleucina-1a (KANEMOTO et al. 2000), sem confirmação por outros autores (BUONO et al. 2001). Também foram descritos como associadas a epilepsia mesial do lobo temporal, variantes alélicas no gene que codifica o receptor 1 de GABA-B (GAMBARDELLA et al. 2003) e polimorfismos no promotor do gene que codifica a proteína prodonorfina (STOGMANN et al. 2002).

Outros tipos de epilepsias freqüentemente tratáveis cirurgicamente são as relacionadas às anormalidades do desenvolvimento cortical (ADC). As ADC são descritas como uma série de desordens na arquitetura do córtex cerebral (CHEVASSUS-AU-LOUIS et al. 1999). O desenvolvimento cortical é um processo complexo envolvendo a proliferação celular, migração neuronal e organização cortical tardia. Embora tenham sido descritas algumas formas hereditárias de ADC, ainda não foi totalmente esclarecida qual a contribuição genética e quais genes estariam envolvidos na patogênese destas anormalidades (CRINO et al. 2002)

3.1.2 Epilepsia - Sincronia e Excitabilidade

Excitabilidade e sincronia são propriedades dos neurônios e da rede neural envolvidos nos processos fisiológicos e patológicos do sistema nervoso central. Descargas epiléticas são caracterizadas por uma excitabilidade excessiva e hiper sincrônica da população neuronal (SCHWARTKROIN e MCINTYRE 1997). Excitabilidade é definida como uma propriedade pela qual os neurônios podem ser despolarizados quando adequadamente estimulados. A resposta de um neurônio a um determinado estímulo depende de sua fisiologia intrínseca, da interação com a rede neural a qual pertence, isto é neurotransmissores e conexões sinápticas, além das características do estímulo a que foi submetido. A excitabilidade de um único

neurônio é relacionada exclusivamente a sua fisiologia intrínseca e pode ser independente da sua relação com os outros neurônios (CONNORS 1997). Esta fisiologia intrínseca depende de características da membrana neuronal e do meio intracelular, que envolve os canais iônicos, as bombas de sódio e potássio, quinases, fosfatases e o suporte energético requerido para estas reações.

Os neurônios também interagem com as células da glia no processo de neurotransmissão. Foi demonstrado que astrócitos do foco epiléptico de hipocampo humano apresentam potencial de repouso significativamente aumentado, quando comparado a controles. Verificaram também em cultura de astrócitos obtidos de tecido humano epiléptico, que a densidade de canais de sódio era 66 vezes maior quando comparado aos tecidos normais (O'CONNOR et al. 1998).

A anormalidade do eletroencefalograma mais comum de pacientes com epilepsias focais, é o aparecimento de pontas e ondas agudas surgidas na atividade de base do tecido cerebral. As pontas interictais identificam a zona irritadiça, que é a área cortical que freqüentemente está próxima do foco primário de onde originam-se as crises (ROSENOW e LUDERS 2001). Estas pontas são breves períodos de excitação sináptica seguidas por inibição (hiperpolarização) de células piramidais, que são derivadas do desequilíbrio entre influências excitatórias e inibitórias e de interconexões inadequadas da rede neuronal (MCCORMICK e CONTRERAS 2001). Estas pontas ocorrem quando uma população neuronal é despolarizada sincronicamente e isto requer uma interação harmônica entre mecanismos inibitórios e um próximo estímulo excitatório, que irão estimular toda essa população neuronal em conjunto, quando estiver fora do período refratário. Uma ativação repetida de alta freqüência de interneurônios inibitórios acarreta na liberação de uma grande quantidade de GABA (aminoácido gama aminobutírico) na fenda sináptica, que interage com os receptores GABA-B pré-sinápticos, promovendo uma diminuição na inibição pós sináptica. Da mesma forma que contribuem para a sincronização, os neurônios inibitórios GABAérgicos contribuem para o término destes eventos epileptiformes, juntamente com a hidrólise de ATP na fenda sináptica, com produção de adenosina e a depleção dos terminais excitatórios pré sinápticos (BONAN et al. 2000).

A interconexão entre os neurônios excitatórios piramidais e interneurônios inibitórios do hipocampo e neocórtex, torna estas estruturas propensas ao recrutamento rápido de neurônios durante as descargas epileptiformes (SCHWARTKROIN e MCINTYRE 1997). Nas camadas II-IV do neocórtex e CA1 do hipocampo, a maioria dos neurônios piramidais geram um único potencial de ação para cada estimulação limiar (LLINAS 1988; SANABRIA et al. 2001). Na camada V do neocórtex e CA3 do hipocampo, alguns neurônios respondem a um estímulo limiar simples com grupos de potenciais de ação de alta frequência (SCHWARTKROIN e MCINTYRE 1997). Estas células têm um papel importante na atividade epileptiforme hipocampal e neocortical, tanto nas geradas por insultos cerebrais (PRINCE et al. 1997) como nas induzidas farmacologicamente (MCCORMICK e CONTRERAS 2001).

Os modelos de pilocarpina (CAVALHEIRO et al. 1991) e ácido caínico (BEN-ARI et al. 1979) são extremamente úteis para investigar o desenvolvimento, a neuroplasticidade e os achados neuropatológicos relacionados a epilepsia mesial do lobo temporal. Estes agentes induzem a um estado de mal epiléptico (crises re-entrantes) acarretando excitotoxicidade glutamatérgica, dano neuronal por estresse oxidativo e apoptose (DAL-PIZZOL et al. 2000). Após o estado de mal epiléptico há uma seletiva perda neuronal, gliose e uma reorganização sináptica, conhecida como brotamento sináptico, principalmente no hipocampo, nas fibras musgosas. A serina protease extracelular ativador de plasminogênio tecidual (tPA) é induzida no cérebro pelos eventos atividade-dependentes incluindo atividades epiléticas, excitação hipocampal e potencial de ação de longa duração (BARANES et al. 1998). Interessantemente, a excitotoxicidade do ácido caínico envolve a indução de tPA, que por sua vez ativa plasmina no cérebro levando a degradação de laminina e morte neuronal (CHEN E STRICKLAND 1997), sugerindo que o rompimento das interações dos neurônios com a laminina tenha um papel importante nas mudanças estruturais que acompanham a plasticidade atividade-dependente no hipocampo. Considerando que a laminina é um ligante de alta afinidade de PrPc supõe-se que parte dos danos excitotóxicos decorrentes da degradação da laminina possa estar relacionados também com a perda de interação desta molécula e PrPc.

3.1.3 Epilepsia e PrPc

A proteína prion celular é uma proteína de membrana fortemente expressa em neurônios. É capaz de ligar-se a íons cobre e esta ligação mostra uma atividade semelhante a superóxido dismutase (SOD) (BROWN et al. 1999). Experimentos em cultura de células indicam que PrPc afeta a sobrevivência neuronal em condições de estresse e neurônios que não expressam PrPc ($Prnp^{-/-}$) são mais sensíveis a estresse oxidativo "in vitro" que os neurônios selvagens ($PrPc^{+/+}$) (BROWN et al. 1997). Foi também demonstrado uma diminuição de Cu/Zn SOD e catalase nas estruturas cerebrais límbica e cortical no camundongo $Prnp^{-/-}$ e estas regiões também apresentavam um aumento de lipoperoxidação, oxidação proteica e modulação da enzima ornitina decarboxilase (KLAMT et al. 2001). Linhagens celulares derivadas de camundongos $Prnp^{-/-}$ são mais sensíveis a apoptose, quando privadas de soro (KUWAHARA et al. 1999), enquanto a expressão aumentada de PrPc protege as células contra a apoptose induzida por altas concentrações da proteína pró apoptótica Bax (BOUNHAR et al. 2001).

PrPc liga-se à proteína de matriz laminina (GRANER et al. 2000a, b), provocando tanto a extensão como a manutenção de neuritos "in vitro", além de afetar a adesão celular (GRANER et al. 2000 a, b). Uma segunda ligação importante ocorre entre PrPc e STI-1 (ZANATA et al. 2002) desencadeando a sinalização que previne a morte celular, via apoptose, de células de retina pós mitóticas não diferenciadas (CHIARINI et al. 2002).

Sendo assim, em combinação com a perda de atividade antioxidante, a falta de PrPc deve privar o tecido nervoso de sinais neuroprotetores, diminuindo o limiar para a apoptose (CLARKE et al. 2000). A complexa interação entre PrPc, laminina e STI-1 deve, portanto, conectar os sinais extracelulares e intracelulares importantes para a adesão, neuritogênese e em sinais de sobrevivência celular (MARTINS et al. 2002).

Apesar disso, animais que não expressam a proteína ($Prnp^{-/-}$) desenvolvem-se normalmente (BUELER et al. 1992). Na verdade, não foram encontradas alterações que afetassem seu desenvolvimento, provavelmente por que o animal adquire, ainda na embriogênese, mecanismos compensatórios.

Alem dos dados relacionados ao estresse oxidativo, outras alterações foram identificadas em animais que não expressam PrPc. Alguns autores demonstraram alterações nas propriedades celulares intrínsecas das células piramidais do hipocampo dos animais $Prnp^{-/-}$, por alteração das correntes de potássio ativadas por cálcio (COLLING et al. 1996). Também foram relatadas nestes animais, a inibição anormal de receptores GABA-A no hipocampo, que poderiam contribuir para um estado de hiperexcitabilidade (COLLINGE et al. 1994), dados estes que foram rebatidos por outros autores (LLEDO et al. 1996). Astrócitos que não expressam PrPc têm habilidade reduzida de retirada de glutamato através do mecanismo dependente de sódio, alterando a regulação da excitação sináptica dos neurônios no SNC (BROWN e MOHN 1999). No exame histopatológico do cérebro desses animais verificou-se mudanças na reorganização das fibras musgosas do hipocampo semelhantes às observadas na epilepsia do lobo temporal relacionadas a esclerose hipocampal (COLLING et al. 1997). Foram também encontradas mudanças nas ectonucleotidases sinaptossomais nas regiões do hipocampo e neocórtex, resultando em baixo grau de hidrólise de ADP, o que levaria a baixos níveis do anticonvulsivante endógeno adenosina, na fenda sináptica (PEREIRA et al. 2001).

Porém, a correlação de PrPc com modulação do limiar para convulsões e/ou epileptogênese vem da demonstração de que os animais $Prnp^{-/-}$ apresentam uma sensibilidade aumentada a crises epiléticas induzidas farmacologicamente (WALZ et al. 1999). Após uma única injeção de PTZ (pentilenotetrazol), 91% destes animais morriam por epilepsia contra 33% dos selvagens; injeção de pilocarpina causava 86,7% de mortes no camundongo $Prnp^{-/-}$ contra 40% no animal $PrPc^{+/+}$ e depois da injeção de ácido cáinico, 70% desenvolviam pelo menos uma crise severa (50% mostravam crises epiléticas repetidas), enquanto nenhum animal selvagem ($PrPc^{+/+}$) exibia crises observáveis com a mesma dose da droga. Foi observado nestes animais $Prnp^{-/-}$ uma alta propensão a progressão da excitação neuronal quimicamente induzida, sugerindo um papel de PrPc não somente na regulação do limiar das crises, mas também no processo epileptogênico resultante de repetitivas crises (WALZ et al. 1999).

Esta resposta hiperexcitável a agentes convulsivantes indicam que neurônios de animais nocautes para PrPc apresentam uma hiperexcitabilidade que pode estar

relacionada às outras alterações descritas nestes animais. Estes dados foram reforçados recentemente, com a geração de uma linhagem de camundongos nos quais o gene *Prnp* é bloqueado após o nascimento. Num estudo usando estes animais nocautes condicionais para PrPc, foi mostrada uma significativa redução do potencial de hiperpolarização nas células da região CA1 do hipocampo, indicando que a perda da função de PrPc, mesmo na fase adulta, induz um estado de hiperexcitabilidade neuronal (MALLUCCI et al. 2002).

Portanto, os dados experimentais em animais que não expressam a proteína PrPc sugerem que a perda da função desta proteína ou os mecanismos compensatórios ligados a este fato, podem estar relacionados à epileptogênese e a modulação do limiar convulsivo. Esta hipótese nos levou a investigar a presença de modificações na seqüência de *Prnp* em pacientes portadores de epilepsias.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Pesquisar as variantes alélicas presentes no gene *Prnp* em pacientes epiléticos refratários a tratamento clínico, com epilepsia de lobo temporal mesial associada a esclerose hipocampal (ELTM-EH) e epilepsias focais associadas a anormalidades do desenvolvimento cortical (ADC).

- Determinar a associação entre alelos variantes do gene *Prnp* e as variáveis clínicas, demográficas e a resposta ao tratamento cirúrgico dos pacientes.

3.3 ARTIGOS PUBLICADOS

- 3.3.1** Walz R, Castro RM, Velasco TR, Alexandre V Jr, Lopes MH, Leite JP, Santos AC, Assirati JA Jr, Wichert-Ana L, Terra-Bustamante VC, Bianchin MM, Maciag PC, Ribeiro KB, Guarnieri R, Araujo D, Cabalero O, Moura R, Salim AC, Kindlmann K, Landemberger MC, Marques W Jr, Fernandes RM, Serafini LN, Machado HR, Carlotti CG Jr, Brentani RR, Sakamoto AC, Martins VR. Surgical outcome in mesial temporal sclerosis correlates with prion protein gene variant. **Neurology**. 2003;61(9):1204-10. - **ANEXO 1**
- 3.3.2** Walz R, Castro RM, Landemberger MC, Velasco TR, Terra-Bustamante VC, Bianchin MM, Wichert-Ana L, Serafini LN, Leite JP, Araujo D, Alexandre V Jr, Bastos AC, Assirati JA Jr, Santos AC, Machado HR, Carlotti CG Jr, Brentani RR, Martins VR, Sakamoto AC. Malformations of cortical development are associated with a rare polymorphism of cellular prion protein gene. **Neurology** 2004; 63(3): 557-560. - **ANEXO 2**
- 3.3.3** Castro RM, Landemberger MC, Walz R, Carlotti CG Jr , Huang N, Cunha DR, Moura R, Caballero OL, Sakamoto AC, Nitrini R, Brentani RR, Martins VR. High capacity and low cost detection of prion protein gene variant alleles by denaturing HPLC. **J Neurosci Methods** 2004, 139(2):263-269. Disponibilizado *on line* em 22/06/2004 <http://www.sciencedirect.com/science/doi:10.1016/j.jneumeth.2004.05.001> - **ANEXO 3**

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram encontrados nos 100 casos de ELTM- EH e 68 casos de ADC estudados, as mesmas freqüências dos polimorfismos no códon 117 silencioso (A/A) e de deleção de um octapeptídeo repetitivo no gene *Prnp*, quando comparados aos 180 controles analisados ($p = 0,08$ e $p = 0,89$ em pacientes com ELTM- EH; $p = 0,50$ e $p = 1,0$ em pacientes com ADC).

Um terceiro polimorfismo no códon 129 do gene *Prnp*, freqüente na população e associado à susceptibilidade genética em doenças priônicas, mostrou a mesma freqüência das variantes comparando-se os pacientes e o grupo controle (variante M/V $p=0,57$ e variante V/V $p= 0,06$; em pacientes com ELTM- EH; variante M/V $p= 0,22$ e variante V/V $p= 0,01$; em pacientes com ADC).

Verificamos porém, a presença de uma variante alélica no códon 171 (N/S) do gene *Prnp*, em uma freqüência de 23% nos pacientes com EH ($p<0,001$) e de 13,2% nos pacientes com MDC ($p<0,001$), que não foi encontrada no grupo controle. Esta variante alélica foi primeiramente descrita numa família com uma forma de esquizofrenia atípica (SAMAIA et al. 1997) e é citada na literatura com uma freqüência de 5 a 8% em populações africanas e descendentes, encontradas na Jamaica e Camarões (MEAD et al. 2003). Já que nossos pacientes eram 80% de brancos, nossos achados não podem ser classificados como um viés introduzido pela etnia da amostra. Não foram encontrados pacientes homozigotos para essa variante.

Não foi encontrada nenhuma diferença estatisticamente significativa quanto as variantes alélicas encontradas no gene *Prnp* e os dados clínicos, demográficos e avaliação pré cirúrgica dos pacientes portadores de ELTM- EH.

As variantes alélicas no códon 117, 129 e de deleção em um octapeptídeo do gene *Prnp* não mostraram correlação com a resposta cirúrgica dos pacientes com ELTM- EH. Entretanto, após a cirurgia, pacientes que possuíam um dos alelos codificando serina no códon 171 de *Prnp*, possuíam 5 vezes maior risco de permanecer com crises convulsivas do que aqueles que não carregavam este alelo. Após 18 meses de seguimento pós cirúrgico, 91,8% dos pacientes portando o alelo normal estavam livres de doença, enquanto somente 68,2% dos portadores da variante 171 N/S permaneciam com esta resposta.

É importante salientar que a variante alélica no códon 171 N/S do gene *Prnp* não foi encontrada em todos pacientes com EH e MDC. Na ELTM-EH alguns pacientes que apresentavam esta variante ficaram completamente livres de crises convulsivas após a cirurgia. Isto sugere que o PrPc contribui apenas parcialmente no desenvolvimento e na resposta cirúrgica, possivelmente facilitando o desenvolvimento da condição epiléptica.

Concluindo, nossos dados mostram a molécula de PrPc como um fator de susceptibilidade e predisposição para a epilepsia. Mudanças na proteína não causam epilepsia mas induzem um estado pró epileptogênico que, em associação com outros fatores inatos ou adquiridos, predisporiam ao desenvolvimento destes tipos de epilepsia. Além disso, mostramos que o códon polimórfico 171 N/S influencia na resposta cirúrgica das escleroses hipocampais, o que pode tornar a análise de *Prnp* um método de identificação de grupos de risco, tanto para o desenvolvimento da doença como também para a pior resposta ao tratamento cirúrgico da epilepsia mesial do lobo temporal associada a esclerose hipocampal.

Para a pesquisa de mutações e polimorfismos realizadas neste trabalho, padronizamos a detecção de variantes alélicas no gene *Prnp* por cromatografia líquida denaturante (DHPLC) (CASTRO et al. 2004). As técnicas convencionais de pesquisa de mutações e polimorfismos no gene *Prnp* são muito caras e demoradas para uma avaliação em larga escala de populações. Esta ferramenta mostrou-se bastante útil, pois é bastante rápida e prática para a análise tanto de grandes quantidades como de poucas amostras, necessitando apenas de uma amplificação prévia do DNA por PCR e os resultados são simples de ser interpretados. Além disso, ficou demonstrado tratar-se de um método bastante sensível, confirmando em 100% os polimorfismos achados no seqüenciamento e na digestão por endonucleases. Com o uso de dois pares de primers conseguimos distinguir todas as variantes descritas neste trabalho, além de pontos de mutação nos códons 102, 183 e 210, ligado a GSS e a duas formas de CJD, respectivamente.

A necessidade de técnicas precisas e rápidas para a detecção de variantes alélicas no gene *Prnp* tem sido enfatizada na literatura tanto pelas novas classificações de doenças priônicas esporádicas e transmitidas (nvCJD) com base no códon polimórfico 129, como na classificação correta das doenças hereditárias

3.5 Conclusões

- ✓ A variante alélica no códon 171 (N/S) do gene *Prnp* está associada as epilepsias refratárias a medicamentos relacionada a esclerose hipocampal e a malformação do desenvolvimento cortical.

- ✓ A variante alélica no códon 171 (N/S) do gene *Prnp* está associada a uma pior resposta cirúrgica em pacientes com ELTM- EH refratária ao tratamento farmacológico.

- ✓ Alterações genéticas na proteína prion celular podem ser um fator de risco para a epileptogênese relacionada a esclerose hipocampal e a malformação do desenvolvimento cortical.

- ✓ A determinação da seqüência de *Prnp* pode vir a melhorar o diagnóstico e a identificação dos grupos de pior resposta cirúrgica em epilepsia do lobo temporal mesial ligada a esclerose hipocampal.

- ✓ A detecção de mutações e polimorfismos no gene *Prnp* pela técnica de DHPLC (denaturation high performance liquid chromatography), padronizada neste trabalho, mostrou-se bastante rápida, sensível e eficaz, podendo ser utilizada como pré seleção em pacientes com doenças priônicas e não priônicas envolvidas com as variantes alélicas de *Prnp*.

3.6 Perspectivas do estudo

A pesquisa da expressão da proteína prion celular em tecido cerebral extraído de pacientes com ELTM-EH e ADC está sendo desenvolvida no Departamento de Anatomia e Cirurgia do Hospital das Clínicas - USP Ribeirão Preto. A expressão do PrPc também está sendo investigada em modelos experimentais de esclerose hipocampal, anormalidades do desenvolvimento cortical, traumatismo crânio-encefálico e meningite.

Considerando achados recentes em que se encontrou uma associação entre a performance cognitiva em pacientes com síndrome de Down, mal de Alzheimer e em pacientes idosos e o polimorfismo do codon 129 (BERR et al. 1998; RUJESCU et al. 2003; CROES et al. 2003; DERMAUT et al. 2003; DEL BO et al. 2003), estamos investigando se existe associação entre o desempenho cognitivo dos pacientes portadores de ELTM-EH e alelos variantes do *Prnp*.

Também está sendo investigada a prevalência dos alelos variantes em outras formas de epilepsias focais associadas ou não a lesão estrutural do cérebro bem como em síndromes epilépticas do tipo generalizadas primárias e crises convulsivas febris.

As alterações celulares e moleculares envolvidas com a presença de serina no códon 171 de PrPc já começaram a ser investigadas (KINDELMANN 2003). Estes estudos são bastante relevantes para se estabelecer o mecanismo no qual este polimorfismo atua na epileptogênese. Animais transgênicos com a proteína alterada estão sendo produzidos para uma melhor avaliação do papel desta variante alélica na epileptogênese.

4 SEGUNDA PARTE - A Proteína Prion Celular no Câncer

4.1 INTRODUÇÃO

4.1.1 Tumorigenese - Aspectos moleculares e celulares

O câncer é uma doença causada por alterações genéticas e epigenéticas variadas. Mutações em alguns genes transmitidas hereditariamente causam algumas síndromes de câncer familiar. Além disso, familiares de pacientes tem um elevado risco de desenvolver o mesmo tipo de câncer, pois uma predisposição genética contribui para o desenvolvimento de uma grande proporção de tumores esporádicos. Também, a exposição aos mesmos agentes carcinogênicos mostra uma diferença individual de susceptibilidade para o desenvolvimento do câncer. Vários estudos demonstraram que esta predisposição genética do câncer em humanos é um fenômeno poligênico, isto é, envolve muitos genes com pequenos efeitos. Conseqüentemente, o impacto coletivo destes genes de baixa penetrância no câncer esporádico pode ser maior que o efeito de genes fortes que causam as síndromes familiares, mais raras (DEMANT 2003).

Alguns polimorfismos genéticos e características genotípicas de raça podem ser importantes para modificar a evolução e o comportamento de um clone celular em transformação, ou mesmo predispor o indivíduo a uma instabilidade genômica maior (SCHNEIDER e KUSLESZ-MARTIN 2004).

Os mecanismos que envolvem esta predisposição genética ao câncer nem sempre são fáceis de serem demonstrados. Um exemplo clássico é dado pelas enzimas que ativam e que degradam um determinado carcinógeno e que podem apresentar alterações e variações de expressão de indivíduo para indivíduo, resultando assim em diferentes sensibilidades ao mesmo fator oncogênico (KIYOHARA et al. 2004). Assim, é sabido que a proteína p53 contém vários sítios polimórficos e alguns deles afetam a susceptibilidade da degradação desta proteína pela E6 do vírus HPV (*human papilloma virus*), afetando a predisposição ao câncer de indivíduos infectados (DE ARAUJO SOUZA e VILLA 2003; JEE et al. 2004). Polimorfismos em genes que codificam enzimas reguladoras de níveis hormonais,

alteram o risco de desenvolvimento de câncer de mama em mulheres na pós menopausa (EISINGER et al. 2004). Da mesma maneira temos diferentes respostas ao tratamento por diferenças individuais no metabolismo das drogas e entender esses mecanismos e os genes envolvidos nos levará a terapias mais eficazes e individualizadas (KOHN et al. 2004).

Várias alterações em genes e promotores de genes já foram e continuam sendo descritos em uma variedade de cânceres. Eventos epigenéticos, que podem resultar na alteração de expressão de uma proteína, por um transcrito instável, ou por uma clivagem inadequada resultando em uma proteína que competirá com a proteína original, ou ainda por metilação na região promotora, silenciando a expressão da proteína, têm papel importante nas alterações das funções normais da célula e na progressão tumoral (TAYLOR et al. 2001).

Tanto mutações e polimorfismos em genes específicos, como eventos epigenéticos com alterações na expressão de proteínas se tornaram marcadores para um diagnóstico precoce não invasivo. Como múltiplas variáveis são importantes na progressão neoplásica combinado com o grande nível de complexidade da doença, vários destes marcadores ainda são desconhecidos. Devemos levar em conta que o mesmo fator que sinaliza um evento, pode ter diferentes efeitos em diferentes tipos celulares ou até na mesma célula sob condições diferentes (GREEN e EVAN 2002).

A necessidade da aquisição simultânea de condições que levem a expansão do clone celular alterado, envolve o descontrole da proliferação celular e a supressão de apoptose. E isto deve estar acompanhado de um contexto correto através de colaboração de células vizinhas e do meio extracelular. Uma célula prolifera ou diferencia dependendo da sinalização que recebe indicando um destes eventos. Da mesma maneira a apoptose só ocorrerá se a sinalização neste sentido for a correta e os genes e proteínas atuantes nestes processos estiverem íntegros. Sinais que promovem apoptose numa célula podem aumentar a expressão de um ligante ou de um receptor na superfície celular e cada tipo de célula tumoral adota uma estratégia anti-apoptótica mais indicada para os eventos que estão ocorrendo e ativados naquela célula específica. Em adição, a morte rápida de muitos tipos celulares quando ocorre desligamento da matriz extracelular indica que sinais anti-apoptóticos vêm do

contato da célula com a matriz e célula - célula, refletindo a necessidade do tecido em se manter íntegro (HANAHAAN e WEINBERG 2000).

Há, portanto, a necessidade de estudos que enfoquem todas estas alterações para um melhor entendimento da biologia da célula normal e do tumor, para que se consiga uma intervenção diagnóstica e terapêutica efetiva.

A tecnologia de *cDNA microarray* tem analisado diferenças de expressão entre tecidos normais e tumorais mostrando alterações de expressão em uma variedade de proteínas, validadas por técnicas como a imunohistoquímica utilizando *tissue microarray*, onde se verifica a presença da proteína em centenas de tumores em uma única lâmina (RUSSO et al. 2003). Os genes candidatos para esta pesquisa incluem aqueles envolvidos com proliferação celular, diferenciação, apoptose, adesão e migração, além de outros com envolvimento menos óbvio.

4.1.2 Gliomas

Nos vertebrados, o tubo neural embrionário ou neuroectoderme dá origem as principais células do sistema nervoso. Neste, após formado, neurônios ficam em fase pós mitótica e somente uma pequena porção continua indiferenciada, enquanto que as células da glia continuam com a habilidade de proliferação por toda a vida. Neste contexto não é de se estranhar que os tumores gliais ou gliomas são os que mais ocorrem em adultos. Os gliomas incluem os astrocitomas, composto predominantemente de células com características de astrócitos; oligodendrogliomas, de oligodendrócitos; de misturas de várias células gliais como os oligoastrocitomas; e os ependimomas, de células ependimárias. Dentre todos os gliomas, os astrocitomas são os mais prevalentes e constituem mais de 60% de todos os tumores cerebrais (ZHU E PARADA 2002).

Em estatísticas recentes, os gliomas aparecem com menos de 1,5% dos novos casos de câncer notificados a cada ano, entretanto estão entre os mais devastadores. Apesar dos vários avanços terapêuticos das últimas décadas, o prognóstico dos pacientes com tumores cerebrais permanece ruim. São a quarta causa de morte relacionada a câncer nos Estados Unidos, por serem de difícil ressecção cirúrgica total e freqüentemente refratários à quimioterapia e radioterapia (LU et al. 2001).

Embora existam vários tipos de classificação, a mais usada é a proposta pela Organização Mundial da Saúde (KLEIHUES e CAVENEE 2000), que os separa em graus I, II, III e IV baseado na malignidade determinada por critérios clínicos e histopatológicos.

Dentre os astrocitomas, o grau I é reservado ao astrocitoma pilocítico, que apresenta um prognóstico mais favorável, tem um comportamento de tumor localizado, não infiltrativo, tem crescimento lento e que raramente evolui para um grau mais elevado (KLEIHUES et al. 2000b). Glioblastomas são os astrocitomas grau IV, os mais agressivos, altamente invasivos e podem ser subdivididos em dois tipos, os primários ou "de novo", onde não há relato de tumores de baixo grau pré existentes e os secundários, que derivam do desenvolvimento progressivo de tumores graus II e III. Diferentes mutações em vários genes parecem indicar o início e a progressão dos gliomas e já foram descritas a inativação de conhecidos genes supressores de tumor como *TP53* (que codifica a proteína p53), *CDKN2A* (*cyclin dependent kinase nuclear 2A*, que codifica a proteína p16), *CDKN2B* (*cyclin dependent kinase nuclear 2B*, que codifica a proteína p15), *RB* (gene do retinoblastoma) e *PTEN* (*phosphatase and tensin homolog*), além da ativação de oncogenes como *EGFR* (*epidermal growth factor receptor*), *CDK4* (*cyclin dependent kinase 4*), *CDK6* (*cyclin dependent kinase 6*), *MDM2* (p53 binding protein) e *CDKN1A* (*cyclin dependent kinase nuclear 1A*, que codifica a proteína p21) (FURNARI et al. 1997; NAGANE et al. 1998). Alguns estudos indicam que pacientes que apresentam mutações em *TP53* desenvolvem glioblastomas secundários com mais frequência, enquanto que amplificação do gene *EGFR* costuma ser encontrada em glioblastomas "de novo" (LOUIS et al. 2002).

Há indícios de que os glioblastomas "de novo" têm origem na desdiferenciação de astrócitos em células precursoras. A glia compreende as células não neuronais do cérebro. Suas funções são diversas e incluem o desenvolvimento, diferenciação, migração, interação célula-célula e indução de apoptose. No desenvolvimento do SNC, células da glia radial têm o potencial não somente de guiar os novos neurônios, como também gerar novos neurônios e astrócitos, em processos de regeneração tecidual. Foi proposto que mutações oncogênicas no cérebro adulto com lesões prévias poderiam desencadear um processo de regeneração errônea, de

onde emergiria o glioblastoma primário (ZHU e PARADA 2002). Análises moleculares para elucidar os mecanismos biológicos de formação destes tumores e análises de gliomas por técnicas de *c-DNA microarray* levaram a descoberta de muitas proteínas envolvidas no processo (RICKMAN et al. 2001; SALLINEN et al. 2000; MARIANI et al. 2001), sendo que várias destas são expressas em células durante o desenvolvimento embrionário e voltam a ser expressas em algum momento da progressão tumoral, como NG2 (*non-mature glial chondroitin sulfate proteoglycon*) e PDGF α R (*platelet derived growth factor α receptor*) descritos como presentes em alguns tumores (LU et al. 2001).

O desenvolvimento e a progressão de um glioma é acompanhado pela formação de novos vasos, sendo que o glioblastoma encontra-se entre os mais bem vascularizados tumores humanos. Em adição a marcada necrose, a presença de proliferação microvascular são algumas das marcas histológicas do glioblastoma. Esta associação entre a necrose e a angiogênese sugere que as células tumorais ganham a habilidade de recrutar células epiteliais vasculares dos tecidos vizinhos frente a hipóxia (KLEIHUES et al. 2000c).

A invasão tumoral é uma característica importante dos tumores de linhagem glial. Gliomas de grau III e IV (astrocitoma anaplásico e glioblastoma) e astrocitomas difusos, grau II, infiltram difusamente regiões adjacentes, o que torna sua ressecção completa difícil e a irradiação focal ineficaz (KLEIHUES et al. 2000a). Estas invasões locais necessariamente implicam em mudanças na interação célula-célula e célula-matriz extracelular, que são geradas por mudanças na expressão e apresentação de proteínas celulares que participam destes processos (CAVANNE et al. 2000). Estudos da expressão de proteínas de matriz em gliomas e receptores destas proteínas, mostram a importância da expressão desses receptores, super ou sub-expressos (ENAM et al. 1998; VAN METER et al. 2001).

Alto poder de invasão, rápida progressão e a resistência dos gliomas às drogas e à radioterapia, indicam que as células neoplásicas acumulam um alto grau de proliferação celular e uma diminuição na apoptose. Sabe-se que mutações com perda de função em p53 ocorrem em todos graus histológicos de astrocitomas em mais de 60% dos casos. E, em contraste com outros tipos de câncer que perdem p53 em estágios mais avançados, esta perda ocorre mesmo em gliomas de baixo grau, o que

sugere que a evasão da apoptose, para migrar e sobreviver no microambiente, é requerida nos primeiros estágios da tumorigenese, como um requisito básico. Alguns experimentos revelam que astrócitos de animais nocautes para p53 mostram um crescimento aumentado e uma susceptibilidade maior para transformação (ZHU e PARADA 2002).

A heterogeneidade celular intra tumoral dos gliomas mostra que a progressão está associada a alterações em várias células dentro do mesmo tumor no mesmo paciente, dificultando uma associação simples entre mutações e desenvolvimento do câncer. São tumores que podem se apresentar geneticamente mistos, tendo algumas células com mutações que não são encontradas nas células tumorais vizinhas ou com alterações genéticas adicionais (NOBLE e DIETRICH 2004). Estudos recentes sugerem que alterações de metilação do DNA são as maiores responsáveis pelas modificações na expressão de proteínas nos gliomas. Estas anormalidades na metilação de regiões promotoras de genes e exons podem ocorrer com uma frequência maior e contribuir mais efetivamente para o crescimento tumoral do que as próprias mutações, mesmo em tumores de baixo grau de agressividade (NOBLE e DIETRICH 2004). Portanto, para uma abordagem adequada, além das alterações genéticas, deve-se levar em conta a expressão de proteínas na progressão dos gliomas.

Os fatores preditivos de prognóstico são ainda escassos. Em glioblastomas a presença de extensas áreas de necrose são correlacionadas com pior prognóstico. Além disso, astrocitomas graus II e III que mostram presença de células gemistocíticas têm progressão mais rápida (KLEIHUES et al. 2000 a e b). O uso de marcadores imunoistoquímicos auxiliam na definição do grau histológico, mas em biópsias e exciões cirúrgicas só a expressão de p53 tem algum valor prognóstico. Tumores com alterações na expressão de p53 parecem progredir com mais frequência e o intervalo até a progressão parece ser menor. A imunoreatividade de p53 em astrocitomas difusos estão associados a menor sobrevida. Índice de proliferação como ki67 e MIB-1 tem algum valor, mas não podem ser relacionados totalmente com melhor ou pior prognóstico (KLEIHUES et al. 2000 a e b). Em glioblastomas altos níveis de expressão de PTEN foram associados com sobrevida

maior, enquanto alta expressão de catepsina B parece predizer um prognóstico pior (KLEIHUES et al. 2000c).

Ao diagnóstico, déficit neurológico e cefaléia são queixas comuns. Crises convulsivas podem ser um dos primeiros sintomas de um paciente com tumor maligno do SNC, ocorrendo em 15 a 50% dos pacientes, às vezes como único sintoma da doença. Pacientes com tumores semelhantes quanto a localização, grau e tamanhos, podem cursar ou não com crises convulsivas prévias, dependendo de fatores ainda não bem esclarecidos. Além disso, tumores no cérebro estão associados a história de epilepsia, que podem ocorrer de 1 mês a vários anos antes do diagnóstico do tumor (WOLF e WIESTLER 1999; NELSON et al. 2000). Dados da literatura mostram que, em 15 a 25% dos pacientes que tiveram resecção cortical para controle de epilepsia fármaco-resistente, foram encontrados gangliocitomas e gangliogliomas (WOLF et al. 1995; ODA et al. 1998; BLUMCKE e WIESTLER, 2002). De acordo com um estudo de LIIGANT et al. (2001), 62% dos pacientes com gliomas mistos, 53% dos pacientes com oligodendroglioma e 42% dos pacientes com astrocitomas experimentam "status epilepticus". Destes pacientes, 55% tiveram episódios recorrentes antes do diagnóstico de câncer.

Compressão de áreas do cérebro pelo tumor pode causar danos às células adjacentes e a presença de edema traz também disfunção local podendo causar epilepsia (BEAUMONT e WHITTLE 2000). Alguns autores sugerem, no entanto que a epileptogênese não ocorre por efeito de massa, mas tem como causa a desorganização neuronal causada pelo tumor (SONTHEIMER 2003). Astrócitos respondem a atividade neuronal com uma elevação do cálcio intracelular que regulam a saída de transmissores, modulando a atividade neuronal e a quantidade de sinapses formada entre eles, controlando portanto a formação, função e plasticidade do SNC. Já estão estabelecidas entre as funções dos astrócitos no cérebro normal, o resgate e redistribuição de potássio durante as atividades neurais e a remoção do glutamato e GABA nas sinapses, além da síntese de precursores destes dois neurotransmissores (PIET et al. 2004; SCHOUSBOE 2003). Vários grupos observaram que a falha nesta redistribuição do glutamato em gliomas é crucial para o crescimento tumoral e disfunção neural local, como que se as células tumorais usassem os neurotransmissores, seus transportadores e alterações nos canais iônicos

para auxiliar seu crescimento e a invasão (SONTHEIMER 2003). Estes mecanismos podem estar envolvidos com a história prévia de epilepsia e o desenvolvimento tumoral (NOBLE 2000).

4.1.3 Justificativa do estudo

Como visto, alguns estudos evidenciam a associação de gliomas e epilepsia (SCHLEHOFER et al. 1999; LIIGANT et al. 2001) e é sabido que alguns tumores do SNC estão associados a epilepsia de lobo temporal, com mais frequência os gangliogliomas graus I a III, seguidos de tumores neuroepiteliais desembrioplásticos, astrocitomas pilocíticos, astrocitomas grau II, oligodendrogliomas grau II e com menos frequência em outros tipos histológicos (NELSON et al. 2000).

Na primeira parte deste trabalho encontramos o polimorfismo no codon 171 do gene *Prnp* com alta prevalência em pacientes com epilepsias de difícil controle farmacológico, particularmente epilepsia do lobo temporal mesial associada a esclerose hipocampal (ELTM-EH) e epilepsias focais associadas a anormalidades do desenvolvimento cortical (ADC) (WALZ et al. 2003 e 2004). Além disso, pacientes com ELTM-EH que possuíam a variante heterozigótica do códon 171 (N/S) apresentaram 5 vezes mais chance de continuar a ter crises epilépticas após a realização da cirurgia do que aqueles que carregavam o alelo normal (WALZ et al. 2003). Portanto, a variante alélica do códon 171 (N/S) do gene *Prnp* influencia a resposta ao tratamento cirúrgico em pacientes com epilepsia de lobo temporal mesial associada a esclerose hipocampal refratária a medicamentos.

Isso sugere uma associação entre a proteína prion celular e a susceptibilidade a estas formas de epilepsia. Alterações genéticas na proteína prion celular podem contribuir, mesmo que parcialmente, para o mecanismo da epileptogênese, sendo um fator predisponente para a doença.

Estes dados nos levaram a estudar o gene de PrPc em pacientes com gliomas, buscando a presença de polimorfismos e sua relação com história prévia de epilepsia.

Nosso estudo teve ainda como objetivo avaliar a expressão de PrPc e STI-1 nestes tumores. Não há praticamente descrição na literatura da expressão da proteína PrPc no câncer. Alguns estudos limitam-se ao achado ocasional da expressão diferencial do mRNA de PrPc em análises de *cDNA microarray*. Nestes estudos o

transcrito ora é encontrado superexpresso ora com expressão reduzida, dependendo do tipo tumoral estudado e condições das células tumorais em estudo. Quanto a proteína STI-1 não há relato na literatura sobre sua expressão em condições normais ou alteradas, fora os dados mostrando ser uma proteína que está aumentada em situações de estresse celular e em processos de regeneração e proliferação (HONORÉ et al. 1992).

Dados da literatura e do nosso grupo mostram que PrPc está envolvido com adesão celular, diferenciação e sinalização intracelular para a sobrevivência celular, particularmente na sua associação com STI-1 e laminina (GRANER et al. 2000a e b; ZANATA et al.2002; CHIARINI et al. 2002). Desta forma podemos supor que a proteína PrPc possa estar aumentada ou diminuída dependendo do estágio do crescimento tumoral, uma vez que o desenvolvimento da célula tumoral envolve alterações no controle da apoptose e o bloqueio de atividades como adesão e diferenciação celular.

Sabe-se ainda que PrPc participa de mecanismos de proteção celular contra o estresse oxidativo (BROWN et al. 1999). Desta forma incluímos a pesquisa da expressão das enzimas oxidantes n-NOS e i-NOS em nosso estudo, visto o envolvimento destas enzimas no processo tumoral (UMANSKY e SCHIRRMACHER 2001). Alguns autores mostraram o envolvimento de proteínas de resposta a estresse nos neurônios e glia da região peritumoral (GOEL et al. 2003). Outros dados mostram i-NOS envolvida com apoptose e angiogenese e a possível correlação entre a expressão da enzima e a progressão tumoral (XIE E HUANG, 2003; LUDWIG et al. 2000). O envolvimento de NO em epilepsia também já foi descrito, afetando o potencial de membrana neuronal contribuindo assim na excitabilidade hipocampal (LEITE et al. 2002).

As proteínas i-NOS e PrPc têm sua expressão aumentada em processos inflamatórios e a associação destas duas proteínas tem sido alvo de vários estudos (LALA e CHAKRABORTY 2001). A atuação de NO como mediador químico da inflamação é bastante conhecido assim como as altas concentrações de i-NOS nestes processos. Há uma forte associação entre algumas condições inflamatórias e o aparecimento do câncer, evidenciados pela história natural das doenças e por estudos epidemiológicos, como por exemplo: esofagite de refluxo e câncer esofágico na

síndrome de Barrett, colite ulcerativa e doença de Crohn e câncer de cólon, pancreatite crônica e carcinoma pancreático, hepatite C e carcinoma hepatocelular, *Helicobacter pylori* e câncer gástrico (COTRAN et al. 1999).

Portanto, realizamos um estudo da expressão de PrPc em astrocitomas, acrescentando ao estudo seu ligante celular STI-1 e as enzimas i-NOS e n-NOS.

Uma vez que PrPc é expresso em praticamente todos os tecidos (FORD et al. 2002b), decidimos avaliar a expressão de PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS em outros tumores além dos gliomas, para termos uma visão preliminar sobre a distribuição destas proteínas no câncer. Esta abordagem teve como objetivo observar tendências, num estudo piloto com poucas amostras, a partir do qual poderemos escolher seguir com os tumores que se mostrarem com expressão modificada destas proteínas.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Pesquisar as variantes alélicas no gene *PRNP* em pacientes com gliomas.
- Associar a presença dessas variantes alélicas no gene *PRNP* com história prévia de crises convulsivas e com o grau de malignidade tumoral.
- Verificar a expressão da proteína PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS em astrocitomas e em alguns tipos de tumores sólidos.
- Verificar possíveis associações entre a expressão de PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS nestes tumores e o grau de malignidade e invasividade tumoral.

4.3 MATERIAIS E METODOS

4.3.1 Análise de mutações e polimorfismos no gene de PrPc em amostras de gliomas

4.3.1.1 Pacientes

Um total de 49 amostras de pacientes portadores de tumores do SNC foram analisados. Foram incluídos neste estudo 36 casos provenientes do banco de tumores do Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer, que possuíam amostras de sangue no banco de tumores da instituição, prontuários corretamente preenchidos e termo de consentimento pós-informado assinado. Foram também analisadas 13 amostras provenientes da Faculdade de Medicina da USP - Ribeirão Preto, sendo 5 casos de câncer e outros 8 de tumores benignos. Os critérios de inclusão foram os mesmos descritos acima.

4.3.1.2 Análise de Prontuários

Todos os dados demográficos e clínicos incluindo história, exame físico, sintomatologia, padrões de invasão do tumor estabelecidos em exames de imagem (Tomografia Computadorizada ou Ressonância Nuclear Magnética), modalidades de tratamento (abordagem cirúrgica, quimioterapia e radioterapia), seguimento e resultados histológicos foram analisados nos prontuários e nos bancos de dados das instituições envolvidas. Foi preenchida uma ficha de coleta de informações elaborada com o auxílio da equipe do Centro de Estudos do Hospital do Câncer, para análise das variáveis envolvidas (Anexo 4). Os casos foram classificados quanto ao tipo tumoral (*WHO Classification of Tumours of the Nervous System*) (KLEIHUES e CAVENNE, 2000), presença ou não de crises epiléticas ao diagnóstico e localização do tumor.

4.3.1.3 Extração do DNA, análise por cromatografia e por digestão com enzimas de restrição e seqüenciamento do gene de PrPc

Os DNAs foram extraídos de leucócitos, partindo de 3 a 5 ml do sangue periférico. As técnicas utilizadas para a extração, as análises por DHPLC, digestão

com exonucleases e o seqüenciamento das amostras estão descritas nos artigos encartados nos anexos 1, 2 e 3 (WALZ et al. 2003 e 2004, CASTRO et al. 2004).

4.3.1.4 Análise dos dados

Os pacientes foram estratificados de acordo com as variáveis demográficas (sexo, idade), clínicas (presença de epilepsia, resposta ao tratamento e prognóstico), anátomo-patológicas (grau tumoral e tipo histológico) e variantes alélicas encontradas, utilizando-se testes de qui-quadrado ou Fischer quando apropriado. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Para isso foi usado o programa SPSS 12,0 for Windows.

4.3.2 Avaliação da expressão de PrPc, STI-1, NOS-1 e NOS-2 em tumores sólidos por imunistoquímica

4.3.2.1 Amostras Utilizadas

4.3.2.1.1 Tecidos Normais

Usamos para padronização da técnica, cérebros extraídos de camundongos C57- BL 10 e tecidos cerebrais obtidos de necrópsias de pacientes não oncológicos, provenientes do arquivo do Departamento de Anatomia Patológica do Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer.

4.3.2.1.2 Tecidos tumorais

Para a análise da expressão das proteínas nos tumores foram utilizadas 29 amostras de gliomas obtidas no Departamento de Anatomia Patológica do Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer e 80 amostras provenientes do arquivo do departamento de anatomia patológica da Faculdade de Medicina da USP - Ribeirão Preto. Partindo-se dos tecidos fixados em formol tamponado a 4% e parafinizados, foram feitos cortes histológicos de 3 a 5 μ m em lâminas silanizadas, onde foram avaliados 2 laminas de cada amostra.

4.3.2.1.2.1 "Tissue Micro Array" (TMA)

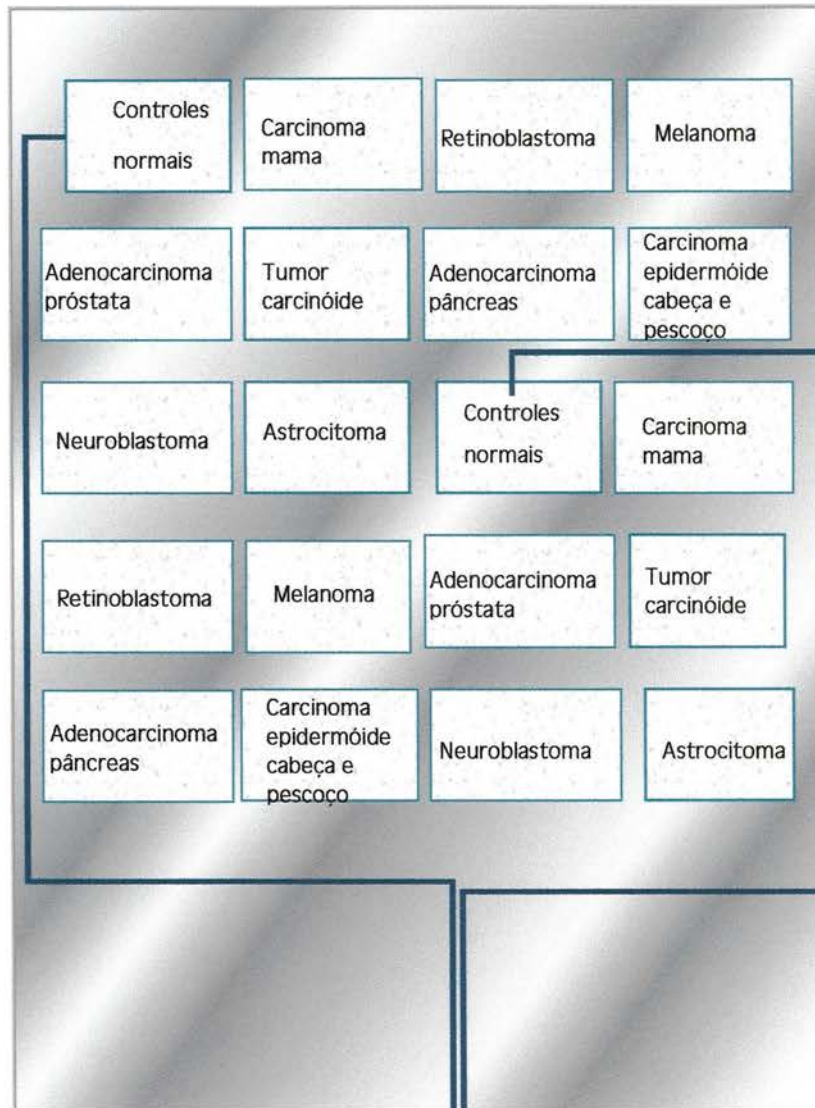
Foram separados dos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica do Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer, 25 amostras de cada um dos seguintes tumores: astrocitomas, neuroblastomas, retinoblastomas, tumores carcinóides, carcinomas ductais invasivos de mama, adenocarcinomas de pâncreas, carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço, adenocarcinomas de próstata e melanomas, além de tecidos normais correspondentes (4 amostras de tecido proveniente do sistema nervoso central, 4 amostras de tecido mamário, 4 amostras de pâncreas, 4 amostras de próstata, 4 amostras de retina e 5 de pele).

Esta metodologia foi desenvolvida por KONONEN et al. (1998) e foi padronizada no Hospital do Câncer pelo Dr. Fernando Soares, no Departamento de Anatomia Patológica.

No início da confecção do TMA foram selecionados os casos a serem avaliados, com prontuário devidamente preenchido e consentimento pós informado assinado. Os blocos de parafina que preenchem esses critérios foram separados e um corte de 5µm foi preparado, corado por hematoxilina-eosina e analisado por um patologista (Dr. Antonio Hugo JFM Campos). Essa lâmina marcada serviu de guia para a retirada dos cilindros de cada bloco doador. Em cada uma das lâminas foram portanto, identificadas e marcadas duas áreas representativas do tumor, sendo que cada uma delas marcavam um dos cilindros do tissue array, que seriam arranjados em duplicata. Cilindros de tecido de 0,6 mm de diâmetro foram retirados de cada um dos blocos de parafina. Cada cilindro foi precisamente ordenado em um novo bloco de parafina com 1 mm de espaçamento entre eles, tendo-se o cuidado de anotar a localização de cada tecido dentro da nova montagem. Desta forma, foram emblocados 20 grupos de 25 tecidos cada, num total de 500 cilindros, contendo 250 amostras para análise em duplicata, conforme mostrado na figura 1.

Uma fita adesiva especial (Beecher Instruments Inc., USA) colocada na face do bloco de array antes de cada corte, manteve os tecidos na sua formatação. Cortes de 5 µm foram feitos serialmente e colocados em lâminas (Starfrost, Beecher Instruments Inc., USA), com a ajuda do adesivo. A fita foi então removida e os tecidos fixados por UV, conforme recomendação do fabricante.

A



B

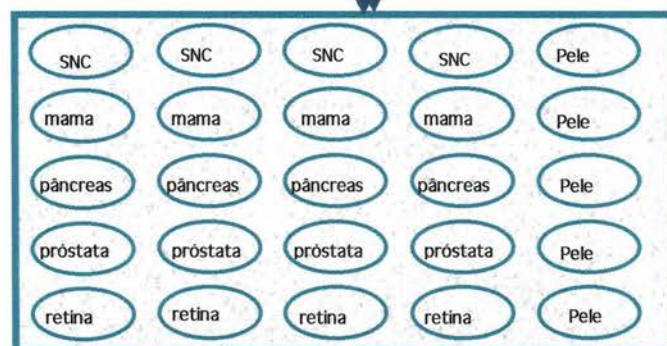


Figura 1- Esquema representando como foi desenhada a lâmina multitumoral do TMA (*tissue micro array*). Na parte superior (A) podemos ver como foi distribuído cada tipo de tecido na lâmina, sendo que cada bloco contém 25 amostras. Abaixo (B) está a distribuição dos tecidos normais colocados nos blocos de controles.

4.3.2.2 Anticorpos utilizados

Foram usados os seguintes anticorpos:

- anticorpo policlonal para PrPc produzido em camundongos nocautes (Prnp^{-/-}) após imunização com a proteína recombinante His6-PrPc (ZANATA et al. 2002; CHIARINI et al. 2002), que reconhece o peptídeo 163 a 182 da proteína. Diluição ótima: 1/1000;
- anticorpo policlonal para STI-1 produzido em coelho (soro total) contra a proteína recombinante (ZANATA et al. 2002; CHIARINI et al. 2002), (Bethyl Lab Inc, Montgomery, TX, USA). Diluição ótima: 1/2000;
- anticorpo monoclonal para NOS-1 (n-NOS, BD Transduction Lab., BD Biosciences Pharmigen, USA). Diluição ótima: 1/100;
- anticorpo monoclonal para NOS-2 (i-NOS, BD Transduction Lab., BD Biosciences Pharmigen, USA). Diluição ótima: 1/10.

4.3.2.3 Imunoistoquímica

Foram usadas 2 lâminas para cada anticorpo avaliado, tanto nos casos de cortes convencionais como no TMA, sendo então os primeiros analisados em duplicata e os cortes que compuseram o TMA em quadruplicata. Estes cortes eram preferencialmente distantes vários cortes um do outro para um aprofundamento do tecido e uma análise do tumor como um todo.

Os cortes foram inicialmente desparafinizados em xilol e hidratados com concentrações decrescentes de etanol. As lâminas foram então, incubadas em uma solução de peróxido de hidrogênio a 10%, para eliminação de peroxidase endógena. Nas lamínas de cortes regulares, fizemos um tratamento para exposição de sítios ativos por aquecimento em microondas (SHI et al. 1991) por 15 minutos, potência alta, em tampão citrato 0,01M, pH 6,4 e um tratamento adicional, para eliminar grupos aldeídos que ainda estariam ligados ao tecido que consiste em uma incubação de 30 minutos com glicina 50 mM, em tampão Tris 0,1 M pH 7,4. Esse tratamento não foi feito nas lamínas de TMA.

Para a pesquisa de expressão de PrPc em cortes regulares, incubamos as lamínas por 4 horas a temperatura ambiente, com um tampão bloqueador de ligações inespecíficas (tampão fosfato 0,02 M, salina pH7,4 contendo Triton X-100 a 0,2%,

leite desnatado a 5%, acrescido de soro normal de cabra a 5%) (CASTRO 2000). Para a pesquisa de expressão de STI1, i-Nos e n-NOS o tampão bloqueador foi modificado substituindo-se o leite desnatado por soro albumina bovina a 1%. Este mesmo tampão bloqueador foi usado nas lâminas de TMA.

