

GUILHERME RIBAS TAQUES

**EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA PARQUINA, p53 E p53R2 EM
CARCINOMAS DE PLEXO COROIDE COM E SEM A MUTAÇÃO R337H NO
GENE *TP53***

**DOUTORADO
EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
PUCPR**

**CURITIBA
2019**

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

TESE DE DOUTORADO

**EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA PARQUINA, p53 e p53R2 EM
CARCINOMAS DE PLEXO COROIDE COM E SEM A MUTAÇÃO R337H NO
GENE *TP53***

DOUTORANDO: GUILHERME RIBAS TAQUES

ORIENTADOR: LUCIA DE NORONHA

A apresentação desta tese é um requisito do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná para obtenção do título de doutor em Ciências da Saúde.

CURITIBA
2019

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central
Edilene de Oliveira dos Santos CRB 9 / 1636

T175e
2019 Taques, Guilherme Ribas
Expressão imunoistoquímica da parquina, p53 e p53R2 em carcinomas de plexo coroide com e sem a mutação R337H no gene TP53 / Guilherme Ribas Taques ; orientadora, Lúcia de Noronha. -- 2019
57 f. : il. ; 30 cm

Tese (doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná,
Curitiba, 2019
Bibliografia: f. 49-57

1. Tumores. 2. Sistema nervoso – Doenças. 3. Imunoistoquímica. 4. Plexo corióideo. I. Noronha, Lucia de. I. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDD 20. ed. – 616.994



ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE EXAME DE TESE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL DE DOUTORADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ.

Aos 14 dias do mês de agosto de 2019 às 13:30, realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese “Expressão Imunoistoquímica da parkina, p53 e p53R2 em Carcinomas de Plexo Coroide com e sem a Mutação R337H no gene TP53” apresentado por **Guilherme Ribas Taques** para obtenção do título de Doutor; Área de concentração: Medicina e áreas afins.

A banca examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Profa. Dra. Lucia de Noronha – Presidente - (PUCPR)	
Prof. Dr. Sergio Ossumu Ioshii – (PUCPR)	
Prof. Dra. Marina Luise Viola de Azevedo - (PUCPR)	
Prof. Dr. Cleber Machado de Souza	
Profa. Dra. Ana Paula Percicote (UFPR)	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Profa. Dra. Lucia de Noronha

Conceito APROVADO

Prof. Dr. Sergio Ossumu Ioshii

Conceito APROVADO

Prof. Dra. Marina Luise Viola de Azevedo

Conceito APROVADO

Prof. Dr. Cleber Machado de Souza

Conceito APROVADO

Profa. Dra. Ana Paula Percicote

Conceito APROVADO

Parecer Final: APROVADO

Observações da Banca Examinadora:

Profa. Dra. Lucia de Noronha
Presidente da Banca Examinadora

Prof.ª Dra. Cristina Pellegrino Baena
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Prof.ª Dra. Cristina Pellegrino Baena
Coordenadora do PPGCS-PUCPR

AGRADECIMENTOS

Primeiro de tudo, gostaria de agradecer a Deus por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

Minha família, que é o alicerce da minha existência. Minha esposa Laryssa de Lima Ribas Taques, que está sempre ao meu lado me apoiando e motivando. Ao meu filho João Pedro de Lima Ribas Taques que serve de motivação todos os dias. Meus pais, que primaram pela minha educação. Obrigado Sr. Jorge Luiz Ribas Taques e Sra. Salete Regina Pacheco Barbosa Taques. Meu irmão Paulo Ribas Taques que me deu apoio nos momentos difíceis e conturbados.

Tenho que agradecer a minha orientadora Dra. Lucia de Noronha, que tem me ajudado a trilhar a minha formação e abriu a porta da Patologia para mim em 2004 quando me deu a oportunidade de estagiar no Hospital de Clínicas. Durante a residência médica foi uma excelente preceptora, motivando a atividade de pesquisa e docência. Durante o doutorado me motivou a produzir novos conhecimentos, sempre me induzindo a pensar criticamente. Obrigado.

Estendo meus agradecimentos aos funcionários do Laboratório de Anatomia Patológica na Pesquisa Clínica e Experimental da PUC-PR, em especial: Ana Paula, Marina e Seigo. Obrigado pela prontidão e ensinamentos.

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq – Brasil. Agradeço esta instituição pelo apoio financeiro e, principalmente pelo interesse nesse estudo.

Por último, agradeço a Pontifícia Universidade Católica do Paraná- PUC-PR que com sua excelente estrutura, equipe e professores dedicados me preparou para o mercado de trabalho durante a minha graduação. Agora, durante o doutorado me fez amadurecer como profissional, pesquisador e professor. Obrigado a todos profissionais da PUC-PR, em especial aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

SUMÁRIO

1	RESUMO.....	5
2	INTRODUÇÃO	6
3	JUSTIFICATIVA.....	13
4	OBJETIVO GERAL.....	13
	4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
5	ARTIGOS.....	14
6	CONCLUSÃO	53
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA TESE.....	54

RESUMO

Os Tumores de plexo coroide (TPC) são neoplasias raras do sistema nervoso central afetando principalmente crianças abaixo dos 3 anos de idade, com uma alta mortalidade. No sul do Brasil há uma incidência elevada de carcinomas de plexo coroide (CPC), que foi associada a mutação R337H no gene *TP53*. A parkina que tem sido descrita em neoplasias como mama, ovário e colón e é uma proteína codificada no gene *PRKN*, que no câncer pode estar mutado ou deletado. Esta proteína está envolvida em muitos processos celulares agindo como supressor tumoral. Além disto, alterações no *TP53* podem contribuir para a desregulação da expressão do *PRKN*, resultando na sua baixa transcrição. O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão imunohistoquímica de parkina, p53R2, p53, Ciclina D1 e Ciclina E1, em casos de tumores de plexo coroide (TPC) com e sem a mutação R337H no gene *TP53*. Foram selecionados pacientes com TPC operados entre 1992 e 2010 em um Hospital terciário de referência no sul do Brasil. A imunopositividade para p53 foi mais frequente em pacientes com CPC do que em pacientes com papiloma de plexo coroide (PPC) ($p=0,006$). Todos os casos de PPC testados foram positivos para p53R2, já em CPC a expressão desta proteína foi variável. Todos os pacientes com diagnóstico de CPC sem expressão de p53R2 estão mortos ($p=0,041$). Observamos neste estudo uma tendência estatística ($p = 0,097$) quando comparamos os pacientes com e sem mutação R337H no gene *TP53*, sendo que pacientes com esta mutação parecem ter mais parkina. Encontramos uma correlação positiva entre a parkina e a p53R2 (+43%; $p = 0,019$). Este estudo aponta para uma possível ação protetora da parkina em conjunto com a p53R2 na tentativa de manutenção do controle do ciclo celular nos CPC, especialmente em indivíduos com *TP53* mutado, tendo como evidencia a correlação positiva entre estas duas proteínas e a relação entre a ausência de expressão da p53R2 e a progressão para o óbito em pacientes com CPC.