Após isso, seguiu-se uma incubação por 12 horas com os anticorpos primários diluídos no tampão bloqueador, também a temperatura ambiente. Amostras dos mesmos tecidos foram também incubados com o soro pré imune do animal em que foi feito o anticorpo primário e na mesma diluição usada, para servir de controle negativo da reação. As lâminas foram então lavadas em tampão fosfato-salina pH 7,4 acrescido de Triton X-100 a 0,2% e incubadas com o anticorpo secundário, um conjugado ligado a um polímero de dextran que amplifica o sinal de ligação antígeno-anticorpo e é livre de biotina (Universal Dako EnVision Systems, peroxidase, Dako Corporation). As lâminas foram novamente lavadas 3 vezes (10 minutos/ lavagem) em tampão fosfato-salina pH7,4 acrescido de Triton 0,2%.

A reação foi revelada com diaminobenzidina tetrahidrocloro (1 mg/ml em tampão fosfato-salina 0,02M, pH 7,4, acrescido de 40ul/ml de peróxido de hidrogênio a 10%) e contra coradas por hematoxilina de Harris.

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico Olympus em aumentos de 1,5 a 40X e as imagens foram capturadas em câmera DP70 (Olympus Optical Co,LTD) com o auxílio do programa Image Pro-Plus versão 4,5 1,22 (Media Cybernetics Inc). Todas as lâminas foram revisadas pelos patologistas Dr. Fernando A. Soares, Dra. Maria Betânia M. Araujo e Dr. Antonio Hugo J. F. M. Campos, do Departamento de Anatomia Patológica do Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer.

O escore de cada amostra foi calculado correlacionando o número de células que apresentavam expressão e a intensidade desta expressão para a proteína analisada, visualizados em aumento de 400X em cinco campos representativos. Foi atribuído um valor para cada uma das variáveis, conforme tabela 3. O escore final foi dado pela multiplicação dos dois fatores (CRNOGORAC-JURCEVIC et al. 2003).

Tabela 3 – Cálculo dos escores para a análise da expressão de cada uma das proteínas marcadas por imunistoquímica. O cálculo foi feito após a análise das lâminas em microscópio, visualizados em aumento de 400X em cinco campos representativos.

Escore do número de células expressando a proteína (n)			
< 5% das células	5 a 50% das células	> 50% das células	
1	2	3	
Escore de intensidade de expressão (i)			
Negativo	Fracamente positivo	Moderadamente positiva	Fortemente positiva
0	1	2	3
Escore Final = n.i			
1 a 3 = negativo (-)			
4 a 6 = expressão moderada (+)			
6 a 9 = expressão forte (++)			

4.3.2.4 Análise dos dados

Os pacientes foram estratificados de acordo com as variáveis demográficas (sexo e idade), anátomo-patológicas (grau tumoral e tipo histológico) e expressão imunistoquímica das proteínas utilizando-se testes de qui-quadrado ou teste exato de Fisher quando apropriado. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Para isso foi usado o programa SPSS 12,0 for Windows.

4.3.3 Análise computacional da expressão diferencial de PrPc e STI-1

Foi pesquisado os genes de PrPc e STI-1 e a quantidade expressa em amostras normais, tumorais, e em cultura de células, encontrada pela técnica de SAGE (serial analysis of gene expression), que encontram-se depositados no banco de dados CGAP (Cancer Genome Anatomy Project, <http://cgap.nci.nih.gov/SAGE>). A avaliação estatística de comparação de expressão entre as amostras depositadas neste banco de dados foi feita utilizando-se de programa disponibilizado na rede (BIN-<http://www.lbc.ludwig.org.br/~rvencio/SageBeBin>).

4.4 RESULTADOS

4.4.1 Análise de mutações e polimorfismos no gene *Prnp* em gliomas

Para a pesquisa de polimorfismos e mutações no gene *Prnp* analisamos 49 amostras de DNA extraídas de pacientes com tumores cerebrais, utilizando a mesma metodologia da análise dos pacientes epiléticos (primeira parte do trabalho; CASTRO et al. 2004).

Na tabela 4 podemos ver a distribuição das variáveis estudadas, como idade, sexo, presença ou não de epilepsia, distribuídas pelo grau de malignidade tumoral. O grupo estudado consistia de 1 (2,0%) paciente com tumor misto glial e neuronal, 12 (24,5%) pacientes apresentando tumores benignos do SNC, 8 (16,4%) com astrocitomas pilocíticos (grau I); 9 (18,4%) com astrocitoma grau II; 2 (4,0%) com astrocitoma grau III e 17 (34,7%) com astrocitoma grau IV (classificação OMS).

Tabela 4- Distribuição pela faixa etária, sexo e a apresentação de sintomas ou não de crises epiléticas anteriores ao diagnóstico, dos pacientes com tumores de SNC estudados, separados pelo grau de malignidade tumoral

Variáveis		Tumores estudados					
		Benignos N (%) n=12	Mistos N (%) n=1	Astrocitomas pilocíticos N (%) n=8	Astrocitoma Grau II N (%) n=9	Astrocitoma Grau III N (%) n=2	Astrocitoma Grau IV N (%) n=17
Idade (anos)							
<18	17 (34,7)	7 (58,3)	0 (0)	6 (75,0)	0 (0)	0 (0)	4 (23,5)
19-40	17 (34,7)	4 (33,3)	1 (100,0)	1 (12,5)	7 (77,8)	2 (100,0)	2 (11,8)
>41	15 (30,6)	1 (8,4)	0 (0)	1 (12,5)	2 (22,2)	0 (0)	11 (64,7)
Sexo							
Masc	29 (59,2)	6 (50,0)	0 (0)	4 (50,0)	5 (55,6)	2 (100,0)	12 (70,6)
Fem	20 (40,8)	6 (50,0)	1 (100,0)	4 (50,0)	4 (44,4)	0 (0)	5 (29,4)
Epilepsia							
Não	20 (40,8)	2 (16,7)	0 (0)	6 (75,0)	2 (22,2)	0 (0)	10 (58,8)
Sim - controladas	15 (30,6)	2 (16,7)	0 (0)	1 (12,5)	4 (44,4)	1 (50,0)	7 (41,2)
Sim - refratárias	14 (28,6)	8 (66,6)	1 (100,0)	1 (12,5)	3 (33,4)	1 (50,0)	0 (0)

Nos astrocitomas pilocíticos 6 pacientes (75,0%) não apresentaram crises, 1 (12,5%) apresentou crises epiléticas controladas por medicamentos e 1 (12,5%) apresentou crises epiléticas refratárias a medicamentos. Nos astrocitomas grau II 2 pacientes (22,2%) não apresentaram nenhum sintoma epilético, 4 (44,4%) apresentaram crises epiléticas controladas por medicamentos e 3 (33,4%) apresentaram crises epiléticas refratárias a medicamentos. Nos astrocitomas grau III 1 paciente (50,0%) apresentou crises epiléticas controladas por medicamentos e 1 (50,0%) crises epiléticas refratárias a medicamentos. Já nos astrocitomas grau IV 10 pacientes (58,8%) não apresentaram nenhum sintoma epilético e 7 (41,2%) apresentaram crises epiléticas controladas por medicamentos.

Na tabela 5 podemos verificar a incidência de epilepsia nos casos estudados, agrupando os tipos tumorais em de baixo grau (tumores mistos, benignos e astrocitomas pilocíticos) e alto grau (astrocitomas grau II, III e IV). Podemos observar que dos 21 (42,9%) pacientes com tumores de baixo grau 13 (61,9%) tiveram crises epiléticas. Já dos 28 (57,1%) pacientes com tumores de alto grau 16 (57,1%) apresentaram crises como queixa anterior ao diagnóstico, não havendo associação de apresentação do quadro epilético e grau tumoral ($p=0,564$).

Tabela 5- Distribuição de pacientes com tumores do SNC, separados pelo grau de malignidade tumoral, apresentando sintomas ou não de crises epiléticas anteriores ao diagnóstico.

		Crise Epilética		
		sim	não	p*
	N (%)	N (%)	N (%)	
	49	29 (59,2)	20 (40,8)	
TUMORES				
Misto; benigno e Astrocitoma pilocítico	21 (42,9)	13 (61,9)	8 (38,1)	0,564
Gliomas graus II; III; IV	28 (57,1)	16 (57,1)	12 (42,9)	

* valores de p calculados pelo teste exato de Fisher

Os polimorfismos em *Prnp* encontrados nos nossos pacientes foram uma deleção em heterozigossidade de oito aminoácidos na região repetitiva (octarepeat R12234/R1234), um segundo polimorfismo no códon 117 (Ala/Ala silencioso) também em heterozigossidade e outro no códon 129 (Met/Val) tanto em homo como em heterozigossidade (Met/Met; Met/Val e Val/Val). O polimorfismo do códon 117 está presente em 2 pacientes em conjunto com o polimorfismo do códon 129 ambos em heterozigossidade (Ala117Ala silencioso e Met129Val). A deleção do "octarepeat" foi encontrada em 2 pacientes, sendo que associada ao polimorfismo do códon 129, ambos em heterozigossidade (R12234/R1234 e Met129Val) em um paciente e em outro em conjunto com o polimorfismos no códon 129 em homozigossidade para metionina (R12234/R1234 e Met129Met).

Na tabela 6 os polimorfismos encontrados nos pacientes foram comparados com o grupo controle (180 amostras de voluntários sem doença usadas na análise de pacientes epiléticos, WALZ et al. 2003 e 2004). Os resultados mostraram que 6,1% das nossas amostras apresentam deleção de octarepeat contra 5,6% nos controles. Para o códon 129, 57,1% dos pacientes apresentam metionina em homozigose, contra 57,8% encontrado nos controles; 32,7% com códon 129 metionina/valina contra 37,8% nos controles; 10,2% com códon 129 com valina em homozigose contra 4,4% no grupo controle. Por sua vez, o polimorfismo silencioso no códon 117 está presente em 4,1% dos pacientes contra 3,9% nos controles, sendo que a análise estatística não mostrou diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$). A tabela 6 mostra ainda que entre os polimorfismos encontrados separados pelo tipo tumoral, a deleção do octarepeat foi encontrada em 1 (8,3%) dos pacientes com tumores benignos e em 1 (11,85) dos com astrocitomas grau IV. O polimorfismo silencioso no códon 117 foi encontrado em 1 (11,1%) paciente com astrocitoma grau II e em 1 (5,9%) com astrocitoma grau IV. No códon 129 em heterozigossidade (Met129Val) o polimorfismo foi encontrado em 6 (50,0%) dos pacientes portadores de tumores benignos, 2 (25,0%) dos portadores de astrocitomas pilocíticos, 3 (33,4%) dos portadores de astrocitomas grau II e 5 (29,4%) dos portadores de astrocitomas grau IV e em homozigossidade para valina (Val129Val) em 1 (8,3%) dos pacientes com tumores benignos, 2 (22,2%) dos portadores de astrocitomas grau II, 1 (50,0%) dos portadores de grau III e 1 (5,9%) dos portadores de astrocitomas grau IV.

Tabela 6 - Distribuição dos polimorfismos no gene *Prnp* encontrados em pacientes com tumores do SNC e no grupo controle.

	Tumores estudados							Controles
		Benignos	Mistos	Astrocitomas pilocíticos	Astrocitomas Grau II	Astrocitomas Grau III	Astrocitomas Grau IV	
<i>Prnp</i> ^a	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
	49	12	1	8	9	2	17	180
R12234	46 (93,9)	11 (91,7)	1 (100,0)	8 (100,0)	9 (100,0)	2 (100,0)	15 (88,2)	170 (94,4)
R1234	3 (6,1)	1 (8,3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (11,8)	10 (5,6)
A117A	47 (95,9)	12 (100,0)	1 (100,0)	8 (100,0)	8 (88,9)	2 (100,0)	16 (94,1)	173 (96,1)
A117A silencioso	2 (4,1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (11,1)	0 (0)	1 (5,9)	7 (3,9)
M129M	28 (57,1)	5 (41,7)	1 (100,0)	6 (75,0)	4 (44,4)	1 (50,0)	11 (64,7)	104 (57,8)
M129V	16 (32,7)	6 (50,0)	0 (0)	2 (25,0)	3 (33,4)	0 (0)	5 (29,4)	68 (37,8)
V129V	5 (10,2)	1 (8,3)	0 (0)	0 (0)	2 (22,2)	1 (50,0)	1 (5,9)	8 (4,4)

^a Polimorfismos: octarepeat R12234 = região contendo as 5 repetições de oito aminoácidos, R1234 = região contendo deleção de uma das regiões repetitivas; A117A = alanina no códon 117 nos dois alelos codificados por GCA, A117A silencioso = alanina no códon 117 codificado em um alelo por GCA e no outro alelo por GCG; M129M = presença de metionina no códon 129, nos dois alelos; M129V = presença de metionina em um alelo e valina no outro alelo; V129V = presença de valina nos dois alelos.

Na tabela 7 correlacionamos a epilepsia com a presença dos polimorfismos e podemos observar que a deleção do octarepeat foi encontrada em 1 (3,4%), o polimorfismo silencioso no códon 117 em 1 (3,4%), o polimorfismo no códon 129 em heterozigosidade (Met129Val) em 8 (27,6%) e o polimorfismo no códon 129 em homozigosidade para valina (Val129Val) em 4 (13,8%) dos pacientes com os sintomas. Agrupando os tipos tumorais em baixo grau (tumores mistos, benignos e astrocitomas pilocíticos) e alto grau (astrocitomas grau II, III e IV) e correlacionando com a presença dos polimorfismos, podemos ver ainda na tabela 7 que a deleção do octarepeat foi encontrada em 1 (4,8%), o polimorfismo no códon 129 em heterozigosidade (Met129Val) em 8 (38,1%) e o polimorfismo no códon 129 em homozigosidade para valina (Val129Val) em 1 (4,8%) dos pacientes com tumores de baixo grau. Já nos pacientes com tumores de alto grau a deleção do octarepeat foi encontrada em 2 (7,1%), o polimorfismo silencioso no códon 117 em 1 (3,6%), o polimorfismo no códon 129 em heterozigosidade (Met129Val) em 8 (28,6%) e o polimorfismo no códon 129 em homozigosidade para valina (Val129Val) em 4 (14,3%). Entretanto nenhuma das associações mostrou-se significativa ($p>0,05$).

Tabela 7 - Distribuição dos polimorfismos no gene *Prnp* encontrados nos pacientes com tumores do SNC estudados, agrupados pelo grau de malignidade e pela presença ou não de quadro de crises epilépticas anteriores ao diagnóstico.

		<i>Prnp</i>									
		octarepeat*			Códon 117*			Códon 129*			
		R12234	R1234	p**	Ala/Ala	silencioso	p**	Met/Met	Met/Val	Val/Val	p**
N=49 (%)		N (%)	N (%)		N (%)	N (%)		N (%)	N (%)	N (%)	
Crises Epilépticas											
Não	20 (40,8)	18 (90,0)	2 (10,0)	0,348	20 (100,0)	0 (0)	0,401	11 (55,0)	8 (40,0)	1 (5,0)	0,476
Sim	29 (59,2)	28 (96,6)	1 (3,4)		28 (96,6)	1 (3,6)		17 (58,6)	8 (27,6)	4 (13,8)	
Tumores -											
Misto; benígno e											
Astrocitoma	21 (42,9)	20 (95,2)	1 (4,8)		21 (100,0)	0 (0)		12 (57,1)	8 (38,1)	1 (4,8)	
pilocítico				0,731			0,382				0,496
Gliomas graus	28 (57,1)	26 (92,9)	2 (7,1)		27 (96,4)	1 (5,6)		16 (57,1)	8 (28,6)	4 (14,3)	
II; III; IV											

* Polimorfismos: octarepeat R12234 = região contendo as 5 repetições de oito aminoácidos, R1234 = região contendo deleção de uma das regiões repetitivas; códon 117 Ala/Ala = alanina nos dois alelos codificados por GCA, silencioso = alanina codificado num alelo por GCA e no outro alelo por GCG; códon 129 Met/Met - presença de metionina no códon, nos dois alelos; Met/Val - presença de metionina em um alelo e valina no outro alelo; Val/Val - presença de valina nos dois alelos.

**valores de p calculados pelo teste de qui-quadrado, Pearson.

Na tabela 8 analisamos a presença do polimorfismo do códon 129 pela presença de metionina (em homo ou heterozigozidade) ou valina (em homo ou heterozigozidade) e procuramos associa-la com a queixa de epilepsia e os tipos tumorais também agrupados em baixo e alto grau. Podemos ver que 9 (45,0%) dos pacientes que não apresentaram crises convulsivas e 12 (41,4%) dos que apresentaram esse quadro eram portadores de pelo menos um alelo com valina no códon 129 (Met129Val e Val129Val). De maneira semelhante, dos pacientes que não apresentaram crises convulsivas 19 (95,0%) eram portadores de metionina em pelo menos um dos alelos (Met129Met e Met129Val) e 25 (86,2%) dos que apresentaram esse quadro. Nenhuma das análises mostrou diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 8 - Distribuição do polimorfismo no códon 129 de *Prnp* encontrados nos tumores estudados, agrupados pelo grau de malignidade e pela presença ou não de quadro de crises epiléticas anteriores ao diagnóstico.

		<i>Prnp</i> códon 129						
		Met/Met*	Met/ Val Val/Val*	p**	Met/Met Met/Val*	Val/Val*	p**	
		N (%)	N (%)		N (%)	N (%)		
Gliomas	Total	49	28 (57,1)	21 (42,9)		44 (89,8)	5 (10,2)	
Misto; benígno e Astrocitoma pilocítico	21 (42,9)	12 (57,1)	9 (42,9)	0,999	20 (95,2)	1 (4,8)	0,569	
Graus II; III; IV	28 (57,1)	16 (57,1)	12 (42,9)		24 (85,7)	4 (14,3)		
Crises Epiléticas								
Não	20 (40,8)	11 (55,0)	9 (45,0)	0,801	19 (95,0)	1 (5,0)	0,0513	
Sim	29 (59,2)	17 (58,6)	12 (41,4)		25 (86,2)	4 (13,8)		

*Met/Met - presença de metionina no códon, nos dois alelos; Met/Val - presença de metionina em um alelo e valina

no outro alelo; Val/Val - presença de valina nos dois alelos.

**valores de p calculados pelo teste de qui-quadrado, Pearson.

Ainda na tabela 8, associando a presença de valina ou metionina neste mesmo códon com tumores de alto e baixo grau, vemos que 9 (42,9%) dos pacientes com tumores de baixo grau e 12 (42,9%) dos pacientes com tumores de alto grau tem pelo menos um alelo com valina no códon 129 (Met129Val e Val129Val) ($p= 0,999$), enquanto que 20 (95,2%) dos pacientes com tumores de baixo grau e 24 (85,7%) dos pacientes com tumores de alto grau tem metionina em pelo menos um dos alelos (Met129Met e Met129Val).

O polimorfismo no códon 171 previamente encontrado em alta prevalência em pacientes com ETLM-EH e ADC (WALZ et al. 2003; 2004) não estava presente nestes pacientes, não permitindo portanto a análise da repercussão de sua presença no quadro epiléptico de pacientes com gliomas.

A análise da resposta terapêutica dos pacientes e a presença das outras variáveis não foi viável, pois tivemos perda de contato com 30 (61,2%) pacientes. O tempo de seguimento dos pacientes restantes (19) mostrou uma média de 19,6 meses (desvio padrão = 14,7 meses, mínimo = 1,2 e máximo de 65,4), sendo que 9 (18,4%) vieram a óbito.

Os resultados encontrados por amostra podem ser vistos na tabela 9, em conjunto com a idade, sexo, tipo tumoral, presença ou não de epilepsia e localização tumoral, de cada paciente.

Este grupo de resultados indica que não há correlação entre os polimorfismos no gene de PrPc e as variáveis estudadas nos tumores cerebrais.

Tabela 9- Distribuição dos casos estudados, com idade de cada paciente, sexo, tipo tumoral, com grau de malignidade segundo a OMS entre parênteses, presença ou não de crises epilépticas anteriores ou manifestação de crise convulsiva como sintoma, localização cerebral do tumor e polimorfismos encontrados no seqüenciamento do gene *Prnp*.

ID	idade	sexo	tipo tumoral	epilepsia	localização	<i>Prnp</i>
G1	18	F	Xantocitoma pleomorfo (II)	não	talamo e hipocampo D	del oct+M129V
G2	46	M	glioblastoma multifome (IV)	sim	frontal D	M129M
G3	29	F	astrocitoma fibrilar (II)	não	parasagital D - frontal	M129V
G4	3	F	astrocitoma pilocítico (I)	não	fossa posterior - cerebelo	M129V
G5	8	F	astrocitoma subependimário de células gigantes (I)	sim	lobo frontal D-talamo e núcleo caudato	M129V
G6	54	M	glioblastoma multifome (IV)	não	fronto parietal D	M129M
G7	81	M	glioblastoma multifome (IV)	não	subcortical-temporo parietal D	M129M
G8	22	M	ependimoma (II)	não	IV ventriculo E	V129V
G9	57	M	glioblastoma multifome (IV)	sim	fronto parietal E	M129M
G10	40	M	astrocitoma anaplástico (III)	sim **	parasagital E	M129M
G11	43	M	glioblastoma multifome (IV)	sim	parasagital D	V129V
G13	8	F	glioblastoma multifome (IV)	não	supratentorial	M129M
G18	9	F	glioblastoma multifome (IV)	sim	parieto-cortical	del oct+M129M
G19	66	M	glioblastoma multifome (IV)	não	parietal D	M129V/ 117 si
G20	40	M	astrocitoma anaplástico (III)	sim	temporal E	V129V
G21	34	M	glioblastoma multifome (IV)	sim	Parietal D #1	M129V
G22	59	F	glioblastoma multifome (IV)	não	encefalo temporal D	M129M
G23	46	M	glioblastoma multifome (IV)	não	temporal D	del oct +M129V
G24	52	M	glioblastoma multifome (IV)	não	temporal E #2	M129V
G25	10	F	glioblastoma multifome (IV)	sim	frontoparietal E #3	M129M
G27	10	F	astrocitoma pilocítico (I)	não	talamo E	M129M
G28	76	M	glioblastoma multifome (IV)	não	temporoparietal E	M129M
G29	35	F	astrocitoma fibrilar (II)	sim	Temporal E	M129M
G30	45	M	glioblastoma multifome (IV)	não	Temporal D	M129V
G32	34	M	oligodendroglioma (II)	sim	frontal E	M129V
G33	33	M	oligodendroglioma (II)	sim	Frontal D	V129V
G34	41	M	astrocitoma pilocítico (I)	nao	frontal D	M129M
G35	7	F	xantocitoma pleomorfo (I)	nao	fronto temporal D	M129M
G37	1	F	astrocitoma desmoplástico da infância (I)	sim	frontobasal parasagital D	V129V
G38	27	M	glioblastoma multifome (IV)	sim	frontal	M129M
G39	3	F	glioblastoma multifome (IV)	nao	fronto parietal E	M129M
G40	4	M	astrocitoma pilocítico (I)	nao	IV ventriculo de transição occipito medul	M129M
G41	13	M	astrocitoma pilocítico (I)	sim	cerebelo	M129M
G42	32	F	astrocitoma fibrilar (II)	sim	frontal E	M129V/ 117 si
G43	2	F	astrocitoma pilocítico (I)	nao	fronto parietal bilateral	M129M
G44	4	M	astrocitoma pilocítico (I)	nao	cerebelo	M129V
74	33	F	Ganglioglioma (misto:neuronal e glial=baixo grau)	sim **	neocortical	M129M
83	46	F	Oligodendroglioma (II)	sim **	giro cíngulo	M129M
125	41	M	Astrocitoma difuso (II)	sim **	-----	M129M
126	38	F	Cisto Dermoide	sim **	temporal E	M129V
127	9	M	Cisto Dermoide	sim **	Frontal D	M129M
128	19	M	Tu desembrionario neuroectodermico (I)	sim **	temporal inferior e mesial	M129V
129	13	M	Tu desembrionario neuroectodermico (I)	sim **	temporal E	M129M
130	38	M	Tu desembrionario neuroectodermico (I)	sim **	temporal inferior e mesial	M129V
135	41	M	Cisto Dermoide	sim **	Fronto-parietal D	M129V
136	32	M	Tu desembrionario neuroectodermico (I)	sim **	Frontal E	M129M
137	24	M	Oligoastrocitoma (II)	sim **	Frontal E	M129M
138	22	F	astrocitoma pilocítico (I)	sim **	Frontal E #4	M129M
139	12	F	Hamartoma	sim **	hipotalamo	M129M

Abreviações: ID = identificação no banco de tumores; F = feminino; M = masculino; idade em anos; del oct = deleção do octarepeat (24pb); 117 si = polimorfismo silencioso no códon 117 (A/A); M129M = homocigoto para metionina no códon 129; M129V = heterocigoto no códon 129 para metionina; V129V = homocigoto para valina no códon 129; ** = epilepsia de difícil controle terapêutico; #1 = paciente com progressão de astrocitoma grau II inicial; #2 = paciente apresentou recidiva do mesmo tumor; #3 = paciente apresentou recidiva do mesmo tumor em região temporal D; #4 = paciente apresentou progressão tumoral para oligodendroglioma grau III (OMS).

4.4.2 Expressão das proteínas PrPc, STI-1, iNOS e nNOS em astrocitomas

Para a análise da expressão das proteínas em astrocitomas, padronizamos inicialmente a reação em tecido cerebral normal. Para isso, foram usados cérebros de camundongos adultos, fixados em formalina tamponada e emblocados em parafina, nos quais foram feitos cortes seriados para abranger várias regiões do cérebro. A seguir, foram também utilizadas amostras de tecido cerebral normal humano proveniente de necrópsias.

A expressão de PrPc e STI-1 em áreas do córtex e hipocampo humano mostrou-se muito semelhante aquela encontrada nos respectivos tecidos cerebrais de camundongos.

A expressão normal de PrPc nos neurônios é forte e concentra-se nos prolongamentos axonais e dendríticos (figura 2). Nas células da glia a coloração é mais fraca e difusa, como mostrado nas figuras 2a e 2d onde podemos ver a região do hipocampo marcado pela proteína prion celular. A região do cerebelo e do córtex também mostraram positividade difusa em axônios e dendritos para a proteína PrPc (figuras 2g e 2j).

A análise da expressão de STI-1 em tecidos cerebrais normais mostrou forte positividade em neurônios, com expressão mais acentuada no citoplasma celular e positividade moderada nas células da glia (figuras 2b e 2e). Os prolongamentos neuríticos mostraram uma reatividade difusa. A coloração de STI-1 em células de Purkinge, no cerebelo mostrou-se forte e citoplasmática (figura 2h).

A coloração de n-NOS é forte e citoplasmática nos neurônios (figuras 2c, 2f e 2i) e não encontramos nenhuma positividade para i-NOS em tecidos cerebrais normais. Usamos como amostra para padronização deste último anticorpo, cortes de granuloma, onde a positividade para i-NOS é sabidamente alta nas células histiocíticas (WONG et al. 1995).

Portanto, usando o escore estabelecido inicialmente, a expressão de PrPc, STI-1 e n-NOS nas células gliais normais foi considerada moderada (+), enquanto que a expressão de i-NOS foi considerada como negativa.

Para a análise nos tecidos tumorais optamos por não utilizar todos os casos avaliados genotipicamente (banco de tumores), retirando as amostras de oligodendroastrocitomas, ependimomas e xantoastrocitomas pleomórfico, bem como o tumor misto neuroglial e os tumores benignos, de maneira a concentrar nosso estudo em um tipo tumoral bem definido, os astrocitomas. Foram acrescentados aos casos avaliados na etapa anterior, astrocitomas graus I, II, III e IV, totalizando 29 tumores, onde 25 destas amostras compuseram o "*tissue microarray*" (TMA), comentado mais adiante. Para uma melhor avaliação dos nossos resultados, acrescentamos ao nosso estudo 80 amostras de astrocitomas provenientes dos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da USP - Ribeirão Preto.

Foram então analisadas um total de 109 amostras de astrocitomas, que incluíam 19 (17,4%) amostras de astrocitomas pilocíticos (grau I – OMS), 27 (24,8%) de astrocitomas grau II (OMS), 13 (11,9%) de astrocitomas grau III (OMS) e 50 (45,9%) de glioblastomas multiforme (grau IV- OMS).

Na tabela 10 podem ser vistos alguns dados de cada uma das amostras utilizadas e os resultados das imunoistoquímicas, individualmente. Foi utilizado o cálculo de escores para a classificação da expressão das proteínas em estudo, descrito em material e métodos. Este escore, nos casos em que a reação se apresentava difusa, foi alterado, sendo que consideramos a área que apresentava o padrão difuso para o cálculo do escore final ao invés de contagem de células positivas. Os resultados encontrados nas reações imunoistoquímicas para as 4 proteínas em todos os astrocitomas avaliados podem ser vistos na tabela 11.

✦

Tabela 10 - Dados das amostras de astrocitomas utilizadas no estudo, com número do relatório anátomo- patológico (número AP), localização do tumor (local), grau histológico (Grau) e resultados da imunohistoquímica para PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS, segundo o escore obtido ("++" = forte, "+" = moderado e "-" = ausente).

Número AP	LOCAL	Grau	PrPc	STI-1	i -NOS	n -NOS
B97-8390	cerebelo	I	-	-	-	-
B98-1923	temporal E	I	+	+	-	-
B98-6370	cerebelo	I	-	-	-	+
B99-4732	frontoparietal bilateral	I	+	-	-	++
B99-05698	cerebelo	I	+	-	-	++
3947/95	frontal D	I	++	+	-	-
1341/96	parieto-occipital E	I	+	++	++	++
1924/96	temporal E	I	-	+	-	+
8682/96	parietal D	I	++	++	++	++
3357/99	temporal D	I	++	++	++	++
5938/99	frontal D	I	+	-	-	-
9086/00	Frontal E	I	++	++	++	++
8259/00	cerebelar E	I	-	+	-	-
10220/01	temporal E	I	-	-	++	++
5059/01	parietal E	I	++	+	++	++
8984/96	cerebelo	I	++	++	-	-
2794/98	frontal E	I	-	+	-	-
7468/96	temporo-parietal	I	+	++	++	++
9137/96	parieto- cortical D	I	-	+	++	++
BA0-1252	frontal E	II	+	-	-	++
B98-1715	frontal D	II	++	+	+	++
B98-2195	parietal D	II	-	-	-	++
B98-7360	temporal D	II	+	-	-	+
B98-7762	temporal E	II	+	-	-	++
BA0-1839	fronto- parietal E	II	+	++	+	++
BA0-7540	temporal E	II	-	-	-	+
BA1-9675	temporal E	II	-	-	-	+
B6292/01	temporal E	II	+	++	+	+
B8134/02	temporal E	II	-	-	-	++
B2076/02	frontoparietal	II	+	++	+	++
B776/02B	temporal E	II	-	-	++	++
B2860/00A	frontal D	II	+	+	++	++
8644/00B	fronto- parietal E	II	-	+	++	++
B1457/00D	temporal E	II	-	++	++	++
B3915/98B	parietal D	II	-	+	++	++
B3349/99C	temporal D	II	-	+	++	++
B5163/93B	frontal D	II	++	++	++	++
B11735/97B	Frontal E	II	+	+	++	++
B4773/00J	temporal E	II	-	-	-	-
B2784/98A	temporal E	II	-	-	-	-
B10580/96	frontoparietal E	II	-	-	-	-
B1087/97	frontal D	II	-	+	++	++
B5036/95	frontal E	II	-	-	-	-
B97-4805	frontal D	II	-	+	++	-
B99-1109	frontal D	II	-	-	-	-
B99-1581	frontal E	II	-	-	-	-

- em negrito amostras provenientes do Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer; restante das amostras provenientes do Hospital das clínicas da FMUSP-RP.

Continuação da Tabela 10

Número AP	LOCAL	Grau	PrPc	STI-1	i-NOS	n-NOS
B98- 3707	frontal D	III	+	++	++	++
BA0-8259	parietal D	III	+	++	++	++
976/96	temporal D	III	-	-	++	++
8853/96	temporal E	III	-	-	-	++
9454/96	parietal E	III	++	++	++	++
2050/99	Frontal E	III	-	-	-	-
10156/00	temporal E	III	-	-	-	-
11434/00	temporal E	III	-	+	+	-
3122/01	temporal E	III	-	-	-	-
4776/01	frontoparietal	III	-	+	++	+
11530/01	temporal E	III	++	++	++	++
5686/02	frontal E	III	-	-	-	-
B97-7605	parietal E	III	-	-	++	++
B98-7501	temporal E	IV	-	+	-	++
B99-0263	parietal D	IV	+	-	+	++
B99-4045	temporal D	IV	-	-	-	-
BA0-1433	frontal D	IV	++	++	+	++
BA0-6206	Frontal E	IV	++	+	-	++
BA0- 9318	cerebelar E	IV	++	-	-	++
BA0-9925	temporal E	IV	+	+	-	++
BA1-0784	frontoparietal E	IV	+	-	+	++
B98-9057	encéfalo	IV	-	+	-	++
BA2-6632	frontal E	IV	++	+	-	++
B1267A	fronto temporal	IV	++	+	-	++
B1200A	parietal	IV	++	+	++	++
B539B	frontal E	IV	++	+	++	++
B4953B	frontal D	IV	+	++	+	++
B691A	parietal D	IV	++	++	-	++
B7709A	temporal D	IV	+	+	++	++
B10900C	temporal E	IV	++	++	+	++
B1314A	fronto- parietal E	IV	++	+	+	++
B5231A	parietal D	IV	+	++	+	++
B7437B	fronto temporal	IV	+	-	-	++
B6877A	temporal E	IV	++	++	++	++
B7821A	fronto temporal	IV	+	+	++	++
B10452B	fronto-parietal	IV	+	-	-	+
B5036C	fronto temporal	IV	++	++	+	++
B10497A	frontal D	IV	-	-	++	-
B10256A	parieto-occipital E	IV	-	-	++	+
B12235A	temporal E	IV	++	++	+	++
B2894A	parietal D	IV	-	-	-	-
B5264A	temporal D	IV	+	++	++	++
B7073C	frontal D	IV	++	++	+	++
B12319B	Frontal E	IV	++	+	+	++
B286B	fronto temporal	IV	+	-	-	+
B5205C	temporal E	IV	++	++	+	++
B4807B	frontoparietal E	IV	++	+	++	++
B5033B	fronto temporal	IV	-	-	++	++
B1659C	frontal E	IV	++	++	+	++
B2464B	temporo-parietal	IV	-	-	-	+
B2595	parieto- cortical D	IV	++	++	++	++
B3167D	frontal E	IV	-	-	++	++
B4141A	frontal D	IV	++	++	++	++
B4854E	parietal D	IV	++	++	++	++
B8046A	temporal D	IV	-	-	-	+
B11149A	temporal E	IV	++	++	++	++
B11788C	fronto- parietal E	IV	-	+	++	+
B4220A	temporo-parietal	IV	++	++	++	++
B4231C	fronto temporal	IV	++	+	++	++
B5460B	temporal E	IV	++	+	++	++
B7590B	fronto temporal	IV	++	+	++	++
B3767B	fronto-parietal	IV	++	+	++	++
B4493A	fronto temporal	IV	++	++	-	++

Tabela 11 - Distribuição da expressão de PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS nos astrocitomas estudados, separados pelo grau tumoral.

Astrocitomas													
Grau	N (%)	PrPc			STI-1			iNOS			nNOS		
		++ N (%)	+ N (%)	- N (%)	++ N (%)	+ N (%)	- N (%)	++ N (%)	+ N (%)	- N (%)	++ N (%)	+ N (%)	- N (%)
I	19 (17,4)	6 (31,6)	6 (31,6)	7 (36,8)	6 (31,6)	8 (42,1)	5 (26,3)	8 (42,1)	2 (10,5)	9 (47,4)	12 (63,2)	0 (0)	7 (36,8)
II	27 (24,8)	2 (7,4)	8 (29,6)	17 (63,0)	5 (18,5)	7 (25,9)	15 (55,6)	10 (37,0)	4 (14,8)	13 (48,2)	20 (74,1)	0 (0)	7 (25,9)
III	13 (11,9)	2(15,4)	2 (15,4)	9 (69,2)	4 (30,7)	2 (15,4)	7 (53,9)	7 (53,8)	1 (7,7)	5 (38,5)	7 (53,8)	1 (7,7)	5 (38,5)
IV	50 (45,9)	28 (56,0)	11 (22,0)	11 (22,0)	18 (36,0)	18 (36,0)	14 (28,0)	21 (42,0)	11 (22,0)	18 (36,0)	35 (70,0)	12 (24,0)	3 (6,0)
total	109 (100,0)	38 (34,8)	27 (24,8)	44 (40,4)	33 (30,3)	35 (32,1)	41 (37,6)	46 (42,2)	18 (16,5)	45 (41,3)	74 (67,9)	13 (11,9)	22 (20,2)

A figura 3 mostra a distribuição da expressão de PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS nos astrocitomas grau I e a figura 4 mostra as fotomicrografias representativas das reações imunohistoquímicas. A expressão da proteína PrPc mostrou uma marcação forte no citoplasma da maioria das células tumorais (figuras 4a e 4b) em 6 (31,6%) amostras, moderada e difusa (figuras 4c e 4d) em 6 (31,6%) amostras e ausente em 7 (36,8%) (figura 4f) (tabela 11). Algumas células da microglia apresentam positividade semelhante á observada em células com reatividade inflamatória (histiócitos), mostrando uma positividade forte e granular no citoplasma das células, encontradas na maioria dos tumores, independente do grau histológico (figura 4a).

Nos mesmos tumores a expressão da proteína STI-1 mostrou positividade forte na maioria das células (figuras 4g) em 6 (31,6%) amostras, uma positividade moderada e difusa (figuras 4h) em 8 (42,1%) dos casos e ausente em 5 (26,3%) amostras (figuras 4i).

Ainda nos astrocitomas grau I pudemos observar a expressão da proteína i-NOS mostrando uma positividade forte na maioria das células (figuras 4j) em 8 (42,1%) amostras, uma positividade moderada (figura 4l) em 2 (10,5%) e ausente em 9 (47,4%). Algumas células da microglia também mostraram positividade típica de processo inflamatório (figura 4k).

A expressão da proteína n-NOS mostrou positividade forte na maioria das células (figuras 4m e 4n) em 12 dos casos (63,2%) e se mostrou ausente (figura 4o) em 7 (36,8%) dos astrocitomas pilocíticos.

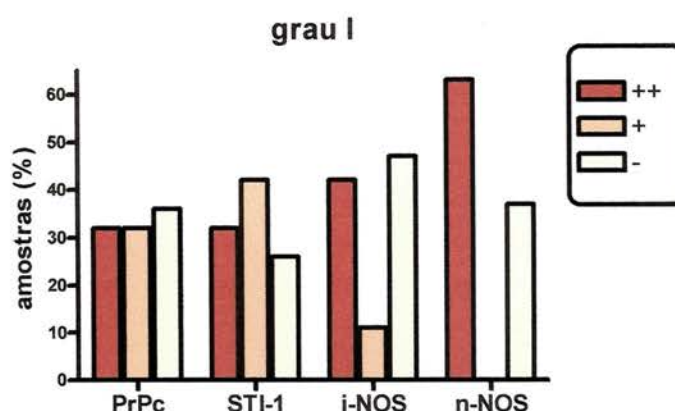


Figura 3- Distribuição dos escores encontrados para a expressão das proteínas PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS nos astrocitomas grau I analisados.

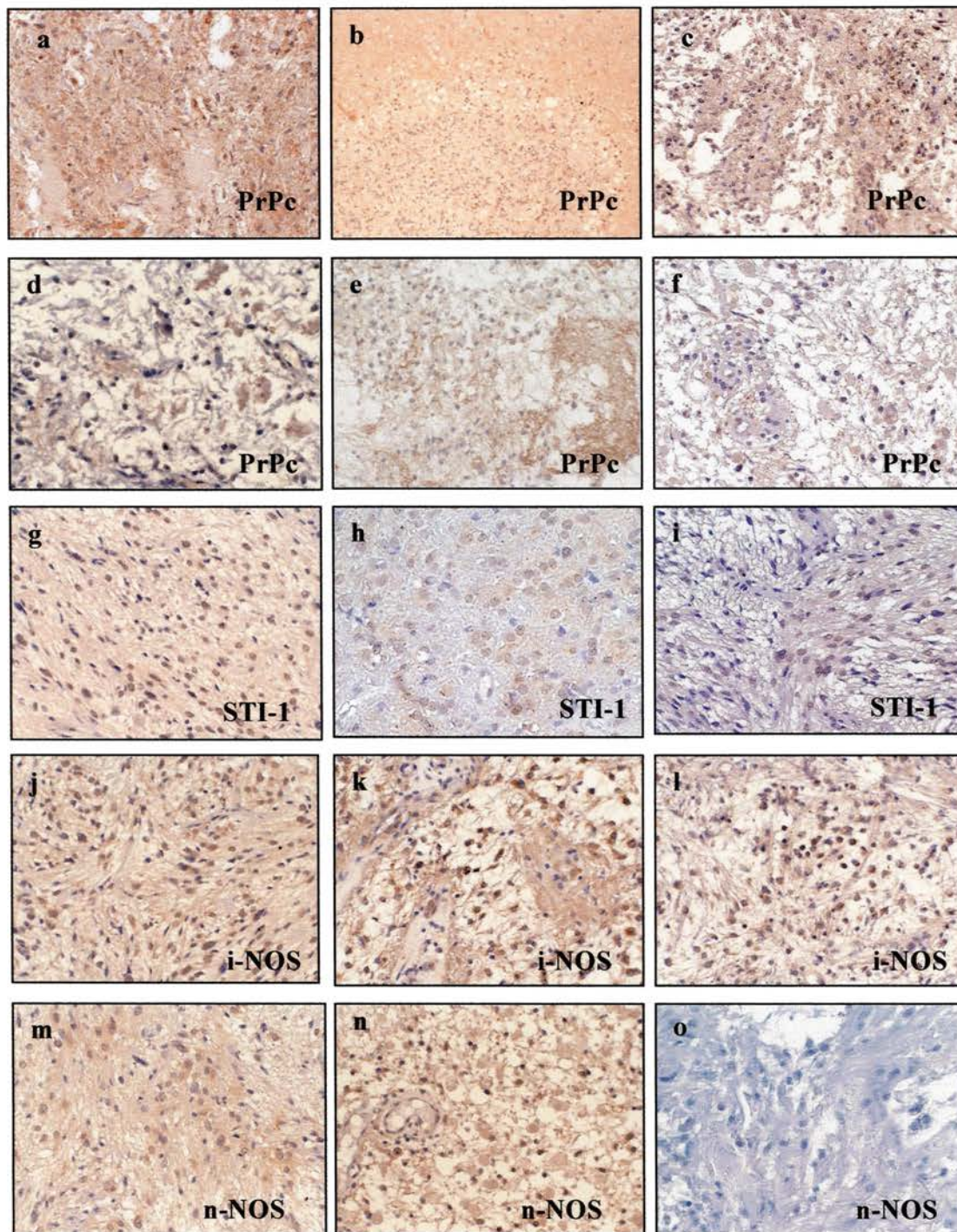


Figura 4 - Fotomicrografias representativas das expressões de PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS demonstradas por imunistoquímica em Astrocitomas grau I. **a** = reação difusa forte (++) para PrPc marcando algumas células reativas, aumento 200X, **b** = positivo difuso (++) para PrPc mostrando a interface com tecido normal, aumento 100X, **c** = moderadamente difuso (+) para PrPc, aumento de 200X, **d** = reação fraca e citoplasmática em algumas células tumorais para PrPc (+), aumento de 400X, **e** = reação para PrPc negativa nas células e positiva nas fibras, aumento de 200X, **f** = reação considerada negativa para a proteína PrPc, aumento de 200X; **g** = reação difusa (++) para STI-1, aumento de 200X, **h** = reação citoplasmática para STI-1 (+), aumento de 400X, **i** = reação considerada negativa para a proteína STI-1, aumento de 200X; **j** = difusa e no citoplasma de algumas células para i-NOS (++) , aumento de 200X, **k** = difusa em algumas regiões com marcação de células reativas para i-NOS, aumento de 200X, **l** = reação positiva em algumas células para i-NOS (+), aumento de 200X; **m** = positiva difusa e no citoplasma de algumas células (++) para n-NOS, aumento de 400X, **n** = reação positiva para n-NOS no citoplasma de algumas células, aumento de 200X, **o** = reação negativa para n-NOS, aumento 400X.

A figura 5 mostra a distribuição da expressão de PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS nos astrocitomas grau II e a figura 6 as fotomicrografias representativas das reações imunoistoquímicas. A marcação para a proteína PrPc mostrou uma expressão forte na maioria das células tumorais (figuras 6a e 6b) de 2 (7,4%) amostras, uma positividade moderada (figura 6d) em 8 (29,6%) e ausente em 17 (63,0%) (figura 6f). Células gemistocíticas apresentaram forte positividade citoplasmática para a proteína PrPc (figura 6c).

A expressão da proteína STI-1 mostrou positividade forte na maioria das células (figura 6g) em 5 (18,5%) dos astrocitomas grau II (tabela 11), uma positividade moderada e difusa em 7 (25,9%) (figura 6h) e ausente em 15 (55,6%). A coloração em células gemistocíticas mostrou-se mais fraca que a apresentada para PrPc, mas também positiva no citoplasma (figura 6i).

A expressão da proteína i-NOS mostrou positividade forte (figuras 6j e 6k) na maioria das células em 10 (37,0%) amostras, positividade moderada em 4 (14,8%) e ausente (figura 6l) em 13 (48,2%) dos astrocitomas grau II. A coloração em células gemistocíticas mostrou-se fortemente positiva.

A expressão da proteína n-NOS mostrou positividade forte na maioria das células (figuras 6m e 6n) em 20 (74,1%) dos casos e ausente (figura 6o) em 7 (25,9%) dos astrocitomas grau II (tabela 11). A coloração em células gemistocíticas também se mostrou positiva no citoplasma.

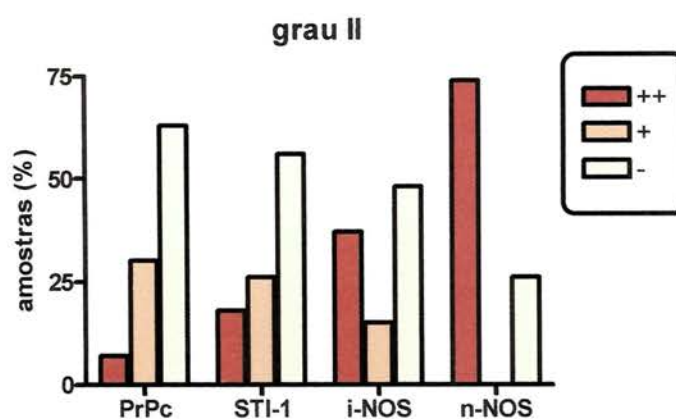


Figura 5 - Distribuição dos escores encontrados para a expressão das proteínas PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS nos astrocitomas grau II analisados.

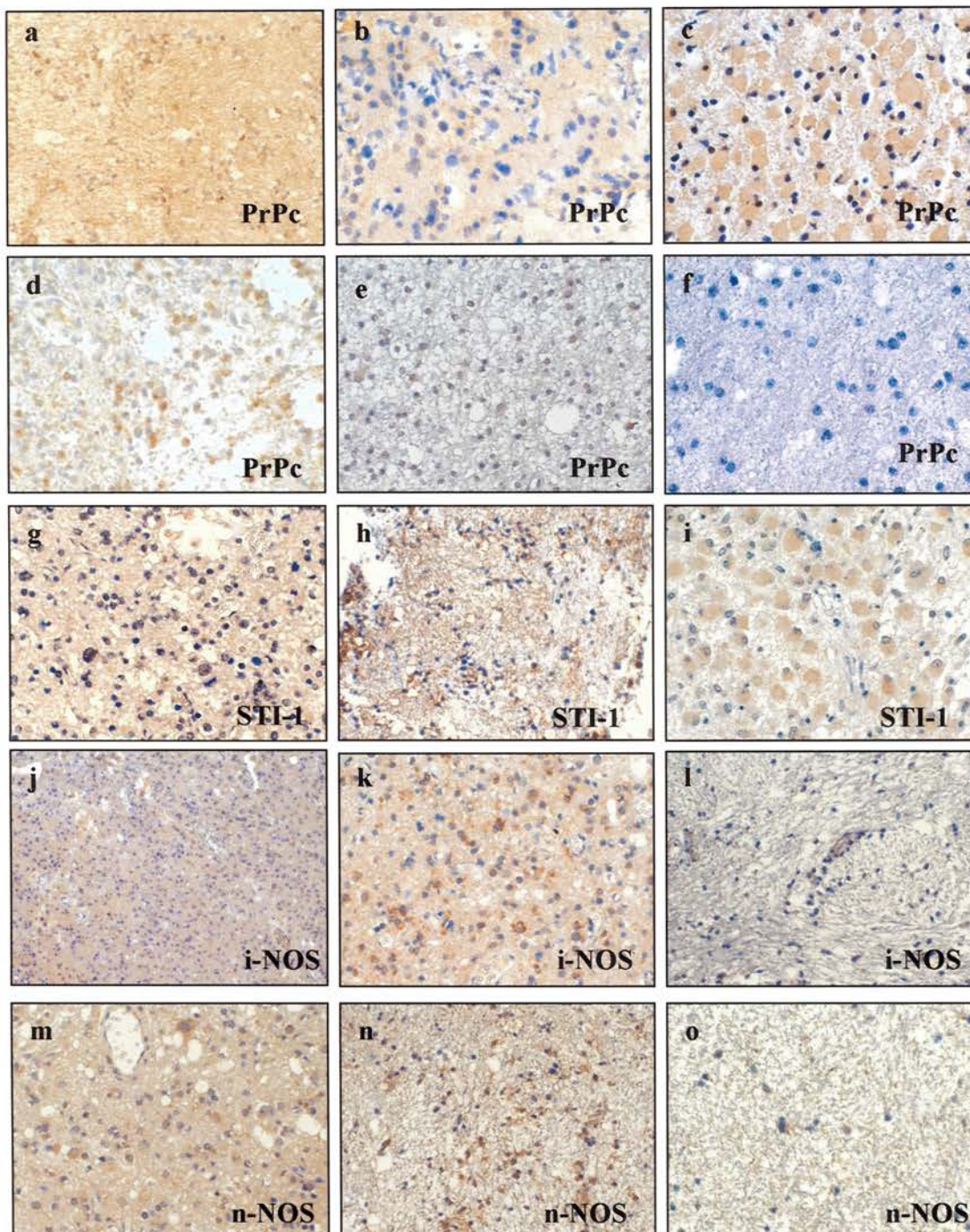


Figura 6 - Fotomicrografias representativas das expressões de PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS demonstradas por imunohistoquímica em Astrocitomas grau II. **a** = positividade difusa (++) para PrPc na matriz tumoral, aumento de 200X, **b** = positividade difusa (++) para PrPc, aumento de 600X, **c** = gemistocitos positivos para PrPc, aumento de 400X, **d** = positividade moderada (+) para PrPc com marcação em células reativas, aumento de 400X, **e** = reação fraca para PrPc em algumas células e negativa na matriz tumoral, aumento de 200X, **f** = reação negativa para PrPc, aumento de 600X; **g** = reação positiva difusa (++) para STI-1, aumento de 400X, **h** = reação positiva em algumas células (+) para STI-1, aumento de 200X, **i** = gemistocitos positivos para STI-1, aumento de 400X; **j** = reação difusa (++) para i-NOS, aumento de 100X, **k** = positivo difuso (++) e em algumas células reativas para i-NOS, aumento de 400X, **l** = reação negativa para i-NOS, aumento de 200X; **m** = reação positiva difusa e no citoplasma de algumas células para n-NOS (++) , aumento de 400X, **n** = positiva para n-NOS em algumas células, aumento de 200X, **o** = reação considerada negativa para n-NOS, aumento de 200X.

A figura 7 mostra a distribuição da expressão de PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS nos astrocitomas grau III e a figura 8 as fotomicrografias representativas das reações imunoistoquímicas.

A proteína PrPc mostrou uma expressão forte na maioria das células tumorais (figuras 8a e 8b) em 2 (15,4%) dos casos, uma positividade moderada (figura 8d e 8e) em 2 (15,4%) e ausente (figura 8f) em 9 (69,2%) dos casos (tabela 11).

Por sua vez, a coloração da proteína STI-1 nestes tumores mostrou positividade forte na maioria das células (figura 8 g) em 4 (30,7%), moderada (figura 8h) em 2 (15,4%) e ausente em 7 (53,9%).

A expressão da proteína i-NOS mostrou positividade forte na maioria das células (figuras 8j) em 7 (53,8%) dos astrocitomas grau III, moderada (figuras 8k) em 1 (7,7%) dos casos e ausente (figuras 8l) em 5 (38,5%).

A proteína n-NOS mostrou expressão forte em 7 (53,8%) amostras analisadas (figura 8m), moderada (figura 8n) em 1 (7,7%) e ausente (figura 8o) em 5 (38,5%) dos astrocitomas grau III.

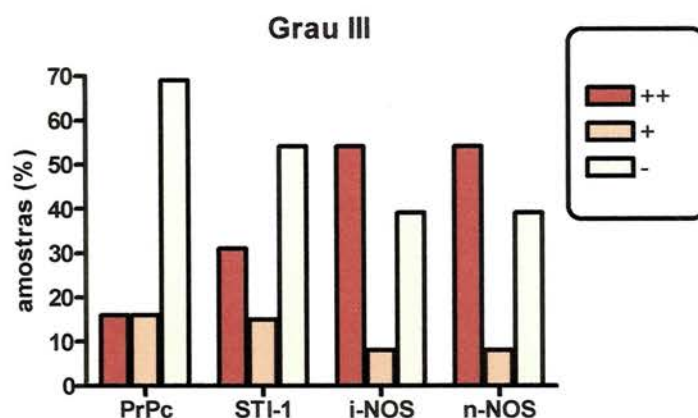


Figura 7 - Distribuição dos escores encontrados para a expressão das proteínas PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS nos astrocitomas grau III analisados.

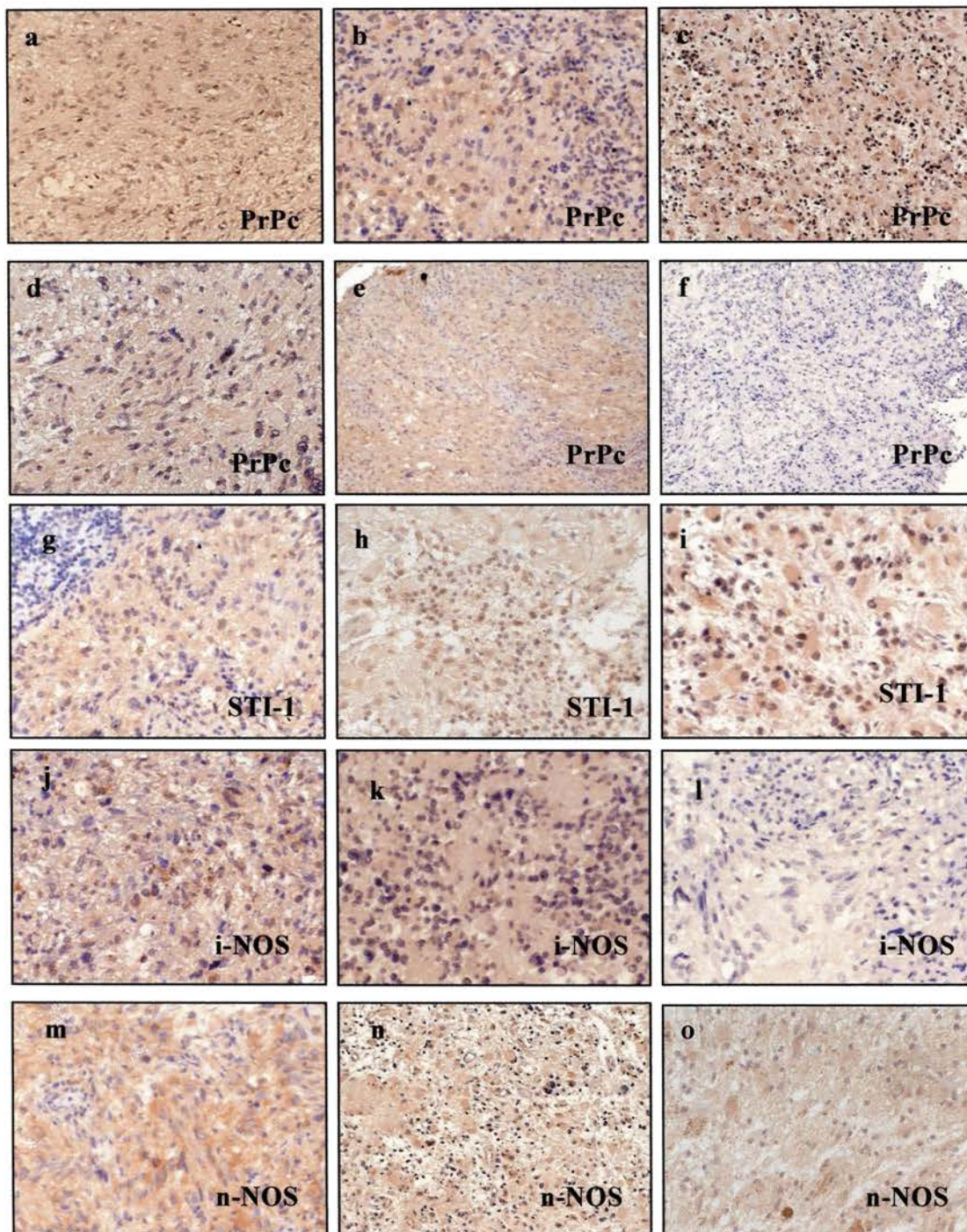


Figura 8 - Fotomicrografias representativas das expressões de PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS demonstradas por imunistoquímica em Astrocitomas grau III. **a** = positividade difusa (++) e em algumas células reativas para PrPc, aumento de 200X, **b** = positivo (++) para PrPc em algumas células tumorais, aumento de 400X, **c** = gemistocitos positivos para PrPc, aumento de 100X, **d** = reação difusa moderada (+) para PrPc, aumento de 400X, **e** = algumas áreas mostrando positividade fraca difusa (+) para PrPc, aumento de 100X, **f** = reação negativa para PrPc, aumento de 100X; **g** = reação positiva difusa (++) para STI-1, aumento 400X, **h** = reação difusa fraca (+) para STI-1, aumento 200X, **i** = gemistocitos positivos para STI-1, aumento 400X; **j** = reação forte (++) para i-NOS em algumas células, aumento de 400X, **k** = reação difusa para i-NOS (+), aumento de 400X, **l** = reação considerada negativa para i-NOS, aumento de 200X; **m** = reação difusa forte (++) para n-NOS, aumento 200X, **n** = gemistocitos positivos e áreas com positividade difusa (+) para n-NOS, aumento de 100X, **o** = reação considerada negativa para n-NOS, aumento de 200X.

A figura 9 mostra a distribuição da expressão de PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS nos astrocitomas grau IV e a figura 10 as fotomicrografias representativas das reações imunohistoquímicas. Pudemos verificar uma expressão da proteína PrPc forte no citoplasma da maioria das células tumorais (figuras 10a - d) em 28 (56,0%), comparados a uma positividade moderada (figura 10f) em 11 (22,0%) e ausente em 11 (22,0%) dos casos (tabela 11). Células gigantes mostraram-se negativas (figura 10e), enquanto células da microglia reativa e áreas de necrose se mostraram positivas.

A expressão da proteína STI-1 mostrou positividade forte na maioria das células em 18 (36,0%) dos glioblastomas (figura 10g), observamos uma positividade moderada (figura 10h) em 18 (36,0%) dos casos e a proteína estava ausente (figura 10i) em 14 deles (36,0%).

A expressão da proteína i-NOS mostrou positividade forte na maioria das células (figura 10j) em 21 (42,0%) dos glioblastomas, moderada (figura 10k) em 11 (22,0%) e ausente em 18 (36,0%) das amostras analisadas.

A expressão da proteína n-NOS mostrou positividade forte na maioria das células (figura 10m) em 35 (70,0%), moderada (figura 10n) em 12 (24,0%) e ausente em 3 (6,0%) dos glioblastomas. Células gigantes mostraram-se positivas para i-NOS e para n-NOS (figuras 10l e 10o).

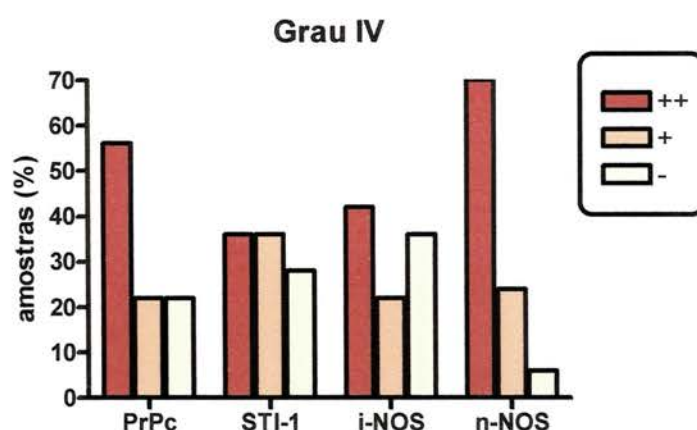


Figura 9 - Distribuição dos escores encontrados para a expressão das proteínas PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS nos astrocitomas grau IV analisados.

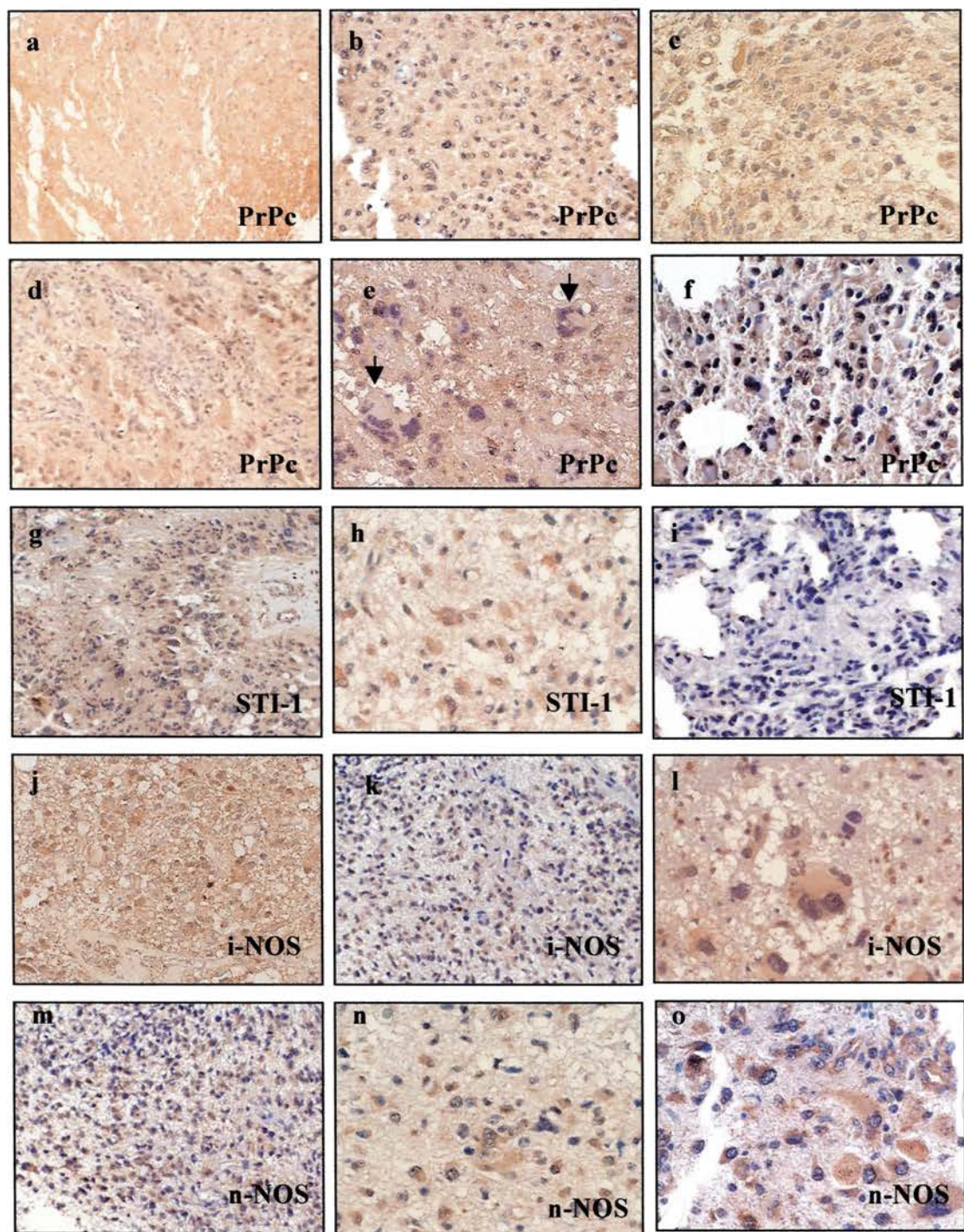


Figura 10 - Fotomicrografias representativas das expressões de PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS demonstradas por imunistoquímica em Glioblastomas. **a** = reação difusa forte para PrPc (++) , aumento de 100X, **b** = reação positiva difusa forte e no citoplasma de algumas células (++) , aumento de 200X, **c** = reação positiva para PrPc na maioria das células (++) , aumento de 400X, **d** = difusa para PrPc (++) , aumento de 200X, **e** = células gigantes com reação negativa para PrPc (setas), aumento de 600X, **f** = positiva (+) para PrPc no citoplasma de algumas células, aumento de 600X; **g** = reação positiva forte (++) para STI-1 no citoplasma de algumas células, aumento de 200X, **h** = reação moderada difusa (+) para STI-1, aumento de 400X, **i** = reação negativa para STI-1, aumento de 200X; **j** = reação difusa forte (++) para i-NOS, aumento de 200X, **k** = reação positiva para i-NOS em algumas células (+), aumento de 100X , **l** = células gigantes positivas para i-NOS, aumento de 600X; **m** = reação positiva para n-NOS no citoplasma de algumas células (++) , aumento de 100X, **n** = reação positiva (+) para n-NOS em algumas células, aumento de 400X, **o** = células gigantes positivas para n-NOS, aumento de 600X.

Analisando os resultados excluindo aqueles obtidos nos astrocitomas pilocíticos, por serem estes tumores de características não infiltrativas e por não evoluírem para os graus mais elevados, os resultados da expressão das proteínas PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS nos demais astrocitomas podem ser vistos na tabela 12, onde analisamos os resultados obtidos nos astrocitomas graus II e III agrupados e nos glioblastomas, quanto a expressão comparada a apresentada pelo astrócito normal. Desta maneira, podemos ver que a expressão de PrPc está aumentada em 56,0% dos glioblastomas e diminuída em 22,0% destes, enquanto 10,0% das amostras graus II e III mostraram expressão aumentada e 65,0% tiveram a expressão diminuída, diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$, teste exato de Fisher) para um aumento de expressão em glioblastomas e diminuição em astrocitomas de baixo grau.

Para STI-1 a expressão mostrou-se aumentada em 36,0% das amostras de glioblastomas e diminuída em 55,0% das amostras de astrocitomas graus II e III, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p = 0,034$, teste exato de Fisher).

A expressão de i-NOS apresentou-se aumentada em 55,0% das amostras de astrocitomas grau II e III e em 68,0% dos glioblastomas, diferença estatisticamente não significativa ($p = 0,132$, teste exato de Fisher).

A expressão de n-NOS mostrou-se aumentada em 67,5% das amostras grau II e III e diminuída em 30,0% delas, enquanto que nos glioblastomas esta expressão apresentou-se aumentada em 70,0% das amostras e diminuída em 6,0% delas, diferença estatisticamente significativa ($p = 0,006$, teste exato de Fisher).

Estes dados mostram que a expressão de PrPc está aumentada na maioria dos glioblastomas e diminuída nos astrocitomas graus II e III. STI-1 tem expressão diminuída na maioria dos astrocitomas graus II e III e tanto i-NOS como n-NOS têm sua expressão aumentada na maioria dos astrocitomas graus II, III e glioblastomas.

Tabela 12- Distribuição da expressão das proteínas PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS nos astrocitomas em relação a expressão do astrócito normal, separados pelos graus de malignidade.

Astrocitomas	PrPc				STI-1			i-NOS		n-NOS						
	N (%)	maior N (%)	igual N (%)	menor N (%)	<i>P</i> *	maior N (%)	igual N (%)	menor N (%)	<i>P</i> *	maior N (%)	igual N (%)	menor N (%)	<i>P</i> *			
Graus II, III	40 (44,4)	4 (10,0)	10 (25,0)	26 (65,0)	<0,001	9 (22,5)	9 (22,5)	22 (55,0)	0,034	22 (55,0)	18 (45,0)	0,132	27 (67,5)	1 (2,5)	12 (30,0)	0,006
Glioblastoma	50 (55,6)	28 (56,0)	11 (22,0)	11 (22,0)		18 (36,0)	18 (36,0)	14 (28,0)		32 (68,0)	18 (32,0)		35 (70,0)	12 (24,0)	3 (6,0)	
Total	90 (100,0)	32 (35,6)	21 (23,3)	37 (41,1)		27 (30,0)	27 (30,0)	36 (40,0)		54 (60,0)	36 (40,0)		62 (68,9)	13 (14,4)	15 (16,7)	

*Teste exato de Fisher

**Maior = expressão aumentada quando comparada com a observada em astrócitos normais; Igual = mesma expressão da visualizada no astrócito normal; Menor = expressão diminuída quando comparada a observada em astrócitos normais.

4.4.3 Expressão das proteínas PrPc, STI-1, iNOS e nNOS em outros tumores - *tissue micro array* (TMA)

Conduzimos ensaios de *tissue micro array* (TMA) para avaliar as proteínas de interesse em uma maior variedade de tumores. O número de amostras de cada tipo tumoral estudado foi pequena (25) e nosso objetivo não foi uma avaliação com significado estatístico, mas sim um projeto piloto para a observação do comportamento destas proteínas nestes tumores para uma abordagem posterior com número de amostras adequado.

Nos vários tumores estudados pelo TMA observamos algumas perdas teciduais que ocorreram durante o procedimento imunoistoquímico, que foram contornadas, na maioria dos casos, pela leitura de 2 lâminas com duplicata de amostras. Neste estudo as perdas teciduais foram mínimas e as expressões se mostraram compatíveis com as obtidas em cortes tradicionais, comparação feita nos casos de carcinoma ductal invasivo de mama e tecidos normais de mama. Houve perda de um mesmo tumor nos dois pontos do TMA nos grupos de adenocarcinoma de próstata e em neuroblastoma e nossa amostragem ficou em 24 tecidos para a análise destes dois tipos tumorais. As amostras em duplicata, por serem de regiões diferentes do bloco inicial e pela heterogeneidade própria dos tumores, por vezes não coincidiam nos resultados imunoistoquímicos, o que foi contornado pelo uso de uma média dos escores obtidos individualmente em cada uma das lâminas.

A análise de todos os tumores pode ser vista na tabela 13, enquanto que nas tabelas em anexo (Anexo 5) podem ser visualizados os demais dados de cada amostra avaliada, bem como os escores encontrados para a expressão de cada uma das proteínas analisadas em cada uma das amostras.

Tabela 13- Distribuição da reatividade imunohistoquímica de PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS nos tumores analisados no *tissue microarray* (TMA).

TMA	N	PrPc			STI-1			i-NOS			n-NOS		
		++	+	-	++	+	-	++	+	-	++	+	-
		N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
SNC	4	4 (100,0)	0 (0)	0 (0)	4 (100,0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0(0)	4 (100,0)	4 (100,0)	0 (0)	0 (0)
Neuroblastoma	24*	16 (66,7)	8 (33,3)	0 (0)	10 (41,6)	13 (54,2)	1 (4,2)	11 (45,8)	0 (0)	13 (54,2)	2 (8,3)	22 (91,7)	0 (0)
Retina	4	0 (0)	4 (100,0)	0 (0)	4 (100,0)	0 (0,0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (100,0)	0 (0)	4 (100,0)	0 (0)
Retinoblastoma	25	20 (80,0)	4 (16,0)	1 (4,0)	13 (52,0)	9 (36,0)	3 (12,0)	0 (0)	0 (0)	25 (100,0)	0 (0)	19 (76,0)	6 (24,0)
Tumor Carcinóide	25	13 (52,0)	8 (32,0)	4 (16,0)	12 (48,0)	9 (36,0)	4 (16,0)	2 (8,0)	12 (48,0)	11 (44,0)	18 (72,0)	0 (0)	7 (28,0)
Mama	4	0 (0)	0 (0)	4 (100,0)	4 (100,0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 ^c (100,0)	0 (0)	4 ^d (100,0)	0 (0)
Carcinoma ductal invasivo de mama	25	25 (100,0)	0 (0)	0 (0)	13 (52,0)	5 (20,0)	7 (28,0)	18 (72,0)	6 (24,0)	1 (4,0)	25 (100,0)	0 (0)	0 (0)
Pâncreas	4	4 (100,0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (100,0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (100,0)	4 (100,0)	0 (0)	0 (0)
Adenocarcinoma de pâncreas	24*	7 (29,2)	15 (62,5)	2 (8,3)	6 (25,0)	17 (70,8)	1 (4,2)	10 (41,7)	14 (58,3)	0 (0)	24 (100,0)	0 (0)	0 (0)
Próstata	4	4 (100,0)	0 (0)	0 (0)	4 (100,0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (100,0)	4 (100,0)	0 (0)	0 (0)
Adenocarcinoma de próstata	25	25 (100,0)	0 (0)	0 (0)	25 (100,0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (4,0)	24 (96,0)	25 (100,0)	0 (0)	0 (0)
Pele	5	0 (0)	5 (100,0)	0 (0)	0 (0)	5 (100,0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	5 (100,0)	5 (100,0)	0 (0)	0 (0)
Melanoma	25	3 (12,0)	14 (56,0)	8 (32,0)	11 (44,0)	12 (48,0)	2 (8,0)	10 (40,0)	0 (0)	15 (60,0)	0 (0)	16 (64,0)	9 (36,0)
Carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço	25	5 (20,0)	18 (72,0)	2 (8,0)	14 (56,0)	10 (40,0)	1 (4,0)	11 (44,0)	1 (4,0)	13 (52,0)	2 (8,0)	23 (92,0)	0 (0)

* = um tumor foi perdido durante a preparação.

Neuroblastoma

Para a análise da expressão das proteínas estudadas usamos os tecidos normais do sistema nervoso já usados na análise dos astrocitomas, além das amostras de SNC constantes do TMA, verificando a expressão das proteínas nos neurônios. A figura 11 mostra a distribuição da expressão de PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS nos neuroblastomas estudados em comparação com a expressão observada nos neurônios normais e a figura 12 mostra algumas fotomicrografias representativas das reações imunoistoquímicas.

As proteínas PrPc, STI-1 e n-NOS mostraram uma coloração forte nestas células, enquanto não foi verificada marcação por i-NOS (figuras 12 a, 12d, 12g e 12j).

Para a proteína PrPc a marcação nos tumores foi forte (figura 12b) em 16 (66,7%) e moderada (figura 12c) em 8 (33,3%) das amostras. Para STI-1 esta coloração foi forte (figura 12e) em 10 (41,6%), moderada (figura 12f) em 13 (54,2%) e ausente em 1 (4,2%) dos tumores (tabela 13).

Para i-NOS a reação foi forte (figura 12h) em 11 (45,8%) e negativa (figura 12i) em 13 (54,2%) dos casos. Para n-NOS a reação mostrou-se fortemente positiva (figura 12k) em 2 (8,3%) e moderada (figura 12-l) em 22 (91,7%) dos casos.

As expressões de PrPc, STI-1 e n-NOS parecem diminuir nos tumores quando comparadas ao tecido normal, enquanto que i-NOS que mostrou-se ausente nos neurônios normais, passa a ser expressa em cerca de 50% dos neuroblastomas.

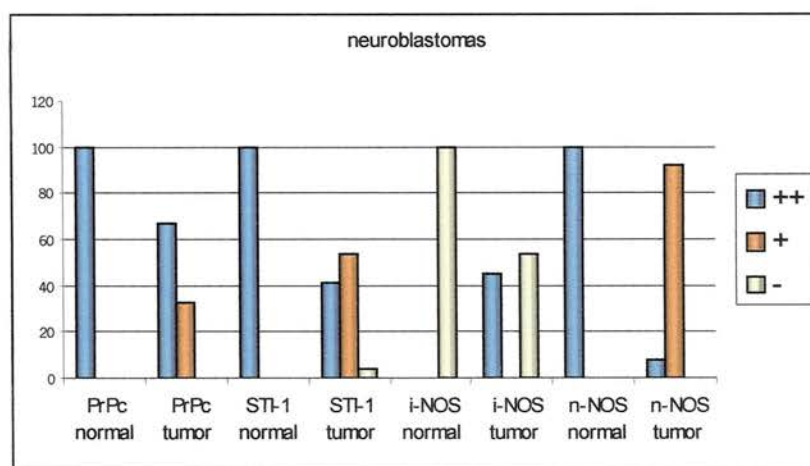


Figura 11 - Distribuição da expressão das proteínas estudadas encontrada nos neuroblastomas e nos neurônios normais.

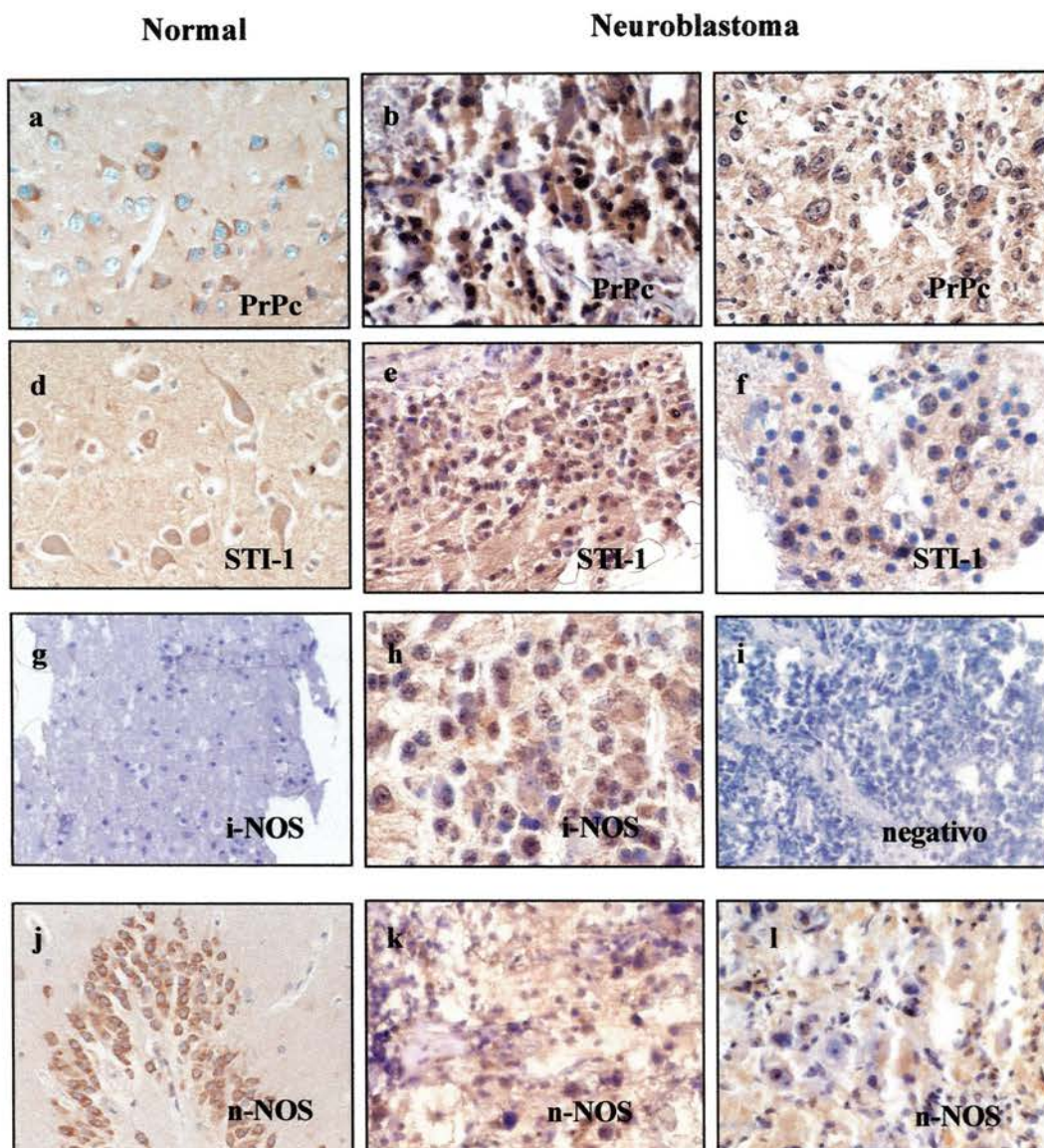


Figura 12 - Imunoistoquímica para PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS em amostras de neuroblastoma. **a** = cérebro humano mostrando neurônios fortemente corados nos citoplasma e prolongamentos por PrPc, aumento de 600X; **b** = neuroblastoma com reação fortemente positiva para PrPc em todas as células, aumento de 400X; **c** = reação moderadamente positiva, aumento de 600X; **d** = cérebro humano mostrando neurônios fortemente corados por STI-1, aumento de 600X; **e** = neuroblastoma com reação positiva em todas as células para STI-1, aumento de 400X; **f** = neuroblastoma com reação positiva em algumas células para STI-1, aumento de 600X; **g** = cérebro humano mostrando neurônios com reação negativa para i-NOS, aumento de 100X; **h** = neuroblastoma mostrando reação positiva para i-NOS, aumento de 600X; **i** = neuroblastoma mostrando reação negativa para i-NOS, aumento de 400X; **j** = hipocampo humano com reação positiva forte para n-NOS, aumento de 400X; **k** = neuroblastoma com reação positiva forte para n-NOS, aumento de 400X; **l** = neuroblastoma com reação moderadamente positiva para n-NOS, aumento de 400X.

Os tumores foram separados em dois grupos de acordo com a classificação histológica, separando os descritos como bem diferenciados e grau I, sem infiltração ou metástases, dos outros tipos e com infiltração e/ou metástases em linfonodos ou a distância (tabela 14).

Observamos que 80% das amostras sem metástases apresentam forte expressão de PrPc, enquanto que este número diminui para 57,1% nos neuroblastomas com invasão ou metástases. Por outro lado, parece não haver diferença na expressão de STI-1, i-NOS e n-NOS entre os tumores com e sem metástases.

Apesar da pequena quantidade de amostras, esta diminuição de expressão de PrPc em amostras com metástases mostrou-se estatisticamente significativa ($p=0,0007$, teste exato de Fisher).

Tabela 14 - Distribuição da expressão de PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS nos neuroblastomas com e sem metástases.

Neuroblastoma		PrPc			STI-1			i-NOS			n-NOS		
		++	+	-	++	+	-	++	+	-	++	+	-
N (%)		N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
Sem metástases	10 (41,7)	8 (80,0)	2 (20,0)	0 (0)	4 (40,0)	6 (60,0)	0 (0)	5 (50,0)	0 (0)	5 (50,0)	1 (10,0)	9 (90,0)	0 (0)
Com invasão ou metástases	14 (58,3)	8 (57,1)	6 (42,9)	0 (0)	6 (42,9)	7 (50,0)	1 (7,1)	6 (42,9)	0 (0)	8 (57,1)	1 (7,1)	13 (92,9)	0 (0)

Retinoblastoma

A figura 13 mostra a distribuição da expressão de PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS nos retinoblastomas estudados em comparação com a expressão observada na retina normal e a figura 14 mostra algumas fotomicrografias representativas das reações imunoistoquímicas.

Na análise da retina normal pudemos verificar uma expressão moderada da proteína PrPc nas células neuronais e em células da epiderme (figura 14a). Na análise dos tecidos tumorais verificamos que PrPc tem coloração forte (figuras 14b e 8c) em 20 (80,0%) dos tumores analisados, mostra coloração moderada (figura 14f) em 4 (16,0%) e ausente em 1 (4,0%) .

Para STI-1 a expressão na retina normal foi forte (figura 14g) e esta continuou forte (figura 14h) em 13 (52,0%), mostrou-se moderada (figura 14i) em 9 (36,0%) e ausente em 3 (12,0%) dos tumores (tabela 13).

Para i-NOS a reação mostrou-se negativa na retina normal e nos tumores (figuras 14d e 14e). Para n-NOS a positividade foi moderada na retina normal (figura 14j) e em 19 (76,0%) dos retinoblastomas (figura 14k) e ausente (figura 14l) em 6 (24,0%) dos tumores.

A expressão de PrPc mostrou-se aumentada quando comparado ao tecido normal, enquanto STI-1 diminui nos tumores. A expressão de i-NOS e n-NOS não parece estar alterada nos retinoblastomas em comparação a expressão na retina normal.

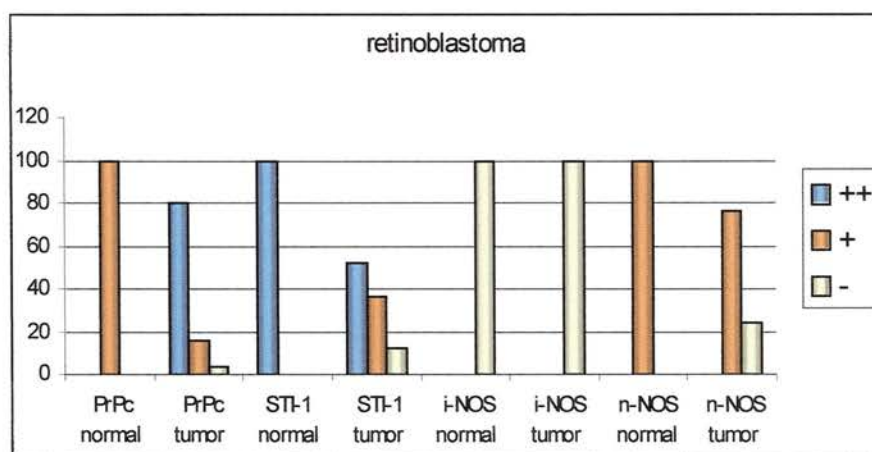


Figura 13 - Distribuição da expressão das proteínas estudadas observada nos retinoblastomas e na retina normal.

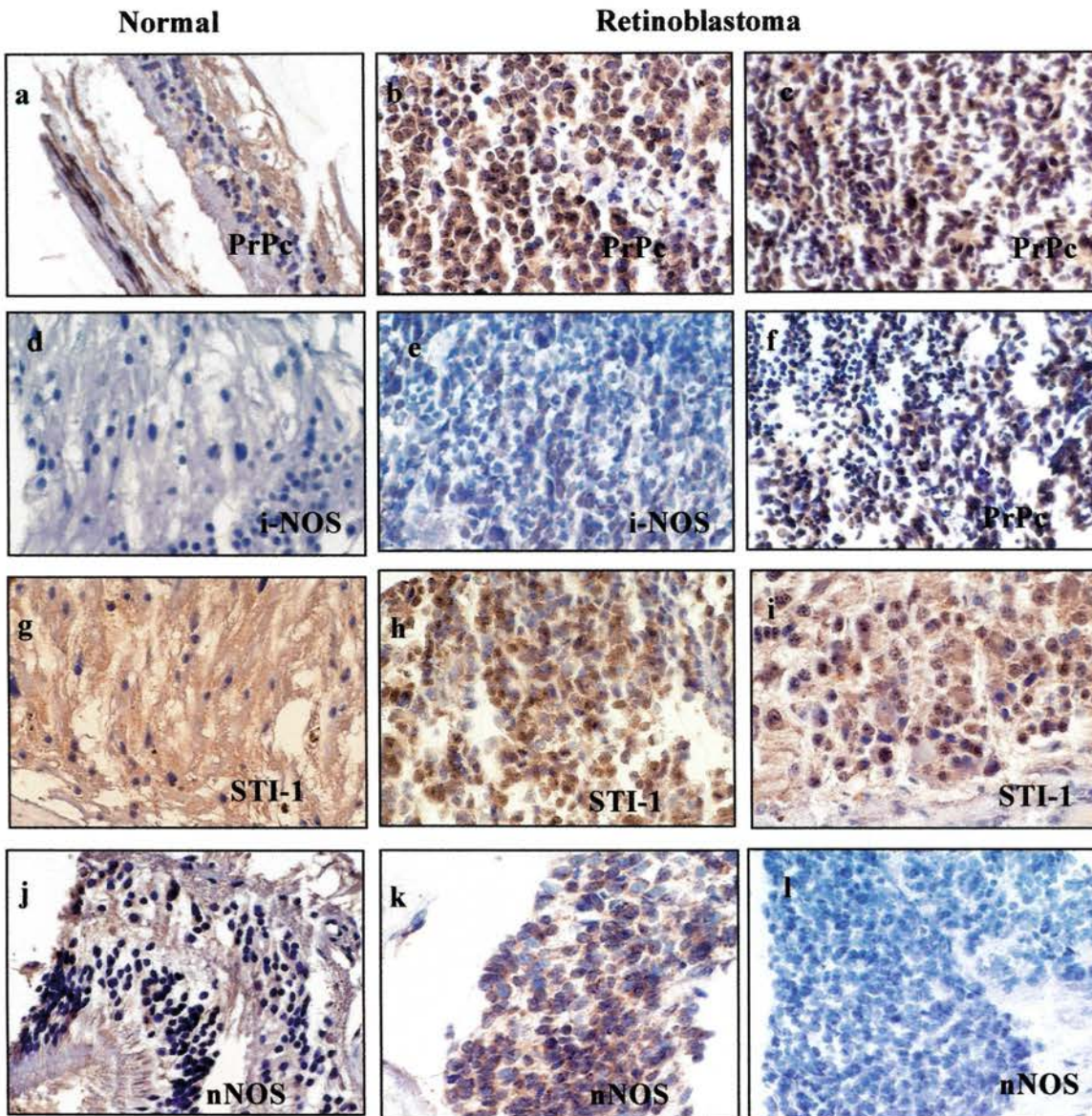


Figura 14 - Imunoistoquímica para PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS em amostras de retina e retinoblastoma. **a** = retina normal com reação positiva moderada para PrPc, aumento de 400X, **b** = retinoblastoma com reação positiva forte para PrPc, aumento de 400X, **c** = retinoblastoma com reação positiva para PrPc, aumento de 200X; **d** = retina mostrando reação negativa para i-NOS, aumento de 400X; **e** = retinoblastoma com reação negativa para i-NOS, aumento de 400X; **f** = retinoblastoma com reação moderada para PrPc, aumento de 200X; **g** = retina mostrando reação positiva para STI-1, aumento de 400X; **h** = retinoblastoma mostrando reação positiva forte para STI-1, aumento de 200X; **i** = retinoblastoma com reação moderada para STI-1, positiva em algumas células, aumento de 400X; **j** = retina normal com reação moderadamente positiva para n-NOS, aumento de 200X; **k** = retinoblastoma com reação positiva para n-NOS, aumento de 400X; **l** = retinoblastoma com reação negativa para n-NOS, aumento de 400X.

Analizamos os tumores separados pelo grau de diferenciação histológica, portanto retinoblastomas bem diferenciados, moderadamente diferenciados e pouco diferenciados. Os casos foram ainda divididos nos que apresentavam invasão de tecidos vizinhos ou não (Tabela 15).

Verificando a expressão de PrPc nos 6 retinoblastomas bem diferenciados vemos positividade forte em 5 (83,3%) e moderada em 1 (16,7%). A coloração de STI-1 foi fortemente positiva em 4 (66,7%) e moderadamente positiva em 2 (33,3%). Já para n-NOS a reação foi moderadamente positiva em todos os casos. Nos 11 retinoblastomas moderadamente diferenciados temos forte expressão de PrPc em 8 (72,7%), expressão moderada em 2 (18,2%) e ausente em 1 (9,1%). Para STI-1 6 (54,5%) se mostraram fortemente positivos, 3 (27,3%) moderadamente positivos e 2 (18,2%) negativos. Para n-NOS a coloração foi moderada em 8 (72,7%) e ausente em 3 (27,2%). Nas 8 amostras de retinoblastomas pouco diferenciado 7 (87,5%) se mostraram fortemente positivos e 1 (12,5%) moderadamente positivo para PrPc; 3 (37,5%) se mostraram fortemente positivos, 4 (50,0%) moderadamente positivos e 1 (12,5%) negativos para STI-1; para n-NOS 5 (62,5%) amostras se mostraram moderadamente positivas e 3 (37,5%) mostraram-se negativas.

Quando comparados ao tecido normal, o aumento de expressão de PrPc nos tumores não parece estar associado ao grau de diferenciação. Com relação a STI-1, uma aparente diminuição com relação ao tecido normal está presente, correlacionando-se com a menor diferenciação.

Das 12 amostras que no relatório histopatológico eram descritas como não infiltrando tecidos vizinhos, 10 (83,4%) eram fortemente positivas, 1 (8,3%) era moderadamente positiva e 1 (8,3%) era negativa para PrPc; 5 (41,7%) eram fortemente positivas, 6 (50,0%) eram moderadamente positivas e 1 (8,3%) era negativa para STI-1; e 9 (75,0%) eram fortemente positivas e 3 (25,0%) negativas para n-NOS. Das 13 amostras que apresentavam infiltração de tecidos vizinhos, 10 (76,9%) mostraram reação forte e 3 (23,1%) moderada para PrPc; 8 (61,5%) forte, 3 (23,1%) moderada e 2 (15,4%) negativas para STI-1; e 10 (76,9%) forte e 3 (23,1%) negativas para n-NOS.

Portanto, parece não haver relação entre a expressão de PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS e a invasão tumoral nos retinoblastomas.

Tabela 15 - Distribuição da expressão de PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS nos retinoblastomas separados pelo grau de diferenciação tumoral ou invasão.

Retinoblastoma	N (%)	PrPc			STI-1				i-NOS				n-NOS		
		++ N (%)	+ N (%)	- N (%)	++ N (%)	+ (%)	N N (%)	- N (%)	++ N (%)	+ (%)	N N (%)	- N (%)	++ N (%)	+ N (%)	- N (%)
Bem diferenciado	6 (24,0)	5 (83,3)	1(16,7)	0 (0)	4 (66,7)	2 (33,3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	6 (100,0)	0 (0)	6 (100,0)	0 (0)		
Moderadamente diferenciado	11 (44,0)	8 (72,7)	2 (18,2)	1 (9,1)	6 (54,5)	3 (27,3)	2 (18,2)	0 (0)	0 (0)	11 (100,0)	0 (0)	8 (72,7)	3 (27,2)		
Pouco diferenciado	8 (32,0)	7 (87,5)	1 (12,5)	0 (0)	3 (37,5)	4 (50,0)	1 (12,5)	0 (0)	0 (0)	8 (100,0)	0 (0)	5 (62,5)	3 (37,5)		
Sem invasão	12 (48,0)	10 (83,4)	1 (8,3)	1 (8,3)	5 (41,7)	6 (50,0)	1 (8,3)	0 (0)	0 (0)	12 (100,0)	0 (0)	9 (75,0)	3 (25,0)		
Com invasão	13 (52,0)	10 (76,9)	3 (23,1)	0 (0)	8 (61,5)	3 (23,1)	2 (15,4)	0 (0)	0 (0)	13 (100,0)	0 (0)	10 (76,9)	3 (23,1)		

Tumor Carcinóide

A expressão da proteína PrPc mostrou uma marcação forte (figura 15a) em 13 tumores (52,0%), moderada (figura 15b) em 8 (32,0%) e negativa em 4 (16,0%) (figura 15c). STI-1 apresentou expressão forte (figura 15d) em 12 (48,0%), moderada em 9 (36,0%) e ausente (figura 15e) em 4 (16,0%) (figura 15f) (tabela 13). Para i-NOS a reação foi forte (figura 15g) em 2 (8,0%), moderada (figura 15h) em 12 (48,0%) e negativa (figura 15i) em 11 (44,0%). Para n-NOS a reação se mostrou fortemente positiva (figuras 15j e 15k) em 18 (72,0%) e negativa em 7 (28,0%) dos casos.

Como pode-se observar na figura 16, os tumores carcinóides parecem ter uma distribuição semelhante das proteínas PrPc e STI-1, que estão bastante expressas na maioria dos tumores, enquanto i-NOS tem expressão moderada e n-NOS é fortemente expressa na maioria deles.

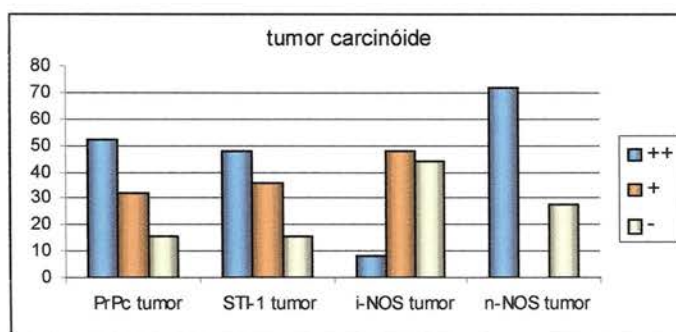


Figura 16 - Distribuição da expressão das proteínas estudadas observada nos tumores carcinóides.

Em uma análise separando-se os tumores carcinóides com e sem metástases em linfonodos ou invasão perineural e angiolinfática (tabela 16), tivemos uma reação positiva forte para PrPc em 2 (33,3%) dos 6 tumores carcinóides que apresentavam metástase ou infiltração, 3 (50,0%) com reação moderada e 1 (16,7%) com reação negativa. Neste mesmo grupo, a proteína STI-1 mostrou positividade forte em 3 (50,0%), moderada em 2 (33,3%) e ausente em 1 (16,7%). A proteína i-NOS mostrou reação moderada em 4 (66,7%) e ausente em 2 (33,3%) dos casos e n-NOS teve forte positividade em 4 (66,7%) e mostrou-se negativa em 2 (33,3%) das amostras do grupo. Avaliando estes dados, parece haver uma diminuição de expressão de PrPc e i-NOS em processos de metástase e invasão. As outras proteínas parecem não correlacionar-se com este processo.

Carcinóide

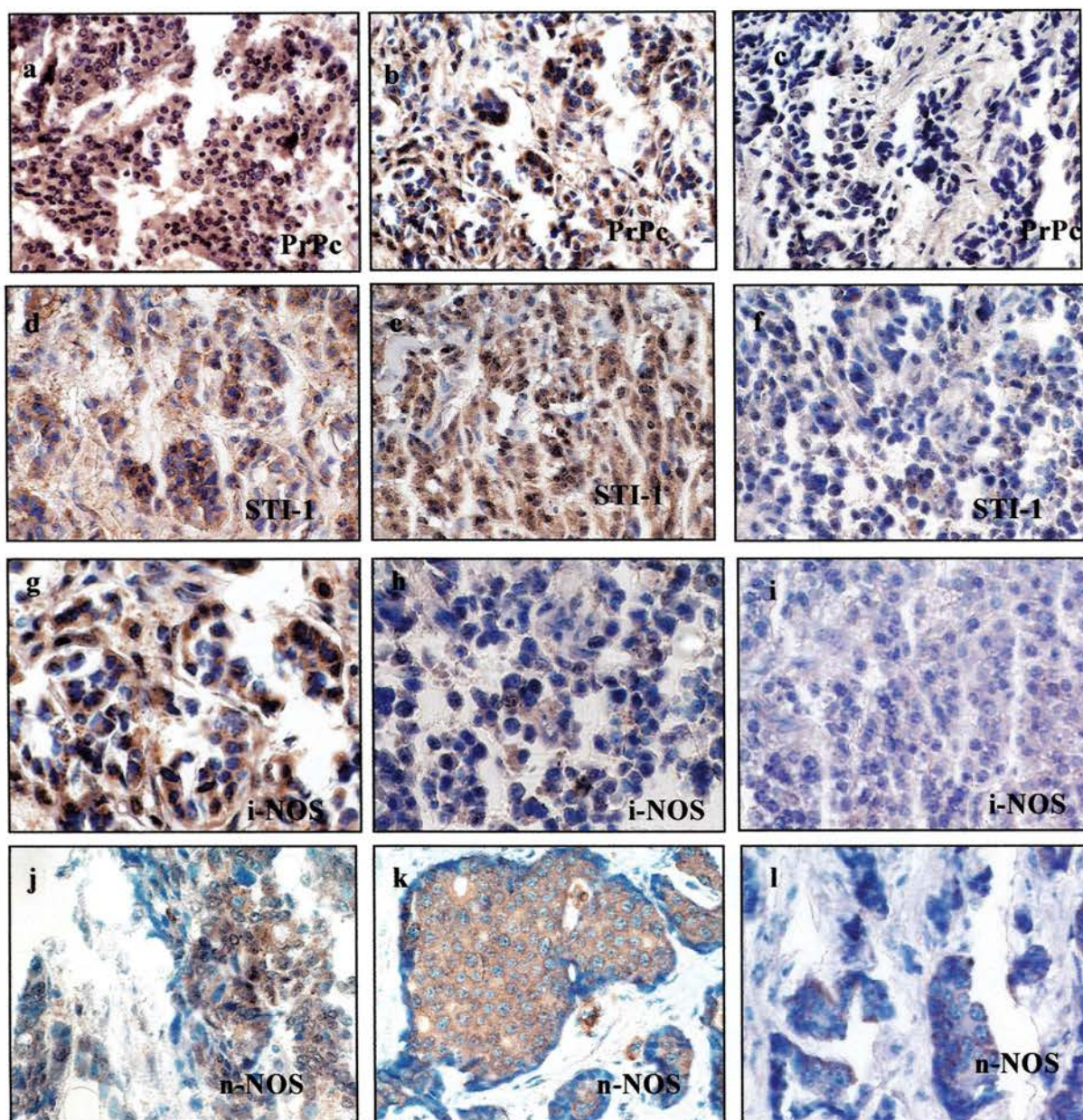


Figura 15 - Imunoistoquímica para PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS em amostras de tumor carcinóide. **a** = corte de tumor carcinóide com reação positiva forte para PrPc, aumento de 200X; **b** = tumor carcinóide com reação moderadamente positiva para PrPc, aumento de 400X; **c** = tumor carcinóide mostrando reação considerada negativa para PrPc, aumento de 400X; **d** = tumor carcinóide com reação positiva forte para STI-1, mostrando aspecto acinar do tumor, aumento de 400X; **e** = tumor carcinóide com reação positiva moderada para STI-1, aumento de 200X; **f** = tumor carcinóide mostrando reação considerada negativa para STI-1, aumento de 400X; **g** = reação positiva forte para i-NOS, aumento de 600X; **h** = tumor carcinóide mostrando reação positiva para i-NOS em algumas células, aumento de 400X; **i** = reação negativa para i-NOS, aumento de 400X; **j** = reação positiva para n-NOS, aumento de 400X; **k** = reação positiva forte para n-NOS em células tumorais de aspecto acinar, aumento de 400X; **l** = reação negativa para n-NOS, aumento de 400X.

Tabela 16 - Distribuição da expressão de PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS em tumores carcinóides quanto a ausência e presença de metástase.

Tumor Carcinóide	N (%)	PrPc			STI-1			i-NOS			n-NOS		
		++	+	-	++	+	-	++	+	-	++	+	-
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
Sem metástase	19 (76,0)	11 (57,9)	5 (26,3)	3 (15,8)	9 (47,4)	7 (36,8)	3 (15,8)	2 (10,5)	8 (42,1)	9 (47,4)	14 (73,7)	0 (0)	5 (26,3)
Com metástase ou invasão	6 (24,0)	2 (33,3)	3 (50,0)	1 (16,7)	3 (50,0)	2 (33,3)	1 (16,7)	0 (0)	4 (66,7)	2 (33,3)	4 (66,7)	0 (0)	2 (33,3)

Carcinoma ductal invasivo de mama

Na análise dos tecidos de mama normal podemos verificar uma ausência de coloração da proteína PrPc nas células dos ductos (figura 17a). Já nos carcinomas todos os 25 (100%) casos analisados mostraram-se fortemente positivos no citoplasma das células tumorais (figuras 17 b e 17c) (tabela 13).

A expressão da proteína STI-1 mostrou positividade forte nas células ductais da mama normal (figura 17d), sendo que em 13 (52,0%) dos tumores a maioria das células também se mostrava fortemente positiva (figuras 17e e 17f), em 5 (20,0%) mostraram coloração moderada e em 7 (28,0%) se mostrou negativa.

A expressão da proteína i-NOS mostrou-se negativa nas células ductais normais (figuras 17g), em contraste com a positividade forte na maioria das células tumorais (figura 17h) em 18 (72,0%) das amostras positividade moderada (figura 17i) em 6 (24,0%) e ausente em 1 (4,0%) dos tumores analisados. A expressão da proteína n-NOS mostrou positividade forte na maioria das células (figuras 17k), em todos os 25 (100,0%) tumores analisados, em contraste com a coloração moderada na mama normal (figura 17j).

Podemos observar na figura 18 que tanto PrPc quanto n-NOS, que mostravam-se negativas nas amostras normais, tiveram uma alta expressão em todos os tumores avaliados. i-NOS também teve sua expressão aumentada nos tumores enquanto STI-1 diminuiu em cerca de 50% deles, em relação ao normal.

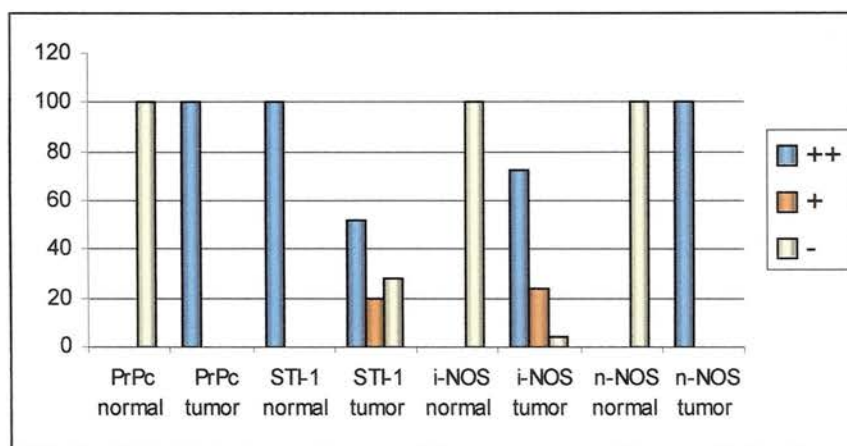


Figura 18 - Distribuição da expressão das proteínas estudadas observada em carcinomas ductais invasivos de mama e tecido mamário normal.

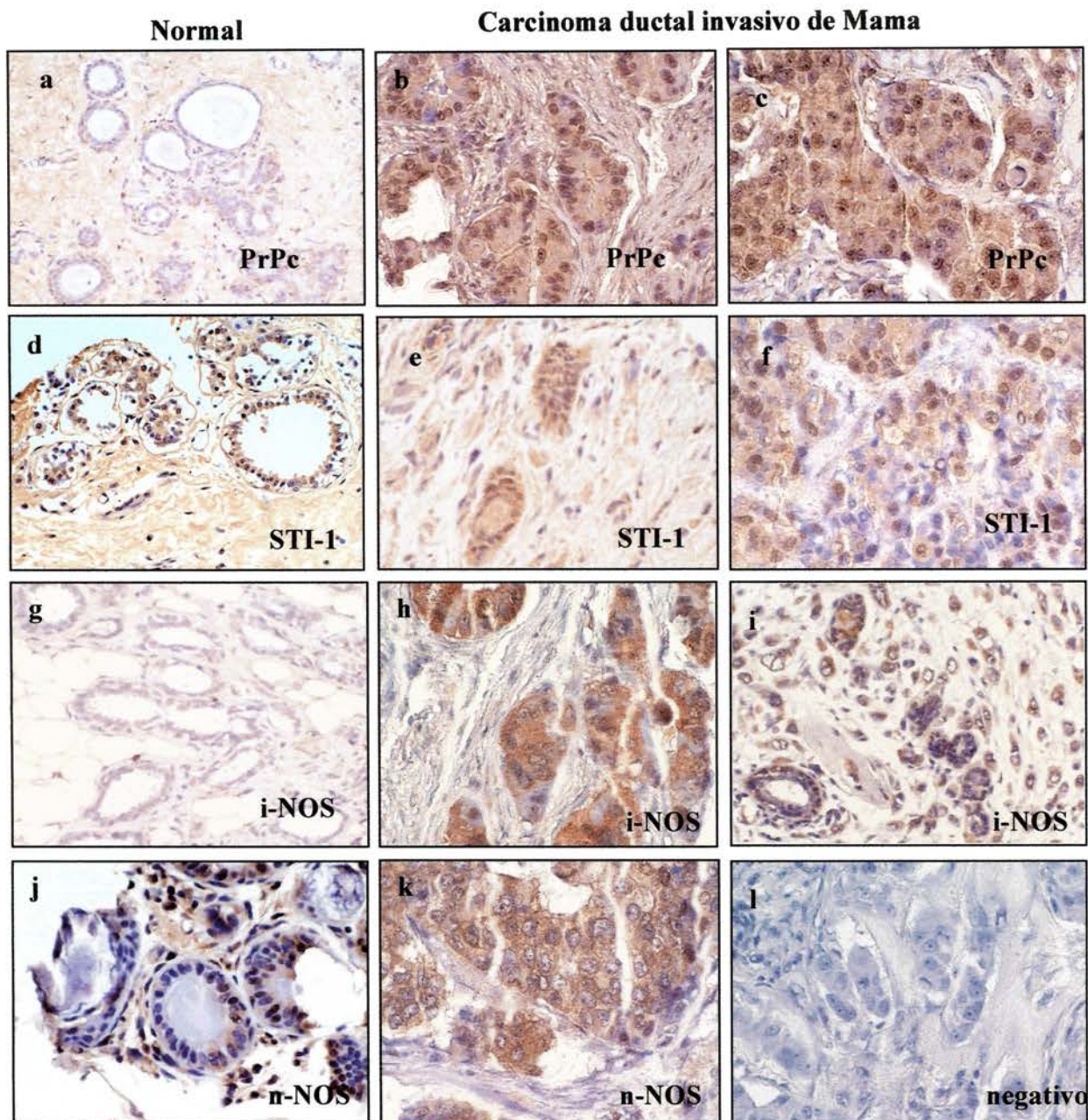


Figura 17 - Imunoistoquímica para PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS em amostras de tecido mamário normal e carcinoma ductal invasivo de mama. **a** = mama normal com reação negativa para PrPc nos ductos, aumento de 400X; **b, c** = carcinoma com reação fortemente positiva para PrPc, aumentos de 400X; **d** = mama normal com reação positiva forte para STI-1, aumento de 100X; **e** = carcinoma mostrando reação positiva forte para STI-1, aumento de 200X; **f** = carcinoma mostrando reação positiva forte para STI-1, aumentos de 400X; **g** = mama normal com reação negativa para i-NOS, aumento de 400X; **h** = carcinoma mostrando reação positiva para i-NOS, aumentos de 400X; **i** = carcinoma mostrando reação positiva moderada para i-NOS, aumentos de 100X; **j** = mama normal com reação positiva moderada para n-NOS, aumento de 600X; **k** = carcinoma com reação positiva forte para n-NOS, aumentos de 400X; **l** = carcinoma mostrando reação negativa (controle), aumento de 400X.

Quando os resultados da expressão das proteínas foi avaliado em função do estadio (grau I, II e III) descrito no relatório histopatológico, pudemos observar que a proteína PrPc é expressa em todos os graus histológicos do carcinoma ductal invasivo de mama, juntamente com n-NOS (tabela 17).