1 INTRODUÇÃO

Tumores de plexo coroide (TPC) são tumores primários do sistema nervoso central raros, derivados do plexo coroide, com localização intraventricular. Correspondem de 0,4 a 0,6 % de todos os tumores intracranianos, afetando predominantemente crianças jovens, geralmente abaixo dos três anos de idade.^{18, 19, 23, 42}

Os TPC são classificados baseados em critérios histológicos como Papilomas de Plexo Coroide (PPC, grau I da OMS), Carcinomas de Plexo Coroide (CPC, grau III da OMS) e uma forma intermediária denominada como Papilomas de Plexo Coroide Atípicos (PPCa, grau II da OMS).^{18, 19, 23, 42} O PPC apresenta tecido fibroconjuntivo delicado franjado, revestido por epitélio uniforme cubico a colunar, com núcleo redondo ou oval basal e índice mitótico baixo (<2 mitoses/10CGA) ou ausente. O PPCa é definido como papiloma de plexo coroide com índice mitótico aumentado (≥ 2 mitoses/10CGA), hiper celularidade, pleomorfismo nuclear e áreas de necrose. O CPC tem sinais francos de malignidade, como mitoses frequentes (>5 mitoses/10CGA), aumento da celularidade, pleomorfismo nuclear, perda das projeções papilíferas, com ninhos celulares pouco estruturado, áreas de necrose e invasão do tecido cerebral.²⁹

O diagnóstico entre carcinoma e papiloma torna-se muitas vezes difícil e isso leva o patologista a optar por essa classificação intermediária de papiloma atípico. A possibilidade de usar a biologia molecular para ajudar nesta dificuldade, poderia suscitar diagnósticos mais precisos, e conseqüentemente, estabelecer melhorias no tratamento e prognóstico desses pacientes.^{4, 46}

O CPC corresponde à forma maligna desses tumores, ocorrendo na razão de 1:5 em relação aos papilomas.^{3,4,46} Bleggi e colaboradores (2004) demonstraram uma incidência aumentada dos casos de CPC no sul do Brasil, na cidade de Curitiba, correspondendo a 66,3% (24/38) dos casos de tumores de plexo coroide.^{4,15}

O prognóstico do TPC depende diretamente do local do tumor, do tipo histológico, da extensão da ressecção cirúrgica e do estágio da doença.¹⁷ Os papilomas de plexo coroide têm bom prognóstico quando a ressecção é

completa, porém nos carcinomas de plexo coroide o prognóstico ainda é pobre uma vez que a ressecção completa destes tumores é muito difícil em razão da localização, principalmente em crianças. Neste grupo, a radioterapia pré ou pós-operatória está indicada, porém pode induzir a deterioração intelectual e endocrinopatias.^{4,15}

O mecanismo mais comum associado a formação do CPC é a perda da expressão do gene supressor tumoral *TP53*, mais frequentemente encontrado em famílias com síndrome de Li-Fraumeni (FSL).¹⁰ A FSL é o protótipo da síndrome de predisposição ao câncer. Indivíduos com FSL herdam a mutação no gene supressor tumoral *TP53*, que resulta no desenvolvimento precoce de câncer. Estes tumores incluem sarcomas ósseos e de partes moles, carcinomas adrenocorticais e tumores cerebrais.^{9,10}

A etiologia dos TPC é desconhecida, porém há trabalhos demonstrando a presença de sequências de DNA do vírus símio 40 (SV40) em papilomas e carcinomas de plexo coroide. A mutação R337H no gene *TP53* foi observada em 50% dos carcinomas de plexo coroide e em 5% dos papilomas de plexo coroide.^{36, 41}

A sobrevida para pacientes com carcinomas de plexo coroide é baixa. A taxa de sobrevida em cinco anos foi de 98,7% para os PPC e de 58,5% para os CPC ($p < 0,001$).²⁴ Em 2012, Crocetti e colaboradores reportaram a taxa 42,6% de sobrevida de cinco anos para os CPC. Este estudo contribuiu significativamente para entender a sobrevida destes pacientes, entretanto não avaliou a associação da taxa de sobrevida com a mutação no gene *TP53*.⁸ Entre os pacientes com carcinoma CPC, a ressecção total está associada a menor mortalidade ($p = 0,007$), com uma sobrevida global em cinco anos de 70,9%, contra 35,9% após ressecção subtotal e 30% quando a cirurgia não foi realizada.²⁴ O tratamento radioterápico não conferiu benefício de sobrevida nos pacientes com CPC. Lam e colaboradores (2014), também não encontraram características demográficas (idade, sexo, raça) associadas significativamente com a mortalidade.²⁴ Relatos têm analisado a mutação no gene *TP53* como fator prognóstico, mostrando que pacientes que não possuem mutação R337H no gene *TP53* e sobrevivem ao pós-operatório têm uma sobrevida longa, mesmo sem receber tratamento radioterápico.⁴⁵ Notavelmente, genes como *TP53* são

frequentemente alvo de mutações nas células neoplásicas, podendo o *PRKN* ser como estes genes.^{13,30,47}

O gene *TP53* codifica uma fosfoproteína nuclear de 53 kD conhecida por p53. Essa proteína atua como um fator de transcrição supressor do crescimento celular podendo induzir a parada do ciclo celular bem como induzir o processo de apoptose. Este fator está inativado por mutações somáticas em muitas formas de câncer. Por outro lado, as mutações mais frequentes da linha germinativa no *TP53* são substituições “missense” que se aglomeram em regiões altamente conservadas do domínio proteico de ligação ao DNA (códon: 125-300).^{28,40,47} No Brasil, uma mutação em particular no gene *TP53* tem sido relatada nos pacientes com TPC. Esta mutação ocorre no exon 10 e é conhecida por R337H, sendo que é uma troca do nucleotídeo G para nucleotídeo A o que traz uma mudança no códon 337 de CGC para CAC. O resíduo de arginina no códon 337 é parte de uma importante alfa-hélice envolvida na oligomerização da p53.⁴⁰ A mutação, por ser uma substituição da arginina por histidina, não favorece o processo final de oligomerização e assim essa mutação compromete a função da p53.²⁸ Essa mutação foi inicialmente identificada em crianças brasileiras com carcinoma adrenocortical.^{1,11,38} Custodio e colaboradores (2011) observaram a presença da mutação R337H no gene *TP53* em 63% dos CPC analisados no Sul do Brasil.^{10,30}