A proteína STI-1 mostrou que a positividade forte foi encontrada em 1 (50,0%) dos de grau I, 9 (52,9%) dos de grau II e 3 (50,0%) dos de grau III. A positividade estava diminuída com relação ao normal, mas ainda presente em 1 (50,0%) dos tumores grau I, 2 (11,8%) dos de grau II e 2 (33,3%) dos de grau III. A proteína STI-1 estava ausente em 6 (35,3%) dos tumores grau II e 1 (16,7%) dos de grau III.

A proteína i-Nos mostrou forte coloração em 2 (100,0%) das amostras de grau I, 13 (76,5%) das de grau II e 3 (50,0%) das de grau III. A coloração foi moderada em 4 (23,5%) das amostras de grau II e 2 (33,3%) das de grau III. Apenas 1 (16,7%) amostra de grau III mostrou-se negativa para a marcação com a proteína.

Portanto, parece não haver uma relação entre o grau histológico e a expressão das quatro proteínas analisadas.

Tabela 17 - Distribuição da expressão de PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS quanto ao grau histológico dos carcinomas ductais invasivos de mama.

Carcinoma ductal invasivo de mama	PrPc			STI-1			i-NOS			n-NOS			
		++	+	-	++	+	-	++	+	-	++	+	-
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
Grau I	2 (8,0)	2 (100,0)	0 (0)	0 (0)	1 (50,0)	1 (50,0)	0 (0)	2 (100,0)	0 (0)	0 (0)	2 (100,0)	0 (0)	0 (0)
Grau II	17 (68,0)	17 (100,0)	0 (0)	0 (0)	9 (52,9)	2 (11,8)	6 (35,3)	13 (76,5)	4 (23,5)	0 (0)	17 (100,0)	0 (0)	0 (0)
Grau III	6 (24,0)	6 (100,0)	0 (0)	0 (0)	3 (50,0)	2 (33,3)	1 (16,7)	3 (50,0)	2 (33,3)	1 (16,7)	6 (100,0)	0 (0)	0 (0)

Adenocarcinoma de Pâncreas

A figura 19 mostra a distribuição da expressão de PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS nos adenocarcinomas estudados em comparação com a expressão observada no tecido pancreático normal e a figura 20 mostra algumas fotomicrografias representativas das reações imunoistoquímicas.

Na análise do tecido normal pudemos verificar uma coloração forte da proteína PrPc nas células acinares dos ductos pancreáticos, mostrando uma positividade citoplasmática (figura 20a). Na análise dos tecidos tumorais verificamos que PrPc continua com coloração forte e mais acentuada na região perinuclear (figuras 20b e 20c) em 7 (29,2%) dos tumores analisados, mostra coloração moderada em 15 (62,5%) e ausente em 2 (8,3%) (tabela 13).

A proteína STI-1 mostrou, no tecido normal, uma positividade moderada (figura 20d). Nos tecidos tumorais a coloração foi forte e na mesma localização perinuclear (figuras 20e e 20f) vista com PrPc em 6 (25,0%) dos casos, manteve-se moderada em 17 (70,8%) e se mostrou ausente em 1 (4,2%) deles. A proteína i-NOS mostrou-se negativa nos tecidos normais (figura 20g) e fortemente positiva (figuras 20h e 20i) em 10 (41,7%) e moderadamente positiva em 14 (58,3%) das amostras analisadas. n-NOS mostrou-se fortemente positiva em todas as amostras normais (figuras 20j) e nas amostras tumorais (figura 20k).

A expressão de PrPc diminui na maioria dos tumores, enquanto STI-1 e i-NOS aumentam e n-NOS fica inalterado.

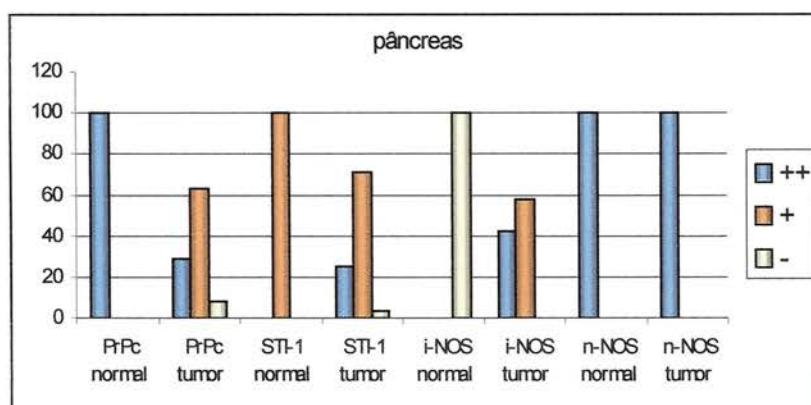


Figura 19 - Distribuição da expressão das proteínas estudadas observada nos adenocarcinomas de pâncreas e no tecido pancreático normal.

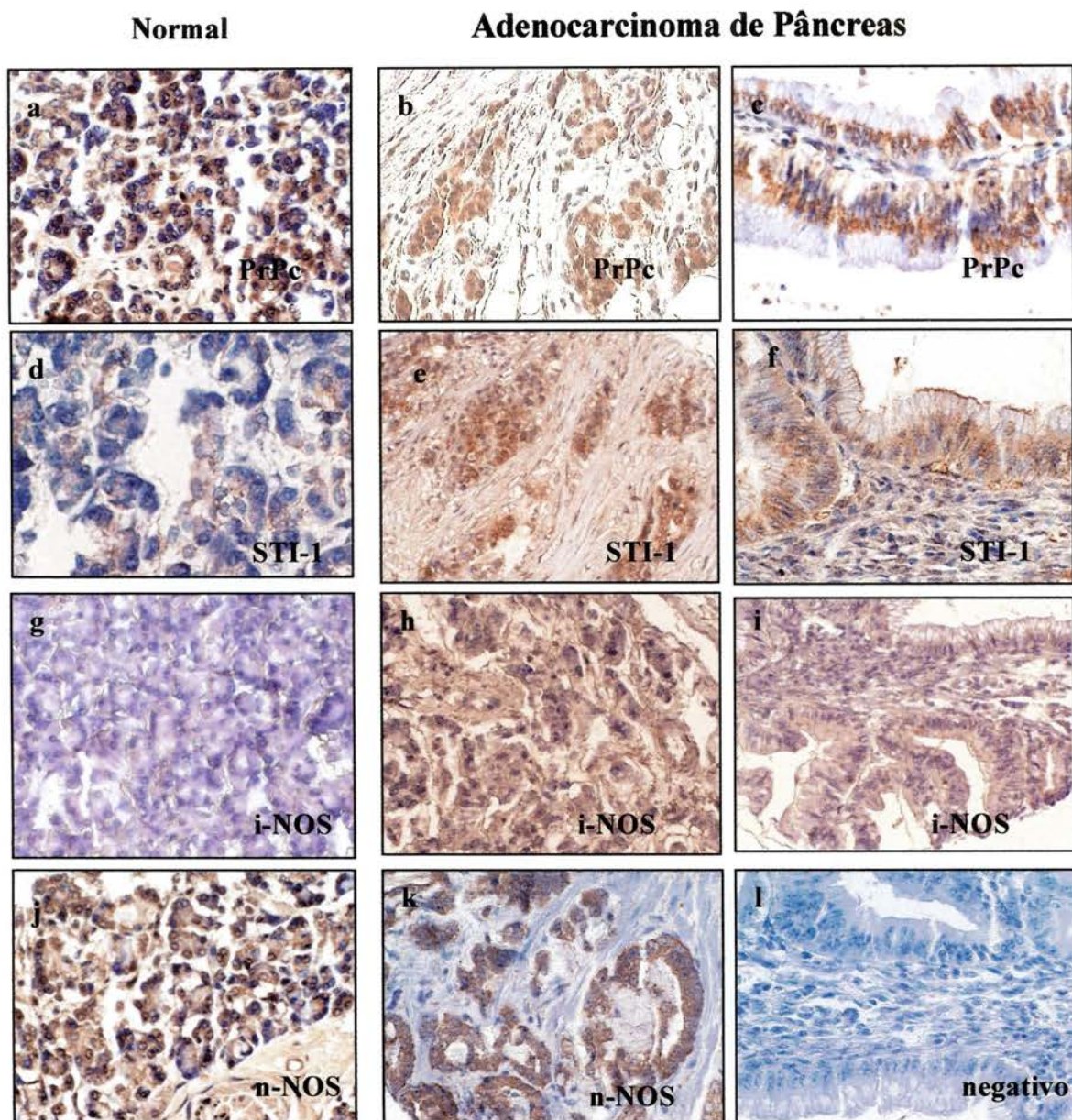


Figura 20 - Imunoistoquímica para PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS em amostras de pâncreas e adenocarcinoma de pâncreas. **a** = pâncreas normal com reação positiva para PrPc, aumento de 200X; **b** = adenocarcinoma com reação positiva para PrPc, aumento de 200X; **c** = adenocarcinoma com reação positiva forte para PrPc, mostrando padrão perinuclear, aumento de 600X; **d** = pâncreas normal mostrando reação positiva para STI-1, aumento de 400X; **e** = adenocarcinoma com reação positiva forte para STI-1, aumento de 200X; **f** = adenocarcinoma mostrando reação positiva para STI-1 perinuclear, aumento de 600X; **g** = pâncreas normal mostrando reação negativa para i-NOS, aumento de 200X; **h, i** = adenocarcinoma com reação positiva para i-NOS, aumentos de 200X e 400X; **j** = pâncreas normal com reação positiva para n-NOS, aumento de 200X; **k** = adenocarcinoma com reação positiva para n-NOS, aumento de 200X; **l** = adenocarcinoma com reação negativa, aumento de 600X.

Para analisar os resultados pelo grau de diferenciação histológica, os adenocarcinomas de pâncreas foram separados pela descrição do relatório histopatológico, em bem diferenciados, moderadamente diferenciados e pouco diferenciados, além de outra separação dos casos naqueles que apresentavam infiltração de tecidos vizinhos e metástases em linfonodos ou não (Tabela 18).

Analisando a expressão de PrPc nos 6 adenocarcinomas bem diferenciados vemos positividade forte em 1 (16,7%), moderada em 4 (66,6%) e ausente em 1 (16,7%). A expressão de STI-1 foi encontrada nas mesmas proporções. Já i-NOS se mostrou fortemente positiva em 4 (66,6%) e moderadamente positiva em 2 (33,4%). Nos 13 adenocarcinomas moderadamente diferenciados temos forte coloração de PrPc em 6 (46,2%), coloração moderada em 6 (46,2%) e ausente em 1 (7,8%). Para STI-1 5(38,5%) se mostraram fortemente positivos e 8 (61,5%) moderadamente positivos. Para i-NOS a expressão foi forte em 4 (30,8%) e moderada em 9 (69,2%). Nas 5 amostras de adenocarcinoma pouco diferenciado temos todas as amostras com expressão moderada para PrPc e STI-1. Para i-NOS 2 (40,0%) amostras se mostraram fortemente positivas e 3 (60,0%) moderadamente positivas. Nestes tumores a expressão das proteínas estudadas parece não ter correlação com o grau de diferenciação tumoral.

Das 10 amostras que no relatório histopatológico eram descritas como não infiltrando tecidos vizinhos, 6 (60,0%) eram moderadamente positivas para PrPc, 7 (70,0%) eram moderadamente positivas para STI-1 e 7 (70,0%) eram fortemente positivas para i-NOS. Das 6 amostras que apresentavam infiltração de tecidos vizinhos, 1 (16,7%) mostrou reação forte, 4 (66,6%) moderada e 1 (16,7%) ausente para PrPc; 1 (16,7%) forte e 5 (83,3%) moderadas para STI-1; e 1 (16,7%) forte e 5 (83,3%) moderadas para i-NOS. Das 8 amostras descritas com metástases em linfonodos, 2 (25,0%) apresentaram reação forte, 5 (62,5%) moderada e 1 (12,5%) reação ausente para PrPc; 2 (25,0%) reação forte, 5 (62,5%) moderada e 1 (12,5%) ausente para STI-1 e para i-NOS a reação se mostrou forte em 2 (25,0%) e moderada em 6 (75,0%) das amostras. Nestes tumores a expressão de PrPc aparece diminuída em um maior número de casos com invasão e metástase.

Tabela 18 - Distribuição da expressão de PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS nos adenocarcinomas de pâncreas de acordo com o grau de diferenciação tumoral e a metástases.

Adenocarcinoma de pâncreas		PrPc			STI-1			i-NOS			n-NOS		
		++ N (%)	+ N (%)	- N (%)	++ N (%)	+ N (%)	- N (%)	++ N (%)	+ N (%)	- N (%)	++ N (%)	+ N (%)	- N (%)
Bem diferenciado	6 (25,0)	1 (16,7)	4 (66,6)	1 (16,7)	1 (16,7)	4 (66,6)	1 (16,7)	4 (66,6)	2 (33,4)	0 (0)	6 (100,0)	0 (0)	0 (0)
Moderadamente diferenciado	13 (54,2)	6 (46,2)	6 (46,2)	1 (7,6)	5 (38,5)	8 (61,5)	0 (0)	4 (30,8)	9 (69,2)	0 (0)	13 (100,0)	0 (0)	0 (0)
Pouco diferenciado	5 (20,8)	0 (0)	5 (100,0)	0 (0)	0 (0)	5 (100,0)	0 (0)	2 (40,0)	3 (60,0)	0 (0)	5 (100,0)	0 (0)	0 (0)
Sem invasão	10 (41,7)	4 (40,0)	6 (60,0)	0 (0)	3 (30,0)	7 (70,0)	0 (0)	7 (70,0)	3 (30,0)	0 (0)	10 (100,0)	0 (0)	0 (0)
Com invasão	6 (25,0)	1 (16,7)	4 (66,6)	1 (16,7)	1 (16,7)	5 (83,3)	0 (0)	1 (16,7)	5 (83,3)	0 (0)	6 (100,0)	0 (0)	0 (0)
Com metástase	8 (33,3)	2 (25,0)	5 (62,5)	1 (12,5)	2 (25,0)	5 (62,5)	1 (12,5)	2 (25,0)	6 (75,0)	0 (0)	8 (100,0)	0 (0)	0 (0)

Adenocarcinoma de Próstata

A figura 21 mostra a distribuição da expressão de PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS nos adenocarcinomas de próstata estudados em comparação com a expressão observada na próstata normal e a figura 22 mostra algumas fotomicrografias representativas das reações imunoistoquímicas.

Na análise dos tecidos de próstata normal podemos verificar uma expressão forte da proteína PrPc nas células dos ductos, mostrando uma positividade citoplasmática e mais acentuada na região perinuclear (figuras 22 a). Nos carcinomas analisados todos os 25 (100%) se mostraram fortemente positivos nas células tumorais (figuras 22b e 22c) (tabela 13). O mesmo aconteceu com a proteína STI-1 (figuras 22d, 22e e 22f) e n-NOS (figuras 22j, 22k e 22l). A proteína i-NOS mostrou-se negativa nas células normais (figura 22g) e manteve a negatividade em 24 (96,0%) dos tumores analisados (figura 22h). Somente 1 (4,0%) dos tumores (Gleason 7) mostrou coloração moderada de i-NOS (tabela 19).

A expressão das quatro proteínas analisadas foi semelhante tanto nos tecidos normais como nos tumores, portanto não houve diferenças de positividade entre os tumores com diferentes níveis de Gleason, mostrando que a expressão destas proteínas não está alterada nos adenocarcinomas de próstata.

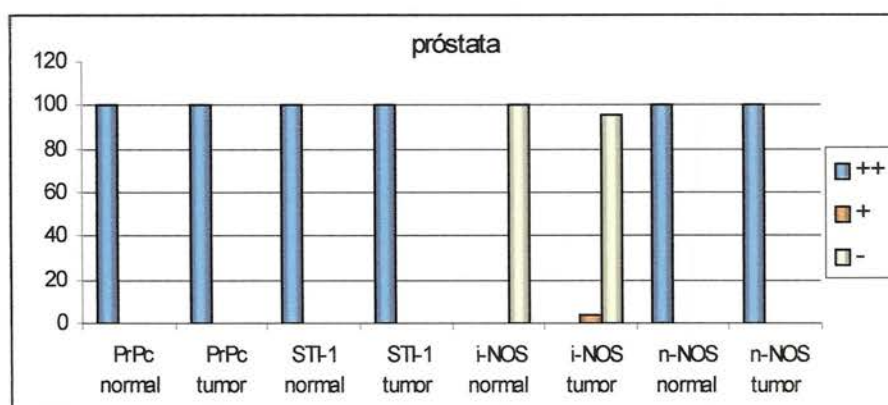


Figura 21 - Distribuição da expressão das proteínas estudadas observada nos adenocarcinomas de próstata e no tecido prostático normal.

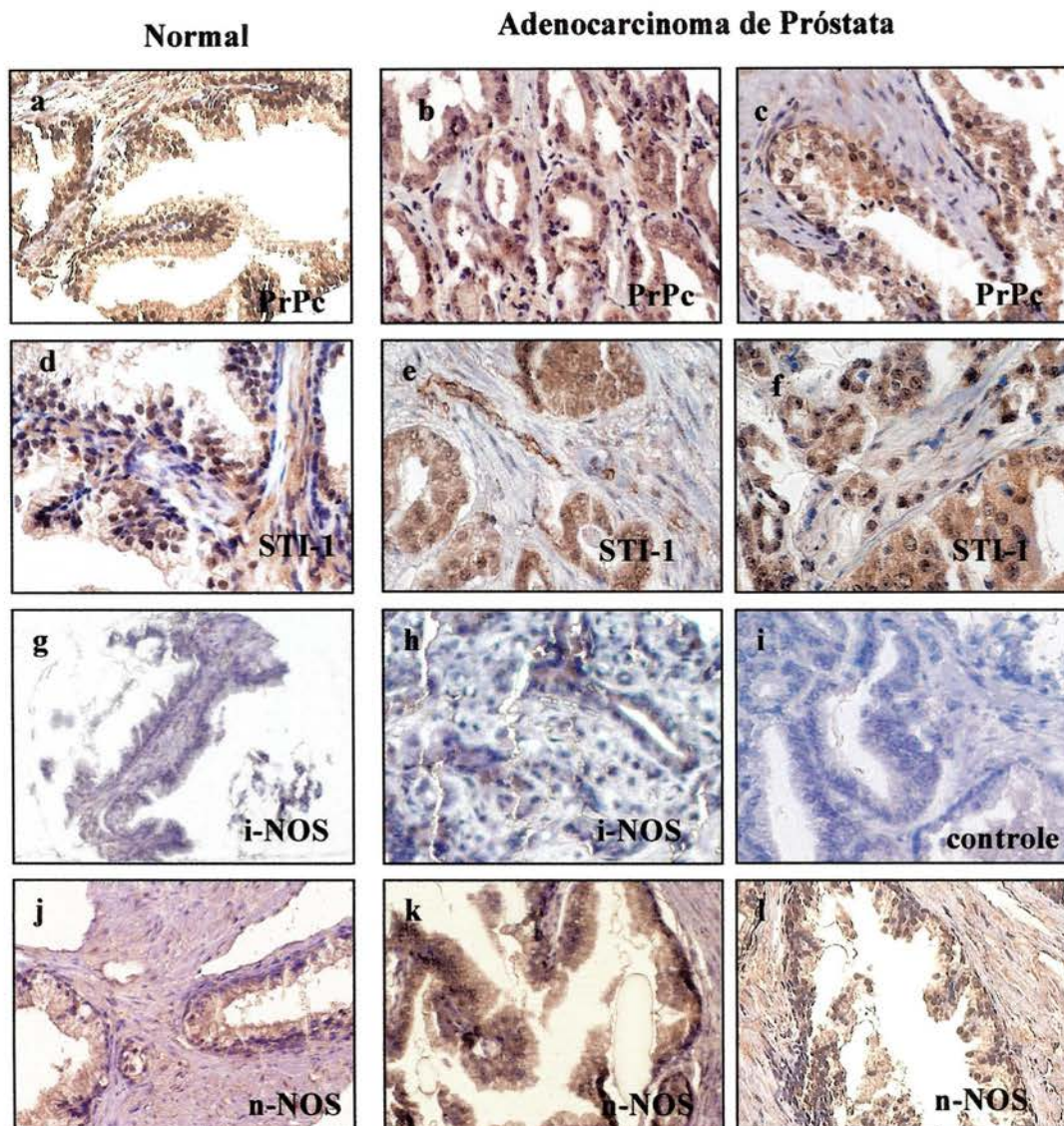


Figura 22 - Imunoistoquímica para PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS em amostras de próstata e adenocarcinoma de próstata. **a** = próstata normal com reação positiva forte para PrPc, aumento de 200X; **b, c** = adenocarcinoma com reação fortemente positiva para PrPc, aumentos de 200X; **d** = próstata normal com reação positiva para STI-1, aumento de 400X; **e** = adenocarcinoma com reação fortemente positiva para STI-1, aumento de 400X; **f** = adenocarcinoma mostrando reação positiva para STI-1, aumento de 400X; **g** = próstata normal com reação negativa para i-NOS, aumento de 100X; **h** = adenocarcinoma com reação negativa para i-NOS, aumento de 200X; **i** = controle negativo da reação, aumento de 400X; **j** = próstata normal com reação positiva para n-NOS, aumento de 200X; **k** = adenocarcinoma com reação fortemente positiva para n-NOS, aumento de 200X; **l** = adenocarcinoma mostrando reação positiva para n-NOS, aumento de 200X.

Tabela 19- Distribuição da expressão de PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS nos adenocarcinomas de próstata separados pela classificação de Gleason,.

Adenocarcinoma de próstata		PrPc			STI-1			i-NOS			n-NOS		
		++ N (%)	+ N (%)	- N (%)	++ N (%)	+ N (%)	- N (%)	++ N (%)	+ N (%)	- N (%)	++ N (%)	+ N (%)	- N (%)
Gleason	N (%)												
2-6	10 (40,0)	10 (100,0)	0 (0)	0 (0)	10 (100,0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	10 (100,0)	10 (100,0)	0 (0)	0 (0)
7	12 (48,0)	12 (100,0)	0 (0)	0 (0)	12 (100,0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (8,3)	11 (91,7)	12 (100,0)	0 (0)	0 (0)
8-10	3 (12,0)	3 (100,0)	0 (0)	0 (0)	3 (100,0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (100,0)	3 (100,0)	0 (0)	0 (0)

Melanoma

A figura 23 mostra a distribuição da expressão de PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS nos melanomas estudados em comparação com a expressão observada nos melanócitos normais e a figura 24 mostra algumas fotomicrografias representativas das reações imunohistoquímicas.

Na análise da pele normal pudemos verificar uma expressão moderada da proteína PrPc nas células do epitélio mostrando também uma positividade moderada nos melanócitos (figura 24a). Na análise dos tecidos tumorais verificamos que PrPc apresentou expressão forte (figura 24 b) em 3 (12,0%), moderada (figura 24c) em 14 (56,0%) e ausente em 8 (32,0%) dos tumores analisados (tabela 13).

Para STI-1 a pele mostrou também uma positividade moderada (figura 24d) e esta coloração nos melanomas foi forte (figura 24e e 24f) em 11 (44,0%), moderada em 12 (48,0%) e ausente em 2 (8,0%).

Para i-NOS a reação mostrou-se negativa na pele normal (figura 24g) enquanto fortemente positiva (figuras 24h e 24i) em 10 (40,0%) e negativa em 15 (60,0%) dos melanomas. Para n-NOS a reação mostrou-se fortemente positiva na pele normal (figura 24j), moderadamente positiva em 16 (64,0%) dos tumores (figura 24k) e negativa em 9 (36,0%) dos casos.

Como podemos observar PrPc apresentou uma expressão variável nestes tumores, STI-1 mostrou um aumento de expressão em quase metade dos casos, acompanhado de i-NOS, enquanto n-NOS teve uma diminuição de expressão em todos os casos estudados.

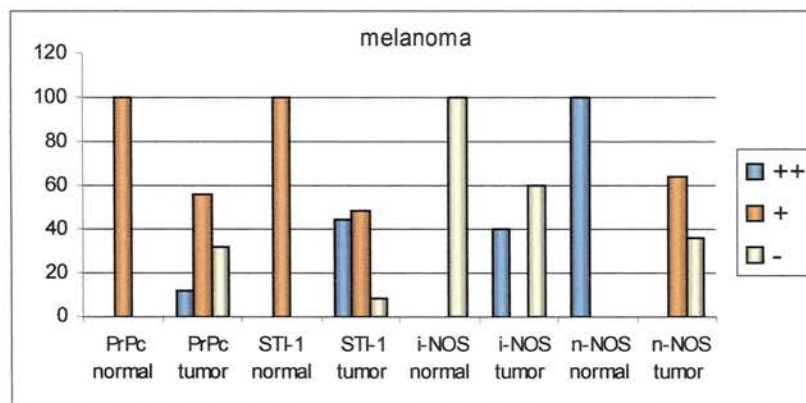


Figura 23 - Distribuição da expressão das proteínas estudadas observada nos melanomas e no melanócito normal.

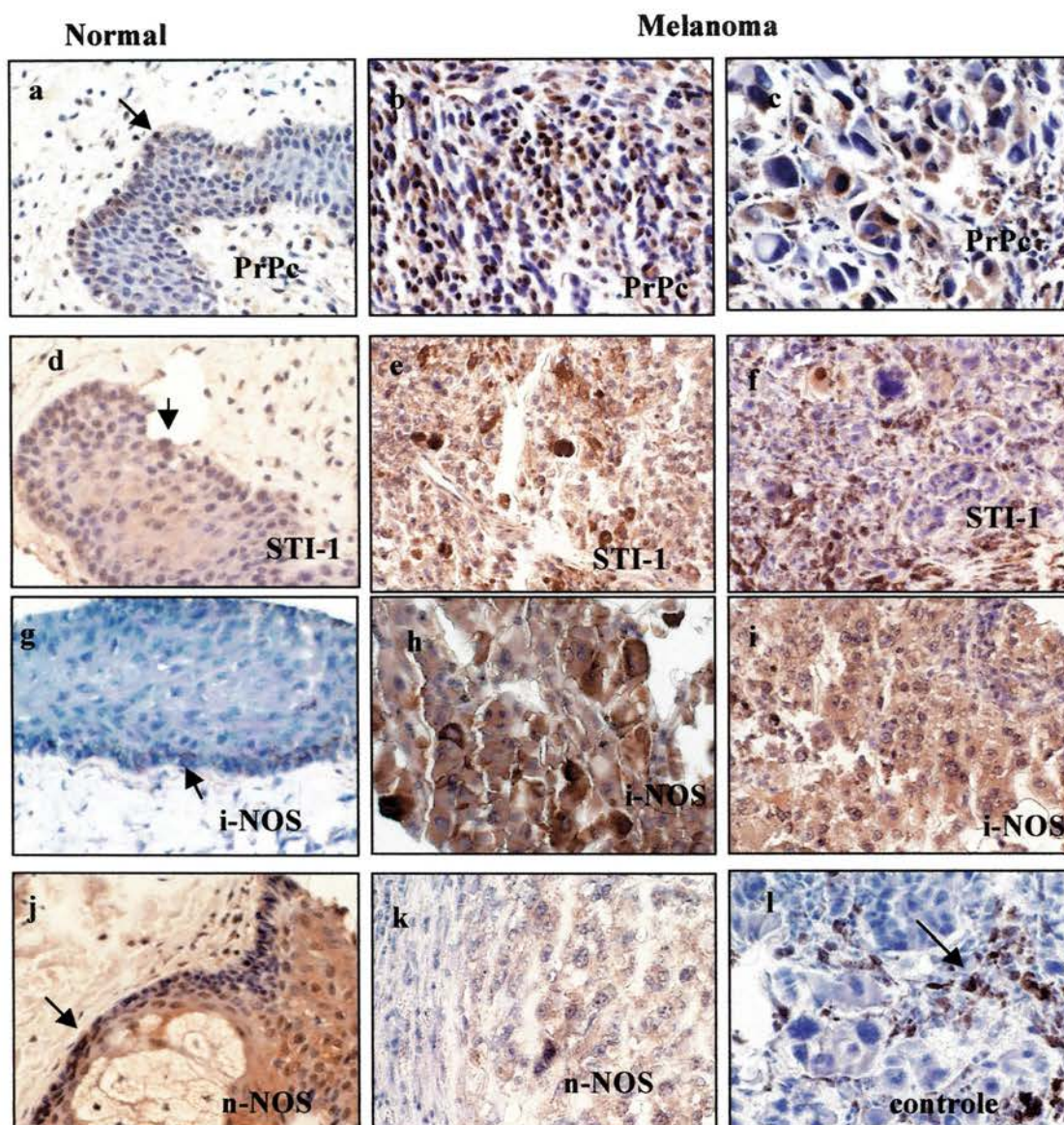


Figura 24 - Fotomicrografia representativa da expressão de PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS em amostras de pele e melanoma, demonstrada por reação imunoistoquímica. **a** = pele normal com reação positiva moderada para PrPc nos melanócitos (seta) e células do epitélio, aumento de 400X; **b** = melanoma com reação fortemente positiva para PrPc na maioria das células, aumento de 200X; **c** = melanoma com reação moderadamente positiva para PrPc em algumas células, aumento de 600X; **d** = pele mostrando reação moderadamente positiva nos melanócitos (seta) para STI-1, aumento de 400X; **e** = melanoma mostrando reação positiva forte para STI-1, aumento de 200X; **f** = melanoma mostrando reação positiva para STI-1 em algumas células, aumento de 200X; **g** = pele mostrando reação negativa para i-NOS (seta mostrando melanócito), aumento de 400X; **h** = melanoma com reação positiva para i-NOS, aumento de 400X; **i** = melanoma com reação positiva forte para i-NOS na maioria das células, aumento de 200X; **j** = pele normal com reação positiva para n-NOS nos melanócitos (seta), aumento de 400X; **k** = melanoma com reação positiva moderada para n-NOS, aumento de 200X; **l** = melanoma controle negativo (seta mostrando melanócito), aumento de 400X.

Em uma análise separando-se os que foram retirados de sítios primários, análise do linfonodo metastático e de metástases em outros órgãos (tabela 20), tivemos uma reação positiva moderada para PrPc em 2 (50,0%) dos 4 tumores retirados de sítios primários e 2 (50,0%) com reação negativa. Neste mesmo grupo, a proteína STI-1 mostrou positividade forte em 2 (50,0%), moderada em 1 (25,0%) e ausente em 1 (25,0%). A proteína i-NOS mostrou reação forte em 3 (75,0%) e ausente em 1 (25,0%) dos casos e n-NOS teve positividade moderada em 2 (50,0%) e mostrou-se negativa em 2 (50,0%) das amostras do grupo.

No grupo, 20 amostras eram provenientes do linfonodo metastático e apresentaram uma reação positiva forte para PrPc em 3 (15,0%), moderada em 11 (55,0%) e negativa em 6 (30,0%) delas. Neste grupo a proteína STI-1 mostrou positividade forte em 9 (45,0%), moderada em 10 (50,0%) e ausente em 1 (5,0%). A proteína i-NOS mostrou reação forte em 7 (35,0%) e ausente em 13 (65,0%) dos casos e n-NOS teve positividade moderada em 13 amostras (65,0%) e mostrou-se negativa em 7 (35,0%) delas.

Analizamos somente 1 caso de metástases em outros órgãos que mostrou-se moderadamente positivo para PrPc, STI-1 e n-NOS e negativo para i-NOS.

Não parece, portanto, existir uma diferença de expressão das proteínas PrPc, STI-1 e n-NOS entre melanomas que ainda não apresentaram metástases e os que já invadiram outros tecidos. A expressão de i-NOS parece diminuir com a invasão do tumor no linfonodo.

Tabela 20 - Distribuição da expressão de PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS em melanomas avaliados pelo local onde se apresentaram.

Melanoma	N (%)	PrPc			STI-1			i-NOS			n-NOS		
		++ N (%)	+ N (%)	- N (%)	++ N (%)	+ N (%)	- N (%)	++ N (%)	+ N (%)	- N (%)	++ N (%)	+ N (%)	- N (%)
Primário	4 (16,0)	0 (0)	2 (50,0)	2 (50,0)	2 (50,0)	1 (25,0)	1 (25,0)	3 (75,0)	0 (0)	1 (25,0)	0 (0)	2 (50,0)	2 (50,0)
Linfonodo	20 (80,0)	3 (15,0)	11 (55,0)	6 (30,0)	9 (45,0)	10 (50,0)	1 (5,0)	7 (35,0)	0 (0)	13 (65,0)	0 (0)	13 (65,0)	7 (35,0)
Metástase à distância	1 (4,0)	0 (0)	1 (100,0)	0 (0)	0 (0)	1 (100,0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1(100,0)	0 (0)	1 (100,0)	0 (0)

Carcinoma epidermóide de Cabeça e pescoço

A figura 25 mostra a distribuição da expressão de PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS nos carcinomas epidermóides estudados e a figura 26 mostra algumas fotomicrografias representativas das reações imunoistoquímicas.

Na análise dos tecidos tumorais verificamos que PrPc mostra uma coloração forte (figuras 26a e 26b) em 5 (20,0%) dos tumores analisados, mostra coloração moderada (figura 26c) em 18 (72,0%) e ausente em 2 (8,0%) (tabela 13).

A proteína STI-1 mostrou, nos tecidos tumorais marcação forte (figuras 26d e 26e) em 14 (56,0%), moderada (figura 26f) em 10 (40,0%) e se mostrou ausente em 1 (4,0%). A proteína i-NOS mostrou-se fortemente positiva (figuras 26g e 26h) em 11 (44,0%), moderadamente positiva em 1 (4,0%) e ausente (figura 26i) em 13 (52,0%) das amostras analisadas. n-NOS mostrou-se fortemente positiva (figura 26j) em 2 (8,0%) e moderadamente positiva (figura 26k) em 23 (92,0%).

As proteínas PrPc, STI-1 e n-NOS apresentaram-se bastante expressas nestes tumores, enquanto i-NOS não mostrou expressão em metade dos casos avaliados.

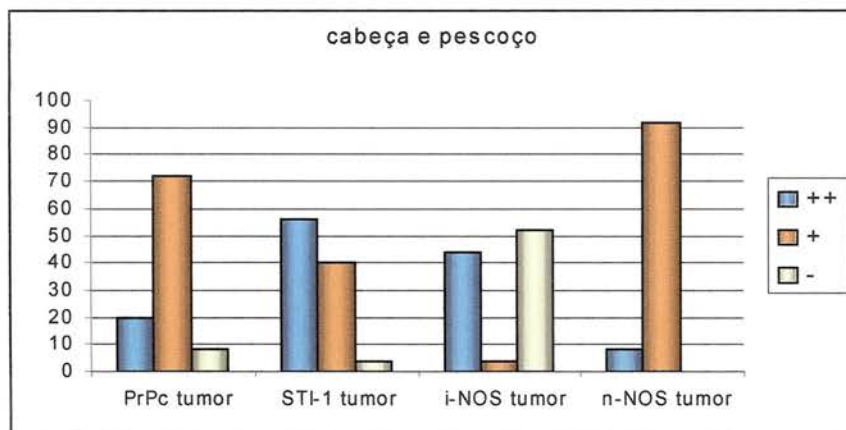


Figura 25 - Distribuição da expressão das proteínas estudadas observadas nos carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço.

Carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço

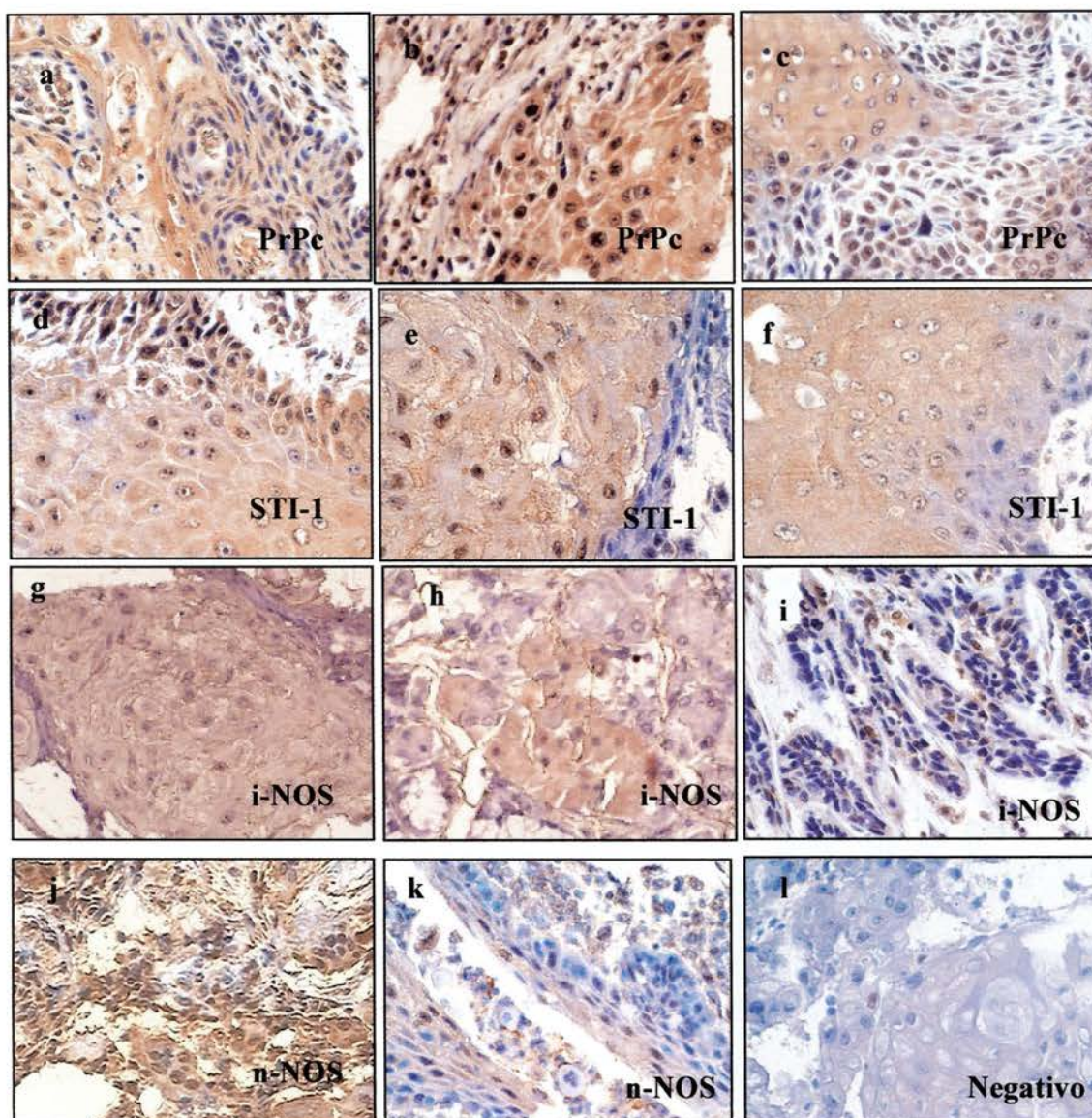


Figura 26 - Fotomicrografia representativa da expressão de PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS em amostras de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, em reação imunoistoquímica. **a** = carcinoma com reação fortemente positiva para PrPc, aumento 200X; **b** = carcinoma com reação fortemente positiva para PrPc na maioria das células, aumento de 400X; **c** = carcinoma com reação positiva moderada para PrPc, aumento de 400X; **d** = carcinoma com reação fortemente positiva para STI-1, aumento de 400X; **e** = carcinoma com reação fortemente positiva para STI-1 na maioria das células, aumento de 400X; **f** = carcinoma com reação moderadamente positiva para STI-1, aumento de 400X; **g** = carcinoma mostrando reação positiva para i-NOS, aumento de 400X; **h** = carcinoma mostrando marcação em algumas células para i-NOS, aumento de 400X; **i** = reação considerada negativa para i-NOS, aumento de 200X; **j** = carcinoma com reação positiva forte para n-NOS, aumento de 200X; **k** = carcinoma com reação moderada para n-NOS, aumento de 400X; **l** = controle negativo da reação, aumento de 400X.

Para analisar melhor os resultados, cada tumor foi classificado pelo grau de diferenciação histológica em carcinomas epidermóide de cabeça e pescoço bem diferenciado ou grau I, moderadamente diferenciado ou grau II e pouco diferenciado ou grau III (Tabela 21).

Analisando a expressão de PrPc nos 7 carcinomas bem diferenciados vemos positividade forte em 1 (14,3%), moderada em 5 (71,4%) e ausente em 1 (14,3%). A coloração de STI-1 foi forte em 4 (57,1%) e moderada em 3 (42,9%). Já i-NOS mostrou-se fortemente positiva em 3 (42,8%), moderadamente positiva em 1 (14,3%) e negativa em 3 (42,8). A proteína n-NOS mostrou positividade forte em 1 (14,3%) e negativa em 6 (85,7%) das amostras.

Nos 17 carcinomas moderadamente diferenciados tivemos forte expressão de PrPc em 3 (17,6%), expressão moderada em 13 (76,5%) e ausente em 1 (5,9%). Para STI-1 9 (52,9%) se mostraram fortemente positivos, 7 (41,2%) moderadamente positivos e 1 (5,9%) se mostrou negativo. Para i-NOS a expressão foi forte em 7 (41,2%) e ausente em 10 (58,8%). A proteína n-NOS mostrou positividade forte em 1 (5,9%) e negativa em 16 (94,1%) das amostras.

Foi analisada 1 amostra de carcinoma pouco diferenciado onde visualizamos coloração forte para PrPc, para STI-1 e para i-NOS, já n-NOS mostrou positividade moderada.

Nestes tumores a expressão das quatro proteínas avaliadas não parecem mostrar correlação com a diferenciação tumoral.

Tabela 21- Distribuição da expressão de PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS nos carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço separados pelo grau de diferenciação tumoral.

Carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço	N (%)	PrPc			STI-1			i-NOS			n-NOS		
		++ N (%)	+ N (%)	- N (%)	++ N (%)	+ N (%)	- N (%)	++ N (%)	+ N (%)	- N (%)	++ N (%)	+ N (%)	- N (%)
Bem diferenciado (grau I)	7 (28,0)	1 (14,3)	5 (71,4)	1 (14,3)	4 (57,1)	3 (42,9)	0 (0)	3 (42,8)	1 (14,3)	3 (42,8)	1 (14,3)	6 (85,7)	0 (0)
Moderadamente diferenciado (grau II)	17 (68,0)	3 (17,6)	13 (76,5)	1 (5,9)	9 (52,9)	7 (41,2)	1 (5,9)	7 (41,2)	0 (0)	10 (58,8)	1 (5,9)	16 (94,1)	0 (0)
Pouco diferenciado (grau III)	1 (4,0)	1 (100,0)	0 (0)	0 (0)	1 (100,0)	0 (0)	0 (0)	1 (100,0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100,0)	0 (0)

4.4.4 Análise computacional da expressão diferencial de PrPc e STI-1

Foi feita uma busca no banco de dados de SAGE (serial analysis of gene expression), disponível na rede pelo CGAP (Cancer genome anatomy project) (<http://cgap.nci.nih.gov/SAGE>), para a descrição da expressão de mRNA transcritos de PrPc (digital northern). Encontramos a seqüência TTCTTGTTTT de *Prnp*, como sendo mais expressa em cérebro normal que em outros órgãos, seguido em ordem decrescente pela retina, tireóide, pulmão, coração, mama, ovário e próstata. A expressão é menor, ainda em ordem decrescente, no fígado, peritônio, rim, músculos, cólon e estômago. Foram pesquisados somente resultados de SAGE resultante de análise de tecidos, excluindo-se ensaios que utilizavam cultura de células. Foram descritas bibliotecas geradas de 7 regiões normais do cérebro, distribuídas em 1 córtex pediátrico, 2 córtex de adulto, 2 cerebelos, 1 tálamo e uma substância nigra. Nos casos de astrocitomas, há a descrição de bibliotecas geradas a partir de um astrocitoma pilocítico grau I, 4 astrocitomas grau II, 3 astrocitomas grau IV e 3 glioblastomas. Para mama foram descritas bibliotecas geradas a partir de 5 tecidos epiteliais e células luminiais de mamas normais e 7 carcinomas ductais invasivos. Em pâncreas vemos a análise de 1 tecido normal e 2 adenocarcinomas, enquanto que em próstata, 2 normais e 3 carcinomas. Os demais tipos histológicos estudados pelo TMA não encontraram descrições no banco de dados.

Fizemos o mesmo para STI-1 (gene *STIP-1*), a seqüência encontrada foi TTATGGGGAG e as mesmas bibliotecas foram examinadas através dos mesmos critérios.

Utilizamos uma ferramenta de avaliação estatística de comparação de expressão entre as amostras depositadas neste banco de dados, disponibilizada na rede (BIN-<http://www.lbc.ludwig.org.br/~rvencio/SageBeBin>). Assim, para *Prnp* não encontramos expressão diferencial entre astrocitomas grau II e cérebro normal ($p=0,68$); astrocitomas grau III e cerebro normal ($p= 0,90$); glioblastomas e cerebro normal ($p= 0,43$); astrocitomas grau II e glioblastomas ($p= 0,36$); astrocitomas grau III e glioblastomas ($p=0,56$); astrocitomas II e III e glioblastomas ($p= 0,69$) e entre carcinoma ductal e mama normal ($p=0,32$) (tabela 22).

Para *STPII* parece ser menos expresso em astrocitomas grau II em relação ao cérebro normal, diferença esta estatisticamente significativa ($p= 0,02$). Não houve

significância estatística para astrocitomas grau III ($p=0,12$); glioblastomas ($p=0,48$); entre glioblastomas e astrocitomas ($p=0,14$; 0,34 e 0,24) e em carcinomas ductais invasivos ($p=0,57$) (tabela 22).

Tabela 22 - Avaliação estatística de comparação de expressão de *Prnp* e *STIP1* entre as amostras depositadas no banco de dados de SAGE.

	<i>Prnp</i>	<i>STIP1</i>
	p	p
Cérebro normal X Grau II	0,68	0,02
Cérebro normal X Grau III	0,90	0,12
Cérebro normal X Grau IV	0,43	0,48
Grau II X Grau IV	0,36	0,14
Grau III X Grau IV	0,56	0,34
Grau II + III X Grau IV	0,69	0,24
Mama normal X carcinoma ductal invasivo	0,32	0,57

Estes dados não são exatamente concordantes com os resultados encontrados nos ensaios de TMA descritos aqui. É possível que a expressão do transcrito não esteja refletindo exatamente a expressão da proteína. Nas análises de astrocitomas, devemos lembrar que esta comparação foi feita com tecido total de cérebro, nos quais os neurônios tem alta expressão de PrPc.

4.5 DISCUSSÃO

4.5.1 Análise de mutações e polimorfismos no gene *Prnp* em Gliomas

Na pesquisa da presença de mutações e polimorfismos em *Prnp* nas amostras de pacientes com gliomas, não foi possível a inclusão de um número maior de casos para serem avaliados, não só pela raridade da doença mas pela falta de amostras que cumprissem as exigências éticas, isto é, amostras onde o paciente tenha consentido o uso do material biológico (consentimento pós informado).

As amostras analisadas mostraram distribuição homogênea quanto ao sexo e a idade. A presença de quadro epiléptico foi semelhante à encontrada na literatura (LIIGANT et al. 2001), com um maior número de pacientes com tumores de baixo grau apresentando crises convulsivas e epilepsia refratária a medicamentos.

Não foram encontradas mutações no gene *Prnp* e a frequência dos vários polimorfismos presentes em nossas amostras mostrou similaridade àquela encontrada nos 180 controles avaliados e a da descrita na literatura (WINDLT et al. 1999; LAMPE et al. 1999). Não houve correlação entre os polimorfismos encontrados e a presença de quadro epiléptico e o grau tumoral, mesmo quando nossas amostras foram agrupadas em tumores de alto e baixo grau.

A presença do alelo no códon 129 codificando valina é descrita na literatura como associada a diminuição na cognição em idosos (BERR et al. 1998; RUJESCU et al. 2003; CROES et al. 2003), com um desenvolvimento precoce da doença de Alzheimer (DERMAUT et al. 2003) e o declínio da habilidade intelectual em síndrome de Down (DEL BO et al. 2003). Neste estudo mostramos não haver correlação entre a presença de variantes alélicas no códon 129 e a predisposição ao desenvolvimento tumoral. Não houve tampouco, correlação entre pacientes portadores de metionina ou valina neste códon e a apresentação de quadro epiléptico associado ao desenvolvimento tumoral.

Não foi encontrado nenhum paciente portador do polimorfismo no códon 171 (N/S), variante alélica demonstrada como prevalente nas epilepsias refratárias a medicamentos (primeira parte do trabalho, WALZ et al. 2003 e 2004), mesmo havendo entre os pacientes, aqueles que apresentavam epilepsia de difícil controle. O fato de não termos encontrado o polimorfismo no códon 171 nos pacientes avaliados

sugere que este não tenha correlação direta com a tumorigenese e a progressão tumoral ou com a predisposição á epilepsia associada ao desenvolvimento de tumores do SNC, o mesmo acontecendo com as outras variantes alélicas.

Entretanto, uma análise de um número maior de pacientes talvez seja necessária para que tenhamos uma posição mais segura sobre os dados aqui apresentados.

4.5.2 Expressão das proteínas PrPc, STI-1, iNOS e nNOS em astrocitomas

Na avaliação da expressão das proteínas por imunistoquímica levamos em conta que este é um método semi quantitativo, porém útil por visualizar a proteína no contexto tecidual onde ela se insere.

Os relatos sobre a expressão da proteína prion celular são muito controversos na literatura, principalmente em estudos imunistoquímicos onde a expressão da proteína pode variar, dependendo da técnica, tipo de tecido usado, tipo de fixação e, principalmente, do anticorpo usado. Isto tem como causa as diferentes formas de glicosilação e clivagens da proteína, já demonstrado que estão distribuídas nos tecidos de forma específica (FOURNIER et al. 2000; MOUDJOU et al. 2001). Desta maneira, o uso de anticorpos que reconheçam mais especificamente cada um dos diferentes níveis de glicosilação e algumas epítopes da proteína podem gerar padrões diferentes de reconhecimento de PrPc (LI et al. 2001; KOVACS et al. 2002). Nosso anticorpo que reconhece o peptídeo 163 a 182 da proteína e as três formas de glicosilação possíveis, demonstrado por técnicas de "Western blot" (ZANATA et al. 2002; CHIARINI et al. 2002), mostrou-se bastante adequado para estas avaliações. Padronizamos a técnica imunistoquímica de maneira a obter uma recuperação antigênica ótima e nossos resultados mostram um padrão de distribuição da proteína no cérebro como é de consenso na literatura (FORD et al. 2000b).

Nas amostras examinadas houve uma grande variedade de áreas afetadas pelo tumor e não foi possível a utilização de todas essas áreas como controle em tecidos humanos normais. Portanto, na padronização da técnica de imunistoquímica, a utilização de cortes seriados de camundongo nos permitiu a avaliação da expressão normal das proteínas nestas diferentes regiões do cérebro, já que a expressão em murinos e humanos é semelhante (FOURNIER 2000).

Assim, a avaliação da expressão da proteína PrPc em tecido cerebral normal mostrou uma grande concentração de proteína, mais nitidamente no hipocampo e córtex, sendo visualizada uma coloração forte nos neurônios e um pouco mais fraca nas células da glia. A positividade difusa revelou marcação forte nos prolongamentos neuríticos, como descrito por outros autores (TARABOULOS et al. 1992; VERGHESE-NIKOLAKAKI et al. 1999; SALES et al. 2002).

Não há descrição da expressão da proteína STI-1 na literatura, mas nossos dados revelaram uma grande quantidade da proteína em todas as regiões do cérebro, com uma maior coloração na região do hipocampo, no cerebelo e também nas várias regiões do córtex. A forte marcação citoplasmática de STI-1 em neurônios, em contraste com a coloração mais forte na membrana por PrPc, pôde ser visualizada, confirmando o que já havia sido demonstrado em estudos do grupo (ZANATA et al. 2002). A reação difusa mostra uma possível co-localização das duas proteínas nos prolongamentos celulares. As células da glia normal mostraram uma reação moderadamente positiva para STI-1, de intensidade mais fraca que em neurônios.

A expressão das enzimas óxido nítrico sintase, neuronal e induzida, em tecido cerebral normal, mostraram expressão semelhante à descrita na literatura (TEWS 1999), onde n-NOS foi visualizada nos neurônios com positividade forte citoplasmática, mostrando-se mais fraca nos prolongamentos neuríticos e nas células da glia, enquanto não foi detectada marcação para i-NOS em nossas amostras.

A expressão de n-NOS, STI-1 e PrPc foi avaliada por imunistoquímica em 109 astrocitomas. Optamos por avaliar as amostras em lâminas convencionais mesmo as que faziam parte do TMA, pois dados da literatura mostram a variabilidade e heterogeneidade do padrão histológicos dos astrocitomas dentro do mesmo tumor (NOBLE e DIETRICH 2004).

Nos chamou a atenção a forte positividade de aspecto granular de PrPc em células da glia reativa presente em alguns tumores e observado também na reação com i-NOS, confirmando dados da literatura que mostram que tanto PrPc (ESIRI et al. 2002) como i-NOS (TEWS 1999), são mais expressas em condições de inflamação tecidual e em células histiocíticas.

Descrevemos a expressão de cada um dos tumores baseado no escore calculado, conforme descrito na tabela 3. Porém, a análise da expressão das proteínas

no astrócito normal, considerada moderada em PrPc, STI-1 e n-NOS e negativa para i-NOS, independente da área do cérebro, foi baseada somente na intensidade de coloração, sem considerar o número de astrócitos corados, pela dificuldade deste tipo de análise. Também não consideramos para cálculos estatísticos, o número de amostras normais avaliadas, já que foram incluídas neste estudo, várias amostras de cérebro humano e de camundongos.

Os astrocitomas pilocíticos tiveram um comportamento diferente dos demais, com um terço das amostras apresentando a proteína PrPc aumentada em comparação com o astrócito normal e um terço mostrando ausência de expressão desta proteína. O mesmo aconteceu para a expressão de STI-1, enquanto que n-NOS e i-NOS mostraram aumento de expressão na maioria destes tumores.

Na análise dos demais astrocitomas, a proteína PrPc mostrou uma coloração mais forte em 56,0% das amostras de grau IV, se comparados aos astrócitos normais, enquanto que essa expressão mais forte só foi encontrada em 15,4% das amostras grau III e em 7,4% das de grau II, indicando um aumento de expressão de PrPc gradativo com a progressão tumoral. Os tumores de grau mais baixo não mantiveram a expressão de PrPc da célula normal, por outro lado, diminuíram de expressão na maioria dos casos. Estes resultados sugerem que deixar de expressar PrPc pode ser importante para a progressão tumoral nos processos iniciais da doença, graus II e III, enquanto que em tumores mais agressivos a proteína não só volta a ser expressa, mas em uma quantidade maior que a normal.

Se compararmos os dados de STI-1, uma diminuição da proteína é também encontrada na maioria dos casos de graus II e III, sendo que a maioria dos casos de glioblastomas volta a expressar STI-1 em níveis iguais ou superiores ao do astrócito normal.

A análise *in silico* de STI-1 mostrou uma expressão significativamente menor em astrocitomas graus II, quando comparamos os tumores e a expressão em cérebro normal (SAGE), corroborando nossos achados. Pela mesma análise comparativa vimos que não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na expressão de PrPc nestes bancos de dados. Devemos levar em conta, o fato de que esta comparação foi feita entre os astrocitomas e o tecido cerebral normal total e não somente a glia. Mesmo quando comparamos astrocitomas de baixo grau e

glioblastomas não vemos diferença com significado estatístico. É possível que esta disparidade de achados entre nossos dados e os de SAGE esteja relacionada com as próprias características com que estes tumores se apresentam. Tumores astrocíticos são descritos compreendendo um largo espectro de neoplasias com variações na localização, potencial de proliferação, achados morfológicos e apresentação clínica. Estas diferenças devem refletir o tipo e a seqüência de alterações genéticas e epigenéticas que adquirem durante o processo de transformação (KLEIHUES e CAVENEE 2000). Os resultados encontrados nas imunohistoquímicas mostram que a maioria, mas não todos os tumores têm a expressão alterada e os dados disponíveis por SAGE são de um número muito reduzido de amostras.

A forte positividade para as duas proteínas em células gemistocíticas parece indicar uma participação de PrPc e STI-1 no progressão tumoral, já que a presença destas células tem sido associada a um pior prognóstico. Estas células de origem astrocitária, têm baixo índice de proliferação apesar de sintetizarem fatores de crescimento ligados a proliferação das células tumorais e endoteliais (WATANABE et al. 1997), além de alta expressão nuclear de Bcl-2, sugerindo uma capacidade de escapar da apoptose, atuar na angiogenese e estimular a proliferação celular das células vizinhas (KLEIHUES e CAVENEE 2000). Além dos dados do nosso grupo mostrando que a interação de PrPc com STI-1 está envolvida com a proteção a morte celular de retinas em desenvolvimento (CHIARINI et al. 2002; ZANATA et al. 2002), a proteína STI-1 foi inicialmente descrita como modulando a atividade de HSP70 e HSP90 (JOHNSON et al. 1998), proteínas de proteção ao estresse celular e que regulam a atividade e a expressão de moléculas sinalizadoras envolvidas com apoptose (BEERE e GREEN 2001). Também já foi relatado a modulação da expressão de PrPc por proteínas de choque térmico (SHYU et al. 2002). A alta concentração de PrPc e STI-1 nas células gemistocíticas parece indicar uma participação nestes processos e merece ser melhor investigada.

Na avaliação da expressão das enzimas de síntese de óxido nítrico, observamos que a enzima i-NOS mostrou-se presente em 58,7% dos tumores com uma maior expressão em glioblastomas e a expressão da enzima n-NOS mostrou um significativo aumento em quase 80,0% dos tumores quando comparada a expressão visualizada no astrócito. Estes dados mostraram grande correlação com os relatados

na literatura. Num estudo com 46 amostras, TEWS (1999) observou que 72% dos astrocitomas anaplásicos e 92% dos glioblastomas apresentam n-NOS aumentado e 50% dos glioblastomas expressando i-NOS. COBBS et al. (1995) mostraram uma correlação positiva entre o aumento da expressão de n-NOS e i-NOS em gliomas e tumores de alto grau. Por outro lado, LUDWIG et al. (2000) mostraram aumento das mesmas enzimas em células de glioblastoma, relacionando esse achado com o aumento de edema peritumoral. Em recente estudo, OYOSHI et al. (2003) observaram um aumento de cerca de duas vezes na produção de NO em gliomas em comparação ao tecido normal, graças a grandes quantidades de i-NOS sintetizada pelas células tumorais. Já BROHOLM et al. (2003), num estudo que incluía 40 tumores gliais, também verificam um aumento pronunciado de n-NOS em astrocitomas de alto grau, mas a expressão aumentada de i-NOS estava presente em apenas alguns tumores.

O óxido nítrico (NO) é um potente sinalizador celular produzido a partir da degradação da L-arginina pelas enzimas de síntese de óxido nítrico (NOS). As enzimas expressas constitutivamente são n-NOS (NOS-1, constitutiva, neuronal) e e-NOS (NOS-3, constitutiva, endotelial). A enzima i-NOS (NOS-2, enzima induzida) não é expressa na maioria das células normais e sua síntese está associada a estímulo em processos inflamatórios, mediada por citocinas como interferon- γ e TNF- α . Tanto a quantidade quanto a duração da produção de NO definem seu efeito protetor ou citotóxico (THOMSEN e MILES 1998). No cérebro, em concentrações normais, desempenha um papel essencial, pois atua ativando a neurotransmissão, além de regular a formação de sinapses (MORBIDELLI et al. 2004). Nos demais tecidos controla o tônus muscular e vascular (STAMLER e MEISSNER 2001).

Por outro lado, NO é um composto mutagênico por definição, pois adiciona radicais livres (oxigênio e nitrogênio) ao DNA e proteínas e é neste sentido que atua como citotóxico. Portanto, pode ser pró ou anti tumorigênico, dependendo da quantidade produzida, do tempo em que a célula foi exposta a ele e das proteínas que estão sendo expressas pelo meio celular. Quando em baixos níveis tem ação inibitória da proliferação, promovendo a diferenciação celular (GIBBS 2003). O resultado da superprodução, associado a fatores que diminuem sua degradação é sempre uma mudança no potencial de redução da célula na direção da

oxidação e sinalização para a apoptose por ativação de p53 e p21. Muitos autores mostraram uma alta expressão da proteína p53 induzida por altas concentrações de NO resultante de alta expressão de i-NOS. Entretanto, p53 pode também diminuir a expressão de i-NOS por inibição da atividade do promotor do gene desta enzima, diminuindo e controlando assim sua genotoxicidade. Algumas evidências sugerem que NO tenha participação na metástase por interações entre as células do tumor e as células vizinhas, sendo que estas sintetizariam mais i-NOS como resultado da agressão, induzindo apoptose e degradação das células saudáveis, facilitando a migração tumoral (XIE e HUANG 2003). NO atua também na promoção da angiogênese e, alterando o tônus vascular, facilita o processo de metástase por ativação de metaloproteases (MORBIDELLI et al. 2004). Em gliomas, NO ativa os processos de apoptose, de invasão tecidual adjacente, a permeabilidade vascular, a angiogênese e a resposta imune (SHINODA e WHITTLE, 2001).

Em nosso estudo encontramos um aumento das duas enzimas na maioria dos tumores de alto grau, mais claramente da enzima n-NOS. Devemos notar que um grande número de tumores de baixo grau mostram aumento de expressão destas enzimas. Isso deve estar refletindo o grau de estresse a que as células tumorais estão submetidas, podendo estar sinalizando, através do NO sintetizado, para a apoptose celular ou promovendo angiogênese e invasão tecidual. Isto poderia ser correlacionado com a progressão destes tumores, o que seria demonstrado em um estudo prospectivo, onde se verificaria se a alta expressão indicaria pior prognóstico. Estudos neste sentido ainda não foram descritos na literatura, para estes tumores.

Avaliando os resultados obtidos até o momento, notamos que, enquanto a célula normal (astrócito) expressa moderadamente a proteína PrPc, uma pequena parcela das amostras mostraram expressão aumentada da proteína já em estágios iniciais da doença, aumentando o número de amostras que tem essa expressão elevada com a progressão tumoral. É possível que, dentre o total das nossas amostras, os casos de astrocitomas graus II e III que expressam a proteína PrPc aumentada tenham uma tendência maior a progressão dos que os casos que expressam níveis mais baixos desta proteína. O fato da maioria de nossas amostras de glioblastomas mostrarem um aumento de expressão de PrPc pode indicar que este fenótipo é vantajoso para o desenvolvimento ou manutenção do tumor.

Analisando o fato de que uma grande parte dos astrocitomas de baixo grau estudados perdem a expressão da proteína e aumentam sua expressão em glioblastomas, podemos sugerir que para a proliferação da célula tumoral, uma alteração na expressão da proteína PrPc pode dar uma vantagem seletiva para as células, sendo que aquelas que adquiriram este fenótipo teriam um potencial de proliferação e sobrevivência maior, talvez pela proteção a apoptose dada pela ligação da proteína PrPc com STI-1. Um estudo que vem sendo realizado na Universidade Federal do Rio de Janeiro, em culturas de células de glioblastomas (culturas de células A172 e culturas primárias de glioblastomas humanos dissociados), verificou o aumento de incorporação de timidina após o tratamento com o peptídeo de STI-1 ligante de PrPc, sugerindo que esta ligação pode estar envolvida com a sinalização no sentido da proliferação destas células (Erlich, em preparação). Não podemos nos esquecer que na formação de um clone tumoral, as células devem adquirir um fenótipo de maior sobrevivência pelo bloqueio da apoptose associado a um fenótipo de alta proliferação (HANAHAN e WEINBERG 2000).

Porém, o fato de encontrarmos PrPc expresso em um número grande de casos de astrocitomas pilocíticos sugere que este aumento de PrPc estaria mais associado a proteção a apoptose que a processos de invasão ou proliferação. A alta expressão desta proteína em uma parcela dos astrocitomas pilocíticos indicam que PrPc pode ser um fator importante também nestes tumores, podendo sinalizar para uma evolução com menor chances de regressão.

Os dados aqui obtidos sugerem uma orquestração de proteínas pró (i-NOS e n-NOS) e anti apóptóticas (PrPc e STI-1) num mesmo tumor, que em conjunto com outras proteínas alteradas e condições específicas, resultam na expansão tumoral e na sobrevivência da célula alterada. PrPc estaria atuando neste quadro garantindo a proliferação ou o resgate da apoptose induzida por NOS. Nas fases iniciais da progressão tumoral, NO garantiria a morte das células alteradas, sendo que a célula tumoral ainda teria controle sobre a expressão de PrPc. Uma nova alteração ou descontrole dessa expressão daria uma vantagem ao clone tumoral.

As proteínas associadas a apoptose parecem estar alteradas de forma variável em neoplasias. Alguns estudos mostram um aumento progressivo de apoptose na progressão enquanto outros mostram uma redução a medida que aumenta o grau

histológico das lesões. Esta variação mostra efeitos do tipo celular envolvido e das mutações e alterações que o clone tumoral carrega, mas de uma maneira geral quando o tumor se inicia estão mais sujeitos a apoptose, com sinais pró apoptóticos provavelmente sendo induzidos pelos danos no DNA. A medida que a massa tumoral aumenta, sinais anti-apoptóticos resultam da seleção de clones resistentes, protegendo o tumor (GREEN e EVAN 2002). É bom lembrar que as células tumorais podem adquirir este fenótipo resistente tanto por diminuição na expressão ou mutação de proteínas pró apoptóticas, como por aumento de expressão de proteínas anti apoptóticas (IGNEY e KRAMMER 2002). No câncer algumas proteínas vão deixando de ser expressas com a progressão, enquanto proteínas que dão vantagem seletivas para o clone vão aumentando sua expressão (BAKER e MCKINNON 2004), sendo que PrPc pode estar entre estas últimas. Esta proteção á apoptose também atua no sentido de maior resistência a quimioterapia e irradiação, pela seleção de clones que contenham elementos chaves na modulação dos sinais apoptóticos. Seguindo este raciocínio, PrPc pode vir a ser um marcador de resistência ao tratamento nestes tumores.

Interessantemente, alguns trabalhos sugerem um envolvimento da proteína de matriz vitronectina, na proteção de células tumorais da apoptose, sendo expressa preferencialmente na margem dos gliomas (UHM et al. 1999; DING et al. 2002). Sua expressão em gliomas de alto grau é alta, diminuindo em graus intermediários e é descrita como ausente em lesões de baixo grau (GLADSON et al. 1995). Vitronectina é um dos ligantes de PrPc descritos pelo grupo e foi demonstrado que esta ligação está envolvida com gênese de neurônios da raiz dorsal (HAJJ, em preparação). Existe a possibilidade de PrPc participar desta proteção a apoptose, após a ligação com vitronectina e já que a expressão destas duas proteínas em gliomas parece ser semelhante, a participação desta ligação na tumorigenese é mais um tópico a ser investigado.

4.5.3 Expressão das proteínas PrPc, STI-1, iNOS e nNOS em outros tipos de tumores sólidos

A pesquisa da expressão das proteínas PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS foi realizada em outros tipos tumorais, para verificarmos se o comportamento visto

anteriormente nos astrocitomas era encontrado em outros tipos tumorais. Para isso, utilizamos lâminas de TMA, onde pudemos testar 225 tumores em duplicata, acrescido de 25 tecidos normais, com o mínimo de gasto de anticorpos. Em particular foi de nosso interesse ter uma visão mais abrangente da expressão destas proteínas no câncer. Uma das perguntas era se PrPc poderia ser utilizado como um marcador de progressão tumoral como sugerido no estudo dos astrocitomas e em quais tumores isso poderia ocorrer.

Para isso, escolhemos alguns tumores de origem neuroectodérmica, como neuroblastomas e retinoblastomas, por PrPc ser altamente expresso em neurônios, expressão que aumenta durante o desenvolvimento (SALES et al. 2002). Os tumores carcinóides foram incluídos pela origem neuroendócrina, já os melanomas e carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço foram incluídos pela origem embriogênica comum aos neurônios, tanto dos melanócitos como das células da epiderme. Adenocarcinoma de próstata, de mama e de pâncreas foram incluídos não só pela importância clínica destes tumores, mas também pelos dados da literatura que descrevem uma localização de PrPc em grânulos secretórios de células epiteliais (FOURNIER et al. 2000; YAMAZAKI et al. 2003).

Nas amostras utilizadas neste trabalho, pudemos observar PrPc sendo expresso em todos os tecidos normais analisados, confirmando os dados da literatura sobre sua expressão ubíqua (PAMMER et al. 1998; ZANUSSO et al. 2001; FORD et al. 2002b). A exceção ficou com as células ductais da mama, que mostraram-se negativas na marcação pela proteína PrPc. A única descrição na literatura de PrPc em tecido mamário mostra a proteína tendo localização em glândulas secretoras, com expressão variando com o estado fisiológico (LASMEZAS 2003). Nossas amostras vêm de biópsias de pacientes em idade adulta, que se submeteram a investigação da presença de nódulos neoplásicos e seria necessário investigar a presença da proteína em várias faixas etárias e estados de maturação da glândula mamária, para uma melhor avaliação da expressão e da importância fisiológica de PrPc em ductos mamários normais.

Já a coloração de PrPc em células do pâncreas e da próstata mostraram uma localização perinuclear intensa. PrPc foi descrita no pâncreas como restrito as células de Langerhans, sendo negativa nas células exócrinas (FORD et al. 2002b). A

expressão de PrPc em células alfa (glucagon) e beta (insulina) do pâncreas é descrita como sendo em concentrações similares aos das células nervosas e regulada positivamente por hormônio de crescimento e corticóides, implicados na maturação das células beta (ATOUF et al. 1994). Mais estudos precisariam ser feitos para mostrar as implicações destes achados.

A proteína STI-1 também se mostrou positiva em todos os tecidos. Este trabalho, com a análise de amostras normais, demonstra pela primeira vez a expressão e localização desta proteína em tecidos humanos.

A expressão de i-NOS e n-NOS em tecidos normais também coincidiram com os dados da literatura, embora alguns autores descrevam a expressão de i-NOS em neutrófilos, macrófagos e em algumas células epiteliais de tecidos normais, esta enzima é descrita como ausente ou fracamente expressa na maioria dos tecidos normais (VAKKALA et al. 2000).

Os dados da literatura sobre a expressão de PrPc em tecidos neoplásicos são escassos. Uma das poucas descrições da expressão da proteína em tecidos tumorais foi feita em uma análise comparativa de tumores epidermais, onde foi mostrada forte expressão de PrPc em carcinomas de células escamosas, enquanto que nos carcinomas de células basais a expressão apresentava-se diminuída (PAMMER et al. 1998).

No presente trabalho PrPc mostrou uma forte coloração na maioria das células neoplásicas, em todos os tipos tumorais estudados, numa grande proporção de amostras. Da mesma maneira STI-1 e n-NOS também se mostraram positivas na maioria dos tumores, enquanto i-NOS mostrou-se ausente nas amostras de adenocarcinomas de próstata e retinoblastomas.

Alguns trabalhos mostram uma expressão elevada de i-NOS na maioria dos adenocarcinomas de próstata (WANG et al. 2003; UOTILA et al. 2001), ao contrário do visualizado em nossas amostras. O consenso da literatura é que a alta expressão de NO produzida tanto pelo tumor como pelas células vizinhas, demonstrada em tumores de mama, cabeça e pescoço, bexiga, cólon e próstata, dá-se às custas do aumento de expressão de n-NOS (MORBIDELLE et al 2004). Os dados mostrados aqui para a expressão de i-NOS em amostras de carcinoma ductal invasivo de mama e de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço são compatíveis com os dados da

literatura. Além disso, os dados obtidos para n-NOS em todos os tumores estudados, são bastante semelhantes aos já descritos (THOMSEN e MILES 1998; LALA e CHAKRABORTY 2001), corroborando para a validação de nossos dados.

Na análise comparativa dos dados, a expressão de PrPc parece estar aumentada em relação ao tecido normal, em carcinomas ductais invasivos de mama e retinoblastomas. Os neuroblastomas e adenocarcinomas de pâncreas parecem mostrar uma diminuição de expressão. Os adenocarcinomas de próstata não tiveram uma alteração na expressão de PrPc em relação ao tecido normal. Os tumores carcinóides e os carcinomas epidermóides mostraram positividade para PrPc na maioria das amostras analisadas (84% e 92% dos casos, respectivamente).

Chamou-nos atenção a positividade de PrPc em todos os tumores ductais invasivos de mama, onde a negatividade contrastante das células ductais normais, nos levou a comparação com a expressão de i-NOS descrita na literatura (REVENEAU et al. 1999; VAKKALA et al. 2000; CARVALHO 2002) e visualizada em nossas amostras. Todas as nossas amostras de carcinoma de mama também mostraram um aumento de expressão para n-NOS, embora a expressão desta enzima na literatura seja controversa (LALA e CHAKRABORTY 2001). Já STI-1 mostrou positividade nas células ductais normais, tendo uma diminuição de expressão em quase metade das amostras tumorais.

Portanto, nos carcinomas ductais invasivos de mama o aumento de expressão de PrPc parece não ser acompanhado pela expressão de seu ligante STI-1. Este desequilíbrio sugere um aumento de PrPc livre, o que facilitaria sua interação com outras proteínas, ativando uma via de sinalização diferente. É conhecida a participação de PrPc nos processo de sinalização ativando os sistemas antioxidantes e as defesas celulares (RACHIDI et al. 2003). O aumento das enzimas produtoras de NO nos tumores observado por nós, pode indicar uma sinalização para um aumento de atividade anti-oxidante na célula tumoral e PrPc pode estar envolvido neste processo. Também já foi mostrada a indução de i-NOS pelo peptídeo hidrofóbico de PrPc (FABRIZI et al. 2001), podendo indicar que PrPc esteja atuando no sentido de sinalizar para que haja um aumento de NO. Foi descrita a proteína PrPc atuando como ativador de p53 (PAITEL et al. 2002) e mostrando atividade pró apoptótica quando super expressa (PAITEL et al. 2003), sugerindo que talvez esse mecanismo

possa estar ocorrendo neste tipo específico de tumor. A biologia do carcinoma de mama é complexa e envolve receptores hormonais, fatores de crescimento, oncogenes e vários genes supressores de tumor, que parecem alterar a susceptibilidade para o desenvolvimento do câncer. Em câncer de mama, alta expressão de i-NOS não indica um resultado benigno, ao contrário, são os tumores de pior prognóstico (LALA e CHAKRABORTY, 2001).

Da mesma maneira, nos retinoblastomas também ocorre um aumento de expressão de PrPc na maioria dos casos, mas sem alteração na expressão das proteínas STI-1, n-NOS e i-NOS. Entretanto, quando os tumores são divididos pelo grau de diferenciação tumoral observamos que a proteína STI-1 está diminuindo com a menor diferenciação do tumor, mostrando um maior número de casos com menor expressão em tumores pouco diferenciados. Dados do nosso grupo mostram que a interação PrPc - STI-1 está relacionada fisiologicamente com a diferenciação neuronal pela via MAPK (LOPES, em preparação). Desta forma, uma diminuição na concentração de STI-1 poderia contribuir para uma alteração nos processos de diferenciação celular, que é uma das características da agressividade tumoral.

Com relação aos neuroblastomas, quando subdividimos as amostras para uma análise da expressão das proteínas e a progressão tumoral, um número maior de casos que apresentavam metástase ou invasão tumoral tiveram a expressão de PrPc diminuída em comparação com os casos que não apresentavam invasão. Em tumores carcinóides, os baixos níveis de PrPc em amostras que apresentavam metástase também foram verificados, o mesmo acontecendo nas amostras de adenocarcinoma de pâncreas. Esta associação entre baixas concentrações de PrPc e invasão pareceu-nos interessante. Dados recentes do grupo mostram que células tumorais provenientes de animais que não expressam a proteína PrPc formam maior número de colônias pulmonares *in vivo* do que aquelas oriundas de animais que expressam a proteína (MURAS, em preparação). Este estudo indica uma participação de moléculas de adesão célula-célula sendo mais expressas em células que não expressam PrPc, fazendo com que o trombo de células tumorais sobreviva melhor aos processos de embolização e disseminação vascular. As células metastáticas devem adquirir várias propriedades para que a invasão de novos tecidos tenha sucesso, como expressão aumentadas de receptores de moléculas de adesão,

produção de proteases e fatores de motilidade celular (COTRAN 1999). Vários estudos levaram a descoberta de "genes supressores de metástase", que estão expressos em altas concentrações em tumores de baixo potencial metastático e em baixos níveis em linfonodos metastáticos, como o *nm23*, *KISS1* e *KAI1* (MASHIMO et al. 1998; SAMANT et al. 2000; JEE et al. 2003; GONCHARUK et al. 2004). Estes dados sugerem que PrPc pode estar atuando da mesma maneira. A menor expressão de PrPc em casos de tumores metastáticos se confirmado, pode vir a ser usado como um marcador de agressividade da doença.

Alterações na proliferação, diferenciação, sobrevivência e invasão são fatores que marcam a carcinogênese e a progressão tumoral. Visto o papel de PrPc em todos estes eventos é razoável admitir sua participação no processo tumoral e que a alteração de expressão de PrPc deva influenciá-los. Um estudo comparando a expressão gênica de linhagens de fibroblastos com e sem a expressão de PrPc e na ausência ou presença de fatores de crescimento, indicou que a ausência de PrPc está ligada a regulação de vários genes envolvidos com proliferação, diferenciação e sobrevivência das células, diminuindo a expressão de genes que codificam proteínas envolvidas em cascatas de sinalização dependentes de ras e rac (SATOH et al. 2000). Numa avaliação de genes envolvidos com transformação celular feitos com culturas estáveis de células epiteliais de rim de ratos expressando H-Ras, *Prnp* foi encontrado reprimido (YOON et al. 2001). A resistência de células de fibrosarcoma a drogas supressoras da replicação do DNA (afidicolina, doxorubicina e hidroxiureia), foi associada a regulação de genes envolvidos com replicação, reparo de DNA, controle do ciclo celular, resposta a estresse e transdução de sinal, sendo que *Prnp* estava entre os genes superexpressos (LEVENSON et al. 2000). HAN et al. (2002) mostraram *Prnp* até sete vezes mais expresso em linhagem celular de adenocarcinoma de pâncreas que em células normais de pâncreas. Recentemente, numa análise de linhagem de carcinoma de mama resistentes ao tratamento com TNF alfa, *Prnp* também foi encontrado superexpresso (DIARRA-MEHRPOUR et al. 2004).

Os dados aqui obtidos revelam que a expressão da proteína PrPc pode estar aumentada ou reprimida em uma variedade de tumores, sendo que esta variabilidade na expressão poderia estar correlacionada com a alteração na sinalização para a

morte celular, o que implicaria na progressão da doença ou maior resistência a drogas.

Há, portanto, indícios da participação de PrPc e STI-1 no câncer, que devem ser explorados em novas pesquisas, onde serão revelados quais os mecanismos utilizados por estas proteínas que estariam favorecendo a transformação celular, atuando na tumorigenese, na progressão tumoral ou facilitando a invasão de novos tecidos.

4.6 CONCLUSÕES

- Em pacientes portadores de gliomas não há variantes alélicas prevalentes no gene de PrPc e não há correlação entre elas e a presença de epilepsia ou o grau de malignidade tumoral.
- Em astrocitomas, PrPc tem sua expressão aumentada em glioblastomas em comparação a sua expressão em astrócitos normais. PrPc tem uma expressão diminuída em astrocitomas graus II e III. Essa expressão vai aumentando a medida que o grau histológico aumenta na progressão tumoral (grau II para grau III e deste para grau IV). STI-1 tem diminuição de expressão em astrocitomas de baixo grau e em glioblastomas volta a expressar níveis iguais ou superiores ao do astrócito normal. A enzima n-NOS acompanhou PrPc na alta expressão em glioblastomas. A enzima i-NOS mostrou-se altamente expressa nestes tumores. As proteínas PrPc, STI-1, i-NOS e n-NOS apresentam forte positividade em células gemistocíticas. Estes dados sugerem uma participação de PrPc na transformação maligna e na progressão tumoral.
- Em carcinoma ductal invasivo de mama, PrPc mostrou-se mais expresso em todos os tumores em comparação ao tecido normal. Este aumento de expressão parece acompanhar a expressão de i-NOS.
- Em retinoblastomas, PrPc mostrou expressão aumentada em relação ao tecido normal. STI-1 parece diminuir de expressão com a menor diferenciação nestes tumores.
- Em neuroblastomas invasivos e com metastases, PrPc apresenta uma diminuição de expressão na maioria das amostras.
- Em tumores carcinóides e carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço, PrPc mostra-se altamente expresso e este aumento é acompanhado por STI-1,

i-NOS e n-NOS. Em tumores carcinóides há uma diminuição de expressão em amostras com invasão e metástase.

➤ Em adenocarcinoma de pâncreas, melanomas e adenocarcinomas de próstata PrPc, STI-1, n-NOS e i-NOS também mostraram-se expressos na maioria dos tumores analisados.

➤ Foi demonstrada a expressão de STI-1 em tecidos humanos normais de cérebro, próstata, pâncreas, mama, retina e pele.

4.7 PERSPECTIVAS DO ESTUDO

Os resultados aqui apresentados suscitam várias perguntas e abrem novas linhas de pesquisa para o estudo da proteína PrPc e sua participação em processos tumorais.

Devemos continuar as investigações aqui iniciadas, ampliando o número de amostras dos tumores que nos pareceram mais promissores, tais como os retinoblastomas, os neuroblastomas e os carcinomas ductais invasivos de mama.

Um TMA de adenocarcinomas de próstata já foi avaliado confirmando a expressão de PrPc em 150 amostras tumorais e 50 normais. Para os carcinomas de mama este estudo já está em andamento, sendo que estamos analisando outro TMA com mais amostras de carcinoma ductal invasivo (n=305), acrescido de mais tecidos normais (n=46), tecido mamário com hiperplasia (n=46) e outros tipos de carcinoma de mama como o carcinoma ductal *in situ* (n=103) e o carcinoma lobular (n=20).

O papel da diminuição de expressão de PrPc em processos de invasão e metástase também deve continuar a ser estudado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguzzi A, Polymenidou M. Mammalian prion biology: one century of evolving concepts. **Cell** 2004; 116:313-27.

Alpers T, Cramp WA, Haig DA, Clarke MC. Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? **Nature** 1967; 214:764-6.

Atouf F, Scharfmann R, Lasmezas C, Czernichow P. Tight hormonal control of PrP gene expression in endocrine pancreatic cells. **Biochem Biophys Res Commun** 1994; 201:1220-6.

Baker SJ, McKinnon PJ. Tumour-suppressor function in the nervous system. **Nat Rev Cancer** 2004; 4:184-96.

Baranes D, Lederfein D, Huang YY, Chen M, Bailey CH, Kandel ER. Tissue plasminogen activator contributes to the late phase of LTP and to synaptic growth in the hippocampal mossy fiber pathway. **Neuron** 1998; 21:813-25.

Barbanti P, Fabbrini G, Salvatore M, Petraroli R, Cardone F, Maras B, Equestre M, Macchi G, Lenzi GL, Pocchiari M. Polymorphism at codon 129 or codon 219 of PRNP and clinical heterogeneity in a previously unreported family with Gerstmann-Straussler-Scheinker disease (PrP-P102L mutation). **Neurology**. 1996;47(3):734-41.

Barclay GR, Hope J, Birkett CR, Turner ML. Distribution of cell-associated prion protein in normal adult blood determined by flow cytometry. **Br J Haematol** 1999; 107:804-14.

Beaumont A, Whittle IR. The pathogenesis of tumour associated epilepsy. **Acta Neurochir (Wien)** 2000; 142:1-15.

Beere HM, Green DR. Stress management - heat shock protein-70 and the regulation of apoptosis. **Trends Cell Biol** 2001; 11:6-10.

Ben-Ari Y, Lagowska J, Tremblay E, Le Gal La Salle G. A new model of focal status epilepticus: intra-amygdaloid application of kainic acid elicits repetitive secondarily generalized convulsive seizures. **Brain Res** 1979; 163:176-9.

Beringue V, Mallinson G, Kaisar M, et al. Regional heterogeneity of cellular prion protein isoforms in the mouse brain. **Brain** 2003; 126:2065-73.

Berkovic SF, Jackson GD. The hippocampal sclerosis whodunit: enter the genes. **Ann Neurol** 2000; 47:557-8.

Berr C, Richard F, Dufouil C, Amant C, Alperovitch A, Amouyel P. Polymorphism of the prion protein is associated with cognitive impairment in the elderly: the EVA study. **Neurology** 1998; 51:734-7.

BIN, Bayesian model accounting for within-class biological variability in SAGE analysis. Available from <URL:<http://www.lbc.ludwig.org.br/~rvencio/SageBeBin>>. [2004 Mai 25].

Blatch GL, Lassle I, Takatori T, Grandhi T, Kundra V, Zetter BR. Molecular characterization of extendin: a protein localized in extending pseudopia. **Proc Am Assoc Res** 1995; 36: 68.

Blatch GL, Lassle M, Zetter BR, Kundra V. Isolation of a mouse cDNA encoding mSTII, a stress-inducible protein containing the TPR motif. **Gene** 1997; 194:277-82.

Blattler T, Brandner S, Raeber AJ, et al. PrP-expressing tissue required for transfer of scrapie infectivity from spleen to brain. **Nature** 1997; 389:69-73.

Blumcke I, Wiestler OD. Gangliogliomas: an intriguing tumor entity associated with focal epilepsies. **J Neuropathol Exp Neurol** 2002; 61:575-84.

Bonan CD, Walz R, Pereira GS, et al. Changes in synaptosomal ectonucleotidase activities after status epilepticus induced by pilocarpine and kainic acid. **Epilepsy Res** 2000; 39: 229-238.

Bosque PJ, Ryou C, Telling G, et al. Prions in skeletal muscle. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2002; 99:3812-7.

Bounhar Y, Zhang Y, Goodyer CG, LeBlanc A. Prion protein protects human neurons against Bax-mediated apoptosis. **J Biol Chem** 2001; 276:39145-9.

Broholm H, Rubin I, Kruse A, et al. Nitric oxide synthase expression and enzymatic activity in human brain tumors. **Clin Neuropathol** 2003; 22:273-81.

Brown DR, Qin K, Herms JW, et al. The cellular prion protein binds copper in vivo. **Nature** 1997; 390:684-7.

Brown DR, Mohn CM. Astrocytic glutamate uptake and prion protein expression. **Glia** 1999; 25:282-92.

Brown DR, Wong BS, Hafiz F, Clive C, Haswell SJ, Jones IM. Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase. **Biochem J** 1999; 344: 1-5.

Brown DR, Clive C, Haswell SJ. Antioxidant activity related to copper binding of native prion protein. **J Neurochem** 2001; 76:69-76.

Brown DR, Sassoon J. Copper-dependent functions for the prion protein. **Mol Biotechnol** 2002; 22:165-78.

Brown DR, Nicholas RS, Canevari L. Lack of prion protein expression results in a neuronal phenotype sensitive to stress. **J Neurosci Res** 2002; 67:211-24.

Brown DR. Role of the prion protein in copper turnover in astrocytes. **Neurobiol Dis** 2004; 15:534-43.

Bueler H, Fischer M, Lang Y, et al. Normal development and behavior of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. **Nature** 1992; 356:577-82.

Buono RJ, Ferraro TN, O'Connor MJ, et al. Lack of association between an interleukin 1 beta (IL-1beta) gene variation and refractory temporal lobe epilepsy. **Epilepsia** 2001; 42:782-4.

Caboclo LO, Huang N, Lepski GA, et al. Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease following human growth hormone therapy: case report. **Arq Neuropsiquiatr** 2002; 60:458-61.

Cabral AL, Lee KS, Martins VR. Regulation of the cellular prion protein gene expression depends on chromatin conformation. **J Biol Chem** 2002; 277:5675-82.

Cancer Genome Anatomy Project. Available from. <URL:<http://cgap.nci.nih.gov/SAGE>>. [2004 Mai 25]

Carvalho SMT. **Estudo da expressão das sintases do óxido nítrico no câncer de mama e sua correlação com o estadió clínico, grau histológico, receptores hormonais e proteína p53**. São Paulo; 2002. [Dissertação de Mestrado-Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo].

Castro RMRPS **Composição química e estudo imunohistoquímico de amiloidoses**. São Paulo; 2000. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Castro RMRPS, Landemberger MC, Walz R, et al. High capacity and low cost detection of prion protein gene variant alleles by denaturing HPLC. **J Neurosci Meth** 2004. <http://www.sciencedirect.com/science> doi:10.1016/j.jneumeth.2004.05.001.

Cavalheiro EA, Leite JP, Bortolotto ZA, Turski WA, Ikonomidou C, Turski L. Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. **Epilepsia** 1991; 32:778-82.

Cavanne WK, Furnari FB, Nagane M, et al. Diffusely infiltrating astrocytomas. In: Kleihues P, Cavanne WK, editors. **Pathology & genetics of tumors of the nervous system**. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2000. p.5-21.

Cervenakova L, Buete fish C, Lee HS, et al. Novel PRPN sequence variant associated with familial encephalopathy. **Am J Med Genet** 1994; 88:653-56.

Chen SG, Teplow DB, Parchi P, Teller JK, Gambetti P, Autilio-Gambetti L. Truncated forms of the human prion protein in normal brain and in prion diseases. **J Biol Chem** 1995; 270:19173-80.

Chen ZL, Strickland S. Neuronal death in the hippocampus is promoted by plasmin-catalyzed degradation of laminin. **Cell** 1997; 91:917-25.

Chevassus-au-Louis N, Baraban SC, Gaiarsa JL, Ben-Ari Y. Cortical malformations and epilepsy: new insights from animal models. **Epilepsia** 1999; 40:811-21.

Chiarini LB, Freitas ARO, Zanata SM, Martins VM, Brentani RR, Linden R. Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. **EMBO J** 2002; 21: 3317-26.

Clarke G, Collins RA, Leavitt BR, et al. A one-hit model of cell death in inherited neuronal degenerations. **Nature** 2000; 406:195-9.

Cobbs CS, Brenman JE, Aldape KD, Bredt DS, Israel MA. Expression of nitric oxide synthase in human central nervous system tumors. **Cancer Res** 1995; 55:727-30.

Coitinho AS, Roesler R, Martins VR, Brentani RR, Izquierdo I. Cellular prion protein ablation impairs behavior as a function of age. **Neuroreport** 2003;14:1375-9.

Colling SB, Collinge J, Jefferys JG. Hippocampal slices from prion protein null mice: disrupted Ca(2+) - activated K+ currents. **Neurosci Lett** 1996; 209:49-52.

Colling SB, Khana M, Collinge J, Jefferys JG. Mossy fibre reorganization in the hippocampus of prion protein null mice. **Brain Res** 1997; 755:28-35.

Collinge J, Whittington MA, Sidle KCL, et al. Prion protein is necessary for normal synaptic function. **Nature** 1994; 370:295-7.

Colognato H, Yurchenco PD. Form and function: the laminin family of heterotrimers. **Dev Dyn** 2000; 218:213-34.

Connors BW. Neocortical anatomy and physiology. In: Engel J, Pedley TA, editors. **Epilepsy: a comprehensive textbook**. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997. p.307-21.

Cotran R S, Kumar V, Collins T. **Robbins: pathologic basis of disease**. 6th. ed. Philadelphia: W. B. Saunders; 1999. Neoplasia; p.260-327.

Crino PB, Miyata H, Vinters HV. Neurodevelopmental disorders as a cause of seizures: neuropathologic, genetic, and mechanistic considerations. **Brain Pathol** 2002; 12:212-33.

Crnogorac-Jurcevic T, Efthimiou E, Nielsen T, et al. Expression profiling of microdissected pancreatic adenocarcinomas. **Oncogene** 2002; 21:4587-94.

Croes EA, Dermaut B, Houwing-Duistermaat JJ, et al. Early cognitive decline is associated with prion protein codon 129 polymorphism. **Ann Neurol** 2003;54:275-6.

Croes EA, Alizadeh BZ, Bertoli-Avella AM, et al. Polymorphisms in the prion protein gene and in the doppel gene increase susceptibility for Creutzfeldt-Jakob disease. **Eur J Hum Genet** 2004; 12:389-94.

Dal-Pizzol F, Klamt F, Vianna MM, et al. Lipid peroxidation in hippocampus early and late after status epilepticus induced by pilocarpine or kainic acid in Wistar rats. **Neurosci Lett** 2000; 291:179-82.

De Araujo Souza PS, Villa LL. Genetic susceptibility to infection with human papillomavirus and development of cervical cancer in women in Brazil. **Mutat Res.** 2003; 544(2-3): 375-83.

Del Bo R, Comi GP, Giorda R, et al. The 129 codon polymorphism of the prion protein gene influences earlier cognitive performance in Down syndrome subjects. **J Neurol** 2003; 250:688-92.

Demant P. Cancer susceptibility in the mouse: genetics, biology and implications for human cancer. **Nat Rev Genet** 2003; 4:721-34.

Dermaut B, Croes EA, Rademakers R, et al. PRNP Val129 homozygosity increases risk for early-onset Alzheimer's disease. **Ann Neurol** 2003; 53:409-12.

Diarra-Mehrpour M, Arrabal S, Jalil A, et al. Prion protein prevents human breast carcinoma cell line from tumor necrosis factor alpha-induced cell death. **Cancer Res** 2004; 64:719-27.

Dimcheff DE, Portis JL, Caughey B. Prion proteins meet protein quality control. **Trends Cell Biol** 2003; 13:337-40.

Ding Q, Stewart J Jr, Prince CW, et al. Promotion of malignant astrocytoma cell migration by osteopontin expressed in the normal brain: differences in integrin signaling during cell adhesion to osteopontin versus vitronectin. **Cancer Res** 2002; 62:5336-43.

Dodelet VC, Cashman NR. Prion protein expression in human leukocyte differentiation. **Blood** 1998; 91:1556-61.

Doh-Ura K, Tateishi J, Sasaki H, Kitamoto T, Sakaki Y. Pro---Leu change at position 102 of prion protein is the most common but not the sole mutation related to GSS. **Biochem Biophys Res Commun** 1989; 163:974-9.

Eisinger F, Bressac B, Castaigne D, Cottu PH, Lansac J, Lefranc JP, Lesur A, Nogues C, Pierret J, Puy-Pernias S, Sobol H, Tardivon A, Tristant H, Villet R. Identification and management of hereditary predisposition to cancer of the breast and the ovary. **Bull Cancer** 2004;91(3):219-37.

Enam SA, Rosenblum ML, Edvardsen K. Role of extracellular matrix in tumor invasion: migration of glioma cells along fibronectin positive mesenchymal cell processes. **Neurosurgery** 1998; 42:599-608.

Engel J, Jr. Surgery for seizures. **N Engl J Med** 1996; 334:647-52.

Esiri MM, Carter J, Ironside JW. Macrophage and microglial cell immunoreactivity for PrP(c) in a random post-mortem population. **Neuropathol Appl Neurobiol** 2002; 28:79-82.

Fabrizi C, Silei V, Menegazzi M, et al. The stimulation of inducible nitric-oxide synthase by the prion protein fragment 106--126 in human microglia is tumor necrosis factor-alpha-dependent and involves p38 mitogen-activated protein kinase. **J Biol Chem** 2001; 276:25692-6.

Finckh U, Muller-Thomsen T, Mann U, et al. High prevalence of pathogenic mutations in patients with early-onset dementia detected by sequence analyses of four different genes. **Am J Hum Genet** 2000; 66:110-7.

Follet J, Lemaire-Vieille C, Blanquet-Grossard F, et al. PrP expression and replication by Schwann cells: implications in prion spreading. **J Virol** 2002; 76:2434-9.

Ford MJ, Burton LJ, Li H, et al. A marked disparity between the expression of prion protein and its message by neurones of the CNS. **Neuroscience** 2002a; 111:533-51.

Ford MJ, Burton LJ, Morris RJ, Hall SM. Selective expression of prion protein in peripheral tissues of the adult mouse. **Neuroscience**. 2002b; 113:177-92.

Fournier JG, Escaig-Haye F, Billette de Villemeur T, Robain O, Lasmezas CI, Deslys JP, Dormont D, Brown P. Distribution and submicroscopic immunogold localization of cellular prion protein (PrP_c) in extracerebral tissues. **Cell Tissue Res**. 1998; 292 (1):77-84.

Fournier JG. Introduction to histological localization of prion proteins. **Microsc Res Tech** 2000; 50:1.

Furnari FB, Lin H, Huang HJS, Cavenee WK. Growth suppression of glioma cells by PTEN requires a functional phosphatase catalytic domain. **Proc Natl Acad Sci USA** 1997; 94:12479-84.

Gajdusek DC, Zigas V. Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea; the endemic occurrence of kuru in the native population. **N Engl J Med**. 1957; 257(20):974-8.

Gambardella A, Manna I, Labate A, et al. GABA(B) receptor 1 polymorphism (G1465A) is associated with temporal lobe epilepsy. **Neurology** 2003; 60:560-3.

Gene Bank. Available from <URL://www.ncbi.nlm.nih.gov>. [2003 Jan 24]

Ghetti B, Piccardo P, Spillantini MG, et al. Vascular variant of prion protein cerebral amyloidosis with tau-positive neurofibrillary tangles: the phenotype of the stop codon 145 mutation in PRNP. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1996; 93:744-8.

Gibbs SM. Regulation of neuronal proliferation and differentiation by nitric oxide. **Mol Neurobiol** 2003; 27:107-20.

Gill AC, Ritchie MA, Hunt LG, et al. Post-translational hydroxylation at the N-terminus of the prion protein reveals presence of PPII structure in vivo. **EMBO J** 2000; 19:5324-31.

Gladson CL, Wilcox JN, Sanders L, Gillespie GY, Cheresch DA. Cerebral microenvironment influences expression of the vitronectin gene in astrocytic tumors. **J Cell Sci** 1995; 108:947-56.

Goel S, Wharton SB, Brett LP, Whittle IR. Morphological changes and stress responses in neurons in cerebral cortex infiltrated by diffuse astrocytoma. **Neuropathology** 2003; 23:262-70.

Goldfarb LG, Brown P, McCombie WR, et al. Transmissible familial Creutzfeldt-Jakob disease associated with five, seven, and eight extra octapeptide coding repeats in the PRNP gene. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1991; 88:10926-30.

Goldfarb LG, Brown P, Little BW, et al. A new (two-repeat) octapeptide coding insert mutation in Creutzfeldt-Jakob disease. **Neurology** 1993; 43:2392-4.

Goldmann W, O'Neill G, Cheung F, Charleson F, Ford P, Hunter N. PrP (prion) gene expression in sheep may be modulated by alternative polyadenylation of its messenger RNA. **J Gen Virol** 1999; 80:2275-83.

Goncharuk VN, del-Rosario A, Kren L, et al. Co-downregulation of PTEN, KAI-1, and nm23-H1 tumor/metastasis suppressor proteins in non-small cell lung cancer. **Ann Diagn Pathol** 2004; 8:6-16

Graner E, Mercadante AF, Zanata SM, et al. Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. **Brain Res Mol Brain Res** 2000a; 76: 85-92.

Graner E, Mercadante AF, Zanata SM, Martins VR, Jay DG, Brentani RR. Laminin-induced PC-12 cell neurite behavior following laser inactivation of cellular prion protein. **FEBS Letters** 2000b; 482:257-60.

Green DR, Evan GI. A matter of life and death. **Cancer Cell** 2002; 1:19-30.

Griffith JS. Self-replication and scrapie. **Nature** 1967; 215 (105):1043-4.

Haik S, Faucheux BA, Sazdovitch V, et al. The sympathetic nervous system is involved in variant Creutzfeldt-Jakob disease. **Nat Med** 2003; 9:1121-3.

Han H, Bearss DJ, Browne LW, Calaluca R, Nagle RB, Von Hoff DD. Identification of differentially expressed genes in pancreatic cancer cells using cDNA microarray. **Cancer Res** 2002; 62:2890-6.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. **Cell** 2000; 100:57-70.

Harris DA. Cellular biology of prion diseases. **Clin Microbiol Rev** 1999; 12:429-44

Hauser WA. Incidence and prevalence. In: Engel J, Pedley TA, editors. **Epilepsy: a comprehensive textbook**. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1998. p.47-57.

Hegde RS, Mastrianni JA, Scott MR, et al. A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease. **Science** 1998; 279:827-34.

Heppner FL, Aguzzi A. Prions. In: **Encyclopedia of the life sciences**. Danvers: Nature Publ Group; 2001. Available from <URL: <http://www.els.net/>. [2003 Jan 12]

Hetz C, Maundrell K, Soto C. Is loss of function of the prion protein the cause of prion disorders? **Trends Mol Med** 2003; 9:237-43.

Hijazi N, Shaked Y, Rosenmann H, Ben-Hur T, Gabizon R. Copper binding to PrPC may inhibit prion disease propagation. **Brain Res** 2003; 993:192-200.

Hill AF, Joiner S, Wadsworth JD, et al. Molecular classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. **Brain** 2003; 126:1333-46.

Honoré B, Leffers H, Madsen P, Rasmussen HH, Vandekerckhove J, Celis JE. Molecular cloning and expression of a transformation-sensitive human protein containing the TPR motif and sharing identity to stress-inducible yeast protein ST1. **J Biol Chem** 1992; 267:8485-91.

Horiuchi M, Yamazaki N, Ikeda T, Ishiguro N, Shinagawa M. A cellular form of prion protein (PrPC) exists in many non-neuronal tissues of sheep. **J Gen Virol** 1995; 76:2583-7.

Horiuchi M, Ishiguro N, Nagasawa H, Toyoda Y, Shinagawa M. Alternative usage of exon 1 of bovine PrP mRNA. **Biochem Biophys Res Commun** 1997; 233:650-4.

Hsiao K, Baker HF, Crow TJ, et al. Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Straussler syndrome. **Nature** 1989; 338:342-5.

Hsiao K, Dlouhy SR, Farlow MR, Cass C, Da Costa M, Conneally PM, Hodes ME, Ghetti B, Prusiner SB. Mutant prion proteins in Gerstmann-Straussler-Scheinker disease with neurofibrillary tangles. **Nat Genet.** 1992;1(1):68-71.



Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. **Nat Rev Cancer** 2002; 2:277-88.

Inoue I, Kitamoto T, Doh-ura K, Shii H, Goto I, Tateishi J. Japanese family with Creutzfeldt-Jakob disease with codon 200 point mutation of the prion protein gene. **Neurology** 1994; 44:299-301.

Jarrett JT, Lansbury PT, Jr. Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? **Cell** 1993; 73:1055-8.

Jee B, Jin K, Hahn JH, Song HG, Lee H. Metastasis-suppressor KAI1/CD82 induces homotypic aggregation of human prostate cancer cells through Src-dependent pathway. **Exp Mol Med** 2003; 35:30-7.

Jee SH, Won SY, Yun JE, Lee JE, Park JS, Ji SS. Polymorphism p53 codon-72 and invasive cervical cancer: a meta-analysis. **Int J Gynaecol Obstet.** 2004;85(3):301-8.

Johnson BD, Schumacher RJ, Ross ED, Toft DO. Hop modulates Hsp70/Hsp90 interactions in protein folding. **J Biol Chem** 1998; 273:3679-86.

Kadoya H, Ikeda K, Nakatani K, Seki S, Kaneda K. Cellular prion protein expression in non-ciliated epithelial cells of proliferating bronchioles during bleomycin-induced pulmonary fibrosis in hamster. **Osaka City Med J** 2001;47:23-32.

Kanemoto K, Kawasaki J, Miyamoto T, Obayashi H, Nishimura M. Interleukin (IL)1beta, IL-1alpha, and IL-1 receptor antagonist gene polymorphisms in patients with temporal lobe epilepsy. **Ann Neurol** 2000; 47:571-574.

Keshet GI, Ovadia H, Taraboulos A, Gabizon R. Scrapie-infected mice and PrP knockout mice share abnormal localization and activity of neuronal nitric oxide synthase. **J Neurochem** 1999; 72:1224-31.

Kim BH, Lee HG, Choi JK, et al. The cellular prion protein (PrPC) prevents apoptotic neuronal cell death and mitochondrial dysfunction induced by serum deprivation. **Brain Res Mol Brain Res** 2004; 124:40-50.

Kim SJ, Rahbar R, Hegde RS. Combinatorial control of prion protein biogenesis by the signal sequence and transmembrane domain. **J Biol Chem** 2001; 276:26132-40.

Kindlmann K. **Avaliação da atividade biológica de moléculas de PrPc contendo os polimorfismos nos códons M129V e N171S**. São Paulo; 2003. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Kitada T, Seki S, Ikeda K, et al. Clinicopathological characterization of prion: a novel marker of activated human hepatic stellate cells. **J Hepatol** 2000; 33:751-7.

Kitamoto T, Ohta M, Doh-ura K, Hitoshi S, Terao Y, Tateishi J. Novel missense variants of prion protein in Creutzfeldt-Jakob disease or Gerstmann-Straussler syndrome. **Biochem Biophys Res Commun**. 1993;191(2):709-14.

Kiyohara C, Yoshimasu K, Shirakawa T, Hopkin JM. Genetic polymorphisms and environmental risk of lung cancer: a review. **Rev Environ Health** 2004; 19:15-38.

Klamt F, Dal-Pizzol F, Conte da Frota ML Jr, et al. Imbalance of antioxidant defense in mice lacking cellular prion protein. **Free Radic Biol Med** 2001; 30:1137-44.

Kleihues P, Cavenee WK. World Health Organization Classification of Tumours. In: **Pathology & genetics of tumors of the nervous system**. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2000. p.6-7.

Kleihues P, Davis RL, Ohgaki H, Burger PC, Westphal MM, Cavenee WK. Diffuse astrocytomas. In: Kleihues P, Cavanne WK, editors. **Pathology & genetics of tumors of the nervous system**. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2000a. p.22-26.

Kleihues P, Davis RL, Coons SW, Burger PC. Anaplastic astrocytomas. In: Kleihues P, Cavanne WK, editors. **Pathology & genetics of tumors of the nervous system**. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2000b. p.27-8.

Kleihues P, Burger PC, Collins VP, Newcomb EW, Ohgaki H, Cavenee WK. Glioblastoma. In: Kleihues P, Cavanne WK, editors. **Pathology & genetics of tumors of the nervous system**. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2000c. p.29-39.

Klein MA, Frigg R, Flechsig E, et al. A crucial role for B cells in neuroinvasive scrapie. **Nature** 1997; 390:687-90.

Kohn EC, Lu Y, Wang H, et al. Molecular therapeutics: promise and challenges. **Semin Oncol** 2004; 31:39-53.

Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. **Nat Med** 1998; 4:844-7.

Kovacs GG, Lindeck-Pozza E, Chimelli L, et al. Creutzfeldt-Jakob disease and inclusion body myositis: abundant disease-associated prion protein in muscle. **Ann Neurol** 2004; 55:121-5.

Kretzschmar HA, Stowring LE, Westaway D, Stubblebine WH, Prusiner SB, Dearmond SJ. Molecular cloning of a human prion protein cDNA. **DNA** 1986; 5:315-24.

Kuwahara C, Takeuchi AM, Nishimura T, et al. Prions prevent neuronal cell-line death. **Nature** 1999; 400:225-6.

Laine J, Marc ME, Sy MS, Axelrad H. Cellular and subcellular morphological localization of normal prion protein in rodent cerebellum. **Eur J Neurosci** 2001; 14:47-56.

Lala PK, Chakraborty C. Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression. **Lancet Oncol** 2001; 2:149-56.

Lampe J, Kitzler H, Walter MC, Lochmuller H, Reichmann H. Methionine homozygosity at prion gene codon 129 may predispose to sporadic inclusion body myositis. **Lancet** 1999; 353: 465-6.

Lasmezas CI. Putative functions of PrP(C). **Br Med Bull** 2003; 66:61-70.

Lassle M, Blatch GL, Kundra V, Takatori T, Zetter B. Stress-inducible, murine protein mSTII. **J Biol Chem** 1997; 272: 1876-84.

Lee KS, Magalhães AC, Zanata SM, Brentani RR, Martins VR, Prado MA. Internalization of mammalian fluorescent cellular prion protein and N-terminal deletion mutants in living cells. **J Neurochem** 2001; 79:79-87.

Lee KS, Linden R, Prado MA, Brentani RR, Martins VR. Towards cellular receptors for prions. **Rev Med Virol** 2003; 13:399-408.

Leite JP, Chimelli L, Terra-Bustamante VC, et al. Loss and sprouting of nitric oxide synthase neurons in the human epileptic hippocampus. **Epilepsia** 2002; 43 Suppl 5:235-42.

Levenson VV, Davidovich IA, Roninson IB. Pleiotropic resistance to DNA-interactive drugs is associated with increased expression of genes involved in DNA replication, repair, and stress response. **Cancer Res** 2000; 60:5027-30.

Li R, Liu D, Zanusso G, et al. The expression and potential function of cellular prion protein in human lymphocytes. **Cell Immunol** 2001; 207:49-58.

Liigant A, Haldre S, Oun A, et al. Seizure disorders in patients with brain tumors. **Eur Neurol** 2001; 45:46-51.

Lledo PM, Tremblay P, De Armond SJ, Prusiner SB, Nicoll RA. Mice deficient for prion protein exhibit normal neuronal excitability and synaptic transmission in the hippocampus. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1996; 93:2403-7.

Llewelyn CA, Hewitt PE, Knight RS, et al. Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. **Lancet** 2004; 363:417-21.

Llinás RR. The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: insights into central nervous system function. **Science** 1988; 242:1654-64.

Lorenz H, Windl O, Kretschmar HA. Cellular phenotyping of secretory and nuclear prion proteins associated with inherited prion diseases. **J Biol Chem** 2002; 277:8508-16.

Louis DN, Pomeroy SL, Cairncross JG. Focus on central nervous system neoplasia. **Cancer Cell** 2002; 1:125-8.

Lu QR, Park JK, Noll E, et al. Oligodendrocyte lineage genes (OLIG) as molecular markers for human glial brain tumors. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2001; 98:10851-6.

Ludwig HC, Feiz-Erfan I, Bockermann V, Behnke-Mursch J, Schallock K, Markakis E. Expression of nitric oxide synthase isozymes (NOS I-III) by immunohistochemistry and DNA in situ hybridization: correlation with macrophage presence, vascular endothelial growth factor (VEGF) and oedema volumetric data in 220 glioblastomas. **Anticancer Res** 2000; 20:299-304.

Ma J, Lindquist S. Conversion of PrP to a self-perpetuating PrP^{Sc}-like conformation in the cytosol. **Science** 2002; 298:1785-8.

Macario ME, Moura-Neto V, Vaisman M, et al. Abnormal proteins in the cerebrospinal fluid of a patient with Creutzfeldt-Jakob disease following administration of human pituitary growth hormone. **Braz J Med Biol Res** 1992; 25:1127-30.

Magalhães AC, Silva JA, Lee KS, et al. Endocytic intermediates involved with the intracellular trafficking of a fluorescent cellular prion protein. **J Biol Chem** 2002; 277:33311-8.

Mallucci GR, Ratten S, Asante EA, et al. Post-natal knockout of prion protein alters hippocampal CA1 properties, but does not result in neurodegeneration. **EMBO J** 2002; 21:202-10.

Mallucci G, Dickinson A, Linehan J, Klohn PC, Brandner S, Collinge J. Depleting neuronal PrP in prion infection prevents disease and reverses spongiosis. **Science** 2003; 302:871-4.

Manson J, West JD, Thomson V, McBride P, Kaufman MH, Hope J. The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis? **Development** 1992; 115:117-22.