Outra proteína importante no processo de carcinogênese, e que está relacionada diretamente com a proteína p53, é a p53R2. A p53R2 é uma proteína homóloga a um dos componentes do sistema ribonucleotídeo-redutase (RR) que provê nucleotídeos para o reparo do DNA no ciclo celular. A ribonucleotídeo-redutase humana é um tetrâmero composto por dois homodímeros hRRM1 (R1) e hRRM2 (R2).^{6,12,31} R1 e R2 são expressos exclusivamente durante a fase S do ciclo celular. A unidade R1 possui meia-vida longa e o seu nível é constante ao longo do ciclo celular.⁵⁰ Já a unidade R2 é rapidamente degradada na fase G1 e sua ausência inativaria o complexo RR.³⁷ A partir da ligação de p53 com o gene *p53R2*, codifica-se a proteína p53R2, um peptídeo com 351 aminoácidos, que mostra notável semelhança com a subunidade R2 do complexo RR, mantendo-a ativada e promovendo reparo do DNA. A presença dessa molécula em tumores é importante, pois a expressão de p53R2 é regulada por p53 em resposta a danos no DNA.^{20,31,33,48}

Okuma e colaboradores (2006) analisaram a relação entre expressão da p53R2 em carcinoma escamocelular de esôfago e invasão tumoral, metástase linfonodal, estadiamento patológico e expressão de p53.³⁴ O grupo que foi negativo para p53 e positivo para p53R2 demonstrou invasão tumoral profunda e estágio mais avançado.³⁴ Outros autores encontraram que alta expressão de p53R2 em melanomas está correlacionada com invasão tumoral profunda, metástase a distância e estágio tumoral.³¹ Já Hsu e colaboradores (2011) avaliaram a expressão de p53R2 em amostras de câncer de pulmão com parâmetros clínicos e taxa de sobrevida, sendo que os autores concluíram que a expressão de p53R2 estava associada com altas taxas de sobrevida e prognóstico favorável em câncer de pulmão.²⁰ A função divergente da p53R2 pode estar relacionada a mutações que afetam esta importante proteína. A mutação pontual foi detectada no códon 115 do gene *p53R2* em linhagens celulares de câncer (HCT116) levando a substituição de valina por leucina, levando a consequente perda da função da p53R2.⁴⁸ A p53R2 vem sendo considerada um possível alvo no tratamento do câncer. Novos reguladores e inibidores de RR e suas subunidades têm sido descobertos podendo ser potenciais biomarcadores ou alvos terapêuticos.

A desregulação da p53R2 também pode sensibilizar as células a dano no DNA no câncer durante estresse oxidativo de maneira independente de p53.^{7,49}

A p53R2 tem sido aceita com fator dependente de p53, entretanto o *Tp53* esta frequentemente mutado ou deletado em tumores. Cho e colaboradores (2017) demonstraram a não associação da expressão e função da p53R2 e o status da p53, sugerindo que a regulação da transcrição basal da p53R2 envolve mecanismos independentes de p53. Além da p53 e sua família, p73, FOXO3 e E2F1 são os novos reguladores da transcrição da p53R2. A FOXO3, supressor tumoral, ativa p53R2 promove e induz sua expressão. A expressão de p53R2 e FOXO3 inibe a proliferação de células neoplásicas, e a co-expressão de FOXO3 e p53R2 é um potencial biomarcador preditivo de doença do câncer.⁷

A p53R2 pode desempenhar papel duplo na regulação do ciclo celular dependendo da localização da p21 e do status da p53 em cânceres. Regulador do ciclo celular, o P21 é um gene alvo da p53 que medeia o controle e inibição do ciclo celular em G1 através da expressão da p21 nuclear. Já a p21

citoplasmática foi encontrada promovendo a progressão do ciclo celular e sobrevivência de células tumorais. A p53R2 pode, por sua vez, interagir e superregular a p21 citoplasmática.^{7,49}

Park e colaboradores (2019) descreveram que a parquina seria responsável pela degradação da p21, a qual é bem conhecida como uma lentificadora de progressão do ciclo celular por meio de inibição de formação de complexos ativados de ciclinas. Sendo assim, altos níveis de parquina seriam responsáveis por baixos níveis de p21 e consequente aumento da velocidade de ciclagem da célula.³⁵

A deleção do *PRKN*, gene que codifica a parquina, é correlacionada negativamente com cinco oncogenes (genes *CCND1* da proteína ciclina D1, *CCNE1* da proteína ciclina E1, *CDK4* da proteína CDK-4 ou quinase 4 dependente de ciclina, *BCL-XL* da proteína de mesmo nome e *PAX8* também da proteína de mesmo nome) e um supressor tumoral (gene *BRCA1* da proteína de mesmo nome). Este achado apoia fortemente a função de supressor tumoral da parquina em humanos.^{13,43,44}

A alteração genética no *PRKN* é comum em muitas neoplasias em humanos e também na doença de Parkinson hereditária. No câncer, o gene *PRKN* está mutado e/ou deletado, com a perda do número de cópias sendo o modo de alteração primário. Gong e colaboradores (2014) examinaram o padrão de deleção do *PRKN* através de 4934 tumores abrangendo 11 tipos de câncer.¹³ A deleção focal do *PRKN* ocorre em 11% dos tumores entre todas as linhagens e a perda de todo braço do cromossomo ocorre em 19% das amostras, resultando numa taxa geral de 30% de perda.¹³ Deleções do *PRKN* são as mais comuns em tumores serosos do ovário, bexiga e carcinomas de mama (60%, 38% e 32% de taxa de deleção, respectivamente). Estes dados indicam que o *PRKN* é um dos mais frequentes genes deletados no câncer em humanos.¹³

PRKN codifica a proteína parquina que está envolvida em muitos processos celulares como a degradação proteossômica, xenofagia, controle do ciclo, proliferação e migração celular, resposta a estresse oxidativo, homeostase mitocondrial e supressora tumoral.²²

Timothy e colaboradores (2017), demonstraram que o *PRKN* é um supressor tumoral que controla a ação anti-apoptótica do Bcl-xL promovendo a

morte celular programada. A parquina liga diretamente a ubiquitina à Bcl-xL, sinalizando esta para degradação no proteassoma. Com isto, a inativação da parquina leva ao acúmulo aberrante de Bcl-xL aumentando a ação anti-apoptótica do mesmo. A mutação no *PRKN* anula a habilidade da ubiquitina E3 ligase de degradar a Bcl-xL, produzindo o mesmo efeito. Além disso, a parquina modula a despolarização mitocondrial e apoptose de maneira independente de Bcl-xL.¹⁴ Linhagens de células neoplásicas que contêm a deleção do gene *PRKN* demonstram resistência a morte celular induzida pelo TNF- α , sugerindo uma potencial função da parquina como regulador da resposta imune e da apoptose.²⁶

A parquina pode inibir a via de sinalização e crescimento JAK2/STAT3/VEGF, controlando a rede de vias de proliferação celular, se tornando um supressor tumoral vital.²⁶

Estudos também têm indicado que depleção de parquina promove a inativação de PTEN.¹⁶ A inativação do gene *PTEN* tem sido encontrada em muitas linhagens tumorais em humanos. A inativação de *PTEN* promove sobrevivência de células neoplásicas, estimulação de ciclo celular, angiogênese e síntese proteica.^{16,27}

Outro mecanismo de ação descrito para a parquina é a interação genética entre os genes *PRNK*, *CCND1*, *CCNE1* e *CDK4*, a qual está relacionada com processos de desregulação do controle do ciclo celular.^{13,43} A regulação do ciclo celular através da degradação controlada da ciclina D1 (gene *CCND1*), ciclina E1 (gene *CCNE1*) e da CDK-4 (gene *CDK4*), pode estar relacionada a supressão tumoral.^{22,42,43} A relação genética entre parquina, Ciclina D1, Ciclina E1 e CDK-4 é particularmente intrigante. Ciclina D1, Ciclina E1 e CDK-4 controlam a progressão de G1/S e são todas codificadas por oncogenes que estão frequentemente amplificados em muitos tipos de neoplasias. Uma possibilidade é que, a perda da parquina tem função similar ao ganho de cópias dos genes das ciclinas e da CDK-4. A depleção de parquina resulta em um aumento das ciclinas D1 e E1, levando ao crescimento e proliferação celular. Gong e colaboradores (2014), observaram, como resultado da deleção do *PRKN*, acúmulo das proteínas Ciclina D1 e Ciclina E1, mas não de outros efetores do

ciclo celular. Além disso, a superexpressão da parquina resulta numa diminuição coordenada nos níveis de Ciclina D1 e E1.¹³

Por fim, alterações no *TP53* podem contribuir para a desregulação da expressão do *PRKN*, resultando na sua baixa transcrição deste gene, o que explicaria alterações de expressão de parquina em neoplasias com mutação na p53.²²

2 JUSTIFICATIVA

Os CPC são tumores raros, afetando principalmente crianças, tem sobrevida baixa e apresentam alta incidência no sul do Brasil devido a presença da mutação R337H do gene *TP53*. Assim sendo, é de suma importância entender a oncogênese deste tumor e as moléculas envolvidas neste processo.

As proteínas p53, parquina e p53R2, Ciclina D1 e ciclina E1, por se tratarem de proteínas envolvidas com a supressão e progressão tumoral, têm demonstrado ter um papel importante em variadas neoplasias e podem ter algum papel na carcinogênese do TPC, principalmente naqueles casos de CPC com mutação no gene *TP53*.

Em vista do acima exposto, este trabalho visa estudar a expressão destas proteínas em amostras de TPC parafinadas, visando correlaciona-las com a sobrevida, o tipo histológico e a presença da mutação R337H no gene da p53.

3 OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como finalidade avaliar se a mutação R337H no gene *TP53* está associada com a expressão dos marcadores imunoistoquímicos parquina, Ciclina D1, Ciclina E1, p53 e p53R2 em tumores de plexo coroide.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever a expressão da parquina em tumores de plexo coroide.
- Comparar a expressão de parquina, Ciclina D1, Ciclina E, p53 e p53R2 em papilomas de plexo coroide e carcinomas de plexo coroide, e correlacionar a expressão da parquina com os demais marcadores e a mutação R337H no gene *Tp53*.
- Buscar encontrar um possível fator diagnóstico e/ou prognóstico associado a estes marcadores.

4 ARTIGOS

Este trabalho resultou em dois artigos.

O primeiro relatando a associação da mutação R337H no gene *TP53* com a expressão das proteínas p53 e p53R2 que foi publicado em setembro de 2017 no International Journal of Science and Research (IJSR), durante o curso do doutorado.

O segundo artigo que descreve a expressão da parquima em tumores de plexo coroide e a correlaciona com a mutação R337H do gene *TP53* e os demais marcadores (p53, p53R2, Ciclina D1 e Ciclina E1), está em processo de redação final para submissão.

Os dois artigos serão apresentados a seguir.

4.1 ARTIGO 1

International Journal of Science and Research (IJSR)
ISSN (Online): 2319-7064
Index Copernicus Value (2015): 78.96 | Impact Factor (2015): 6.391

Relationship between the Presence of the R337H Mutation of the *TP53* Gene and Expression of the p53 and p53R2 Proteins in Choroid Plexus Carcinomas

Short title: R337H mutation and p53/p53R2 expression in choroid plexus carcinomas

Guilherme R Taques^{1,4}, Cleber M de Souza², Elizabeth S Gugelmin³, Maria DFS Begnami⁴, Gislaine Custódio⁵, Luiz F Bleggi-Torres⁵, Bonald C Figueiredo⁵, Lucia de Noronha¹

¹ Health Science Postgraduate Program of the School of Medicine of the Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba-Paraná, Brazil

² School of Life Science of the Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba-Paraná, Brazil

³ Little Prince Children's Hospital, Curitiba-Paraná, Brazil

⁴ Anatomical Pathology Service, A.C. Camargo Hospital, São Paulo, Brazil

⁵ Graduate Program in Biotechnology Applied to Child and Adolescent Health, Little Prince Schools, Curitiba-Paraná, Brazil

Abstract: Background: The most common mechanism associated with the development of choroid plexus carcinoma seems to be mutation of the *TP53* gene. The R337H mutation of the *TP53* gene has been reported in a significant proportion of patients with choroid plexus tumors. The aim of the present study was to use immunohistochemical techniques to establish whether the presence of the R337H mutation is associated with changes in the expression of p53 and p53R2 in choroid plexus tumors. **Methodology/Principal Findings:** A total of 27 samples collected from patients with choroid plexus tumors were screened for p53 and p53R2 expression using

Relationship between the presence of the R337H mutation of the *TP53* gene and expression of the p53 and p53R2 proteins in choroid plexus carcinomas

Short title: **R337H mutation and p53/p53R2 expression in choroid plexus carcinomas**

Guilherme R Taques^{1,4¶}, Cleber M de Souza^{2&}, Elizabeth S Gugelmin^{3¶}, Maria DFS Begnami^{4¶}, Gislaine Custódio^{5¶}, Luiz F Bleggi-Torres^{5¶}, Bonald C Figueiredo^{5¶}, Lucia de Noronha^{1*}

¹ Health Science Postgraduate Program of the School of Medicine of the Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba-Paraná, Brazil

² School of Life Science of the Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba-Paraná, Brazil

³ Little Prince Children's Hospital, Curitiba-Paraná, Brazil

⁴ Anatomical Pathology Service, A. C. Camargo Hospital, São Paulo, Brazil

⁵ Graduate Program in Biotechnology Applied to Child and Adolescent Health, Little Prince Schools, Curitiba-Paraná, Brazil

* Corresponding author

E-mail: lnno@terra.com.br

¶These authors contributed equally to this work.

&This author also contributed equally to this work.

Abstract

Background: The most common mechanism associated with the development of choroid plexus carcinoma seems to be mutation of the *TP53* gene. The R337H mutation of the *TP53* gene has been reported in a significant proportion of patients with choroid plexus tumors. The aim of the present study was to use immunohistochemical techniques to establish whether the presence of the R337H mutation is associated with changes in the expression of p53 and p53R2 in choroid plexus tumors.