Mariani L, Beaudry C, McDonough WS, et al. Glioma cell motility is associated with reduced transcription of proapoptotic and proliferation genes: a cDNA microarray analysis. **J Neurooncol** 2001; 53:161-76.

Martins VR, Graner E, Garcia-Abreu J, et al. Complementary hydrophathy identifies a cellular prion protein receptor. **Nat Med** 1997; 3:1376-82.

Martins VR, Mercadante AF, Cabral ALB, Freitas ARO, Castro RMRPS. Insights about cellular prion physiological function. **Braz J Med Biol Res** 2001; 34:585-95.

Martins VR, Linden R, Prado MAM, et al. Cellular prion protein: on the road for functions. **FEBS Letters** 2002; 512:25-8.

Mashimo T, Watabe M, Hirota S, et al. The expression of the KAI1 gene, a tumor metastasis suppressor, is directly activated by p53. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1998; 95:11307-11.

Mastrianni JA, Iannicola C, Myers RM, De Armond S, Prusiner SB. Mutation of the prion protein gene at codon 208 in familial Creutzfeldt-Jakob disease. **Neurology** 1996; 47:1305-12.

Mastrianni JA, Roos RP. The prion diseases. **Semin Neurol** 2000; 20:337-52.

McCormick DA, Contreras D. On the cellular and network bases of epileptic seizures. **Annu Rev Physiol** 2001; 63:815-46.

McIntosh AM, Wilson SJ, Berkovic SF. Seizure outcome after temporal lobectomy: current research practice and findings. **Epilepsia** 2001; 42:1288-307.

McKinley MP, Bolton DC, Prusiner SB. A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. **Cell** 1983; 35:57-62.

Mead S, Mahal SP, Beck J, et al. Sporadic--but not variant--Creutzfeldt-Jakob disease is associated with polymorphisms upstream of PRNP exon 1. **Am J Hum Genet** 2001; 69:1225-35.

Mead S, Stumpf MP, Whitfield J, et al. Balancing selection at the prion protein gene consistent with prehistoric kurulike epidemics. **Science** 2003; 300:640-3.

Medori R, Tritschler HJ, LeBlanc A, et al. Fatal familial insomnia, a prion disease with a mutation at codon 178 of the prion protein gene. **N Engl J Med** 1992; 326:444-9.

Miele G, Alejo Blanco AR, Baybutt H, Horvat S, Manson J, Clinton M. Embryonic activation and developmental expression of the murine prion protein gene. **Gene Exp** 2003; 11:1-12.

Miller MW, Williams ES. Chronic wasting disease of cervids. **Curr Top Microbiol Immunol** 2004; 284:193-214.

Moore RC, Lee IY, Silverman GL, et al. Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel. **J Mol Biol** 1999; 292:797-817.

Morbidelli L, Donnini S, Ziche M. Role of nitric oxide in tumor angiogenesis. **Cancer Treat Res** 2004; 117:155-67.

Morel E, Fouquet S, Chateau D, et al. The cellular prion protein PrP^c is expressed in human enterocytes in cell-cell junctional domains. **J Biol Chem** 2004; 279:1499-505.

Moudjou M, Frobert Y, Grassi J, La Bonnardiere C. Cellular prion protein status in sheep: tissue-specific biochemical signatures. **J Gen Virol** 2001; 82:2017-24.

Moussa F. **Participação da interação PrP^c-laminina nos processos de adesão, migração e invasão de células tumorais.** São Paulo; 2001. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Nagane M, Levitzki A, Gazit A, Cavenne WK, Huang HJS. Drug resistance of human glioblastoma cells conferred by a tumor-specific mutant epidermal growth factor receptor through modulation of Bcl-Xl and caspase-3-like proteases. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1998; 95:5724-29.

Nelson JS, Bruner JM, Wiestler OD, Vandenberg SR. Ganglioglioma and gangliocytoma. In: Kleihues P, Cavanne WK, editors. **Pathology & genetics of tumors of the nervous system**. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2000. p.96-8.

Nitrini R, Rosemberg S, Passos-Bueno MR, et al. Familial spongiform encephalopathy associated with a novel prion protein gene mutation. **Ann Neurol** 1997; 42:138-46.

Noble M. Can neural stem cells be used to track down and destroy migratory brain tumor cells while also providing a means of repairing tumor associated damage? **Proc Natl Acad Sci U S A** 2000; 97:12393-5.

Noble M, Dietrich J. The complex identity of brain tumors: emerging concerns regarding origin, diversity and plasticity. **Trends Neurosci** 2004; 27:148-54.

O'Connor RE, Sontheimer H, Spencer DD, de Lanerolle NC. Astrocytes from human hippocampal epileptogenic foci exhibit action potential-like responses. **Epilepsia** 1998; 39:134-40.

Oda M, Arai N, Maehara T, Shimizu H, Kojima H, Yagishita A. Brain tumors in surgical neuropathology of intractable epilepsies, with special reference to cerebral dysplasias. **Brain Tumor Pathol** 1998; 15:41-51.

Oesch B, Westaway D, Walchli M, et al. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. **Cell** 1985; 40:735-46.

Okuda T, Sumiya T, Mizutani K, et al. Analyses of differential gene expression in genetic hypertensive rats by microarray. **Hypertens Res** 2002; 25:249-55.

Oyoshi T, Nomoto M, Hirano H, Kuratsu J. Pathodynamics of nitric oxide production within implanted glioma studied with an in vivo microdialysis technique and immunohistochemistry. **J Pharmacol Sci** 2003; 91:15-22.

Paitel E, Alves da Costa C, Vilette D, Grassi J, Checler F. Overexpression of PrP^C triggers caspase 3 activation: potentiation by proteasome inhibitors and blockade by anti-PrP antibodies. **J Neurochem** 2002; 83:1208-14.

Paitel E, Fahraeus R, Checler F. Cellular prion protein sensitizes neurons to apoptotic stimuli through Mdm2-regulated and p53-dependent caspase 3-like activation. **J Biol Chem** 2003; 278:10061-6.

Pammer J, Weninger W, Tschachler E. Human keratinocytes express cellular prion-related protein in vitro and during inflammatory skin diseases. **Am J Pathol** 1998; 153:1353-8.

Pammer J, Cross HS, Frobert Y, Tschachler E, Oberhuber G. The pattern of prion-related protein expression in the gastrointestinal tract. **Virchows Arch** 2000; 436:466-72.

Pan T, Li R, Wong BS, Liu T, Gambetti P, Sy MS. Heterogeneity of normal prion protein in two-dimensional immunoblot: presence of various glycosylated and truncated forms. **J Neurochem** 2002; 81:1092-101.

Panegyres PK, Toufexis K, Kakulas BA, Cernevakova L, Brown P, Ghetti B, Piccardo P, Dlouhy SR. A new PRNP mutation (G131V) associated with Gerstmann-Straussler-Scheinker disease. **Arch Neurol**. 2001;58(11):1899-902.

Parry HB. **Scrapie diseases in sheep**. London: Academic Press; 1983.

Pauly PC, Harris DA. Copper stimulates endocytosis of the prion protein. **J Biol Chem** 1998; 273:33107-10.

Peoc'h K, Manivet P, Beaudry P, et al. Identification of three novel mutations (E196K, V203I, E211Q) in the prion protein gene (PRNP) in inherited prion diseases with Creutzfeldt-Jakob disease phenotype. **Hum Mutat** 2000; 15:482.

Pereira GS, Walz R, Bonan CD, et al. Changes in cortical and hippocampal ectonucleotidase activities in mice lacking cellular prion protein. **Neurosci Lett** 2001; 301:72-4.

Perry RT, Go RC, Harrel LE, Acton RT. SSCP analysis and sequencing of the human prion protein gene (PRPN) detects two different 24 bp deletions in an atypical Alzheimer's disease family. **Am J Med Genet** 1995; 60:12-8.

Piccardo P, Dlouhy SR, Lievens PM, et al. Phenotypic variability of Gerstmann-Straussler-Scheinker disease is associated with prion protein heterogeneity. **J Neuropathol Exp Neurol** 1998; 57:979-88.

Piet R, Vargova L, Sykova E, Poulain DA, Olier SH. Physiological contribution of the astrocytic environment of neurons to intersynaptic crosstalk. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2004; 101:2151-5.

Pocchiari M, Salvatore M, Cutruzzola F, et al. A new point mutation of the prion protein gene in Creutzfeldt-Jakob disease. **Ann Neurol** 1993; 34:802-7.

Prince DA, Jacobs KM, Salin PA, Hoffman S, Parada I. Chronic focal neocortical epileptogenesis: does disinhibition play a role? **Can J Physiol Pharmacol** 1997; 75:500-7.

Priola SA, Chesebro B. Abnormal properties of prion protein with insertional mutations in different cell types. **J Biol Chem** 1998; 273:11980-5.

Prusiner SB. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. **Science** 1982; 216:136-44.

Prusiner SB, Scott MR. Genetics of prions. **Annu Rev Genet.** 1997;31:139-75.

Prusiner SB. Prions. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1998; 95:13363-83.

Puckett C, Concannon P, Casey C, Hood L. Genomic structure of the human prion protein gene. **Am J Hum Genet** 1991; 49:320-9.

Puoti G, Limido L, Cotrufo R, Di Fede G, Tagliavini F. Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease with MM1-type prion protein and plaques. **Neurology** 2004; 62:1239.

Rachidi W, Vilette D, Guiraud P, et al. Expression of prion protein increases cellular copper binding and antioxidant enzyme activities but not copper delivery. **J Biol Chem** 2003; 278:9064-72.

Reveneau S, Arnould L, Jolimoy G, et al. Nitric oxide synthase in human breast cancer is associated with tumor grade, proliferation rate, and expression of progesterone receptors. **Lab Invest** 1999; 79:1215-25.

Rickman DS, Bobek MP, Misek DE, et al. Distinctive molecular profiles of high-grade and low-grade gliomas based on oligonucleotide microarray analysis. **Cancer Res** 2001; 61:6885-91.

Roesler R, Walz R, Quevedo J, et al. Normal inhibitory avoidance learning and anxiety, but increased locomotor activity in mice devoid of PrP(C). **Brain Res Mol Brain Res** 1999; 71:349-53.

Rosenow F, Luders H. Presurgical evaluation of epilepsy. **Brain** 2001; 124:1683-700.

Roucou X, Gains M, LeBlanc AC. Neuroprotective functions of prion protein. **J Neurosci Res** 2004; 75:153-61.

Rujescu D, Hartmann AM, Gonnermann C, Moller HJ, Giegling I. M129V variation in the prion protein may influence cognitive performance. **Mol Psychiatry** 2003; 8:937-41.

Russo G, Zegar C, Giordano A. Advantages and limitations of microarray technology in human cancer. **Oncogene** 2003; 22:6497-507.

Sales N, Hassig R, Rodolfo K, et al. Developmental expression of the cellular prion protein in elongating axons. **Eur J Neurosci** 2002; 15:1163-77.

Sallinen SL, Sallinen PK, Haapasalo HK, et al. Identification of differentially expressed genes in human gliomas by DNA microarray and tissue chip techniques. **Cancer Res** 2000; 60:6617-22.

Salvatore M, Genuardi M, Petraroli R, Masullo C, D'Alessandro M, Pocchiari M. Polymorphisms of the prion protein gene in Italian patients with Creutzfeldt-Jacob disease. **Hum Genet** 1994; 94: 375-379.

Samaia HB, Mari JJ, Vallada HP, Moura RP, Simpson ATG, Brentani RR. A prion-linked psychiatric disorder. **Nature** 1997; 390:241.

Samant RS, Seraj MJ, Saunders MM, et al. Analysis of mechanisms underlying BRMS1 suppression of metastasis. **Clin Exp Metastasis** 2000; 18:683-93.

Sanabria ER, Su H, Yaari Y. Initiation of network bursts by Ca²⁺-dependent intrinsic bursting in the rat pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **J Physiol** 2001; 532:205-16.

Sarnataro D, Paladino S, Campana V, Grassi J, Nitsch L, Zurzolo C. PrPC is sorted to the basolateral membrane of epithelial cells independently of its association with rafts. **Traffic** 2002; 3:810-21.

Satoh J, Kuroda Y, Katamine S. Gene expression profile in prion protein-deficient fibroblasts in culture. **Am J Pathol** 2000; 157:59-68.

Scheffer IE, Berkovic SF. The genetics of human epilepsy. **Trends Pharmacol Sci** 2003; 24:428-33.

Schlehofer B, Blettner M, Preston-Martin S, et al. Role of medical history in brain tumour development: results from the international adult brain tumour study. **Int J Cancer** 1999; 82:155-60.

Schneider BL, Kulesz-Martin M. Destructive cycles: the role of genomic instability and adaptation in carcinogenesis. **Carcinogenesis** 2004; 25:1077-81.

Schousboe A. Role of astrocytes in the maintenance and modulation of glutamatergic and GABAergic neurotransmission. **Neurochem Res** 2003; 28:347-52.

Schroder B, Nickodemus R, Jurgens T, Bodemer W. Upstream AUGs modulate prion protein translation in vitro. **Acta Virol** 2002; 46:159-67.

Schwartzkroin PA, McIntyre DC. Limbic anatomy and physiology. In: Engel J, Pedley TA, editors. **Epilepsy: a comprehensive textbook**. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997. p.323-40.

Shaked GM, Fridlander G, Meiner Z, Taraboulos A, Gabizon R. Protease-resistant and detergent-insoluble prion protein is not necessarily associated with prion infectivity. **J Biol Chem** 1999; 274:17981-6.

Shi SR, Key ME, Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. **J Histochem Cytochem** 1991; 39:741-8.

Shibuya S, Higuchi J, Shim RW, Tateishi J, Kitamoto T. Protective protein polymorphisms against sporadic Creutzfeldt Jacob disease. **Lancet** 1999; 351: 419.

Shinoda J, Whittle IR. Nitric oxide and glioma: a target for novel therapy? **Br J Neurosurg** 2001; 15:213-20.

Shyng SL, Huber MT, Harris DA. A prion protein cycles between the cell surface and an endocytic compartment in cultured neuroblastoma cells. **J Biol Chem.** 1993; 268:15922-8.

Shyng SL, Moulder KL, Lesko A, Harris DA. The N-terminal domain of a glycolipid-anchored prion protein is essential for its endocytosis via clathrin-coated pits. **J Biol Chem** 1995; 270:14793-800.

Shyu WC, Harn HJ, Saeki K, Kubosaki A, Matsumoto Y, Onodera T, Chen CJ, Hsu YD, Chiang YH. Molecular modulation of expression of prion protein by heat shock. **Mol Neurobiol.** 2002;26(1):1-12.

Simak J, Holada K, D'Agnillo F, Janota J, Vostal JG. Cellular prion protein is expressed on endothelial cells and is released during apoptosis on membrane microparticles found in human plasma. **Transfusion** 2002; 42:334-42.

Smith DF, Sullivan WP, Marion TN, et al. Identification of a 60-kilodalton stress-related protein, p60, which interacts with hsp90 and hsp70. **Mol Cell Biol** 1993; 13:869-76.

Solfrosi L, Criado JR, McGavern DB, et al. Cross-linking cellular prion protein triggers neuronal apoptosis in vivo. **Science** 2004; 303:1514-6.

Sontheimer H. Malignant gliomas: perverting glutamate and ion homeostasis for selective advantage. **Trends Neurosci** 2003; 26:543-9.

Soto C. Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. **Nat Rev Neurosci** 2003; 4:49-60.

Stamler JS, Meissner G. Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. **Physiol Rev** 2001; 81:209-37.

Steinlein OK. Genes and mutations in idiopathic epilepsy. **Am J Med Genet** 2001; 106:139-45.

Stogmann E, Zimprich A, Baumgartner C, Aull-Watschinger S, Hollt V, Zimprich F. A functional polymorphism in the prodynorphin gene promotor is associated with temporal lobe epilepsy. **Ann Neurol** 2002; 51:260-3.

Taraboulos A, Jendroska K, Serban D, Yang SL, DeArmond SJ. Regional mapping of prion proteins in brain. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1992; 89:7620-4.

Taylor JC, Choi EH, Foster CB, Chanock SJ. Using genetic variation to study human disease. **Trends in Mol Med** 2001; 7:507-11.

Tews DS. Cell death and oxidative stress in gliomas. **Neuropathol Appl Neurobiol** 1999; 25:272-84.

Thomsen LL, Miles DW. Role of nitric oxide in tumour progression: lessons from human tumours. **Cancer Metastasis Rev** 1998; 17:107-18.

Tobler I, Deboer T, Fischer M. Sleep and sleep regulation in normal and prion protein-deficient mice. **J Neurosci** 1997; 17:1869-79.

Uhm JH, Dooley NP, Kyritsis AP, Rao JS, Gladson CL. Vitronectin, a glioma-derived extracellular matrix protein, protects tumor cells from apoptotic death. **Clin Cancer Res** 1999; 5:1587-94.

Umansky V, Schirrmacher V. Nitric oxide-induced apoptosis in tumor cells. **Adv Cancer Res** 2001; 82:107-31.

Uotila P, Valve E, Martikainen P, Nevalainen M, Nurmi M, Harkonen P. Increased expression of cyclooxygenase-2 and nitric oxide synthase-2 in human prostate cancer. **Urol Res** 2001; 29:23-8.

Vakkala M, Kahlos K, Lakari E, Paakko P, Kinnula V, Soini Y. Inducible nitric oxide synthase expression, apoptosis, and angiogenesis in in situ and invasive breast carcinomas. **Clin Cancer Res** 2000; 6:2408-16.

Van Meter TE, Rooprai HK, Kibble MM, Fillmore HL, Broaddus WC, Pilkington GJ. The role of matrix metalloproteinase genes in glioma invasion: co-dependent and interactive proteolysis. **J Neuro-Oncol** 2001; 53:213-35.

Vassallo N, Herms J. Cellular prion protein function in copper homeostasis and redox signalling at the synapse. **J Neurochem** 2003; 86:538-44.

Verghese-Nikolakaki S, Michaloudi H, Polymenidou M, Groschup MH, Papadopoulos GC, Sklaviadis T. Expression of the prion protein in the rat forebrain--an immunohistochemical study. **Neurosci Lett** 1999; 272:9-12.

Vey M, Pilkuhn S, Wille H, et al. Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1996; 93:14945-9.

Walz R, Amaral OB, Rockenbach IC, et al. Increased sensitivity to seizures in mice lacking cellular prion protein. **Epilepsia** 1999; 40:1679-82.

Walz R, Castro RM, Velasco TR, et al. Cellular prion protein: implications in seizures and epilepsy. **Cell Mol Neurobiol** 2002; 22:249-57.

Walz R, Castro RM, Velasco TR, et al. Surgical outcome in mesial temporal sclerosis correlates with prion protein gene variant. **Neurology** 2003; 61:1204-10.

Walz R, Castro RM, Landemberger MC, et al. Malformations of cortical development are associated with a rare polymorphism of cellular prion protein gene. **Neurology** 2004; 63(3): 557-560.

Wang J, Torbenson M, Wang Q, Ro JY, Becich M. Expression of inducible nitric oxide synthase in paired neoplastic and non-neoplastic primary prostate cell cultures and prostatectomy specimen. **Urol Oncol** 2003; 21:117-22.

Watanabe K, Tachibana O, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Role of gemistocytes in astrocytoma progression. **Lab Invest** 1997; 76:277-84.

Watarai M, Kim S, Erdenebaatar J, et al. Cellular prion protein promotes Brucella infection into macrophages. **J Exp Med** 2003; 198:5-17.

Weissmann C. Molecular biology of prion diseases. **Trends Cell Biol** 1994; 4:10-4.

White AR, Collins SJ, Maher F, et al. Prion protein-deficient neurons reveal lower glutathione reductase activity and increased susceptibility to hydrogen peroxide toxicity. **Am J Pathol.** 1999; 155:1723-30.

Williams A, Van Dam AM, Ritchie D, Eikelenboom P, Fraser H. Immunocytochemical appearance of cytokines, prostaglandin E2 and lipocortin-1 in the CNS during the incubation period of murine scrapie correlates with progressive PrP accumulations. **Brain Res** 1997; 754:171-80.

Windl O, Giese A, Schulz-Schaeffer W, et al. Molecular genetics of human prion diseases in Germany. **Hum Genet** 1999; 105:244-52.

Wolf HK, Birkholz T, Wellmer J, Blumcke I, Pietsch T, Wiestler OD. Neurochemical profile of glioneuronal lesions from patients with pharmacoresistant focal epilepsies. **J Neuropathol Exp Neurol** 1995; 54:689-97.

Wolf HK, Wiestler OD. Malformative and neoplastic glioneuronal lesions in patients with chronic pharmacoresistant epilepsies. **Adv Neurol** 1999; 81:69-79.

Wong BS, Liu T, Li R, et al. Increased levels of oxidative stress markers detected in the brains of mice devoid of prion protein. **J Neurochem** 2001; 76:565-72.

Wong JM, Billiar TR. Regulation and function of inducible nitric oxide synthase during sepsis and acute inflammation. **Adv Pharmacol** 1995; 34:155-70.

Yamada M, Itoh Y, Fujigasaki H, et al. A missense mutation at codon 105 with codon 129 polymorphism of the prion protein gene in a new variant of Gerstmann-Straussler-Scheinker disease. **Neurology** 1993; 43:2723-4.

Yamazaki K, Yamada E, Kanaji Y, et al. Stimulation of cellular prion protein expression by TSH in human thyrocytes. **Biochem Biophys Res Commun** 2003; 305:1034-9.

Yoon JW, Kita Y, Frank DJ, et al. Gene expression profiling leads to identification of GLI1-binding elements in target genes and a role for multiple downstream pathways in GLI1-induced cell transformation. **J Biol Chem** 2002; 277:5548-55.

Xie K, Huang S. Contribution of nitric oxide-mediated apoptosis to cancer metastasis inefficiency. **Free Radic Biol Med** 2003; 34:969-86.

Zahn R. Prion propagation and molecular chaperones. **Q Rev Biophys** 1999; 32:309-70.

Zanata SM, Lopes MH, Mercadante AF, et al. The stress-inducible protein 1 membrane protein 1 is the membrane cellular prion ligand that triggers neuroprotection. **EMBO J** 2002; 21:3307-16.

Zanusso G, Vattemi G, Ferrari S, et al. Increased expression of the normal cellular isoform of prion protein in inclusion-body myositis, inflammatory myopathies and denervation atrophy. **Brain Pathol** 2001; 11:182-9.

Zhu Y, Parada LF. The molecular and genetic basis of neurological tumours. **Nat Rev Cancer** 2002; 2:616-26.

Zou WQ, Capellari S, Parchi P, Sy MS, Gambetti P, Chen SG. Identification of novel proteinase K-resistant C-terminal fragments of PrP in Creutzfeldt-Jakob disease. **J Biol Chem** 2003; 278:40429-36.

ANEXOS

Anexo A. 1

Walz R, Castro RM, Velasco TR, Alexandre V Jr, Lopes MH, Leite JP, Santos AC, Assirati JA Jr, Wichert-Ana L, Terra-Bustamante VC, Bianchin MM, Maciag PC, Ribeiro KB, Guarnieri R, Araujo D, Cabalero O, Moura R, Salim AC, Kindlmann K, Landemberger MC, Marques W Jr, Fernandes RM, Serafini LN, Machado HR, Carlotti CG Jr, Brentani RR, Sakamoto AC, Martins VR. Surgical outcome in mesial temporal sclerosis correlates with prion protein gene variant. **Neurology**. 2003;61(9):1204-10.

Surgical outcome in mesial temporal sclerosis correlates with prion protein gene variant

R. Walz, MD, PhD; R.M.R.P.S. Castro, MSc; T.R. Velasco, MD; V. Alexandre Jr., MD; M.H. Lopes; J.P. Leite, MD, PhD; A.C. Santos, MD, PhD; J.A. Assirati Jr., MD; L. Wichert-Ana, MD; V.C. Terra-Bustamante, MD; M.M. Bianchin, MD, PhD; P.C. Maciag, MD, PhD; K.B. Ribeiro, DDS; R. Guarnieri, MD; D. Araújo, MD; O. Cabalero, MD, PhD; R. Moura, MSc; A.C.M. Salim; K. Kindlmann; M.C. Landemberger; W. Marques Jr., MD, PhD; R.M.F. Fernandes, MD, PhD; L.N. Serafini, MD, PhD; H.R. Machado, MD, PhD; C.G. Carlotti Jr., MD, PhD; R.R. Brentani, MD, PhD; A.C. Sakamoto, MD, PhD; and V.R. Martins, PhD

Abstract—*Background:* Mesial temporal lobe epilepsy related to hippocampal sclerosis (MTLE-HS) is the most common surgically remediable epileptic syndrome. Ablation of the cellular prion protein (PrP^c) gene (*PRNP*) enhances neuronal excitability of the hippocampus in vitro and sensitivity to seizure in vivo, indicating that PrP^c might be related to epilepsy. *Objective:* To evaluate the genetic contribution of *PRNP* to MTLE-HS. *Methods:* The *PRNP* coding sequence of DNA from peripheral blood cells of 100 consecutive patients with surgically treated MTLE-HS was compared to that from a group of healthy controls adjusted for sex, age, and ethnicity (n = 180). The presence of *PRNP* variant alleles was correlated with clinical and presurgical parameters as well as surgical outcome. *Results:* A variant allele at position 171 (Asn→Ser), absent in controls, was found in heterozygosis (Asn171Ser) in 23% of patients (p < 0.0001). The *PRNP* genotypes were not correlated with any clinical or presurgical data investigated. However, patients carrying the Asn171Ser variant had a five times higher chance of continuing to have seizures after temporal lobectomy (95% CI 1.65 to 17.33, p = 0.005) than those carrying the normal allele. At 18 months after surgery, 91.8% of patients with the normal allele at codon 171 were seizure free, in comparison to 68.2% of those carrying Asn171Ser (p = 0.005). *Conclusions:* The *PRNP* variant allele Asn171Ser is highly prevalent in patients with medically untreatable MTLE-HS and influences their surgical outcome. The results suggest that the *PRNP* variant allele at codon 171 (Asn171Ser) is associated with epileptogenesis in MTLE-HS.

NEUROLOGY 2003;61:1204–1210

Epilepsy is a health problem with a prevalence of 5 to 10 cases per 1,000 inhabitants in developed countries, which may be even higher in developing countries.¹ Moreover, it affects people of all ages, races, and socioeconomic backgrounds,¹ and accounts for a worldwide illness burden similar to that of breast cancer in women and lung cancer in men.²

Twenty percent of the epilepsies are medically intractable and mesial temporal lobe epilepsy related

to hippocampal sclerosis (MTLE-HS) is the most common form of surgically remediable epileptic syndrome.³ Anterior and mesial temporal lobectomy is a safe and effective treatment for medically intractable MTLE-HS.³ However, the literature regarding prognostic factors for the surgical outcome of MTLE-HS is often contradictory.⁴ Although prolonged febrile seizures, aberrant brain development, perinatal brain damage, and gene defects have been implicated, the pathophysiologic mechanisms involved in the development of MTLE-HS have not been completely elucidated.^{5,6} An association between MTLE-HS and polymorphism of the interleukin-1a

Additional material related to this article can be found on the *Neurology* Web site. Go to www.neurology.org and scroll down the Table of Contents for the November 11 issue to find the title link for this article.

See also page 1168

From CIREP, Centro de Cirurgia de Epilepsia (Drs. Walz, Velasco, Alexandre, Leite, Wichert-Ana, Terra-Bustamante, Guarnieri, Araújo, Fernandes, Bianchin, and Sakamoto), Departamento de Neurologia, Psiquiatria e Psicologia Médica (Drs. Walz, Leite, Santos, Marques, and Sakamoto), Departamento de Anatomia e Cirurgia (Drs. Assirati, Machado, and Carlotti), and Departamento de Patologia (Dr. Serafini), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FMRP-USP), Ribeirão Preto; Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer (R.M.R.P.S. Castro, M.H. Lopes, K.B. Ribeiro, R. Moura, K. Kindlmann, M.C. Landemberger, and Drs. Brentani and Martins); and Ludwig Institute for Cancer Research (Drs. Maciag, Cabalero, Brentani, and Martins, and A.C.M. Salim), São Paulo Branch, Brazil.

Supported by grants from FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) (99/07124-8, 98/143352) and FAEPA-HC.

Received July 24, 2003. Accepted in final form August 13, 2003.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Roger Walz, Centro de Cirurgia de Epilepsia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FMRP-USP), 14.048-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil; e-mail: rogerwalz@hotmail.com or Dr. Vilma R. Martins, Ludwig Institute for Cancer Research, Rua Prof. Antônio Prudente 109 4A, 01509-010 São Paulo, SP, Brazil; e-mail: vmartins@ludwig.org.br

1204 Copyright © 2003 by AAN Enterprises, Inc.



one has been suggested,⁷ but not confirmed by another group.⁶ Variant alleles of the gene encoding the ABA(B) receptor 1 (G1465A)⁸ and the prodynorphin promoter⁹ have also been associated with temporal lobe epilepsy (TLE).

Cellular prion protein (PrP^c) is a glycoprotein anchored to the outer cell surface whose structure conversion is related to uncommon diseases, i.e., the spongiform encephalopathies.^{10,11} PrP^c is encoded by a single exon of a single gene that is highly expressed, predominantly in neurons, throughout adult life.¹¹ This protein binds copper and has antioxidant properties.^{12,13} In addition, PrP^c interacts with laminin and stress-inducible protein 1 (STI1), mediating neuronal cell adhesion, neurite extension and maintenance, and signal transduction.¹⁴⁻¹⁷

Ablation of the cellular prion protein gene (*PRNP*) enhances neuronal excitability of the hippocampus *in vitro*¹⁸⁻²⁰ and sensitivity to seizure *in vivo*,²¹ suggesting that total or partial modification of PrP^c function might be related to epilepsy.²²

We describe the presence of *PRNP* variant alleles in patients with clinically untreatable MTLE-HS and evaluate the association of these variant alleles with clinical, demographic, neurophysiologic, and neuroimaging data, as well as surgical outcome.

Methods. Patients and controls. DNA samples were collected from the peripheral blood cells of 100 consecutive patients surgically treated for MTLE-HS during their postoperative follow-up at the Ribeirão Preto Epilepsy Surgery Program between September 2000 and April 2002. The surgical treatment was indicated because seizures occurred at least monthly despite adequate use of anticonvulsants.

The inclusion criteria were as follows: 1) seizure semiology consistent with MTLE, usually with epigastric, autonomic, or psychic auras, followed by behavioral arrest, progressive clouding of consciousness, orolimentary and manual automatisms, and autonomic phenomena; 2) anterior and mesial temporal interictal spikes; 3) no lesion other than atrophy and increased signal in hippocampal formation identified by MRI; 4) histopathologic examination compatible with hippocampal sclerosis; 5) presurgical investigation compatible with unilateral seizure onset; 6) absence of dual pathology that could be identified by available methods (clinical, electrophysiologic, and neuroimaging methods and histopathology); 7) at least 1 year of postoperative follow-up.

The exclusion criteria were as follows: 1) focal neurologic abnormalities on physical examination; 2) generalized or extratemporal EEG spikes; 3) marked cognitive impairment on neuropsychological testing.

The control group included 180 healthy adults without a previous history of neurologic or psychiatric disease selected during the same period when we collected the cases. They were individuals accompanying patients from the internal medicine outpatient clinic of the same hospital as the patients. Similarly to the patients, all controls came from the same region of the state of São Paulo, were not related one to another, and had no personal or family signs or symptoms suggesting any type of spongiform encephalopathy. Patients and controls came from white (European Brazilians) and nonwhite (African Brazilians) backgrounds. There were no Amerindians or Asians in our sample.

Our research ethics committee approved the study, and informed consent was obtained from controls, patients, or persons legally responsible for them.

Clinical parameters and presurgical evaluation of patients. Clinical characteristics included sex, ethnicity, age at surgery, age at the onset of epilepsy (recurrent seizures), duration of epilepsy, a positive history for an initial precipitating insult (IPI), epilepsy duration until surgery, monthly complex partial seizure frequency impairing awareness in the year before surgery, and

side of surgery. A positive family history of epilepsy was defined when at least one first-degree relative reported at least two spontaneous seizures during his or her life.

Presurgical evaluation was performed by an experienced multidisciplinary team and included a detailed clinical history and neurologic examination, interictal and ictal video-EEG analysis, structural and functional imaging, psychiatric evaluation, neuropsychological testing, and, when appropriate, the intracarotid amobarbital test (Wada test) for memory and speech representation.²³ Detailed methods of neuroimaging and video-EEG analysis are available as supplementary data at www.neurology.org.

Surgical procedure and postoperative follow-up. The surgical approach was similar for all patients. A neurosurgeon experienced in surgery for epilepsy resected a maximum of 4 to 5 cm of the anterior lateral temporal lobe. Mesial resection included the amygdala and at least 1 to 3 cm of the anterior hippocampus (most commonly, 3.0 cm).

After surgery, patients were treated with the same antiepileptic drugs (AED) that they received before surgery and the dose was adjusted to reduce side effects and maintain the necessary serum levels. Patients were also instructed to maintain the medication dosage during the first 3 years after surgery even if they were free of seizures.

The outcome of surgery was defined on the basis of seizure status determined by outpatient clinical interviews. Patients were categorized as seizure free if they experienced no complex partial seizures or generalized tonic-clonic seizures after surgery. Nondisabling auras (Engel class Ib) were not considered seizures in our analysis. Patients who presented a single complex partial or a generalized tonic-clonic seizure clearly related to AED withdrawal (Engel class Id) or during the first month after surgery (perioperative period) but remained well controlled with adequate use of medication were considered seizure free.

A postoperative MRI was carried out 6 to 12 months after surgery. Surgical resection was considered satisfactory if it included both the head and body of the hippocampus, and unsatisfactory if no more than half of the hippocampus was resected.

Seizure outcome and postoperative MRI status were assessed by experienced epileptologists and radiologists who were blind to all clinical parameters, presurgical and surgical data, and the genetic analysis.

PRNP analysis. DNA was extracted from a 3 mL aliquot of whole blood using the Puregene Genomic DNA Isolation Kit (Gentra Systems). Primers (Life Technologies, S.P., Brazil) were designed to amplify two different overlapping fragments of the *PRNP* open reading frame (ORF) (Gene Bank: D-00015): fragment 1—nucleotides 77 to 497 (421 bp), forward: 5' ATGCTGGT-TCTCTTTGTG 3', reverse: 5' AACGGTCTCATAGTCACTGC 3', and fragment 2—nucleotides 307 to 870 (563 bp), forward: 5' TCATGGTGGTGGCTGGGGTCA 3', reverse: 5' CGCCTCCCT-CAAGCTGGAAAA 3'. Amplification reactions were carried out using touchdown PCR. The PCR products were sequenced with the DYEnamic ET terminator sequencing kit (Amersham Pharmacia Biotech) according to manufacturer's instructions using an ABI Prism-377 apparatus (Perkin-Elmer). We also analyzed *PRNP* ORF using denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) of PCR-amplified products using forward and reverse primers for fragment 1 (described above) and the forward (5' ATCATACATTTTCGGCAGT 3') and reverse (5' CTCCCTCAAGCTGGAAAAAGA 3') primers for the second half of the *PRNP* ORF, nucleotides 463 to 867. A DNASEp column (Transgenomic, CA) was used and the parameters of gradient and flow rate adjusted by the Wavemaker system control software (Transgenomic). PCR products from the complete coding region of *PRNP* obtained using the forward primer of fragment 1 and reverse primer of fragment 2 described above were digested with *PvuII*, *NspI*, and *BbvI* (Amersham Pharmacia Biotech and New England Biolabs) to confirm the sequence at codons 117, 129, and 171.²⁴⁻²⁶ In addition, due to the experimental difficulty in defining the exact position of the alteration within codon 117, a GC-rich DNA sequence,²⁷ we cloned (TA-cloning kit, Invitrogen) the PCR products of the complete coding region of *PRNP* from DNA from all patients and controls who presented an alteration at this codon.

Statistical analysis. Differences in sex and ethnicity distribution between cases and controls were analyzed by the two-tailed Fisher exact test. The proportions of cases and controls bearing a given *PRNP* genotype were ascertained. The magnitude of associ-

Table 1 Frequency of PRNP alleles in patients and controls

Residue position	Genotype	Exposed (%)		Crude		Adjusted§	
		Controls n = 180	Cases n = 100	OR (95% CI)	p Value*	OR (95% CI)	p Value
17	Ala/Ala	173 (96.1)	91 (91.0)	1.00		1.00†	
	Ala/Ala _{silent}	7 (3.9)	9 (9.0)	2.44 (0.88–6.78)	0.08	2.23 (0.78–6.38)	0.13
129	Met/Met	104 (57.8)	57 (57.0)	1.00		1.00‡	
	Met/Val	68 (37.8)	32 (32.0)	0.89 (0.50–1.46)	0.57	0.84 (0.49–1.44)	0.52
	Val/Val	8 (4.4)	11 (11.0)	2.51 (0.95–6.59)	0.06	2.35 (0.88–6.27)	0.08
117	Asn/Asn	180 (100.0)	77 (77.0)	1.00		—	—
	Asn/Ser	0 (0)	23 (23.0)	Undefined	<0.0001	NA	NA
Octarepeat	R12234	170 (94.4)	95 (95.0)	1.00		1.00	
	R12234/R1234	10 (5.6)	5 (5.0)	0.89 (0.28–2.69)	0.84	0.99 (0.33–3.03)	0.99
	R1234	0 (0)	0 (0)	—	—	—	—

Binary Logistic Regression.

Multiple logistic regression adjusted for gender, ethnicity, codon 129 distribution, and presence of the octarepeat deletion.

Multiple logistic regression adjusted for gender, ethnicity, genotypes at position 117, and presence of octarepeat deletion.

Hosmer and Lemeshow goodness of fit, $p = 0.897$.

NA = non-applicable.

tion between PRNP alleles and the occurrence of MTLE-HS was measured by the OR and respective 95% CI. Crude and adjusted OR were estimated by unconditional logistic regression using the statistical program SPSS version 10.0 (Chicago, IL). To examine the independent effect of each genotype, OR were also derived after additional adjustment for codons 117 and 129. A p level < .01 was considered to be significant.

Association between a certain PRNP genotype and the clinical and presurgical evaluation data of patients was also determined. Analyses were done using the Mann-Whitney U test for continuous variables and the two-tailed Fisher exact test for categorical ones.

The Kaplan-Meier method was used to establish the cumulative probability of event-free survival. Differences between groups were determined by the log-rank test. The Cox proportional hazards model was applied to identify independent risk factors for having seizures after surgery. Only variables with $p \leq 0.25$ (by the log-rank test) were included in the final multiple Cox model.

For the statistical analysis of clinical and presurgical evaluation results the level of significance was set at $p < 0.05$. Our study fulfills the fundamental requisites when performing genetic investigations of complex multietiologic diseases.²⁸

Results. The sex and ethnic distribution were similar in patients and controls. Men represented 46% ($n = 84$) of the controls and 44% ($n = 44$) of the patients ($p = 0.7$). European Brazilians represented 86% ($n = 155$) of the controls and 88% ($n = 88$) of the patients ($p = 0.7$). The mean age of patients and controls was 36.2 (SD ± 10.7) and 36.5 (SD ± 10.5) years.

PRNP variant alleles were confirmed using three different experimental approaches: DNA sequencing, DHPLC, and endonuclease digestion (for codons 117, 129, and 171), and their frequencies in patients and in controls are shown in table 1. Two well-described PRNP polymorphic sites were present in our population. The single octapeptide repeat (24 bp) deletion (R12234)²⁹ was present in heterozygosity (R12234/R1234) in 5.0% of the patients and 5.6% of the controls ($p = 0.84$, OR = 0.89, 95% CI 0.28 to 2.69). The second polymorphic site was at codon 129 (Met→Val), which is located at the first PrP^c α -helix and is important for protein conformation.³⁰ The common polymorphism at

this codon appears to act as a genetic susceptibility factor in familial, sporadic, iatrogenic, and new variant Creutzfeldt-Jakob disease (CJD).³¹ In our population, heterozygous samples (Met/Val) at codon 129 had a nonsignificant decrease in OR for epilepsy ($p = 0.57$, OR = 0.89, 95% CI 0.50 to 1.46), whereas homozygous Val/Val showed a trend toward the opposite effect ($p = 0.06$, OR = 2.51, 95% CI 0.95 to 6.59), as compared to Met/Met individuals (see table 1). The octapeptide repeat deletion and codon 129 genotype frequencies in our controls were similar to those described in white populations.^{29,31}

Another polymorphic site at codon 117 where a GCA is altered to GCT without an amino acid change (Ala117Ala_{silent}) was present in heterozygosity in 7 (3.9%) of our controls and in 9 (9.0%) of the patients. This variant allele has been described in 5 to 10% of the normal white population,²⁶ close to the percentage observed in our cases and controls. A nonsignificant association with epilepsy was observed for those individuals carrying the Ala117Ala_{silent} allele ($p = 0.08$, OR = 2.44, 95% CI 0.88 to 6.78).

We additionally verified the presence of a variant allele in codon 171 (Asn→Ser), previously described in a familial form of atypical psychosis.³² The Asn/Ser heterozygous genotype was found in 23 (23.0%) of the patients and was absent in the control group ($p < 0.0001$) (see table 1), whereas the Ser/Ser genotype was not observed in our samples. This variant allele was first described as a rare polymorphism²⁴ and very recently Collinge's group was unable to detect it in a total of 944 tested individuals from East Asian, South Asian, Pacific, South American, and European populations.³³ Conversely, its frequency is around 5 to 8% in some African or African descendant populations (Cameroon and Jamaica).³⁴ Thus, the absence of this variant allele in our controls is in accordance with the literature and ethnicity is not a bias because more than 80% of both patients and controls are European Brazilians.

Table 2 Surgical outcome according to PRNP genotype

RNP variants	All	Overall surgical outcome		Cumulative % of seizure-free	p Value	Crude HR to remain with seizures	95% CI	p Value
	Patients n = 98 (%)	Seizure-free n = 85 (%)	Seizure n = 13 (%)					
Position 117								
Ala/Ala	89 (90.8)	77 (90.6)	12 (92.3)	86.6		1.00		
Ala/Ala _{silent}	9 (9.2)	8 (9.4)	1 (7.7)	87.5	0.64	0.78	0.10–5.98	0.81
Position 129								
Met/Met	56 (57.1)	49 (57.6)	7 (53.8)	87.2		1.00		
Met/Val	31 (31.6)	27 (31.8)	4 (30.8)	86.3		1.04	0.30–3.56	0.95
Val/Val	11 (11.2)	9 (10.6)	2 (15.4)	79.5	0.86	1.51	0.31–7.29	0.60
Position 171								
Asn/Asn	76 (77.6)	70 (82.4)	6 (46.2)	91.8		1.00		
Asn/Ser	22 (22.4)	15 (17.6)	7 (53.8)	68.2	0.005	4.12	1.38–12.77	0.01
Octapeptide repeat								
R12234	93 (94.9)	80 (94.1)	13 (100.0)	86.2		1.00		
R12234/R1234	5 (5.1)	5 (5.9)	0 (0.0)	100.0	0.41	NA	—	—

The distribution of Asn/Ser heterozygous alleles in patients was not changed by genotypes at positions 117 or 129 or octapeptide repeat deletion as verified by stratified analysis, suggesting that this variant allele might be independently associated with epilepsy (data not shown).

OR were also derived after additionally controlling for the effect of genotypes at positions 117 and 129, the presence of the octapeptide deletion, sex, and ethnicity (see table 1). Neither the Met/Val genotype at position 129 nor the presence of the octapeptide deletion was found to be associated with MTLE-HS, whereas a trend for a higher frequency of Val/Val genotypes at position 129 was observed in the patients ($p = 0.08$, adjusted OR 2.35, 95% CI 0.88 to 6.27). Individuals carrying the silent variant allele Ala/Ala_{silent} at position 117 also disclosed a nonsignificantly increased OR for epilepsy ($p = 0.13$, adjusted OR 2.23, 95% CI 0.78 to 6.38). Independent effects of genotypes at position 171 could not be evaluated.

No other PRNP variant alleles besides those described here were found in cases or controls. All genotype distributions studied were in good agreement with Hardy-Weinberg equilibrium (data not shown).

Because all our patients were surgically treated we were able to perform histopathologic examinations of resected material and no spongiform degeneration was found in brain tissue.

No differences were found between PRNP variant alleles and the wild type genotype ($p \geq 0.15$) with respect to the clinical, demographic, and presurgical data investigated. There was a nonsignificant increased OR ($p = 0.44$, OR = 1.67, 95% CI 0.6 to 4.2) for positive family history of epilepsy in those patients with the variant allele Asn171Ser. For more details, see supplementary data at www.neurology.org.

The postoperative seizure outcome according to patient PRNP genotype is shown in tables 2 and 3; data related to patient characteristics can be found in supplementary tables E-1 and E-2 (available at www.neurology.org). Two patients who presented surgical complications that could

affect seizure outcome (meningitis and hemorrhagic stroke) were excluded from this analysis. The mean time of postoperative patient follow-up was 3.1 years (SD ± 1.3 , range 1.0 to 7.5 years). Of the 98 patients, 85 (86.7%) remain seizure free after surgery. This is in agreement with more recent data suggesting that, with careful selection of patients, a good seizure outcome may be achieved in approximately 90% of cases.^{4,36}

The seizure outcome was not correlated with any preoperative clinical, neurophysiologic, or neuroimaging data (see table 3 and supplementary data [www.neurology.org]). Variant alleles at positions 117 ($p = 0.64$) and 129 ($p = 0.86$) and the octapeptide deletion ($p = 0.41$) were also not correlated with surgical outcome (see table 2). However, the hazard ratio to continue to have seizures after temporal lobectomy in those patients carrying the Asn171Ser variant allele was more than four times higher than in those with the normal allele ($p = 0.01$, 95% CI 1.38 to 12.77) (see table 2). After an 18-month follow-up, the cumulative probability of being seizure free was 91.8% for patients with normal alleles at codon 171 (Asn171Asn) and only 68.2% for those with the Asn171Ser variant allele in heterozygosity ($p = 0.005$) (figure). After adjustment for ethnicity, history of IPI, presurgical MRI findings, interictal spikes, and age at epilepsy onset (see table 3), the risk for surgical failure in those patients with the variant allele at codon 171 remained high ($p = 0.005$, adjusted HR = 5.35, 95% CI 1.65 to 17.33). Positive history of IPI, bilateral findings on the presurgical MRI, presence of bilateral interictal spikes, and early age at epilepsy onset were not independently associated with a worse surgical outcome in our sample. Independent effects of ethnicity could not be evaluated.

One patient showing the variant allele at codon 171 had a generalized seizure in the first week after surgery, and became well during the next 2-year follow-up. Among the 15 seizure-free patients showing the abnormal variant allele at codon 171, one had a complex partial seizure related to AED withdrawal (Engel Id), in comparison with 8 of the

Table 3 Independent effect of the PRNP variant allele on the surgical outcome

Variable	Crude HR	95% CI	Adjusted HR*	95% CI	p Value
History of IPI					
No	1.00		1.00		
Yes	1.93	0.65–5.73	0.48	0.15–1.57	0.23
MRI findings					
Unilateral	1.00		1.00		
Bilateral	2.53	0.53–11.4	1.75	0.36–8.40	0.48
Interictal spikes†					
Unilateral	1.00		1.00		
Bilateral	2.45	0.67–9.11	1.58	0.38–6.45	0.52
Age at epilepsy onset					
After the first decade	1.00		1.00		
First decade	2.36	0.72–7.65	2.03	0.50–8.36	0.32
Position 171					
Asn/Asn	1.00		1.00		
Asn/Ser	4.12	1.38–12.77	5.35	1.65–17.33	0.005

Hazard-ratio to continue to have with seizure after surgery adjusted for ethnicity, history of IPI, pre-surgical MRI findings, IS, and age at epilepsy onset.

Interictal spikes were not quantified in three patients.

PI = initial precipitating insult.

0 showing the normal allele ($p = 1.0$). Patients with AED withdrawal became well controlled with an adequate AED scheme during a mean follow-up of 3.4 years (range 1.7 to 15.5 years).

All patients who underwent semi-invasive investigation with foramen ovale electrodes had the Asn171Asn genotype.

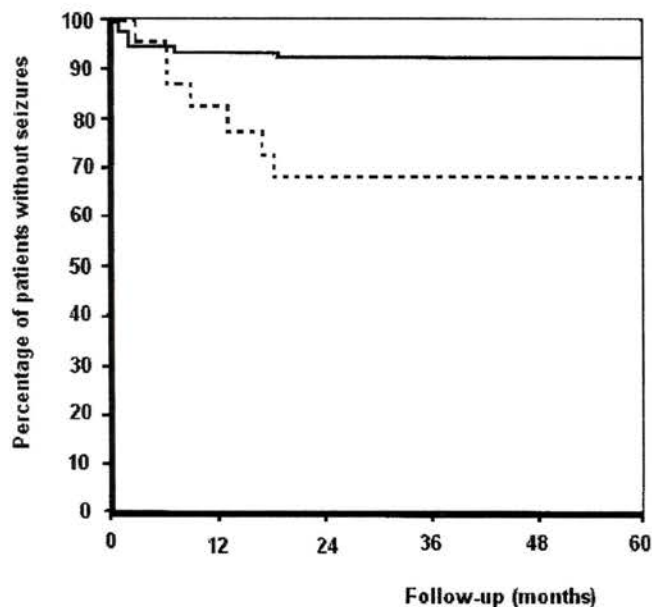


Figure. Kaplan-Meier event-free survival curves comparing the cumulative percentages of patients who were free of seizures according to the genotype at codon 171. There were more seizure-free patients with the Asn171Asn allele than patients with the Asn171Ser variant ($p = 0.005$ by log-rank test). Genotype: — = Asn171Asn; - - - = Asn171Ser.

The eight cases with bilateral MRI findings presented symmetrically increased signals in the hippocampus but asymmetric hippocampal atrophy, which was coincident with the inferred epileptogenic zone (EZ). One patient with bilateral hippocampal atrophy was excluded from the outcome analysis due to postoperative meningitis. Finally, among the seven patients with bilateral hippocampal atrophy, all the seizure-free patients ($n = 5$) presented the Asn171Asn genotype; the others who persisted with seizures ($n = 2$) had the Asn171Ser variant allele ($p = 0.048$).

Discussion. Using a candidate gene approach, we found that the PRNP variant Asn171Ser is highly associated with medically untreatable MTLE-HS and independently influences the postsurgical seizure outcome of patients.

The association between PRNP and epilepsy and especially with MTLE-HS is plausible and supported by previous in vivo and in vitro experimental data. Mice devoid of PRNP presented a higher sensitivity to seizures chemically induced by different agents in four different protocols.²¹ This hyperexcitability can be related or attributed to the interaction of at least five distinct abnormalities reported in those animals: 1) disrupted Ca^{+2} -activated K^{+} currents, with loss of I_{HAP} conductance in the hippocampus¹⁸; 2) abnormal GABA-A inhibition in the hippocampus¹⁹; 3) mossy fiber reorganization in the hippocampus³⁶; 4) higher levels of oxidative stress in the neocortex and hippocampus¹³; and 5) changes in ectonucleotidases in both hippocampus and neocortex.³⁷ Furthermore, postnatal PrP^c knockout mice showed a significant reduction of after hyperpolarization potentials in the hippocampus.²⁰ These findings suggest that altered PrP^c functions could contribute to modifications of the intrinsic physiology of neurons and the neural

network related to mechanisms of epileptogenesis, particularly in the mesial temporal lobe structures.²² The exact role of *PRNP* variant alleles in PrP^c functions and in MTLE-HS remains to be determined. Position 171 is close to the site where PrP^c interacts with minin, mediating neuritogenesis,¹⁵ which is closely related to neuroplasticity and epileptogenesis.²²

It would be important to establish why modifications in an abundantly expressed neuronal protein could affect focal epileptogenicity. A possible explanation could be that changes in PrP^c function (in humans) or the absence of PrP^c (in knockout mice) do not cause epilepsy but induce a proepileptogenic state that, in association with other inborn (genetic or developmental) or acquired (lesion) abnormalities including a surgical scar), predisposes to temporal lobe epileptogenesis. It was surprising that the *PRNP* variant allele Asn171Ser does not correlate with presurgical variables; however, this finding is in agreement with the lack of association between those already studied presurgical variables and surgical outcome. Association between variant alleles, seizure semiology, and ictal electrophysiology patterns in MTLE-HS or even in other epileptic syndromes is an important point to be investigated in the future.

Although nonsignificant, the trend toward an association between epilepsy and the variant allele Val129Val is still interesting. The critical localization of amino acid 129 at the first PrP^c α -helix renders it important for protein conformation.³⁰ We speculate that the amino acid composition at this position might be directly related to protein function or interfere with other PrP^c domains with biologic activity.

The *PRNP* variant allele at codon 171 was found in many but not all patients with epilepsy. In addition, despite the association of the Asn171Ser variant allele with surgical failure, many patients who presented the variant allele became seizure free. These findings suggest that *PRNP* contributes only partially to the penetrance of MTLE-HS and its surgical outcome, possibly providing a genetic liability for developing the condition. However, only those individuals whose liability crosses the threshold would actually be at risk. In fact, it is well known that epilepsies in general are caused by the interaction of genetic and environmental factors. In these cases, as for other non-mendelian diseases, the combination of susceptibility alleles across the genome that is necessary for disease development provides only a risk of developing the disorder.^{38,39} The lack of association between familial history of epilepsy or seizures and the variant alleles also suggests that a complex pattern of inheritance is involved.⁸

The *PRNP* variant allele Asn171Ser is highly prevalent in patients with untreatable MTLE-HS and influences their surgical outcome, suggesting that *PRNP* modifications may play a role in the process of epileptogenesis of the most common type of surgically remediable epileptic syndrome.³ If con-

firmed by studies in independent patient population samples, determination of *PRNP* sequences could improve the diagnosis and identification of high-risk groups, provide a basis for genetic counseling, and possibly lead to new therapeutic targets for the prevention and treatment of MTLE-HS.