Methodology/Principal Findings: A total of 27 samples collected from patients with choroid plexus tumors were screened for p53 and p53R2 expression using immunohistochemistry; the results were compared as a function of the presence or absence of the R337H mutation. Immunopositivity for p53 was more frequent in patients with choroid plexus carcinomas than in patients with choroid plexus papilloma ($p=0.006$). All six cases of choroid plexus papilloma (100%) tested positive for the p53R2 protein. Patients with choroid plexus carcinomas that were immunopositive for p53R2 had higher odds of survival ($p=0.041$). The R337H mutation and tissue immunoexpression of p53 could be used in the differential diagnosis of atypical papilloma because both occurrences are strongly associated with choroid plexus carcinomas. The use of these factors would make it unnecessary for the World Health Organization (WHO) to maintain a category for atypical papilloma in their classification system. Some evidence points to an association between absence of the p53R2 protein and progression to death in cases of choroid plexus carcinoma.

Significance: Our results show an additional biomarkers that can aid in the diagnosis, treatment and determination of the prognosis of patients with choroid plexus carcinoma will continue to drive future research.

Keywords: choroid plexus carcinoma; p53; R337H; p53R2

Introduction

Choroid plexus tumors represent 0.4 to 0.6% of all intracranial neoplasms and predominantly affect children less than three years old [1-3].

According to histological criteria, choroid plexus tumors are classified as choroid plexus papilloma (WHO grade I) or choroid plexus carcinomas (WHO grade III) or as intermediate forms known as atypical choroid plexus papilloma (WHO grade II). Application of molecular biology techniques might allow for differential diagnoses among these three grades and consequently improve the treatments and prognoses of patients [4].

Although the ratio of the occurrence of choroid plexus carcinoma to papilloma is 1:5, Bleggi-Torres *et al* (2004) found an increased incidence of choroid plexus carcinoma in Southern Brazil [5,6].

The etiology of choroid plexus tumors is unknown; however, it is believed that the mechanism most commonly associated with the development of choroid plexus carcinomas is dysfunction of the *TP53* tumor suppressor gene, which encodes the p53 protein [7-9]. A particular mutation of the *TP53* gene was detected in a significant proportion of Brazilian patients with choroid plexus tumors. This mutation occurs in exon 10 and is known as R337H; it leads to a base-pair substitution of G to A, with a corresponding change in codon 337 from CGC (arginine) to CAC (histidine). The arginine residue of codon 337 is part of an important alpha-helix involved in the functional oligomerization of the p53 protein. By replacing arginine with histidine, the R337H mutation hinders the final stage of p53 oligomerization, disrupting its function. This mutation was first identified in Brazilian children with adrenocortical carcinomas [10,11]. Custódio *et al* (2011) detected the R337H mutation of *TP53* in 63% of choroid plexus carcinomas analyzed in Southern Brazil [12]. In addition, the survival of patients without the R337H mutation and those patients who survive surgery is longer, even when radiotherapy is not performed [4].

Another molecule relevant to carcinogenesis and directly related to p53 is the protein known as p53R2. This protein is homologous to one of the components of the ribonucleotide reductase (RR) system, which provides

nucleotides for DNA repair during the cell cycle. The presence of p53R2 in tumors is significant because its expression is regulated by p53 in response to DNA damage.

The aim of the present study was to establish whether the presence of the R337H mutation of *TP53* is associated with changes in the expression of immunohistochemical markers for p53 and p53R2 in choroid plexus tumors.

Materials and Methods

Study population

The present study included 27 patients with choroid plexus tumors subjected to craniotomy at the Little Prince Children's Hospital (Hospital Infantil Pequeno Príncipe) from 1992 to 2010. Six cases were diagnosed as choroid plexus papilloma, and 21 cases were diagnosed as choroid plexus carcinomas. The description of this population and the methods used for DNA extraction and *TP53* genotyping are described in Custódio *et al* [12].

The present study is part of a larger research project titled "Neonatal screening, mapping of the prevalence of the R337H mutation in *TP53* according to county, cancer history, socioeconomic profile and molecular abnormalities associated with familial tumors in the state of Paraná" that was approved by the Research Ethics Committee (Comitê de Ética em Pesquisa - CEP) of the Little Prince Children's Hospital and the National Council of Research Ethics (Conselho Nacional de Ética em Pesquisa/CONEP - 677/2009).

Immunohistochemical reactions

Representative areas of the tumors were selected, and two cylinders, 1 mm in diameter each, were taken from all of the tumor samples to prepare tissue microarrays (TMAs). This step was performed using the Manual Tissue Array (MTA-I) (Beecher Instruments Inc., Sun Prairie, Wisconsin, USA).

The immunohistochemical reactions were automated using the Benchmark ULTRA (Ventana Medical Systems, Inc., Rotkreuz, Switzerland). The slides were identified using barcode labels and processed by the Benchmark ULTRA. Deparaffinization was performed with EZ PREP solution (Ventana

Medical Systems, Inc., Rotkreuz, Switzerland), and heat-induced antigen retrieval was carried out using the Cell Conditioning 1 (CC1) solution (ULTRA CC1 Solution, Ventana Medical Systems, Inc., Rotkreuz, Switzerland) at high pH and 96 °C for 15 minutes.

Blocking of endogenous peroxidase was then performed for five minutes using a peroxidase blocking reagent (ultraView Universal DAB Inhibitor - 3% H₂O₂, Ventana Medical Systems, Inc., Rotkreuz, Switzerland) followed by a rinse with wash buffer. The sections were then incubated with anti-p53 (Clone DO-7, Dako, Glostrup, Denmark) and anti-p53R2 (N-16, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA) antibodies (1:300) for 30 minutes.

The sections were incubated with horseradish peroxidase (HRP) polymer (HRP Multimer, Ventana Medical Systems, Inc., Rotkreuz, Switzerland) and rinsed several times with wash buffer. The sections were then incubated with the chromogen diaminobenzidine (DAB), rinsed with wash buffer and counterstained with hematoxylin (Hematoxylin II, Ventana Medical Systems, Inc., Rotkreuz, Switzerland).

The slides were dehydrated in ethanol and xylene and mounted using a Tissue-Tek® Film® Coverslipper (Sakura, Alphen aan den Rijn, The Netherlands).

Reading of the anti-p53 and anti-p53R2 immunostained slides was performed on 10 large magnification fields (400x) with an Olympus BX50 Microscope (Tokyo, Japan) using the modified Allred score. Cells with nuclear staining for p53 and cytoplasmic/nuclear staining for p53R2 were considered to be positive. Thus, the samples were scored using the following system: 0 – negative, 1 – weak immunopositivity, 2 – moderate immunopositivity or 3 – strong immunopositivity. The values corresponded to the averages of 10 large magnification fields.

Statistical analysis

For the purpose of statistical analysis, samples with staining intensities of 0 and 1 were considered to be immunonegative for p53 and p53R2, and samples with intensities of 2 and 3 were considered to be immunopositive for p53 and p53R2. In addition, the outcomes “alive” or “dead” were analyzed for choroid

plexus carcinoma cases. The Chi-square and Fisher's Exact tests, which compare two sets of data, were used for statistical analysis. The significance level was set at $p=0.05$. The data were analyzed using SPSS v. 20.0 software (IBM Corporation, Armonk, New York, USA).

Results

Investigation of the R337H mutation

The R337H mutation was detected in 61.7% of the patients with choroid plexus carcinomas ($n=21$; $p=0.016$). None of the cases of choroid plexus papilloma exhibited this mutation (Table 1).

Table 1. Absence or presence of the R337H mutation of *TP53* in the choroid plexus papilloma and carcinoma groups ($n=27$).

R337H mutation	Choroid plexus papilloma* (n=6)	Choroid plexus carcinoma* (n=21)	p- value**
Absent	6 (100.0)	8 (38.1)	0.016
Present	0 (0.0)	13 (61.9)	

*n (%); **Fisher's Exact test

The outcomes “alive” or “dead” were analyzed as a function of the presence or absence of the R337H mutation in cases of choroid plexus carcinoma ($p=1.000$). Approximately 54% of the patients with the mutation died, whereas no deaths occurred among the patients diagnosed with choroid plexus papilloma.

Analysis of immunohistochemical results for p53

Table 2 describes the association between immunohistochemical detection of p53 expression and choroid plexus papilloma and carcinomas ($p=0.006$). Figure 1 illustrates two cases of choroid plexus carcinoma (top); one case was positive for p53 (right), and one case was negative (left) for p53.

Table 2. Absence or presence of p53 and p53R2 expression (intensity) in the choroid plexus papilloma and carcinoma groups (n=27).

p53 intensity	Choroid plexus papilloma* (n=6)	Choroid plexus carcinoma* (n=21)	p- value**
Absent [£]	6 (100.0)	7 (33.3)	0.006
Present [¥]	0 (0.0)	14 (66.7)	
p53R2 intensity			
Absent [£]	0 (0.0)	5 (23.8)	0.555
Present [¥]	6 (100.0)	16 (76.2)	

*n (%); [£]no or weak staining; [¥]moderate or strong staining; **Fisher’s Exact test

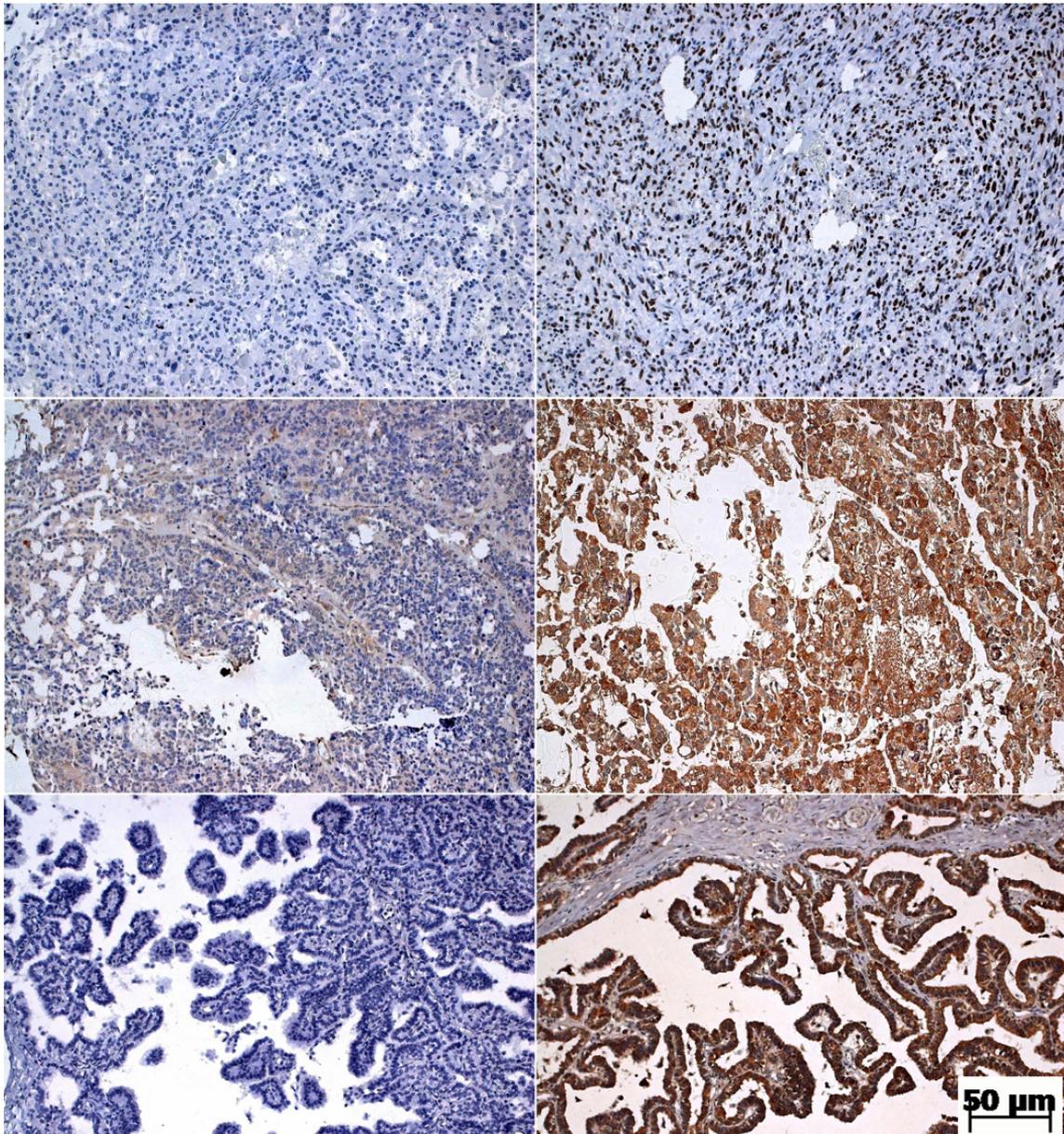


Figure 1. Two cases of choroid plexus carcinoma (top); the one on the right is positive for p53, and the one on the left is negative for p53. Two more cases of choroid plexus carcinoma (middle) immunostained for p53R2; the one on the right is positive, and the one on the left is negative. Finally, two cases of choroid plexus papilloma (bottom); the one on the right is positive for p53R2, and the one on the left is negative for p53. Notice the nuclear immunopositivity of p53 (top right) and the cytoplasmic/nuclear immunopositivity of p53R2 (middle and bottom right). 400x magnification.

When considering only the patients diagnosed with choroid plexus carcinomas, no statistically significant relationship ($p=0.346$) was found between the presence of the R337H mutation and a positive result for p53 expression (Table 3).