References

- Hauser WA. Incidence and prevalence. In: Engel J, Pedley TA, eds. *Epilepsy: a comprehensive textbook*. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1998;47-57.
- Kale R. Bringing epilepsy out of the shadows. *BMJ* 1997;315:2-3.
- Engel J, Jr. Surgery for seizures. *N Engl J Med* 1996;334:647-652.
- McIntosh AM, Wilson SJ, Berkovic SF. Seizure outcome after temporal lobectomy: current research practice and findings. *Epilepsia* 2001;42:1288-1307.
- Berkovic SF, Jackson GD. The hippocampal sclerosis whodunit: enter the genes. *Ann Neurol* 2000;47:557-558.
- Buono RJ, Ferraro TN, O'Connor MJ, et al. Lack of association between an interleukin 1 beta (IL-1beta) gene variation and refractory temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 2001;42:782-784.
- Kanemoto K, Kawasaki J, Miyamoto T, Obayashi H, Nishimura M. Interleukin (IL)1beta, IL-1alpha, and IL-1 receptor antagonist gene polymorphisms in patients with temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* 2000;47:571-574.
- Gambardella A, Manna I, Labate A, et al. GABA(B) receptor 1 polymorphism (G1465A) is associated with temporal lobe epilepsy. *Neurology* 2003;60:560-563.
- Stogmann E, Zimprich A, Baumgartner C, Aull-Watschinger S, Holtt V, Zimprich F. A functional polymorphism in the prodynorphin gene promoter is associated with temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* 2002;51:260-263.
- Aguzzi A, Weissmann C. Prion research: the next frontiers. *Nature* 1997;389:795-798.
- Prusiner SB. Prions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:13363-13383.
- Brown DR. Prion and prejudice: normal protein and the synapse. *Trends Neurosci* 2001;24:85-90.
- Klamt F, Dal-Pizzol F, Conte da Frota MJ, et al. Imbalance of antioxidant defense in mice lacking cellular prion protein. *Free Radic Biol Med* 2001;30:1137-1144.
- Chiarini LB, Freitas AR, Zanata SM, Brentani RR, Martins VR, Linden R. Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. *EMBO J* 2002;21:3317-3326.
- Graner E, Mercadante AF, Zanata SM, et al. Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. *Brain Res Mol Brain Res* 2000;76:85-92.
- Graner E, Mercadante AF, Zanata SM, Martins VR, Jay DG, Brentani RR. Laminin-induced PC-12 cell differentiation is inhibited following laser inactivation of cellular prion protein. *FEBS Lett* 2000;482:257-260.
- Zanata SM, Lopes MH, Mercadante AF, et al. Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. *EMBO J* 2002;21:3307-3316.
- Colling SB, Collinge J, Jefferys JG. Hippocampal slices from prion protein null mice: disrupted Ca(2+)-activated K+ currents. *Neurosci Lett* 1996;209:49-52.
- Collinge J, Whittington MA, Sidle KC, et al. Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature* 1994;370:295-297.
- Mallucci GR, Ratte S, Asante EA, et al. Post-natal knockout of prion protein alters hippocampal CA1 properties, but does not result in neurodegeneration. *EMBO J* 2002;21:202-210.
- Walz R, Amaral OB, Rockenbach IC, et al. Increased sensitivity to seizures in mice lacking cellular prion protein. *Epilepsia* 1999;40:1679-1682.
- Walz R, Castro RM, Velasco TR, et al. Cellular prion protein: implications in seizures and epilepsy. *Cell Mol Neurobiol* 2002;22:249-257.
- Velasco TR, Wichert-Ana L, Leite JP, et al. Accuracy of ictal SPECT in mesial temporal lobe epilepsy with bilateral interictal spikes. *Neurology* 2002;59:266-271.
- Fink JK, Peacock ML, Warren JT, Jr., Roses AD, Prusiner SB. Detecting prion protein gene mutations by denaturing gradient gel electrophoresis. *Hum Mutat* 1994;4:42-50.
- Windl O, Giese A, Schulz-Schaeffer W, et al. Molecular genetics of human prion diseases in Germany. *Hum Genet* 1999;105:244-252.
- Wu Y, Brown WT, Robakis NK, et al. A PvuII RFLP detected in the human prion protein (PrP) gene. *Nucleic Acids Res* 1987;15:3191.
- Parker LT, Deng Q, Zakeri H, Carlson C, Nickerson DA, Kwok PY. Peak height variations in automated sequencing of PCR products using Taq dye-terminator chemistry. *Biotechniques* 1995;19:116-121.

1. Bird TD, Jarvik GP, Wood NW. Genetic association studies: genes in search of diseases. *Neurology* 2001;57:1153–1154.
2. Palmer MS, Mahal SP, Campbell TA, et al. Deletions in the prion protein gene are not associated with CJD. *Hum Mol Genet* 1993;2:541–544.
3. Riek R, Wider G, Billeter M, Hornemann S, Glockshuber R, Wuthrich K. Prion protein NMR structure and familial human spongiform encephalopathies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:11667–11672.
4. Zimmermann K, Turecek PL, Schwarz HP. Genotyping of the prion protein gene at codon 129. *Acta Neuropathol (Berl)* 1999;97:355–358.
5. Samaia HB, Mari JJ, Vallada HP, Moura RP, Simpson AJ, Brentani RR. A prion-linked psychiatric disorder. *Nature* 1997;390:241.
6. Mead S, Stumpf MP, Whitfield J, et al. Balancing selection at the prion protein gene consistent with prehistoric kurulike epidemics. *Science* 2003;300:640–643.
7. Moore RC, Lee IY, Silverman GL, et al. Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel. *J Mol Biol* 1999;292:797–817.
35. Kim R, Spencer D. Surgery for mesial temporal sclerosis. In: Lüders HO, Comair YG, eds. *Epilepsy surgery*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2003:643–652.
36. Colling SB, Khana M, Collinge J, Jefferys JG. Mossy fibre reorganization in the hippocampus of prion protein null mice. *Brain Res* 1997;755:28–35.
37. Pereira GS, Walz R, Bonan CD, et al. Changes in cortical and hippocampal ectonucleotidase activities in mice lacking cellular prion protein. *Neurosci Lett* 2001;301:72–74.
38. Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 1996;273:1516–1517.
39. Todd JA. Interpretation of results from genetic studies of multifactorial diseases. *Lancet* 1999;354(suppl 1):15–16.

Randomized, concentration-controlled trial of topiramate in refractory focal epilepsy

Jakob Christensen, MD, PhD; Frederik Andreassen, MD, DMSc; Jørgen Hjelm Poulsen, MD, DMSc; and Mogens Dam, MD, DMSc

Abstract—Objective: To establish the concentration response of topiramate in patients with refractory focal epilepsy. **Methods:** Sixty-five patients with more than eight seizures during an 8-week baseline were randomized to three prespecified plasma levels (low, 6 $\mu\text{mol/L}$ [2 mg/L]; medium, 31 $\mu\text{mol/L}$ [10.5 mg/L]; and high, 56 $\mu\text{mol/L}$ [19 mg/L]). Topiramate treatment was titrated to one of the prespecified plasma levels during an 8-week titration period, followed by a 12-week observation period. **Results:** The overall median (25th to 75th percentile) reduction in seizures during the observation compared with baseline was 50% (9.5 to 90%). In the individual groups, the median reduction was as follows: low, 39% (13 to 70%); medium, 85% (41 to 96%); and high, 39% (2.0 to 81%). The primary outcome of the trial was the comparison of seizure reduction (Mann–Whitney *U* test) between the low and the medium group ($p = 0.03$). Comparisons between the other groups were as follows: medium vs high ($p = 0.05$) and low vs high ($p = 0.81$). Psychiatric adverse events and adverse events related to the CNS were the most frequently encountered. Most adverse events showed concentration response, particularly between low and medium levels. **Conclusions:** Patients assigned to the medium plasma level (31 $\mu\text{mol/L}$ [10.5 mg/L]) had the best seizure outcome. Patients in the medium and high groups experienced more adverse events than patients in the low group. Optimal treatment response is thus most likely found at plasma concentrations higher than 6 $\mu\text{mol/L}$ (2 mg/L), but no further increase in efficacy seems to occur at concentrations above 31 $\mu\text{mol/L}$ (10.5 mg/L).

NEUROLOGY 2003;61:1210–1218

The effect of the new antiepileptic drug topiramate has been well established in several add-on trials in patients experiencing partial seizures.^{1–5} Dose response has been established from clinical trials, all employing a similar design.^{1–5} Response to topiramate was larger with 400 to 600 mg/day compared with 200 mg/day, but there was no further increase in response in patients treated with ≥ 600 mg/day.^{1–5}

The relationship between the plasma concentration of topiramate and efficacy has not been firmly established, and none of the studies mentioned above was concentration controlled. Indeed, problems with the identification of a relationship between plasma concentration and response may stem from choice of an inappropriate study design. To gain valid concentration–response information, Gram et al⁶ argued that

From the Department of Clinical Pharmacology (Drs. Christensen, Andreassen, and Poulsen), Aarhus University, and Departments of Neurology (Drs. Christensen and Dam) and Clinical Biochemistry (Dr. Poulsen), Aarhus University Hospital, Denmark.

Supported by the Center for Clinical Pharmacology, Department of Neurology, Department of Clinical Biochemistry, Janssen–Cilag A/S Denmark (study medication and approximately \$18,000 [to cover part of drug-packing expenses]), Hede Nielsen Foundation, Sven and Ina Hansen Foundation, E. Danielsen and Spouse Foundation, Institute for Experimental Clinical Research, Foundation for Neurologic Research, Danish Epilepsy Society, Lilje and Arthur Bachmann Foundation, and Danish Epilepsy Association.

Received October 7, 2002. Accepted in final form July 22, 2003.

Address correspondence and reprint requests to Dr. J. Christensen, Department of Clinical Pharmacology, Bartholin Building, Aarhus University, 8000 Aarhus C, Denmark; e-mail: Jakob@farm.au.dk

MATERIAL AND METHODS

Prnp analysis

DNA was extracted from 3 ml of whole blood using the Puregene Genomic DNA Isolation Kit (Gentra Systems, MN). Primers (Life Technologies do Brazil, S.P., Brazil) were designed to amplify two different overlapping fragments of the PRNP open reading frame (Gene Bank: AY008282): (Fragment I – nucleotides 65 to 488 (423 bp), Forward: 3'ATGCTGGTTCTCTTTGTG 5', Reverse: 3' AACGGTCCTCATAGTCACTGC 5' and Fragment II – nucleotides 455 to 858 (404 bp), Forward: 3' ATCATACATTTTCGGCAGT 5', Reverse: 3'CTCCCTCAAGCTGGAAAAAGA 5'. Amplification reactions (PCR) were carried out in 50 µl: 100 µg of genomic DNA, 100mM TRIS-HCl, pH 8.3; 500 mM KCl; 25 mM MgCl₂; 200 µM dNTP; 0.5 µM of each primer and 5 U of AmpliTaq Gold (Applied Biosystem, CA). Amplification was performed using a DNA Thermal Cycler PTC-100 (MJ Research, Inc), for fragment I using: 10min at 95°C, then 10 cycles consisting in 1min at 94°C, 1min at 64°C and 1min at 72°C; 10 cycles consisting in 1min at 95°C, 1min at 62°C and 1min at 72°C and 15 cycles consisting in 1min at 95°C, 1min at 60°C and 1min at 72°C. For fragment II amplification cycle was: 10min at 95°C, then 10 cycles consisting in 1min at 94°C, 1min at 62°C and 1min at 72°C; 10 cycles consisting in 1min at 95°C, 1min at 60°C and 1min at 72°C and 15 cycles consisting in 1min at 95°C, 1min at 58°C and 1min at 72°C. This PCR products were used for DHPLC and sequencing of *Prnp*.

DHPLC

Denaturing high-performance liquid chromatography was carried out using automated DHPLC instrumentation equipped with a DNASep column (Transgenomic Inc, CA). The parameters of gradient and flow rate were adjusted by the Wavemaker system control software (Transgenomic Inc, CA). PCR products were subject to an additional 5min at 95°C step for denaturation followed by gradual reannealing from 95°C to 50°C. An aliquot of 5µl was applied for sizing evaluation at 50°C and 8µl for mutation analysis. The temperature required for successful resolution of heteroduplex molecules was determined by a DHPLC melting algorithm: 65°C for fragment I, and 62°C for fragment II.

DNA sequencing

For direct sequencing of the complete coding region of *Pmp*, we sequenced the two amplified fragments. PCR products were sequenced using the DYEnamictm ET terminator sequencing kit (Amersham Pharmacia Biotech Inc, NJ) according to the manufacturer's instructions. Sequencing reactions were separated on an ABI Prism – 377 (Perkin-Elmer, USA).

Endonucleases digestions

DNA was amplified by PCR for the entire open reading frame of *Pmp* using the forward primer of fragment I and reverse primer of fragment II described above. The PCR product was purified using 400ul of 2-propanol (P.A, Merck, Germany) followed by 400ul of 70% ethanol (Merck, Germany) for DNA precipitation. The DNA was re-dissolved in sterile water for a final concentration of 20ng/ul and evaluated by gel eletrophoresis. The restriction endonucleases

PvuII, *NspI* and *BbvI* (New England Biolabs and Amersham Biosciences) were used to analyze codons 117, 129 and 171 respectively (Windl et al *Hum Genet.* 105(3): 244-252, 1999 & Fink et al. *Hum Mutat.* 4(1): 42-50,1994). The digestion was performed using 1U enzyme/ug DNA for 16 hours at 37°C and stopped at 65°C for 20 minutes. The digestion products were analyzed on an 8% polyacrilamida gel eletrophoresis revealed with silver stained.

Cloning of the PCR products

Due to the experimental difficulty to define the exact position of the alteration within codon 117, which is well documented for GC rich DNA sequences (Parker et al. *Biotechniques* 19:116-121, 1995), we cloned PCR products from DNA of all patients and controls that presented an alteration at this codon. For this issue, complete coding region of *Prnp* was amplified using the forward primer of fragment I and reverse primer of fragment II and products were cloned in pCR 2.1 vector using TA-cloning® kit (Invitrogen, USA) according to the manufacturer's recommendations. DNAs from 10 transformant colonies from each control or patient were sequenced using DYEnamic tm ET terminator sequencing kit (Amersham Pharmacia Biotech Inc, NJ), with separation on an ABI Prism – 377 (Perkin-Elmer, USA).

FIGURE LEGENDS:

Figure 1- DHPLC chromatogram elution profiles of homo and heteroduplexes from *Prnp* polymorphic sites. *a*, *b*, *c* and *d* show the profile of the amplification product # 1 from nucleotides 65 to 488 (423 bp) and *e* and *f* amplification product #2 from nucleotides 455 to 858 (404 bp) of the *Prnp* coding-exon. *a*: chromatogram of product #1 of a homoduplex control sample; *b*: heteroduplex at codon 129; *c*: heteroduplex at codon 117, *d*: heteroduplex of an octarepeat deletion; *e*: chromatogram of product #2 of a homoduplex control sample; *f*: heteroduplex sample at codon 171. Note the extra peaks in *b*, *c*, *d*, and *f* that were not observed in the control homoduplex samples.

Figure 2-- Electropherograms of sequencing gel showing the *Prnp* genotypes. *a* and *b* show codon 117 with the homozygous (GCA) or heterozygous (GCA and GCG) sequence for alanine respectively; *c*, *d* and *e* correspond to codon 129 with the homozygous sequence for methionine (ATG), heterozygous for methionine/valine (ATG and GTG) and homozygous for valine (GTG) respectively, *f* and *g* correspond to codon 171 with homozygous sequence for asparagine (AAC) and heretozygous for asparagine/serine (AAC and AGC) respectively.

Figure 3 – Identification of polymorphic sites at *Prnp* codons 117, 129 and 171 using restriction endonucleases.

a- *Prnp* coding sequence (797 bp fragment) digestion with *PvuII* generates two bands of 331 and 466 bp (lane 2) while the silent polymorphism at codon 117 abolishes the site (GCA→GCG). Lane 3 shows the polymorphism in a heterozygous sample.

b: *Prnp* coding sequence (797 bp fragment) digestion with *NspI* generates three bands of 366, 356 and 75 bp (lane 2) The presence of a polymorphic allele at codon 129 (ATG→GTG) abolishes the site resulting in the lost of 75bp fragment

and the gain of a 441bp fragment. Lane 3 shows the polymorphism in a heterozygous sample while lane 4 shows it in an homozygous one.

c: *Prnp* coding sequence (797 bp fragment) digestion with *BbvI* generates 3 fragments of 251; 206 and 95bp (lane 2). The presence of the variant allele coding for serine instead asparagine (AAC→ AGC) creates a new site resulting in fragments of 251, 160, 95 and 46bp. Lane 3 shows a heterozygous sample.

The digestion products were analyzed on 8% poliacrilamida gel stained using silver method. Lane 1 from each panel shows the 100bp DNA ladder.

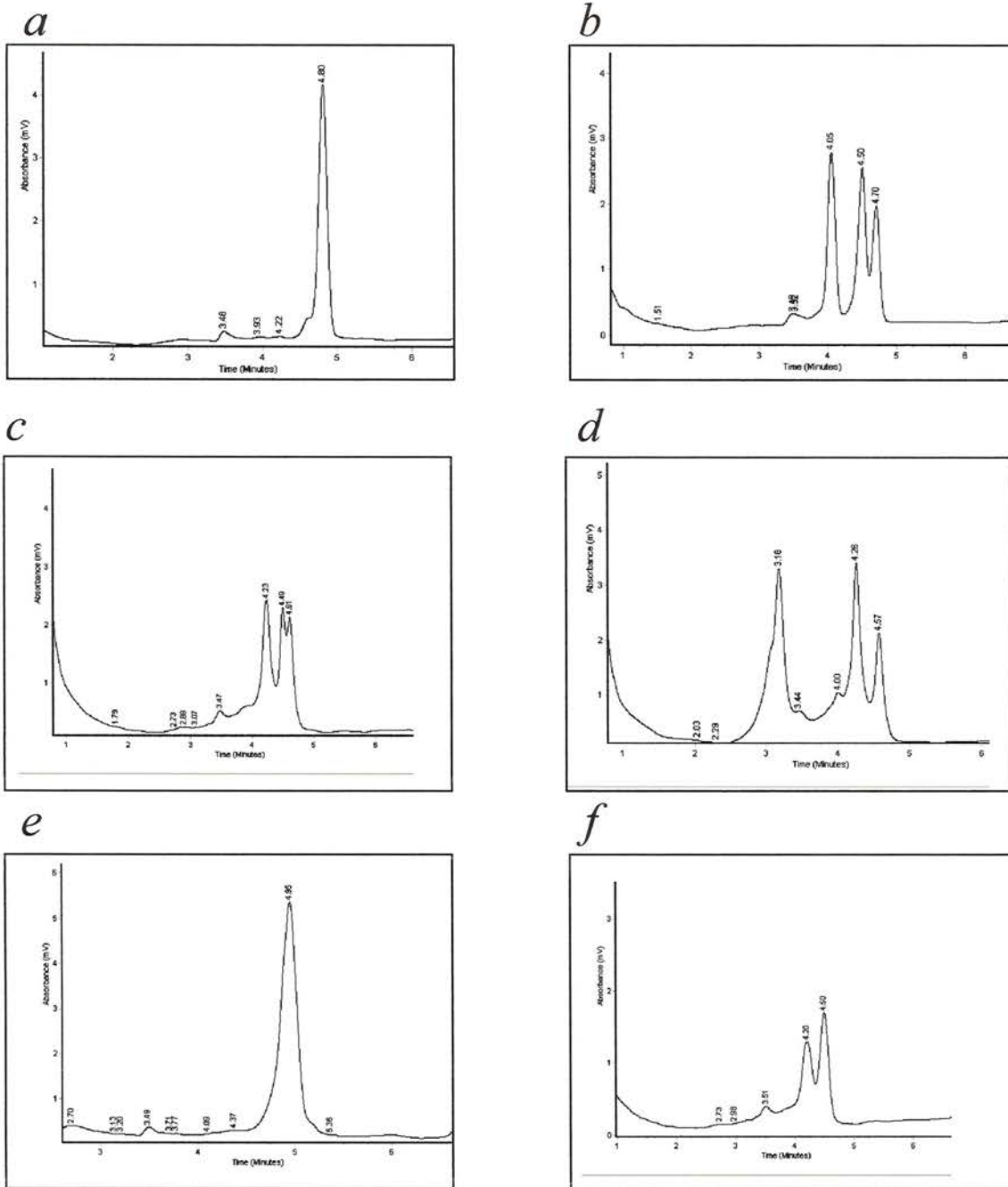


Figure 1

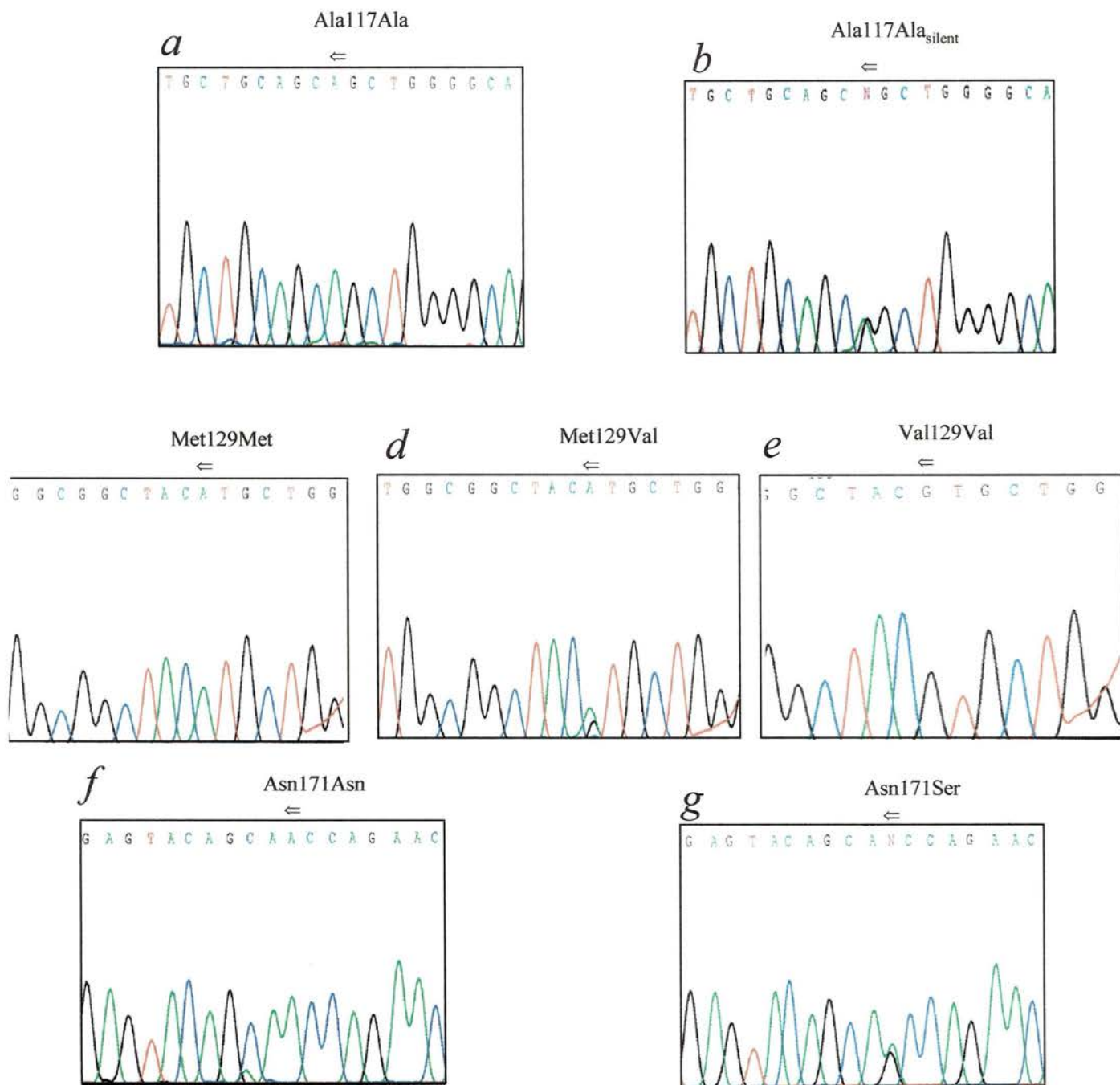


Figure 2

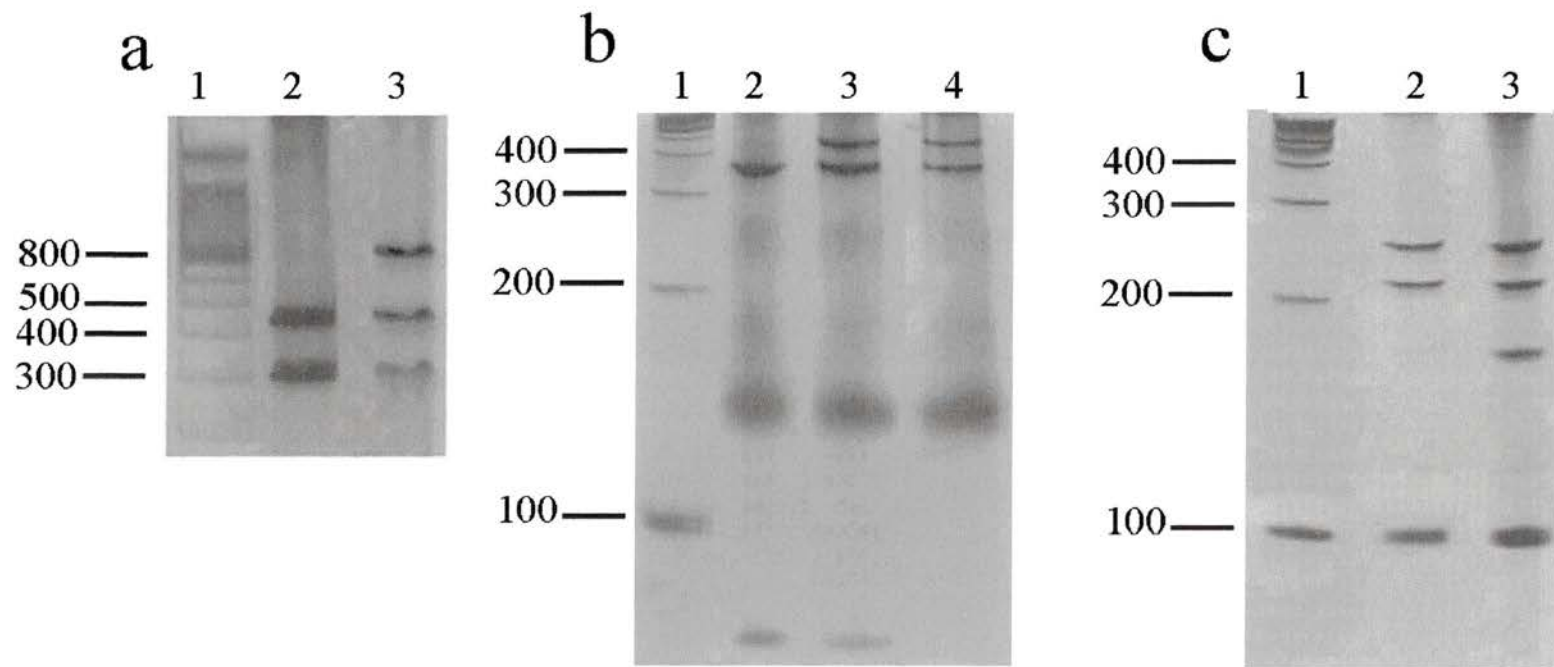


Figure 3

Walz et al., supplement material

ANEXO A . 2

Walz R, Castro RM, Landemberger MC, Velasco TR, Terra-Bustamante VC, Bianchin MM, Wichert-Ana L, Serafini LN, Leite JP, Araujo D, Alexandre V Jr, Bastos AC, Assirati JA Jr, Santos AC, Machado HR, Carlotti CG Jr, Brentani RR, Martins VR, Sakamoto AC. Malformations of cortical development are associated with a rare polymorphism of cellular prion protein gene. **Neurology** 2004; 63(3): 557-560.

Cortical malformations are associated with a rare polymorphism of cellular prion protein

R. Walz, MD, PhD; R.M.R.P.S. Castro, PhD; M.C. Landemberger; T.R. Velasco, MD; V.C. Terra-Bustamante, MD; A.C. Bastos, MD; M. Bianchin, MD, PhD; L. Wichert-Ana, MD, PhD; D. Araújo, MD, PhD; V. Alexandre, Jr., MD, PhD; A.C. Santos, MD, PhD; H.R. Machado, MD, PhD; C.G. Carlotti, Jr., MD, PhD; R.R. Brentani, MD, PhD; V.R. Martins, PhD; and A.C. Sakamoto, MD, PhD

Abstract—Studies in animals lacking the cellular prion protein (PrP^c) gene (*Prnp*) have higher neuronal excitability in vitro and increased sensitivity to seizures in vivo. The authors previously reported a rare polymorphism at codon 171 (Asn→Ser) of human *Prnp* to be associated with mesial temporal lobe epilepsy related to hippocampal sclerosis. They demonstrated that the same variant allele is also associated with symptomatic epilepsies related to different forms of malformations of cortical development.

NEUROLOGY 2004;63:●●●-●●●

Cortical development involves three broad and overlapping steps: cell proliferation, neuronal migration, and cortical organization.¹ Malformations of cortical development (MCD) are important causes of epilepsy. Although inherited forms of MCD have been described, the genetic contribution to most cortical malformations is unknown.¹ The cellular prion protein (PrP^c) is a glycosyl-phosphatidylinositol anchored cell surface glycoprotein mainly expressed in neurons.² Animals in which the PrP^c gene (*Prnp*) was constitutively ablated had a higher sensitivity to seizures in vivo.³ These findings are in agreement with data showing enhanced neuronal excitability in vitro either in constitutively or conditional PrP^c null mice,^{4,5} suggesting that modifications on PrP^c functions could be related to epilepsy.⁶ Recently we showed that a PrP^c variant allele at position 171 (Asn→Ser), absent in healthy controls, was present in heterozygosis (Asn171Ser) in 23% of patients with medically refractory mesial temporal lobe epilepsy (MTLE-HS).⁷ Furthermore, patients with MTLE-HS carrying the Asn171Ser variant were five times more likely to have seizures after surgical treatment.⁷

PrP^c has been implicated with protection against oxidative stress, modulation of neuronal apoptosis, adhesion, neurite outgrowth, and maintenance,⁸

which are all processes involved in the various steps of cortical development.¹ We demonstrate that *Prnp* variant allele at position 171 is also associated with symptomatic epilepsies related to different forms of focal MCD.

Methods. *Patients and controls.* The *Prnp* sequence was determined in DNA samples of 68 consecutive patients with different forms of MCD followed for medically refractory seizures at the Ribeirão Preto Epilepsy Surgery Program between September 2000 and July 2002. Presurgical evaluation was previously described⁷ and included clinical history and neurologic examination, video-EEG analysis, neuroimaging, and psychiatric and neuropsychological evaluation.⁷ Forty-two of 68 patients were surgically treated and classified according to clinical, histopathologic, and neuroimaging criteria, while the 26 nonsurgical cases were classified using only neuroimaging criteria.

Patients were classified into Group I, malformations due to abnormal proliferation/apoptosis; Group II, abnormal migration; or Group III, abnormal late neuronal migration and cortical organization. The exclusion criteria were nonsurgical cases with normal or inconclusive neuroimaging findings and surgical cases with histopathologic findings other than MCD.

The control group, previously described,⁷ included 180 healthy adults without a previous history of neurologic or psychiatric disease, not related to one another and without personal or family signs or symptoms of any type of spongiform encephalopathy or epilepsy.

Prnp analysis. DNA was extracted from an aliquot of whole blood and the *Prnp* ORF amplified and directly sequenced using an ABI Prism-377 apparatus (Perkin-Elmer). Analyses were also performed using denaturing high-performance liquid chromatog-

From CIREP (Drs. Walz, Velasco, Terra-Bustamante, Bianchin, Wichert-Ana, Araújo, Alexandre, Machado, Carlotti, and Sakamoto), Centro de Cirurgia de Epilepsia, Departamento de Neurologia, Psiquiatria e Psicologia Médica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FMRP-USP), Ribeirão Preto, São Paulo; Centro de Cirurgia de Epilepsia do Estado de Santa Catarina (Drs. Walz and Bastos), Hospital Governador Celso Ramos, Florianópolis, Santa Catarina; Faculdade de Medicina (Dr. Walz), Centro de Ciências da Saúde, Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), Itajaí, Santa Catarina; Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer (Drs. Castro, Brentani, and Martins, and M.C. Landemberger), São Paulo; Ludwig Institute for Cancer Research (Drs. Santos, Brentani, and Martins), São Paulo Branch; and Departamento de Anatomia e Cirurgia (Drs. Machado and Carlotti), FMRP-USP, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

Supported by grants from FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo # 99/07124-8 and 98/143352) and FAEPA-HC. M.B., R.M.R.P.S.C., and M.C.L. are research fellows from FAPESP. R.W. is a professor at the postgraduate program at Departamento de Neurologia, Psiquiatria e Psicologia Médica, FMRP, USP, Ribeirão Preto, SP.

Received August 28, 2003. Accepted in final form February 27, 2004.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Roger Walz, Centro de Cirurgia de Epilepsia do Estado de Santa Catarina, Hospital Governador Celso Ramos, Rua Irmã Benedita, S/N, 6° andar, Centro, 88.015-270, Florianópolis, SC, Brazil; or Dr. Vilma R. Martins, Ludwig Institute for Cancer Res., Rua Prof. Antônio Prudente 109 4A 01509-010, São Paulo, SP, Brazil; e-mail: vmartins@ludwig.org.br

Copyright © 2004 by AAN Enterprises, Inc. 1

Table 1 Frequency of Prnp alleles in patients with malformations of cortical development and controls

Residue position	Genotype	Exposed (%)		Crude		Adjusted	
		Controls, n = 180	Cases, n = 68	OR (95% CI)	p Value*	OR (95% CI)	p Value
117	Ala/Ala	173 (96.1)	64 (94.1)	1.0		1.0	
	Ala/Ala _{silent}	7 (3.9)	4 (5.9)	1.55 (0.44–5.45)	0.50	1.08 (0.26–4.47)	0.91†
129	Met/Met	104 (57.8)	30 (44.1)	1.0		1.0	
	Met/Val	68 (37.8)	29 (42.6)	1.48 (0.82–2.68)	0.22	1.32 (0.71–2.44)	0.39‡
	Val/Val	8 (4.4)	9 (13.2)	3.90 (1.38–10.90)	0.01	3.48 (1.19–10.16)	0.02‡
171	Asn/Asn	180 (100%)	59 (86.8)	1.0		—	—
	Asn/Ser	0	9 (13.2)	Undetermined	<0.00001	—	—
Octarepeat	R12234	170 (94.4)	65 (95.6)	1.0		1.0	
	R12234/R1234	10 (5.6)	3 (4.4)	0.78 (0.21–2.94)	1.00	0.79 (0.20–3.05)	1.0§
	R1234	0 (0)	0 (0)	—	—	—	—

* According to Fisher's exact test.

† Multiple logistic regression adjusted for sex, ethnicity, codon 129 distribution, and presence of the octarepeat deletion.

‡ Multiple logistic regression adjusted for sex, ethnicity, genotypes at position 117, and presence of octarepeat deletion.

§ Multiple logistic regression adjusted for sex, ethnicity, and codons 117 and 129.

Table 2 Frequency of Prnp alleles in different types of malformations of cortical development

Residue position	Genotype	Exposed (%)		Crude		Adjusted	
		Controls	Cases	OR (95% CI)	p Value	OR (95% CI)	p Value
Group I—Abnormal neuronal and glial proliferation or apoptosis (n = 25)							
117	Ala/Ala	173 (96.1)	23 (92.0)	1.0		1.0	
	Ala/Ala _{silent}	7 (3.9)	2 (8.0)	2.15 (0.42–10.97)	0.30*	0.85 (0.93–7.74)	0.88‡
129	Met/Met	104 (57.8)	11 (44.0)	1.0		1.0	
	Met/Val	68 (37.8)	11 (44.0)	1.53 (0.63–3.72)	0.35†	1.33 (0.53–3.34)	0.54§
	Val/Val	8 (4.4)	3 (12.0)	3.54 (0.82–15.35)	0.26†	3.55 (0.81–15.61)	0.09§
171	Asn/Asn	180 (100)	23 (92.0)	1.0		—	—
	Asn/Ser	0	2 (8.0)	Undetermined	<0.01*	—	—
Octarepeat	R12234	170 (94.4)	25 (100.0)	1.0		—	—
	R12234/R1234	10 (5.6)	0 (0)	Undetermined	0.61*	—	—
	R1234	0 (0)	0 (0)	—	—	—	—
Group II—Abnormal neuronal migration (n = 9)							
117	Ala/Ala	173 (95.1)	9 (100.0)	1.0		—	—
	Ala/Ala _{silent}	7 (3.9)	0 (0)	Undetermined	1.0*	—	—
129	Met/Met	104 (57.8)	5 (55.6)	1.0		1.0	
	Met/Val	68 (37.8)	2 (22.2)	0.61 (0.11–3.24)	0.56†	0.28 (0.03–2.53)	0.26§
	Val/Val	8 (4.4)	2 (22.2)	5.20 (0.87–31.16)	0.07†	4.18 (0.66–26.64)	0.13§
171	Asn/Asn	180 (0)	8 (88.9)	1.0		—	—
	Asn/Ser	0 (0)	1 (11.1)	Undetermined	0.04*	—	—
Octarepeat	R12234	170 (94.4)	9 (100)	1.0		—	—
	R12234/R1234	10 (5.6)	0 (0)	Undetermined	1.0*	—	—
	R1234	0 (0)	0 (0)	—	—	—	—
Group III—Abnormal cortical organization, including late neuronal migration (n = 34)							
117	Ala/Ala	173 (96.1)	32 (94.1)	1.0		1.0	
	Ala/Ala _{silent}	7 (3.9)	2 (5.9)	1.55 (0.31–7.77)	0.64*	1.54 (0.71–3.49)	0.61‡
129	Met/Met	104 (57.8)	14 (41.2)	1.0		1.0	
	Met/Val	68 (37.8)	16 (47.1)	1.75 (0.80–3.81)	0.17†	1.57 (0.71–3.49)	0.27§
	Val/Val	8 (4.4)	4 (11.8)	3.71 (0.99–13.95)	0.05†	2.75 (0.64–11.86)	0.17§
171	Asn/Asn	180 (100)	28 (82.4)	1.0		—	—
	Asn/Ser	0 (0)	6 (17.6)	Undetermined	<0.0001*	—	—
Octarepeat	R12234	170 (94.4)	31 (91.2)	1.0		1.0	
	R12234/R1234	10 (5.6)	3 (8.8)	1.65 (0.42–6.32)	0.44*	1.63 (0.41–6.42)	0.48¶
	R1234	0 (0)	0 (0)	—	—	—	—

* According to Fisher's exact test.

† Binary logistic regression.

‡ Multiple logistic regression adjusted for sex, ethnicity, codon 129 distribution, and presence of the octarepeat deletion.

§ Multiple logistic regression adjusted for sex, ethnicity, genotypes at position 117, and presence of octarepeat deletion.

¶ Multiple logistic regression adjusted for sex and ethnicity.

¶ Multiple logistic regression adjusted for sex, ethnicity, and codons 117 and 129 distribution.

raphy and restriction endonucleases digestion, as previously described.⁷

Statistical analysis. Sex and ethnicity distribution in cases and controls were analyzed by Fisher's exact test. Association between *Prnp* alleles and the occurrence of different forms of MDC was measured by the OR and respective 95% CIs using unconditional logistic regression (SPSS program, version 10.0, Chicago, IL). When applicable, OR were also derived to determine the independent effect of each genotype, sex, and ethnicity (adjusted OR). The level of significance was set at $p < 0.01$. Our study fulfilled the fundamental requisites of genetic investigations of complex multietiological diseases.⁹

Results. European-Brazilians represented 86.0% of the controls and 84.4% of the patients ($p = 0.84$). Men corresponded to 46.0% of the controls and 39.8% of the patients ($p = 0.39$). The mean age of patients and controls was 19.3 (SD ± 11.0) years and the mean age of controls was 36.5 (SD ± 10.5) years.

The proportion of cases and controls bearing the *Prnp* genotypes are shown in table 1. The frequencies of the silent polymorphic site at codon 117 and the single octapeptide repeat deletion (R1234) both present in heterozygosis (Ala117Ala_{silent} and R12234/R1234) were similar in patients and controls. The heterozygous samples (Met/Val) at codon 129 showed a non-significant increase in OR for MCD, whereas the homozygous Val/Val presented a trend for positive association when compared to Met/Met genotype.

The Asn171Ser heterozygous genotype⁷ was found in 9 (13.2%) of the patients but in none of the controls ($p < 0.0001$). Similar findings were observed after additional control for the effect of genotypes, sex, and ethnicity (see table 1). All studied genotype distributions were in good agreement with the Hardy-Weinberg equilibrium (data not shown).

There were no significant associations among MCD groups and the octapeptide deletion and variant alleles at codons 117 and 129 (table 2). However, the Asn/Ser heterozygous genotype at codon 171 was found in 8.0% of patients from Group I ($p < 0.01$), 11.1% in those from Group II ($p = 0.04$), and 17.6% in those from Group III ($p < 0.0001$). Therefore, the frequency of the *Prnp* heterozygous genotype at codon 171 was variable among the different subtypes of MCD with Group III (cortical organization and late neuronal migration) showing a higher level of significance (see table 2).

The frequency of the variant allele at codon 171 among the different MCD subtypes was evaluated (table 3). In Group I, it was observed in 1 of 6 (16.7%) cases of cortical dysplasia with balloon cells and 1 of 5 (20%) patients with hemimeganencephaly. Group II showed this genotype in 1 out of 2 cases (50%) of subcortical heterotopia. In Group III, it was present in 1 of 7 (14.3%) patients with bilateral polymicrogyria syndromes, 3 of 7 (42.9%) with polymicrogyria with other brain malformations, and 2 of 17 (11.8%) with cortical dysplasia without balloon cells.

Discussion. Taken together with our previous data in patients with MTLE-HS,⁷ these findings suggest that the *Prnp* variant allele at codon 171 might be associated with human susceptibility to different forms of focal symptomatic epilepsies. Nonetheless, only some of the affected patients have the *Prnp* variant allele, indicating that it represents only a risk for the disorder and, as it is well known, a com-

Table 3 Frequency of *Prnp* genotype at codon 171 among different types of malformations of cortical development

Type of malformation of cortical development	All cases	Genotype at codon 171	
		Asn/Asp (%)	Asn/Ser (%)
I. Neuronal and glial proliferation or apoptosis (n = 25)			
A. Microcephalies (n = 1)			
1. Microcephaly with polymicrogyria/cortical dysplasia	1	1 (100)	None
B. Abnormal proliferation (n = 24)			
1. Non-neoplastic			
a. Cortical hamartomas*	2	2 (100)	None
b. Cortical dysplasia with balloon cells	6	5 (83.3)	1 (16.7)
c. Hemimegalencephaly	5	4 (80)	1 (20)
2. Neoplastic (with cortical disordered)			
a. Dysembryoplastic neuroepithelial tumor	9	9 (100)	None
b. Ganglioglioma	1	1 (100)	None
c. Gangliocytoma	1	1 (100)	None
II. Neuronal migration (n = 9)			
A. Lissencephaly/subcortical band heterotopia spectrum (n = 5)	5	5 (100)	None
B. Heterotopia (n = 4)			
1. Subependymal (periventricular)	2	2 (100)	None
2. Subcortical (other than band heterotopia)	2	1 (50)	1 (50)
III. Cortical organization and late neuronal migration (n = 34)			
A. Polymicrogyria and schizencephaly (n = 17)			
1. Bilateral polymicrogyria syndromes	7	6 (85.7)	1 (14.3)
2. Schizencephaly (polymicrogyria with clefts)	3	3 (100)	None
3. Polymicrogyria with other brain malformations or abnormalities	7	4 (57.1)	3 (42.9)
B. Cortical dysplasia without balloon cells (n = 17)	17	15 (88.2)	2 (11.8)
Total	68	59 (86.8)	9 (13.2)

* Cortical hamartomas not related to tuberous sclerosis.

combination of environmental factors and susceptibility alleles across the genome should be necessary for developing the condition.

It is still unknown if changes in *Prnp* could cause epilepsy or only induce a pro-epileptogenic state which, in association with other abnormalities, predisposes to epileptogenesis in humans. The amino acid at codon 171 is positioned right in the middle of the laminin-binding site in the PrP^c molecule⁸ suggesting that the alteration may be related to cell signaling mediated by PrP^c-laminin interaction. Interestingly, seizures induced by kainic acid stimulate plasmin activation which leads to laminin degradation in the brain.¹⁰ The possible effects of the amino acid change at codon 171 (Asn→Ser) on PrP^c functions and their relationship with epilepsy are currently being investigated.

References

1. Barkovich AJ, Kuzniecky RI, Jackson GD, Guerrini R, Dobyns WB. Classification system for malformations of cortical development: update 2001. *Neurology* 2001;57:2168–2178.
2. Prusiner SB. Prions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:13363–1383.
3. Walz R, Amaral OB, Rockenbach IC, et al. Increased sensitivity to seizures in mice lacking cellular prion protein. *Epilepsia* 1999;40:1679–1682.
4. Collinge J, Whittington MA, Sidle KC, et al. Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature* 1994;370:295–297.
5. Mallucci GR, Ratte S, Asante EA, et al. Post-natal knockout of prion protein alters hippocampal CA1 properties, but does not result in neurodegeneration. *EMBO J* 2002;21:202–210.
6. Walz R, Castro RM, Velasco TR, et al. Cellular prion protein: implications in seizures and epilepsy. *Cell Mol Neurobiol* 2002;22:249–257.
7. Walz R, Castro RM, Velasco TR, et al. Surgical outcome in mesial temporal sclerosis correlates with prion protein gene variant. *Neurology* 2003;61:1204–1210.
8. Martins VR, Linden R, Prado MA, et al. Cellular prion protein: on the road for functions. *FEBS Lett* 2002;512:25–28.
9. Bird TD, Jarvik GP, Wood NW. Genetic association studies: genes in search of diseases. *Neurology* 2001;57:1153–1154.
10. Chen ZL, Strickland S. Neuronal death in the hippocampus is promoted by plasmin-catalyzed degradation of laminin. *Cell* 1997;91:917–925.

ANEXO A . 3

Castro RMRPS, Landemberger MC, Walz R, Carlotti CG Jr , Huangg N, Cunha DR, Moura R, Caballero O, Sakamoto AC, Nitrini R, Brentani RR, Martins VR. High capacity and low cost detection of prion protein gene variant alleles by denaturing HPLC. **J Neurosci Meth** 2004, 139(2):263-269.



High capacity and low cost detection of prion protein gene variant alleles by denaturing HPLC

Rosa Maria R.P.S. Castro^{a,b}, Michele C. Landemberger^{a,b}, Roger Walz^{c,d,e},
Carlos G. Carlotti, Jr.^{c,f}, Nancy Huang^g, Danielle R. Cunha^b, Ricardo Moura^b,
Otávia L. Caballero^{a,b}, Américo C. Sakamoto^c, Ricardo Nitrini^g,
Ricardo R. Brentani^{a,b}, Vilma R. Martins^{a,b,*}

^a Ludwig Institute for Cancer Research, São Paulo Branch, São Paulo SP, Brazil

^b Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer, São Paulo, SP, Brazil

^c CIREP, Center for Epilepsy Surgery, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil

^d Center for Epilepsy Surgery, Hospital Governador Celso Ramos, Florianópolis, SC, Brazil

^e Centro de Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, UNIVALI, Itajaí, SC, Brazil

^f Departamento de Anatomia e Cirurgia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil

^g Disciplina de Neurologia, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina USP, São Paulo, SP, Brazil

Received 16 March 2004; accepted 6 May 2004

Abstract

Mutations in the human prion protein gene (*PRNP*) are responsible for hereditary diseases called transmissible spongiform encephalopathies (TSE) and a polymorphic site at codon 129 determines sensitivity to infectious forms of these maladies. More recently, codon 129 has been related to cognition performance in the elderly, in Alzheimer disease (AD) and in Down syndrome. Furthermore, a rare polymorphism at codon 171 was described in 23% of patients with mesial temporal lobe epilepsy related to hippocampal sclerosis (MTLE-HS), the most common form of surgically remediable epileptic syndrome. Thus, a method that permits fast and efficient screening of *PRNP* mutations and polymorphisms in patients, in high risk populations, and in family members is desirable. In the present study, we established the conditions for analysis of the *PRNP* open reading frame using denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC), whereby unpurified PCR products were subjected to denaturing and reannealing steps leading to heteroduplex formation. We described specific profiles for the *PRNP* polymorphisms at codons 129 (M/V), 117 (A/A silent), 219 (E/K), 171 (N/S), and the octarepeat deletion using amplified DNA from 562 samples. The chromatograms for TSE-associated mutations at codons 102 (P/L), 183 (T/A), and 210 (V/I) were also determined. Specificity of the DHPLC profile for each *PRNP* variant allele was confirmed in 100% of the samples by direct and cloned DNA sequencing in addition to endonuclease digestion when applicable. Therefore, the present study shows that DHPLC is a rapid, highly accurate and efficient technique for the detection of *PRNP* genetic variants.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Prion protein gene; Prion; Prion diseases; Mutations; Polymorphisms; Denaturing high-performance liquid chromatography

1. Introduction

Transmissible spongiform encephalopathies (TSE) are a group of fatal human neurodegenerative disorders which can occur in sporadic, familial and acquired forms. The hallmark of TSE is the accumulation in the central nervous

system of PrP^{Sc}, which is an abnormally folded isoform of the encoded cellular prion protein (PrP^C) (Prusiner, 1998). PrP^C is encoded by a single exon of a single gene, *PRNP*, for which some genetic variants have been described and are specifically associated with familial forms of TSEs such as Creutzfeldt–Jakob disease (CJD), Gerstmann–Straussler–Scheinker disease (GSS) and fatal familial insomnia (FFI). The pathogenic mutations include single point variations that are located mostly in the central and C-terminal region of PrP^C such as those from codons 102 (Doh-ura et al., 1989; Hsiao et al., 1989), 183 (Nitrini

* Corresponding author. Present address: Ludwig Institute for Cancer Research, São Paulo Branch, Rua Antonio Prudente 109-4A, Liberdade 01509-010, SP, Brazil. Tel.: +55-11-3388-3220; fax: +55-11-3207-7001.

E-mail address: vmartins@ludwig.org.br (V.R. Martins).

et al., 1997) and 210 (Pocchiari et al., 1993; Ripoll et al., 1993) in addition to deletions and insertions located in the N-terminal domain (Campbell et al., 1996; Capellari et al., 1997; Goldfarb et al., 1993; Laplanche et al., 1995; Owen et al., 1989). In many cases, the diagnosis of these diseases is very difficult and *PRNP* sequencing must be performed in order to validate the presence of a hereditary prion disease.

A highly frequent *PRNP* polymorphism at codon 129 is well known to play a role in modulating disease outcome since its association with a mutation at position 178 seems to be a key determinant between CJD and FFI (reviewed by Gambetti et al., 2003). Homozygosity for methionine at codon 129 also plays an important role in susceptibility to the new variant of Creutzfeldt–Jakob disease (vCJD) (Zimmermann et al., 1999), which was described to be transmitted to humans, particularly to young adults, through the ingestion of meat from cattle infected with bovine spongiform encephalopathy (Collinge et al., 1996). Thus, *PRNP* sequencing became important mainly in patients younger than 50 years to discriminate between vCJD and some early familial forms of TSE (reviewed by Collinge, 2001). In addition, population screening might be important to define higher risk groups.

The octarepeat domain of the human PrP^c molecule is also polymorphic and four or five repeats of the peptide PHGGGWGQ can be found in normal populations (Palmer and Collinge, 1993). It is believed that these variant alleles are not related to susceptibility to prion diseases; however, insertional mutations from two to nine octarepeats are associated with CJD (Campbell et al., 1996). A third *PRNP* polymorphic site at codon 219 is found at very high frequency in the Japanese population and has been reported to delay the onset of GSS (Tanaka et al., 1997).

PRNP variant alleles have been recently related to other human diseases, a finding consistent with partial or total PrP^c loss of function (Martins et al., 2002). The Val/Val polymorphism at codon 129 is indicative of a worse cognition in the elderly (Berr et al., 1998), in patients with Alzheimer disease (Berr et al., 2003) and in Down syndrome (Del Bo et al., 2003). In addition, a very rare polymorphism at codon 171 where an asparagine is changed to a serine, previously found in a familial form of schizoaffective disorder (Samaia et al., 1997), is present in 23% of patients with mesial temporal lobe epilepsy related to hippocampal sclerosis (MTLE-HS) and the serine variant allele indicates a poorer surgical outcome for seizure cure (Walz et al., 2003). Therefore, these data indicate that variant alleles in *PRNP* are associated with human diseases whose prevalence is much higher than that of prion diseases.

Optimization of conventional techniques and the development of new tools for genotyping *PRNP* have been reported to be essential to avoid mistakes that may delay both the correct molecular diagnosis of the diseases and the classification of a normal population in cohort studies. Previously described methods are time consuming and excessively ex-

pensive to be used for routine analysis. Additionally, several polymorphic and mutation sites found in the *PRNP* open reading frame (ORF) are located within a large domain of CpG islands (Lee et al., 1998) which complicates direct sequencing of genomic DNA (Parker et al., 1995).

In the present study we describe the use of denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) to screen variant alleles in *PRNP*. This technique is based on the automated detection of heteroduplexes in short DNA segments by ion-pair reverse phase high-performance liquid chromatography under partially denaturing conditions (Oefner et al., 1992). Therefore, single base substitutions, deletions or insertions can be easily detected. The major advantage of this method is the low cost and the speed of analysis whereby after a single PCR the unpurified product can be analyzed within approximately 16 min. Once the profiles are established DNA sequencing of PCR fragments is unnecessary.

Using two pairs of primers we amplified two overlapping *PRNP* segments comprising the entire ORF and submitted them to DHPLC analysis. We determined specific profiles for the polymorphic sites at the octarepeat domain and at codons 117, 129, 171 and 219 in addition to point mutations at codons 102, 183 and 210. Each profile was confirmed by direct and cloned product sequencing and by restriction endonuclease when applicable.

2. Materials and methods

2.1. Samples and DNA extraction

A total of 567 individuals were included in the study. Blood samples were collected from 177 adult healthy controls, three members of a family presenting GSS with a mutation at codon 102 of the cellular prion protein (P102L), and two patients with CJD, one with a mutation at codon 183 (T183A) and the other with a mutation at codon 210 (V210I). We also analyzed DNA from 385 samples obtained at the Center for Epilepsy Surgery, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto USP (CIREP), from patients with MTLE-HS, different forms of abnormalities of cortical development, gliosis, glial brain tumors, focal epilepsy with normal MRI, idiopathic generalized epilepsies, Rasmussen's syndrome, undiagnosed epileptic syndromes, and from family members of these patients.

DNA was directly extracted from 3 mL of whole blood using the Puregene Genomic DNA Isolation Kit (Gentra Systems, USA).

2.2. PCR conditions

Primers were designed to amplify two different overlapping fragments of the *PRNP* ORF (GenBank accession number AY008282). Their sequence and positions in *PRNP* are shown in Fig. 1.

Fragment 1 – nucleotides 65 to 488 (codons 8 to 148)

Forward: 5' ATG CTG GTT CTC TTT GTG 3'

Reverse: 5' AAC GGT CCT CAT AGTCAC TGC 3'

Fragment 2 – nucleotides 455 to 858 (codons 138 to stop plus 53 bp)

Forward: 5' ATC ATA CAT TTC GGC AGT 3'

Reverse: 5' CTC CCT CAA GCT GGA AAA AGA 3'

Fig. 1. Primers used in this study (based on GenBank sequence AY008282). *PRNP* ORF was divided into two fragments in order to obtain the best performance in DHPLC analysis.

Amplification reactions were carried out using touch down PCR (Don et al., 1991) in a total volume of 50 μ L containing 100 ng of genomic DNA, 100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl₂, 25 mM MgCl₂, 200 μ M dNTPs (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 0.5 μ M of each primer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and 5 U of AmpliTaq Gold enzyme (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Amplifications were performed using a DNA Thermal Cycler PTC-100 (MJ Research Inc., MA, USA) as follows, for fragment 1: 10 min at 95 °C, then 10 cycles consisting of 1 min at 94 °C, 1 min at 64 °C and 1 min at 72 °C; 10 cycles consisting of 1 min at 95 °C, 1 min at 62 °C and 1 min at 72 °C, and 15 cycles consisting of 1 min at 95 °C, 1 min at 60 °C and 1 min at 72 °C. For fragment 2: 10 min at 95 °C, and then 10 cycles consisting of 1 min at 94 °C, 1 min at 62 °C and 1 min at 72 °C; 10 cycles consisting of 1 min at 95 °C, 1 min at 60 °C and 1 min at 72 °C, and 15 cycles consisting of min at 95 °C, 1 min at 58 °C and 1 min at 72 °C (Don et al., 1991).