Table 3. Relationship between the presence of the R337H mutation of *TP53* and the expression of p53 and p53R2 proteins in choroid plexus carcinoma patients (n=21).

p53 intensity	Without R337H in <i>TP53</i>* (n=8)	With R337H in <i>TP53</i>* (n=13)	<i>p</i>- value**
Absent [£]	4 (50.0)	3 (23.1)	0.346
Present [¥]	4 (50.0)	10 (76.9)	
p53R2 intensity			
Absent [£]	2 (25.0)	3 (23.1)	1.000
Present [¥]	6 (75.0)	10 (76.9)	

*n (%); [£]no or weak staining; [¥]moderate or strong staining; **Fisher's Exact test

No significant relationship was found ($p=0.159$) between the outcomes “alive” or dead” and the level of p53 expression in the group of patients with choroid plexus carcinomas (Table 4).

Table 4. Relationship between the outcome of death and the expression of p53 and p53R2 in choroid plexus carcinoma patients (n=21).

Outcome	p53R2 absent[£] * (n=5)	p53R2 present[¥] * (n=16)	p- value**
Alive	0 (0.0)	9 (56.3)	0.041
Dead	5 (100.0)	7 (43.7)	
Outcome	p53 absent[£] (n=7)	p53 present[¥] (n=21)	p- value**
Alive	5 (60.0)	4 (10.0)	0.159
Dead	2 (40.0)	10 (71.4)	

*n (%); [£]no or weak staining; [¥]moderate or strong staining; **Fisher's Exact test

Analysis of immunohistochemical results for p53R2

All six cases of choroid plexus papilloma (100%) were positive for p53R2 (Table 2). Of the 21 cases of choroid plexus carcinoma, 16 cases (76.2%) were positive for p53R2 expression. Although interesting, this relationship was not statistically significant ($p=0.555$). Figure 1 illustrates two cases of choroid plexus carcinoma (middle); one case is negative for p53R2 (left), and one case is positive for p53R2 (right). Figure 1 also depicts two cases of choroid plexus papilloma (bottom); one case is negative for p53 (left), and one case is positive for p53R2 (right).

Table 3 shows that there was no statistically significant relationship ($p=1.000$) between the presence or absence of the R337H mutation and positive immunostaining for p53R2 in the group of patients with choroid plexus carcinomas (n=21).

Table 4 shows that there was a significant correlation ($p=0.041$) between the expression of p53R2 and the outcomes "alive" or "dead" in the group of patients with choroid plexus carcinomas.

Discussion

This observational study investigated the expression of two important proteins, p53 and p53R2, and their relationship with the presence of the R337H mutation in the *TP53* gene in patients with choroid plexus tumors.

In addition, our results provide preliminary evidence for the possibility of using molecular diagnoses that target the R337H mutation as a tool for the anatomical-pathological diagnosis of patients with choroid plexus tumors. Presence of the R337H mutation and immunopositivity for p53 might allow atypical papilloma and carcinomas to be distinguished in clinically ambiguous cases and thus help define cases with carcinoma. Such a definition is highly relevant for early clinical decision-making about the type of specific treatment required. There are different therapeutic approaches to papilloma and carcinomas. In cases of papilloma, surgical resection is the core treatment, and as a rule, end bloc resection is recommended as being curative [4,13]. However, patients with choroid plexus carcinomas should also receive adjuvant therapy after surgery. Some studies have shown that radiotherapy increases the survival of patients with choroid plexus carcinomas [3]. Nevertheless, radiotherapy should be avoided in pediatric patients because it could result in cognitive deficits, endocrine disorders and the development of secondary tumors. In that population, chemotherapy has been used as adjuvant therapy, and in some cases, it achieved a reduction in tumor size. An incorrect therapeutic approach could increase patients' morbidity and reduce their odds for longer survival.

Bleggi-Torres and colleagues found that the incidence of choroid plexus carcinoma was 63.2% of all choroid plexus tumors [5]. Custódio and colleagues reported that adrenocortical tumors and choroid plexus carcinomas are the most frequent neoplasms among patients under 15 years old [14]. In the present study, 77.7% of the choroid plexus tumors were carcinomas. This finding demonstrates that the incidence of choroid plexus carcinomas is high in the state of Paraná.

Tabori *et al* (2010) detected the somatic mutation of *TP53* in 50% of the cases of choroid plexus carcinoma but only in 5% of the cases of papilloma [9]. In 2013, Custódio *et al* reported that choroid plexus carcinomas exhibit the R337H mutation of *TP53* [14]. In our study (Table 1), nearly 62% of the cases with choroid plexus carcinoma carried this mutation, whereas none of patients with choroid plexus papilloma carried the mutation ($p=0.016$). Based on this

evidence, we suggest that choroid plexus carcinomas might be directly associated with the presence of the R337H mutation.

In 2012, Crocetti and colleagues reported that the five-year survival rate for choroid plexus carcinoma cases was 42.6%. This study significantly contributed to the understanding of patient survival; however, it did not assess the association between the survival rate and *TP53* mutations [15]. Some studies employed the R337H mutation as a prognostic factor and found that the survival time of patients with this mutation is short [4,9,13]. Our sample included four cases of choroid plexus carcinoma with the R337H mutation who are still alive more than five years after their initial diagnoses. This finding indicates that the R337H mutation of *TP53* might not be the only component of the signaling pathway that increases the likelihood of the poorest outcome. Other types of molecules might interact with this mutation and play a role in increasing the survival of patients.

Tissue immunoexpression of p53 (Table 2) was positive in 66.7% of the choroid plexus carcinoma cases but in none of the papilloma cases ($p=0.006$). More complete data are available in the study by Custódio *et al* [12]. Gugelmin (2005) found that 80% of choroid plexus carcinoma cases and 12% of papilloma cases were positive for p53 expression [17]. Expression of p53 was also observed by Tena-Suck *et al* (2010) in 86% of choroid plexus carcinomas and in 39% of papilloma [3]. Therefore, there is agreement in the literature that the expression of p53 is increased in choroid plexus carcinomas.

No significant association was found ($p=0.346$) between the R337H mutation and tissue immunoexpression of p53 in the group of patients with choroid plexus carcinomas. A positive result for p53 expression was detected in 76.9% of the choroid plexus carcinoma cases carrying the R337H mutation, whereas 50% of the cases without the mutation were negative for p53.

No statistically significant association was found ($p=0.159$) between the outcomes of patients with choroid plexus carcinomas and being immunopositive for p53. However, it is noteworthy that a large number of patients who progressed into the outcome “death” (71.4%) exhibited positive p53 expression in their tissues. Mutation of p53 inhibits its classic function as a tumor suppressor. Mutated p53 could negatively affect the regulation of cell differentiation,

proliferation and apoptosis. Most *TP53* mutations cause changes between residues 100 and 300 in the DNA-binding domain [18]; as a result, mutated p53 may acquire new functions (“gain-of-function” phenomenon) with regard to cell migration, invasion and metastasis [19]. When p53 expression increases among choroid plexus carcinoma patients with the R337H mutation, it can be speculated that the half-life of this structurally altered p53 is increased, and thus, it is found more readily in cancer cells. In our study, the reason for the higher frequency of p53 expression among the cases that exhibited the outcome “death” might be related to a lack of early tumorigenesis suppression [20].