2.3. DHPLC

DNA amplified in two different reactions (fragments 1 and 2) as described above was submitted to a denaturing step by heating at 95 °C for 5 min followed by a gradual re-annealing by cooling to 60 °C (2 °C/min) to enhance heteroduplex formation. Fifteen microliters of each re-annealed PCR product were applied to an automated HPLC apparatus equipped with a DNASep column (Wave-nucleic acid fragment analysis system—Transgenomic Inc., Omaha, NE, USA). Parameters of gradient and flow rate were adjusted with the Wavemaker system control software (Transgenomic Inc., Omaha, NE, USA). DNA was eluted in a linear acetonitrile gradient of buffers A and B. Buffer A consisted of 0.1 M triethylammonium acetate (TEAA) (Transgenomic Inc., Omaha, NE, USA) and buffer B of 0.1 M TEAA and 25% acetonitrile (JT Baker, NJ, USA). The start and end points of the gradient obtained by mixing eluents A and B were adjusted using the algorithm provided by the Wavemaker software (Transgenomic Inc., Omaha, NE, USA). Elution of DNA was detected by 260 nm UV absorbance and the chromatograms were analyzed based on patterns of peak number and relative weight. First, the amplicons were analyzed under non-denaturing conditions at 50 °C to estab-

lish the volume of sample injection for the mutation analysis that ranged from 8 to 10 μ L. The temperature for optimal resolution of heteroduplex and homoduplex DNA was determined by a DHPLC melting algorithm using the Wavemaker software (Transgenomic Inc., Omaha, NE, USA) and also by analyzing the melting behavior of each PCR fragment while the temperature was varied by 1 °C increments.

Each sample in which only one peak was identified was further analyzed by preparing equimolar mixtures with PCR products from known wild-type samples to generate potential heteroduplex species. After the addition of the wild-type sample, denaturation, re-annealing, and re-injection into the DNASep column the appearance of heterozygous elution profiles confirmed the presence of a homozygous mutant genotype. The corresponding homozygous for the wild type profile appeared as only one peak. The flowchart for this strategy is shown in Fig. 2.

2.4. DNA sequencing

PCR products were sequenced with the DynamicTM ET terminator sequenced kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) according to manufacturer instructions. Sequencing reactions were separated on ABI Prism-377 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

2.5. Endonuclease digestion

PCR for the entire open reading frame of *PRNP* was carried out in a total volume of 50 μ L using the forward primer of fragment 1 and the reverse primer of fragment 2 (Fig. 1) under the same conditions and at an annealing temperature of 63 °C. The PCR products were purified by precipitation with 400 μ L of 2-propanol (PA, Merck, Germany) for precipitation of the DNA and elimination of the PCR mix followed by a second precipitation with 400 μ L of 70% ethanol (Merck, Germany). The DNA was dissolved at 20 ng/ μ L in sterile water. Restriction endonucleases *PvuII*, *NspI*, and *BbvI* were used to analyze codons 117, 129, and 171 respectively (Fink et al., 1994; Windl et al., 1999). Enzymes were supplied by New England Biolabs and Amersham Biosciences and were used according to manufacturer recommendations. Digestion was carried out by incubation at 37 °C for 16 h followed by enzyme inactivation at 65 °C. Digestion products were analyzed by electrophoresis on 8% polyacrylamide gels and DNA was stained with silver.

2.6. Cloning of the PCR products

The complete *PRNP* coding region from DNA samples containing each type of polymorphism or mutation was amplified using the same conditions as described above and products were cloned in the PCR 2.1 vector using the TA-cloning kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). DNA purified from transforming colonies was sequenced to confirm the presence of variant alleles.

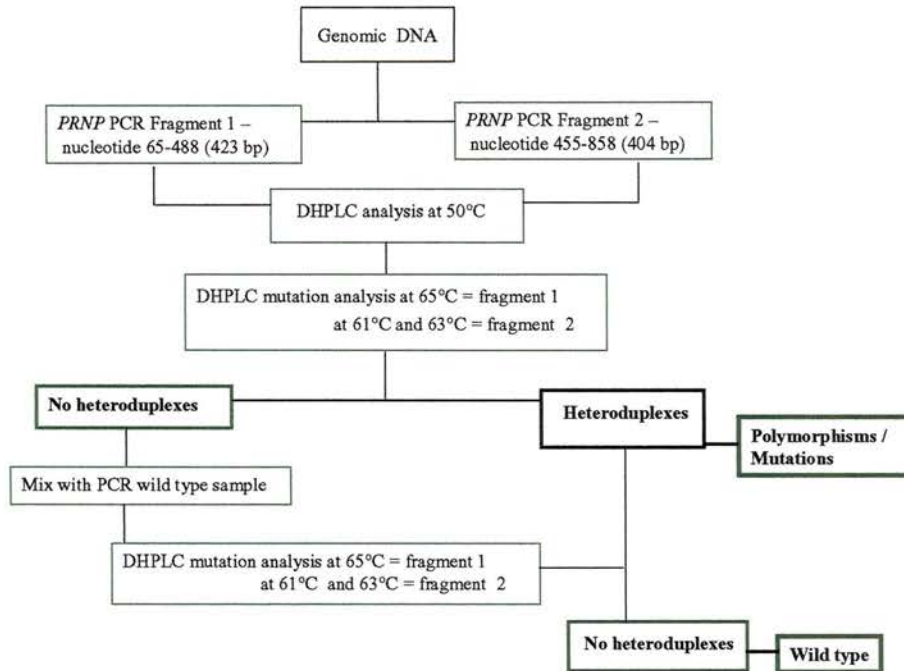


Fig. 2. Flowchart of DHPLC strategy for *PRNP* analysis. *PRNP* ORF was amplified in two separate overlapping fragments and the PCR products submitted to DHPLC. Analysis of each amplicon was done using non-denaturing conditions at 50°C and at partial denaturing temperatures (65°C for fragment 1 and 61 and 63°C for fragment 2). DHPLC profile presenting a single sharp peak indicates homoduplex formation (homozygous sample) while heteroduplex formation (heterozygous sample) is characterized by double or triple peaks and a heterozygous mutant/polymorphic genotype. In the first case (homoduplex) the sample must be mixed with a PCR product from a control (wild type) sample and re-analyzed by DHPLC. The appearance of a single sharp peak (homoduplex) confirms that the sample analyzed is wild type while a heteroduplex formation (double or triple peaks) characterizes a homozygous mutant/polymorphic genotype. In bold, the final findings that guide to the conclusions of the DHPLC analysis.

3. Results

The *PRNP* ORFs of a total 567 genomic DNA samples were submitted to DHPLC analysis and to direct sequencing. We had no previous information about the presence of any *PRNP* polymorphism in 562 DNAs. We also tested DNA samples from GSS and CJD patients with mutations previously described at codons 102, 183 and 210, respectively. Despite the large number of epileptic syndromes evaluated here, their association with *PRNP* polymorphisms was not the scope of the present study.

The samples yielding similar DHPLC profiles were grouped together and compared to their sequencing results. Polymorphic sites at codons 117, 129 and 171 were also confirmed by specific endonuclease digestion.

In order to establish the DHPLC patterns for polymorphic and mutation sites at *PRNP* we divided the ORF into two overlapping amplicons using the primers described in Fig. 1. The strategy applied for each reaction is schematically presented in Fig. 2 where a preliminary analysis of each amplicon was always done using non-denaturing conditions at 50°C in order to quantify and verify the quality of the PCR product. Under these conditions, the presence of an octarepeat deletion within fragment 1 was promptly observed due to a specific DHPLC profile of the shorter PCR product when compared to the wild type sample (Fig. 3).

This pattern was confirmed in all 40 samples characterized as heterozygote for the octarepeat deletion by direct sequencing (Table 1). When fragment 1 amplicon was submitted to 65°C the wild type samples showed a single peak of partially denatured homoduplex DNA, whereas the presence of polymorphic or mutation sites led to distinct profiles with two or more peaks (Fig. 4). These peaks are caused by partially denatured heteroduplex molecules that are retained in the column for shorter times and are specific for each heterozygous site. Specificity of the profiles was confirmed for

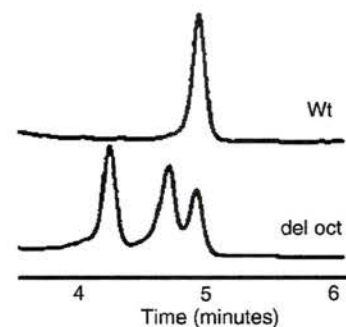


Fig. 3. *PRNP* fragment 1 DHPLC sizing analysis. Amplification products from *PRNP* fragment 1 (codons 8–148) analyzed by DHPLC using non-denaturing conditions at 50°C (sizing) show different profiles for a sample with an octarepeat deletion compared with a wild type sample.

Table 1
Number of *PRNP* variant alleles identified using DHPLC in 567 DNA samples

Fragment 1								Fragment 2			
Octarepeat deletion	P102L	M129V	A117A _{silent}	Del Oct + M129V	P102L + M129V	M129V + A117A _{silent}	V129V	N171S	T183A	V210I	E219K
22	2	221	13	18	1	18	57	44	1	1	2

13 A117A_{silent} samples, 221 samples with M129V, 22 samples with octarepeat deletion and two samples with P102L mutation (Table 1). In addition, different profiles are found when two polymorphic sites are present in this fragment. The occurrence of an octarepeat deletion or an A117A_{silent} polymorphism in heterozygosity with M129V produced profiles which differed from those observed for each single

polymorphism (Fig. 4) and were confirmed in 18 samples of both combinations (Table 1).

It is important to note that the presence of a profile with a sharp peak does not necessary characterize a wild type sample but rather the presence of a homoduplex, which means that a polymorphism/mutation may be present in homozygosity. Therefore, when the first screening analysis shows homoduplex formation, mixing the sample with a PCR product from a wild type sequence is mandatory (Fig. 2). Using this approach, a second round of DHPLC from mixed samples (sample of interest plus wild type control) confirmed 253 wild type samples (for fragment 1) and 57 V129V samples which then produced in this mixed reaction a heteroduplex profile of the M129V samples. Furthermore, there were no heterozygotes for octarepeat deletion or A117A_{silent} polymorphisms in our samples. However, the presence of these variants should produce specific heteroduplex profiles, analogous to those presented in Fig. 4, after mixing with wild type samples and running in a second round of DHPLC.

The second *PRNP* amplicon (codons 138 to stop codon plus 53 bp) was submitted to DHPLC analysis at 63 °C (Fig. 2) and a single peak of partially denatured homoduplex DNA was also observed for the wild type sample. DNA presenting heterozygous polymorphic or mutation sites at codons 171, 183 or 210, respectively, showed different retention times on the DHPLC column (Fig. 5). The pattern specificity was confirmed in 44 samples with the N171S polymorphism characterized by direct sequencing and restriction digestion with *BbvI*. However, only two samples, one containing the mutation at codon 183 (T183A) and the other at codon 210 (V210I), were available for analysis.

The conditions initially used for fragment 2 were unable to discriminate between polymorphic sites at codons 171 (N/S) and 219 (E/K) (Fig. 5) but a reduction of the denaturation temperature to 61 °C permitted us to obtain specific profiles for each of these sites (Fig. 6). Nevertheless, the pattern specificity for the other mutations (codons 183 and 210) was lost at this temperature (61 °C).

In summary, our results showed 100% coincidence of the direct sequencing and restriction enzyme analysis (when applied) with DHPLC when *PRNP* ORF was amplified in two fragments and analyzed at 65 °C for *PRNP* fragment 1 and at 61 °C and 63 °C for fragment 2. Therefore, DHPLC produced highly reproducible profiles allowing the identification of *PRNP* polymorphisms and mutations based on differences in chromatogram shape.

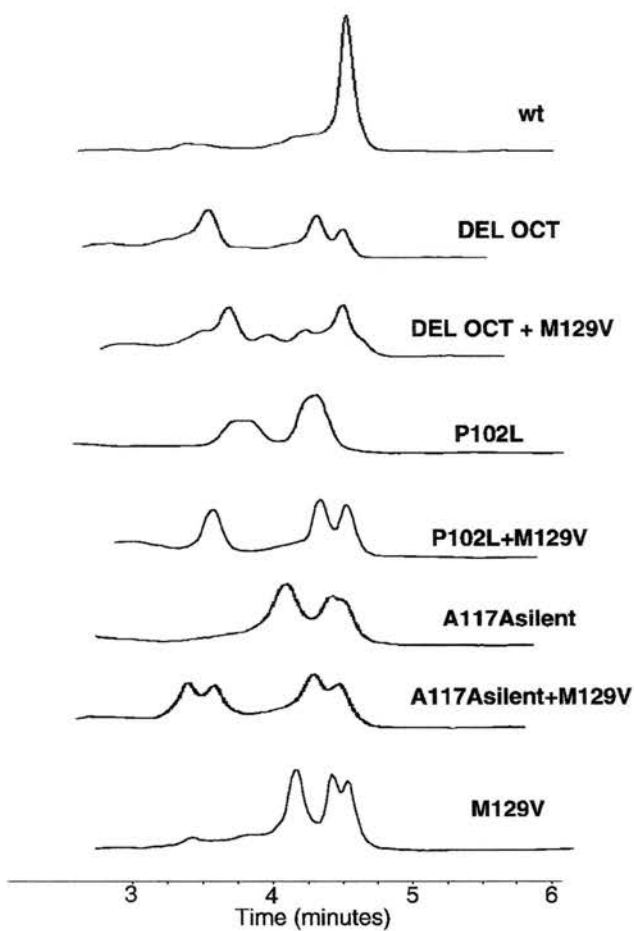


Fig. 4. DHPLC elution profiles of homo and heteroduplexes from *PRNP* fragment 1 (codons 8–148) polymorphic and mutation sites at 65 °C. The chromatograms show a homoduplex control (wild type) sample and samples containing heteroduplexes characterized by specific profiles for mutation at codon 102 (P102L) and polymorphisms at codons 117 (A117A_{silent}), 129 (M129V) and the octarepeat deletion (Del Oct). The combination of two polymorphic sites also produced a specific profile which was different from that presented by each polymorphism alone (Del Oct + M129V, P102L + M129V and A117A_{silent} + M129V).

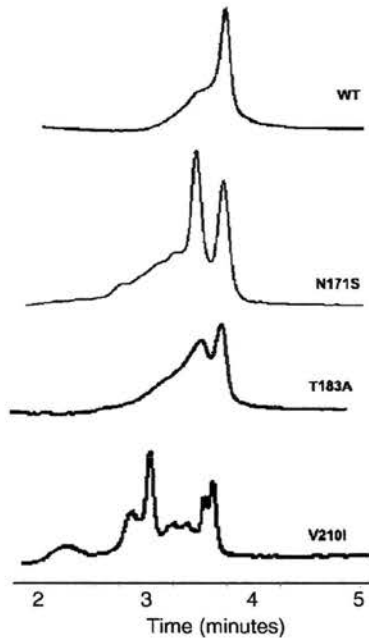


Fig. 5. DHPLC elution profiles of homo and heteroduplexes from *PRNP* fragment 2 (codons 138 to stop plus 53 bp) polymorphic and mutation sites at 63 °C. The chromatograms show a homoduplex control (wild type) sample and samples containing heteroduplexes characterized by specific profiles for the polymorphism at codon 171 (N171S) and mutations at codons 183 and 210.

4. Discussion

There is a continuing need for improved, efficient, rapid and low cost technology for the detection of *PRNP* polymorphisms and mutations. DHPLC has been used successfully for the detection of mutations and polymorphisms in several genes including those related to cancer predisposition (reviewed by Xiao and Oefner, 2001).

DHPLC analysis performed according to the conditions described here resulted in a straightforward detection of the variant alleles in codons 102, 117, 129, 171, 183, 210 and 219 and identified one octarepeat deletion independently of direct DNA sequencing analysis. An identical pattern of retention times within the column was observed for all samples

with the same genetic alteration and no false results were detected, a fact indicating high sensitivity and specificity. Nevertheless, more variant alleles than those evaluated here have been described for *PRNP* (reviewed by Mastroianni and Roos, 2000) and a careful evaluation of DHPLC conditions for each nucleotide change or combination of changes different from those described here will be required.

While direct sequencing may be the most efficient way to identify variant alleles, sometimes problems may occur, in particular when a CG-rich region is analyzed (Parker et al., 1995), which is the case for the 5' region of the *PRNP* ORF. In this situation, it is necessary to clone the PCR products and sequence a large number of colonies, an expensive and time consuming approach. On the other hand, endonuclease digestion can be an interesting alternative but it is restricted to the analyses of variant alleles that create or suppress a cleavage site for the enzyme.

In contrast, DHPLC is an excellent detection strategy of lower cost, excellent resolution and easy analysis. The major requirement is the quality and quantity of PCR products ($A_{260} > 2$ mV) and the size of the amplification product that should be less than 700 bp (reviewed by Xiao and Oefner, 2001). It is also recommended to check the column conditions and the oven temperatures frequently, as well as to run controls with known nucleotide changes in every run to ensure the reproducibility of the assay. Hence, two PCR procedures (fragment 1 and 2) are necessary for *PRNP* ORF evaluation and the profile of each PCR product is completed in 8 min. Therefore, the entire ORF analysis will be ready in 16 min for heterozygous samples. In the case of homozygous samples, the PCR product must be mixed with a control sample, must be submitted to a denaturation step and run again in the DHPLC, a procedure that takes 16 additional minutes. Therefore, with the cost of two PCR reactions (not included the equipment cost) and in about 30 min an entire *PRNP* ORF can be analyzed. The automated DHPLC equipment can be loaded with 192 samples.

In conclusion, the DHPLC technique under optimized conditions is a rapid, highly accurate and useful tool to determine polymorphisms and mutations in *PRNP*. This approach will permit the screening of relatives from families with hereditary prion diseases, high risk populations

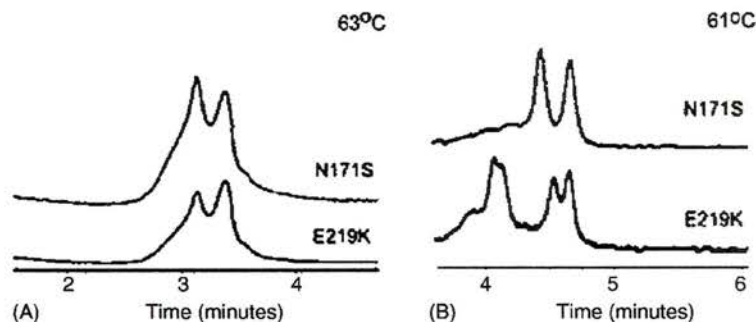


Fig. 6. DHPLC elution profiles from *PRNP* fragment 2 at 63 °C and 61 °C. The DHPLC elution profile of heteroduplexes polymorphic sites at codons 171 (N171S) and 219 (E219K) showed a better resolution at 61 °C (panel B) than at 63 °C (panel A).

for vCJD (Collinge, 2001) and for worse cognition in the elderly (Berr et al., 1998), in Alzheimer (Berr et al., 2003) and Down syndrome (Del Bo et al., 2003) and for susceptibility to epileptic syndromes. It will also permit the prediction of a poorer surgical outcome in patients with Hippocampal Sclerosis (Walz et al., 2003).

Finally, one major sanitary problem is related to prion diseases in cattle and sheep and how variant alleles at their *PRNP* sequence are linked to infection susceptibility (Goldmann et al., 1994; Hunter, 1997). The use of DHPLC and an adaptation of the conditions described here will also permit the prompt evaluation of a large number of animals.

Acknowledgements

This work was supported by grant from FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo # 99/07124-8). R.M.R.P.S. Castro and M.C. Landemberger are research fellows supported by CAPES and FAPESP, respectively.

References

- Berr C, Richard F, Dufouil C, Amant C, Alperovitch A, Amouyel P. Polymorphism of the prion protein is associated with cognitive impairment in the elderly: the EVA study. *Neurology* 1998;51(3):734–7.
- Berr C, Helbecque N, Sazdovitch V, Mohr M, Amant C, Amouyel P, et al. Polymorphism of the codon 129 of the prion protein (PrP) gene and neuropathology of cerebral ageing. *Acta Neuropathol Berl* 2003;106:71–4.
- Campbell TA, Palmer MS, Will RG, Gibb WR, Luthert PJ, Collinge J. A prion disease with a novel 96-base pair insertional mutation in the prion protein gene. *Neurology* 1996;46:761–6.
- Capellari S, Vital C, Parchi P, Petersen RB, Ferrer X, Jamier D, et al. Familial prion disease with a novel 144bp insertion in the prion protein gene in a Basque family. *Neurology* 1997;49:133–41.
- Collinge J, Sidle KC, Meads J, Ironside J, Hill AF. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of new variant CJD. *Nature* 1996;383(6602):685–90.
- Collinge J. Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. *Annu Rev Neurosci* 2001;24:519–50.
- Del Bo R, Comi GP, Giorda R, Crimi M, Locatelli F, Martinelli-Boneschi F, et al. The 129 codon polymorphism of the prion protein gene influences earlier cognitive performance in Down syndrome subjects. *J Neurol* 2003;250:688–92.
- Doh-ura K, Tateishi J, Sasaki H, Kitamoto T, Sakaki Y. Proleu change at position 102 of prion protein is the most common but not the sole mutation related to Gerstmann–Straussler syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;163:974–9.
- Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS. Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucl Acids Res* 1991;19:4008.
- Fink JK, Peacock ML, Warren Jr JT, Roses AD, Prusiner SB. Detecting prion protein gene mutations by denaturing gradient gel electrophoresis. *Hum Mutat* 1994;4:42–50.
- Gambetti P, Parchi P, Chen SG. Hereditary Creutzfeldt–Jakob disease and fatal familial insomnia. *Clin Lab Med* 2003;23:43–64.
- Goldfarb LG, Brown P, Little BW, Cervenakova L, Kenney K, Gibbs Jr CJ, et al. A new (two-repeat) octapeptide coding insert mutation in Creutzfeldt–Jakob disease. *Neurology* 1993;43:2392–4.
- Goldmann W, Hunter N, Smith G, Foster J, Hope J. PrP genotype and agent effects in scrapie: change in allelic interaction with different isolates of agent in sheep, a natural host of scrapie. *J Gen Virol* 1994;75(Pt 5):989–95.
- Hsiao K, Baker HF, Crow TJ, Poulter M, Owen F, Terwilliger JD, et al. Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann–Straussler syndrome. *Nature* 1989;338:342–5.
- Hunter N. PrP genetics in sheep and the applications for scrapie and BSE. *Trends Microbiol* 1997;5(8):331–4.
- Laplanche JL, Delasnerie-Lauprete N, Brandel JP, Dussaucy M, Chate-lain J, Launay JM. Two novel insertions in the prion protein gene in patients with late-onset dementia. *Hum Mol Genet* 1995;4:1109–11.
- Lee IY, Westaway D, Smit AF, Wang K, Seto J, Chen L, et al. Complete genomic sequence and analysis of the prion protein gene region from three mammalian species. *Genome Res* 1998;8:1022–37.
- Martins VR, Linden R, Prado MA, Walz R, Sakamoto AC, Izquierdo I, et al. Cellular prion protein: on the road for functions. *FEBS Lett* 2002;512:25–8.
- Mastrianni JA, Roos RP. The prion diseases. *Semin Neurol* 2000;20:337–52.
- Nitrini R, Rosenberg S, Passos-Bueno MR, da Silva LS, Iughetti P, Papadopoulos M, et al. Familial spongiform encephalopathy associated with a novel prion protein gene mutation. *Ann Neurol* 1997;42:138–46.
- Oefner PJ, Bonn GK, Huber CG, Nathakamkitkool S. Comparative study of capillary zone electrophoresis and high-performance liquid chromatography in the analysis of oligonucleotides and DNA. *J Chromatogr* 1992;625:331–40.
- Owen F, Poulter M, Lofthouse R, Collinge J, Crow TJ, Risby D, et al. Insertion in prion protein gene in familial Creutzfeldt–Jakob disease. *Lancet* 1989;1:51–2.
- Palmer MS, Collinge J. Mutations and polymorphisms in the prion protein gene. *Hum Mutat* 1993;2:168–73.
- Parker LT, Deng Q, Zakari H, Carlson C, Nickerson DA, Kwok PY. Peak height variations in automated sequencing of PCR products using Taq dye-terminator chemistry. *Biotechniques* 1995;19:116–21.
- Pocchiari M, Salvatore M, Cutruzzola F, Genuardi M, Allocatelli CT, Masullo C, et al. A new point mutation of the prion protein gene in Creutzfeldt–Jakob disease. *Ann Neurol* 1993;34:802–7.
- Prusiner SB. Prions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:13363–83.
- Ripoll L, Laplanche JL, Salzmann M, Jouvett A, Planques B, Dussaucy M, et al. A new point mutation in the prion protein gene at codon 210 in Creutzfeldt–Jakob disease. *Neurology* 1993;43:1934–8.
- Samaia HB, Mari JJ, Vallada HP, Moura RP, Simpson AJ, Brentani RR. A prion-linked psychiatric disorder. *Nature* 1997;390(6657):241.
- Tanaka Y, Minematsu K, Moriyasu H, Yamaguchi T, Yutani C, Kitamoto T, et al. A Japanese family with a variant of Gerstmann–Straussler–Scheinker disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997;62(5):454–7.
- Walz R, Castro RMRPS, Velasco TR, Alexandre Jr V, Lopes MH, Leite JP, et al. Surgical outcome in mesial temporal sclerosis correlates with prion protein gene variant. *Neurology* 2003;61:1204–9.
- Windl O, Giese A, Schulz-Schaeffer W, Zerr I, Skworc K, Arendt S, et al. Molecular genetics of human prion diseases in Germany. *Hum Genet* 1999;105:244–52.
- Xiao W, Oefner PJ. Denaturing high-performance liquid chromatography: a review. *Hum Mutat* 2001;17:439–74.
- Zimmermann K, Turecek PL, Schwarz HP. Genotyping of the prion protein gene at codon 129. *Acta Neuropathol Berl* 1999;97:355–8.

ANEXO A . 4**Ficha Epidemiológica – Estudo Gliomas e TMA**

Identificação ID

|_|_|_|

Registro Hospitalar RGH.....

|_|_|_|_|_|_|-|_|

Nome

Data de nascimento.....|_|_|-|_|_|-|_|_|_|_|

Cidade de nascimento.....

País.....

Sexo (1) masculino (2) feminino

Raça (1) branca (2) Amarela (3) Negra (4) Pardo (5) Mulato (9) ignorado..... |_|

(i) HISTÓRICO

Alguém de sua família já teve câncer (0) Não (1) Sim.....|_|

Grau de parentesco (0) Nenhum (1) Pai (2) Mãe (3) Irmão (4) Filho (5) Tio

(6) Primo (7) Cônjuge (8) Avô|_|_|_|_|_|

Localização do câncer.....

Seção 1.02 Já teve ou tem Epilepsia ou convulsão: (0) Não (1) Sim

Já teve ou tem Doença Mental . (0) Não (1) Sim

..... |_| Alguém de sua família apresenta:

Seção 1.03 Epilepsia ou convulsão (0) Não (1) Sim

Doença Mental(0) Não (1) Sim

Outros Dados do Histórico do paciente:

SINTOMAS:

Suspeita Diagnóstica: _____ CID.....|_|_|_|_|

Data da PRIMEIRA CONSULTA: |_|_|-|_|_|-|_|_|_|_|

Médico: _____

CONDUTA:

EXAMES DE IMAGEM:

TC:

RMN:

Outros:

ANATOMIA PATOLÓGICA:

Biopsia () Excisão cirúrgica () Autopsia() N°

|_|_|_|_|_|_|_|

Local do Tumor

Descrição:

Grau histológico|_|_|_|

Estadiamento Clínico.....|_|_|

TRATAMENTO REALIZADO:

(0) nenhum (1) Cirurgia (2) RT (3) QT (4) outros

.....|_|_|_|

Medicação:

Status.....|_|

(1) vivo sem doença (2) vivo com doença (3) morte por câncer (4) morte por outras causas

Data da última informação: |_|_|-|_|_|-|_|_|_|_|

Observações:

ANEXO A . 5

Alguns dados das amostras analisadas pelo TMA e resultados das imunoistoquímicas

Abreviaturas usadas nas tabelas

Posição = posição no TMA

AP = número do relatório anátomo-patológico

Reg hosp = número do registro hospitalar e prontuário do paciente

Local/tumor = localização do tumor e resumo do relatório anátomo- patológico

Outras observações = alguns dados adicionais do relatório anátomo- patológico, onde

nr = nada relatado

PrPc, STI-1, I-NOS e n-NOS = resultados da imunoistoquímicas realizadas, onde

++ = expressão forte, + = expressão moderada e - = expressão ausente.

Neuroblastomas

Posição	AP	reg hosp	local / tumor	outras observações	PrPc	ST-1	i-NOS	n-NOS
1	264016	896054	retro retal / ganglioneuroblastoma (neuroblastoma estroma rico bem diferenciado - Shimada)	nr	++	+	++	+
2	268484	893143	retro retal / ganglioneuroblastoma (neuroblastoma estroma rico bem diferenciado - Shimada)	nr	++	++	++	++
3	297223	92 02367-6	supra renal dir / ganglioneuroblastoma com metástase em linfonodo justo-lateral a cava inferior	nr	+	+	++	+
4	299374	92 02368-6	supra renal esq / ganglioneuroblastoma com metástase em 4/4 linfonodo da supra renal e 3/3 aórticos	nr	++	+	++	+
5	305108	9301316-7	adrenal dir / ganglioneuroma (neuroblastoma estroma rico bem diferenciado - Shimada)	nr	++	+	++	+
6	322478	9501198-5	retroperitônio / ganglioneuroma (neuroblastoma estroma rico bem diferenciado - Shimada) com metástase em linfonodo periaórtico	nr	++	++	++	+
7	329031	9504030-7	ósseo, região sacra/ neuroblastoma tipo nodular estroma rico, com infiltração em osso com áreas diferenciadas de ganglioneuroma	nr	++	+	++	+
8	331520	9505349-2	pulmão e pleura/ ganglioneuroblastoma com metástase em 4/7 linfonodos	nr	+	+	-	+
9	332512	9600670-6	retroperitônio / neuroblastoma intermisto estroma rico com infiltração de músculo esquelético	nr	+	+	-	+
10	335022	9601981-6	ósseo, região parietal/ neuroblastoma em diferenciação estroma pobre com baixo índice mitótico, grau II	nr	++	++	++	+
11	336189	9602658-8	adrenal / neuroblastoma estroma pobre, indiferenciado com alto índice mitótico e cariorexis, grau III com metástase em linfonodos	p30-32 = - ; vimentina = - ; enolase = + padrão difuso	+	-	-	+
12	339102	9602658-8	adrenal E / estroma pobre em diferenciação e alto índice mitótico grau II, com necrose e calcificações, metástases em 5/7 linfonodos	p30-32 = - ; vimentina = - ; enolase = inconclusivo; LCA = - ; AE1/AE2 = -	+	+	-	+
13	897 3674	970286	pélvico / estroma pobre, em diferenciação, grau I baixa contagem mitótica	pós quimioterapia	+	+	-	+
14	897 4684	963394	mediastino / neuroblastoma (estroma rico, variante intermisto - Shimada)	nr	++	++	++	+
15	898 1522	980745	mediastino / neuroblastoma (estroma rico, variante intermisto - Shimada) Grau I	nr	++	+	-	+
16	898 5708	980663	supra renal / neuroblastoma em diferenciação com nódulos de neuroblastos indiferenciados (nodular)	nr	++	++	-	+
17	898 8680	984873	adrenal dir / ganglioneuroma	nr	++	++	-	+
18	899 0519	982750	suprarenal / estroma rico, padrão misto Grau I, índice mitótico 0/10; invasão vascular e linfática metástase em 1/3 linfonodos	cromogranina A = +; enolase = +; sinaptofisina = +; neurofilamento = +	++	++	++	+
19	899 2754	999784	adrenal	nr	+	+	-	+
20	8999123	9902286	supra renal / metástase em fígado	nr	++	++	-	++
21	BA0 10090	2604	adrenal / necrose e metástase em fígado e 2/3 linfonodos do hilo renal	pós quimioterapia	+	+	-	+
22	BA1 10635	102383	adrenal D / necrose e focos de calcificação; ganglioneuroma no hilo renal	nr	++	+	-	+
23	BA1 10789	103703	necrose e calcificações margens comprometidas	pós quimioterapia	++	++	-	+
24	BA2 3063	5089 45-02	nodular intermisto	nr	++	++	++	+

Retinoblastomas

Posição	AP	reg hosp	local / tumor	PrPc	STI-1	i-NOS	n-NOS
1	B994355	9902180	moderadamente diferenciado, necrose e calcificações, invasão vitrea, coróide, esclera e nervo óptico	++	++	-	+
2	B994460	9902389	moderadamente diferenciado, invasão de coróide	+	++	-	+
3	B994565	9902353	bem diferenciado, invasão de coróide	++	++	-	+
4	B994778	9902492	pouco diferenciado, com necrose e calcificação, invasão de coróide	++	++	-	+
5	B994985	9902570	pouco diferenciado, necrose e calcificação, invasão de coróide e esclera	++	+	-	-
6	B995575	9902953	moderadamente diferenciado, necrose	++	++	-	+
7	B995576	9902926	pouco diferenciado, necrose e calcificações, invasão coróide	++	++	-	+
8	B995803	9903060	moderadamente diferenciado, necrose e calcificações	++	+	-	+
9	B997594	9903955	pouco diferenciado, necrose e calcificações	++	+	-	-
10	B998116	9904241	moderadamente diferenciado, necrose e calcificações	++	+	-	-
11	B998491	9904394	pouco diferenciado, necrose e calcificações	++	++	-	+
12	B998886	9904255	bem diferenciado, necrose e calcificações	++	++	-	+
13	B999906	9905050	bem diferenciado, necrose e calcificações	+	+	-	+
14	B999931	9701401	pouco diferenciado, necrose	++	+	-	+
15	BAO0437	9902150	bem diferenciado	++	+	-	+
16	BAO1203	289	moderadamente diferenciado, necrose e calcificações	++	++	-	+
17	BAO1484	436	pouco diferenciado, necrose e calcificações, invasão de coróide, esclera e nervo óptico	+	-	-	-
18	BAO1727	9902833	moderadamente diferenciado, necrose e calcificações, invasão de nervo óptico	++	++	-	+
19	BAO1728	9904692	bem diferenciado, necrose e calcificações, invasão coróide, esclera e nervo óptico	++	++	-	+
20	BAO2531	1152	moderadamente diferenciado, necrose e calcificações, invasão de coróide e nervo óptico	++	+	-	+
21	BAO2587	1063	pouco diferenciado, necrose e calcificações, invasão maciça de coróide, esclera e nervo óptico	++	+	-	+
22	BAO2742	1091	moderadamente diferenciado, necrose e calcificações, invasão do nervo óptico	+	-	-	-
23	BAO3343	1627	moderadamente diferenciado, necrose e calcificações	++	++	-	+
24	BAO3347	1693	bem diferenciado, necrose e calcificações	++	++	-	+
25	BAO3858	1911	moderadamente diferenciado, necrose e calcificações	-	-	-	-

Tumor Carcinóide

Posição	AP	reg hosp	local	outras observações	PrPc	STI-1	i-NOS	n-NOS
1	158 607	741945	pulmão - bronquio principal	nr	++	++	++	++
2	240-286	874 249	pulmão - lobo inferior E	nr	-	+	+	-
3		888 230	pulmão	nr	++	++	+	++
4	266-299	908047	pulmão	EMA +; Enolase -; Prot S100 -	++	++	+	++
5	266 543	908065	pulmão - lobo inferior E com metástase em linfonodo hilar	nr	+	++	+	++
6	280 146	90 1405	pulmão direito	cromogranina +; enolase inconclusiva	++	+	-	++
7	286 441	91 03465-5	pulmão E - lobo inferior	nr	++	++	+	++
8	293 137	92 02289-8	intestino delgado com metástase em 4/4 linfonodos	nr	-	+	+	-
9	297-107	92 03899-9	pulmão- lobo medio D	nr	+	-	+	++
10	302884	9302065-1	bronquio	nr	++	++	-	++
11	316498	9403695-0	tórax, padrão trabecular	nr	++	++	++	++
12	316514	9403695	tórax	nr	++	++	+	++
13	318941	9405208-5	pulmão	cromogranina +; enolase +; vimentina +; citoceratina +	++	++	-	++
14	321485	9501126-9	pulmão		-	-	-	-
15	322516	9501009-2	figado	cromogranina+; Enolase +	-	+	-	-
16	329775	8002823-3	pulmão, padrão glandular e trabecular pT2 pN0	nr	+	+	-	++
17	333312	8200080-8	pulmão E	panciticeratina AE1/AE3 + paranuclear; Enolase +; Sinaptofisina +; Cromogranina +	++	+	-	++
18	B97 2400	912822	pulmão E	panciticeratina AE1/AE3 -; Enolase +; vimentina -; Cromogranina inconclusivo	++	+	+	++
19	B974824	972887	gástrico, pouco diferenciado com extensos focos de diferenciação hepatóide	panciticeratina AE1/AE3 +; Enolase +; Sinaptofisina +; Cromogranina +; S100 +; Vimentina -; HMB45 -; actina alfa -; BHCg +; fetoproteína +	+	++	+	-
20	B977608	972819	pulmão, invasão perineural, vascular e linfática, baixa atividade proliferativa	nr	+	+	-	++
21	B978448	974706	estômago, pT4 pN0 pM1, índice mitótico = 53/10, necrose, invasão perineural e angiolinfática, metástase em figado	citoceratina +; CEA -; cromogranina A; enolase +; S100 -; somatostatina -; vimentina -	+	-	-	-
22	B98 2928	980399	figado metastático	nr	++	++	+	++
23	B98 03114	98 1618	retroperitônio (tumor atípico)	pan citoqueratina -; vimentina -; prot S -; insulina -; somatostatina -; cromogranina +; enolase +; sinaptofisina inconclusiva	+	+	-	++
24	B98 07000	983419	pulmao-lobo superior	nr	+	-	-	-
25	B98 09251	98 80207-0	abdomen - linfonodo cervical e supra claviclar com metastase	nr	++	++	+	++

Carcinoma ductal invasivo de mama

Posição	AP	reg hosp	tumor	outras observações	PrPc	ST11	i-NOS	n-NOS
1	B98-00045	940102	Grau III, grau nuclear=3, índice mitótico=3, necrose e calcificação	1D5 = pos 85%; R de progest = neg. p53= neg. c-erbB2 =pos; catepsina D= positivo	++	-	++	++
2	B98-00060	975037	Grau II, grau nuclear = 2, índice mitótico = 12/10, necrose focal	1D5 = Neg R de progest = neg p53 = neg c erb B2 = positivo	++	++	+	++
3	B98-0314	721035	Grau III, pT4,pN1,pMx, grau nuclear=3, índice mitótico=11/10	nr	++	+	++	++
4	B98-0377	974710	Grau III pT4,pN0,pMx, grau nuclear=2, índice mitótico=8/10	nr	++	++	+	++
5	B98-00585	975055	Grau III, pT4,pN1,pMx, grau nuclear=3, índice mitótico=8/10	nr	++	++	+	++
6	B98-00586	980311	Grau II, pT4,pN1,pMx, grau nuclear=2, índice mitótico=1/10	1D5 = Neg R de progest = neg p53 = neg c erb B2 = neg	++	-	+	++
7	B98-00672	912973	Grau II, grau nuclear=2, índice mitótico=4/10	1D5 = Neg R de progest = neg	++	++	++	++
8	B98-0718	980123	Grau II, pT1,pN1,pMx, grau nuclear=2, índice mitótico=5/10	1D5 = Neg R de progest = neg	++	-	++	++
9	B98-0722	980024	Grau II, pT2,pN1,pMx, grau nuclear=2, índice mitótico=7/10	nr	++	++	++	++
10	B98-00748	980221	Grau II, pT4a, grau nuclear=2, índice mitótico=4/10	1D5 = pos 70%; R de progest = neg; p53 = neg c erb B2 = positivo padrao membrana catepsina D = pos	++	-	+	++
11	B98-00853	973316	Grau II, bilateral, índice mitótico=3/10, esq e 8/10 dir, metástase 7/8 linfonodos	1D5 = Neg R de progest = neg p53 = neg c erb B2 = positivo	++	+	++	++
12	B98-00946	980409	Grau I, pT2,pN1,pMx, grau nuclear=1, índice mitótico=31/10	1D5 = Neg R de progest = neg p53 = neg c erb B2 = positivo padrao membrana catepsina D = positivo	++	+	++	++
13	B98-01053	973459	Grau II, pT2,pN0,pMx, grau nuclear=2, índice mitótico=6/10	1D5 = pos 70%; R de progest = pos 40% p53 = neg c erb B2 = positivo padrao citoplasmatico catepsina D = positivo	++	-	++	++
14	B98-01209	980676	Grau II, pT2,pN0,pMx, grau nuclear=2, índice mitótico=8/10	1D5 = negativo R de progest = neg p53 = neg c erb B2 = pos padrao membrana e citoplasmatico catepsina D = positivo	++	-	+	++
15	B98-01255	921283	Grau II, grau nuclear=2, índice mitótico=12/10	1D5 = Neg R de progest = neg p53 = neg c erb B2 = positivo padrao membrana e citoplasmatico catepsina D = positivo	++	++	++	++
16	B98-01280	974880	Grau I, pT2,pN1,pMx, grau nuclear=2, índice mitótico=5/10, 4/31 linfonodos comprometidos	1D5 = pos 50% R de progest = pos 30% p53 = neg c erb B2 = neg catepsina D = neg	++	++	++	++
17	B98 1553	980739	Grau II, pT1,pN0,pM1, grau nuclear=2, índice mitótico=4/10	1D5 = pos 95%; R de progest = neg, p53 = neg c erb B2 = positivo padrao membrana catepsina D = positivo	++	++	++	++
18	B98-01636	980559	Grau II, pT2,pN1,pMx, grau nuclear= 2, índice mitótico= 2/10, 9/25 linfonodos comprometidos	1D5 = pos 40%; R de progest = neg p53 = neg c erb B2 = positivo padrao membrana catepsina D= Positivo	++	+	++	++
19	B98-1693	980851	Grau III, pT2,pN1b,pMx, grau nuclear=3, índice mitótico=17/10, 21/31 linfonodos comprometidos	1D5 =neg; R de progest = neg p53 = pos 90% c erb B2 = positivo padrao membrana catepsina D= positivo	++	+	++	++
20	B981767	923477	Grau II, grau nuclear=2, índice mitótico=3/10	1D5 = pos 100% R de progest = pos 66%	++	-	++	++
21	B98-01768	932812	Grau II, grau nuclear=2, índice mitótico=3/10, metástase em 1/22 linfonodos	1D5 = pos 38% R de progest=pos48% p53 = neg c erb B2 = neg catepsina D= neg	++	++	-	++
22	B98-1947	980642	Grau II, grau nuclear=2, índice mitótico=3/10, metástase em 3/39 linfonodos	1D5 = pos 87% R de progest = neg; p53 = neg c erb B2 = positivo catepsina D= neg	++	++	++	++
23	B98-2045	980664	Grau II, pT2,pN1,pMx, grau nuclear=3, índice mitótico=13/10, metástase em 3/14 linfonodos	1D5 = Neg; R de progest = neg, p53 = pos 80% c erb B2 = positivo padrao membrana catepsina D= positivo	++	++	++	++
24	B982076	985444	Grau II, pT4,pN1,pMx grau nuclear=2, índice mitótico=13/10, necrose	1D5 = pos 5% R de progest = neg p53 = neg c erb B2 = positivo catepsina D= positivo	++	++	++	++
25	B010780	100164	Grau III, grau nuclear = 3, índice mitótico = 15/10, metástase em 2/27 linfonodos	nr	++	++	++	++

Adenocarcinoma de pâncreas

Posição	AP	reg hosp	local /tumor	PrPc	STI-1	i-NOS	n-NOS
1	174183	814047	bem diferenciado, infiltrando duodeno	+	++	++	++
2	203438	848809	moderadamente diferenciado, de cabeça de pâncreas, metástase em 1/8 linfonodos	+	+	++	++
3	211060	858581	bem diferenciado	+	+	++	++
4	223749	862252	moderadamente diferenciado, com infiltração de serosa de duodeno	+	++	++	++
5	234130	870928	mucosecretor, moderadamente diferenciado, com infiltração da serosa, metástase em 1/4 linfonodos duodenais	++	++	+	++
6	238395	873802	de ductos pancreáticos, bem diferenciado, metástase em 1/3 linfonodos peripancreáticos	-	-	+	++
7	238590	873070	bem diferenciado, de cabeça de pâncreas com infiltração no duodeno e colédoco, metástase em 2/3 linfonodos	+	+	++	++
8	259086	892 859	moderadamente diferenciado, de cabeça de pâncreas	++	+	+	++
9	262671	869356	pouco diferenciado	+	+	++	++
10	271027	907976	pouco diferenciado	+	+	++	++
11	271459	902868	papilífero, moderadamente diferenciado, com granulomas do tipo corpo estranho a cristais de colesterol	++	++	++	++
12	282803	9180326	moderadamente diferenciado com metaplasia intestinal	++	+	++	++
13	315472	9403664-0	ductal, moderadamente diferenciado, invasão vascular e linfática	-	+	+	++
14	318940	9405292-1	moderadamente diferenciado com extensas áreas de necrose e invasão perineural	+	+	+	++
15	B97 0113	9605624	bem diferenciado, padrão tubular, pT3 pN0 pMx	++	+	++	++
16	B98 0215	980018	grau III, com áreas mucosecretoras e áreas papilíferas	+	+	+	++
17	B98 2465	981205	de ductos pancreáticos, moderadamente diferenciado, infiltrando tecido adiposo adjacente, metástase em 1/2 linfonodos	+	+	+	++
18	B98 9239	985282	ductal, pouco diferenciado com extensão nas camadas musculares do intestino delgado, metástase em 2/8 linfonodos	+	+	+	++
19	B99 6545	9501968	ductal tipo mucinoso grau I, índice mitótico 0/10, invasão perineural	+	+	+	++
20	BA0 1435	754	ductal, moderadamente diferenciado, invasão perineural	++	+	+	++
21	BA0 7851	9600712	moderadamente diferenciado, infiltrando tecido peripancreático e parede duodenal, 6/14 linfonodos comprometidos	+	+	+	++
22	BA0 7995	2852	ductal, grau II, infiltrando tecido peripancreático e parede duodenal, infiltração perineural, 4/5 linfonodos comprometidos	++	++	+	++
23	BA0 9073	4484	tubular, moderadamente diferenciado, de ducto periampolar, índice mitótico 6/10	+	++	+	++
24	BA1 2570	101187	ductal, pouco diferenciado, invasão perineural	+	+	+	++

Adenocarcinoma de próstata

Posição	AP	reg hosp	outras observações	PrPc	STI-1	i-NOS	n-NOS
1	B9809688	980313	Gleason 7 (3+4), Infiltração de cápsula, invasão perineural, extensão para vesícula seminal	++	++	-	++
2	B981804	980560	acinar, Gleason 7 (3+4); pT2, pN0, pMx; margens comprometidas, invasão perineural, neoplasia intraepitelial em tecido adjacente	++	++	-	++
3	B982012	896375	Gleason 7 (3+4); pT2, pN0, pMx; invasão perineural; ambos os lobos comprometidos	++	++	-	++
4	B990142	984753	bem diferenciado, Gleason 5(3+2), invasão perineural, vascular e linfática, vesículas seminais D e E comprometidas	++	++	-	++
5	B990517	990177	acinar, com focos de células claras, Gleason 7 (3+4), invasão perineural e capsular	++	++	-	++
6	B990712	984407	Gleason 6 (3+3)	++	++	-	++
7	B991531	9900417	acinar, Gleason 5 (3+2), invasão perineural	++	++	-	++
8	B991943	9900663	acinar, Gleason 6(3+3), invasão perineural	++	++	-	++
9	B992125	9805597	acinar, Gleason 8(4+4), invasão perineural e vascular, infiltração de colo vesical	++	++	-	++
10	B992151	9900558	acinar, Gleason 7 (3+4), invasão perineural, vesículas seminais comprometidas	++	++	-	++
11	B993511	9900380	acinar, Gleason 7 (3+4)	++	++	-	++
12	B994316	9304753	acinar usual, Gleason 7 (3+4), invasão perineural	++	++	-	++
13	B994931	9601426	acinar, Gleason 7 (3+4)	++	++	-	++
14	B995120	9902090	acinar usual, Gleason 7 (3+4), invasão perineural e intraneural	++	++	-	++
15	B995258	9901614	acinar usual, Gleason 9(5+4), invasão perineural e angiolinfática	++	++	-	++
16	BAO3863	9800616	acinar usual, Gleason 6(3+3), invasão perineural	++	++	-	++
17	BAO3874	1439	acinar usual, Gleason 6(3+3), invasão perineural	++	++	-	++
18	BAO7850	4000	acinar usual, Gleason 5(3+2), invasão perineural	++	++	-	++
19	BA10834	100103	acinar usual, Gleason 5(3+2), invasão perineural	++	++	-	++
20	BA11453	9901018	acinar usual, Gleason 7(3+4), invasão perineural e angiolinfática	++	++	+	++
21	BA11614	5367	acinar usual, Gleason 7(3+4), invasão perineural	++	++	-	++
22	BA11629	9403350	acinar usual, Gleason 9(5+4)	++	++	-	++
23	BA211292	02-4947-3	acinar usual, Gleason 6(3+3)	++	++	-	++
24	BA211696	02-05149-4	acinar usual, Gleason 7(3+4), invasão perineural e capsular	++	++	-	++
25	BA211699	8409013-8	acinar usual, Gleason 6(3+3), invasão perineural e angiolinfática	++	++	-	++

Melanoma

Posição	AP	reg hosp	tumor/local	outras observações	PrPc	STI-1	i-NOS	n-NOS
1	211359	813268	linfonodo inguino-crural D, metástase 1/10 linfonodos	nr	++	++	++	+
2	299991	9300206-8	linfonodo calcâneo D, metástase em 3/14 linfonodos inguinais e 1/3 fossa ilíaca	nr	+	++	-	+
3	300591	9202584-6	linfonodo músculo peitoral maior, metástase em 7/34 linfonodos	nr	+	+	-	+
4	300826	9300240-8	linfonodo axilar D	nr	-	+	-	-
5	304537	9301755-3	linfonodo inguinal, metástase em 2/23 linfonodos	nr	-	+	-	-
6	305072	9201630-8	linfonodo inguinal	nr	+	+	++	-
7	313020	9300663-2	linfonodo escapula E	nr	+	++	++	+
8	318384	9405004-0	linfonodo peitoral, metástase em 29/30 linfonodos	nr	+	++	++	+
9	318815	9405205-0	linfonodo axilar E metástase em 4/19	nr	+	+	-	+
10	332474	9600465-7	linfonodo inguino-iliaca	nr	+	+	-	+
11	333969	94 02503-7	linfonodo axila D	nr	+	++	++	+
12	335385	9602187-0	linfonodo região pélvica, metástase em 1/24 linfonodos	nr	++	++	-	+
13	336813	9504139-7	linfonodo axila D, metástase em 8/48 linfonodos	nr	+	++	-	+
14	B980723	974667	globo ocular	nr	-	+	++	-
15	B981152	974046	linfonodo peito e axila E, metástase em 3/3 linfonodos e infiltração plexo branquial	nr	-	-	-	-
16	B981264	980583	linfonodo axilar E, metástase em 8/26 linfonodos	nr	-	+	++	+
17	B982041	942820	pulmão, metástase de melanoma em 4/10 nódulos	nr	+	+	-	+
18	B995171	9902321	linfonodo seio etmoidal E	S100=+, vimentina=+, HBM45=+, enolase=+, cromogranina=, neurofilamento=, desmina=, citoqueratina=, LCA=, actina=, CD34-	-	+	-	-
19	B995241	9802309	linfonodo epigástrico sacrais e peritoneais	nr	+	+	-	-
20	B998115	9704663	globo ocular e coróide, padrão celular fusiforme tipo A, com invasão da esclera	nr	+	++	++	+
21	BA10396	6702490	pele, nível clark IV	Breslow 3,05mm, índice mitótico 14/10 CGA	+	++	++	+
22	BA10690	100257	linfonodos de partes moles pé E, metástase em 6/14 linfonodos	nr	++	++	-	+
23	BA10701	9900769	linfonodo de região cervical	nr	+	++	++	+
24	BA10739	TC00450-1	região supra orbitária, nível Clark III	Breslow 3,1mm, índice mitótico 22/10 CGA	-	-	-	-
25	BA11545	100351	linfonodo de região escapular	nr	-	+	-	-

Carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço

Posição	AP	reg hosp	local/ tumor	PrPc	STI-1	i-NOS	n-NOS
1	B980321	910806	pélate / ca epidermóide grau II com invasão perineural	++	++	++	+
2	B980375	980196	língua / ca epidermóide grau II ulcerado	++	++	++	++
3	B980503	974348	laringe região supra glótica / ca epidermóide, bem diferenciado, padrão de crescimento infiltrativo, com invasão perineural	+	++	++	+
4	B980569	980288	língua / ca epidermóide grau II, com infiltrado linfocitário peritumoral intenso	+	+	-	+
5	B980582	973836	língua / ca epidermóide grau I, ulcerado infiltrando tecido músculo esquelético, glândula salivar maior e glândula submandibular E com invasão perineural	+	+	+	+
6	B980614	974739	laringe / ca epidermóide ulcerado grau II, infiltrando tecido muscular esquelético	++	++	++	+
7	B980663	951191	laringe / ca epidermóide ulcerado grau II com invasão perineural	+	+	++	+
8	B980698	980135	língua / ca epidermóide grau II ulcerado infiltrando tecido músculo esquelético com invasão perineural	+	+	-	+
9	B980777	980031	laringe, supraglote e glote / ca epidermóide grau II ulcerado, infiltrando glândulas salivares maiores e tecido cartilaginoso	+	+	-	+
10	B98 0819	974732	base da língua / ca epidermóide grau III com invasão perineural e linfática	++	++	++	+
11	B98 0905	973471	faringe / ca de células escamosas basiloide, infiltrando tecido muscular esquelético, grau II, invasão e transposição capsular	+	+	-	+
12	B980949	973717	língua / ca epidermóide grau I, bem diferenciado, infiltrante, invasão perineural	+	++	-	+
13	B981116	974370	pélate / ca epidermóide grau I ulcerada com invasão perineural	++	++	++	++
14	B981201	962318	língua / ca epidermóide grau II ulcerado infiltrando tecido músculo esquelético e tecido ósseo	+	+	++	+
15	B981225	980002	boca / ca epidermóide grau I ulcerado infiltrando tecido músculo esquelético e ósseo com invasão perineural	+	+	-	+
16	B981247	973621	língua / ca epidermóide grau II com invasão até músculo estriado	+	++	-	+
17	B98 1340	974773	faringe / ca epidermóide moderadamente diferenciado, grau II infiltrando tecido muscular e adiposo	+	++	-	+
18	B98 1365	980182	órbita / ca epidermóide grau I ulcerado infiltrando conjuntiva e tecido muscular esquelético com invasão perineural	+	++	-	+
19	B98 1458	961660	laringe, supra glote, glote e infra glote / ca epidermóide grau II ulcerado infiltrando tecido muscular esquelético e periocondrio	+	++	-	+
20	B98 1562	980378	máxila E / ca epidermóide grau II infiltrando fossa nasal, invasão linfática e perineural	-	-	-	+
21	B98 1605	980856	laringe e supraglote / ca epidermóide grau I ulcerado, infiltrando tecido muscular esquelético e cartilagem com invasão perineural	-	+	++	+
22	B98 1738	980716	assoalho da boca / ca epidermóide grau II ulcerado infiltrando músculo esquelético, invasão perineural metástase em 1/5 linfonodos	+	++	++	+
23	B98 1872	980435	hipofaringe, seio piriforme E, supra glote, glote, valécua e base da língua/ ca epidermóide grau II ulcerado infiltrando tecido cartilaginoso e muscular com invasão perineural e linfática	+	++	++	+
24	B98 2014	980989	assoalho da boca / ca epidermóide grau II ulcerado, invasão perineural	+	++	-	+
25	B98 2151	934491	laringe, seio piriforme D, valécua, base da língua, supra glótica, glótica e infra glótica, com profundidade até músculo estriado/ ca epidermóide grau II, com colisão com fibro histiocitoma maligno	+	+	-	+