RR is a tetramer composed of two homodimers known as RRM1 (R1) and RRM2 (R2) [21]. The p53R2 protein is homologous to subunit R2 and contains a site for p53 binding. This binding stimulates the transcription/translation of a peptide that is notably similar to R2 [22]. Thus, p53R2 bound to R1 might play a role in DNA repair, mainly in the G1 and G2 cycle cell stages [16,23,24].

In the present study, all of the papilloma and 76.2% of the carcinomas were immunopositive for p53R2 ($p=0.555$). We may infer that the presence of p53R2 was protective in patients with papilloma. This inference is based on the hypothesis that p53R2 provides the conditions for DNA repair by supplying deoxyribonucleotides (dNTPs). As a consequence, the papilloma do not become malignant. The ability of p53R2 to suppress tumor invasion in colon, oropharyngeal, pancreatic and prostate cancers is well known in the literature. Okumura *et al* (2006) analyzed the relationship between expression of p53R2 in esophageal squamous cell carcinomas and tumor invasion, lymph node metastasis, pathological stage and p53 expression [25]. The group that was negative for p53 and positive for p53R2 exhibited deep tumor invasion and reached a more severe stage. Other authors found that high levels of p53R2 expression in melanoma is correlated with deep tumor invasion, distant metastases and tumor stage [26]. Such divergent functions of p53R2 could be related to mutations that affect this important protein. A point mutation that was detected in codon 115 of the *p53R2* gene in a cancer cell line (HCT116) leads to substitution of valine for leucine, with the consequent loss of p53R2 function [27]. In addition, Hsu *et al* (2011) assessed the expression of p53R2 in surgical specimens from lung cancer patients as a function of clinical parameters and

survival rate [28]. The authors concluded that p53R2 expression was associated with higher survival rates; thus, it is associated with favorable prognoses and is a good biomarker for lung cancer.

Among the 13 patients in the present study that had choroid plexus carcinomas with R337H mutations, 10 (76%) exhibited positive expression of p53R2 (Table 3), although this association lacked statistical significance ($p=1.000$). Table 4 shows that 100% of the choroid plexus carcinoma cases that were negative for p53R2 died and that 56% of the choroid plexus carcinoma cases that were positive for p53R2 survived ($p=0.041$). The p53R2 protein supplies nucleotides for DNA repair; perhaps the occurrences of death among the individuals who were negative for p53R2 expression could be accounted for by loss of a DNA repair function [29]. Zhang *et al* (2011) suggested that p53R2 could suppress the proliferation of cancer cells independent of the status of p53 and thus represents a key element in anticancer therapeutics, especially in cases with *TP53* mutations [16].

Conclusion

The R337H mutation and tissue immunoexpression of p53 could be used in the differential diagnosis of atypical papilloma because both occurrences are strongly associated with choroid plexus carcinomas. Such a use would allow better and earlier therapeutic decision-making and would make the permanent inclusion of such an imprecise diagnostic category in the WHO classification unnecessary.

Although immunohistochemical assessment of choroid plexus papilloma and carcinomas showed that the former exhibited high levels of p53R2 expression and that the latter were positive for p53 and weakly positive for p53R2, new markers that have some joint activity with p53R2, such as p73, should be investigated because the roles of p53 and p53R2 cannot yet be asserted with full certainty. In addition, studies of p53R2 mutations would be very useful in the effort to elucidate the pathway in which the protein participates.

Available evidence points to a relationship between absence of the p53R2 protein and progression to death in cases of choroid plexus carcinoma. Further

studies are needed to confirm this hypothesis, which is highly relevant for the determination of new biomarkers with prognostic applications for these types of tumors.

Thus, the search for additional biomarkers that can aid in the diagnosis, treatment and determination of the prognosis of patients with choroid plexus carcinoma will continue to drive future research.

References

1. Hasselblatt M, Mertsh S, Koos B, et al. Twist-1 is overexpressed in Neoplastic Choroid Plexus Epithelial Cells and Promotes Proliferation and Invasion. *Cancer Res.* 2009; 6:2219-2223.
2. Koos B, Paulsson J, Jarvius M, et al. Platelet-Derived Growth Factor Receptor Expression and Activation in Choroid Plexus Tumors. *The American Journal of pathology.* 2009; 175:1631-1637.
3. Tena-Suck ML, Salinas-Lara C, Rembao-Bojórquez D, *et al.* Clinicopathologic and immunohistochemical study of choroid plexus tumors: single-institution experience in Mexican population. *J Neurooncol.* 2010;98:357-365.
4. Wolff J, Sajedi M, Coppes MJ, et al. Choroid plexus tumors. *British Journal of Cancer.* 2002; 87:1086-1091.
5. Bleggi-Torres LF, Noronha L, Scheffel DIH, et al. Tumores de plexo coroide: estudo epidemiológico comparativo de 24 casos. *Arq Neuropsiquiatr.* 2004; 62:127-130.
6. Wrede B, Liu J, Wolff JEA. Chemotherapy improves the survival of patients with choroid plexus carcinomas: a meta-analysis of individual cases with choroid plexus tumors. *J Neurooncol.* 2007; 85:345-351.
7. Patrick TA, Kranz DM, Dyke TE, et al. Folate receptors as potential therapeutic targets in choroid plexus tumors of SV40 transgenic mice. *Journal of Neuro-Oncology.* 1997; 32:111-123.
8. Strong LC. General keynote: hereditary cancer: lessons from Li-Fraumeni syndrome. *Gynecol Oncol.* 2003; 88:S4-7.
9. Tabori U, Shlien A, Baskin B, et al. TP53 Alterations Determine Clinical Subgroups and Survival of Patients with Choroid Plexus Tumors. *Journal of Clinical Oncology.* 2010; 22:1-9.
10. Latronico AC, Pinto EM, Domenice S, et al. An inherited mutation outside the highly conserved DNA-binding domain of the p53 tumor suppressor protein in children and adults with sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86:4970-4973.
11. Ribeiro RC, Sandrini F, Figueiredo B. An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98:9330-9335.

12. Custodio G, Taques GR, Figueiredo BC, et al. Increased incidence of choroid plexus carcinoma due to the germline TP53 R337H mutation in southern Brazil. *PLoS One*. 2011; 6:e18015.
13. Gupta N. Choroid plexus tumors in children. *Neurosurg Clin N Am*. 2003; 14:621-631.
14. Custódio G, Parise GA, Kiesel Filho N, et al. Impact of neonatal screening and surveillance for the TP53 R337H mutation on early detection of childhood adrenocortical tumors. *J Clin Oncol*. 2013; 31:2619-2626.
15. Crocetti E, Trama A, Stiller C, et al. A Epidemiology of glial and non-glial brain tumours in Europe. *European Journal of Cancer*. 2012; 48:1532-1542.
16. Zhang K, Wu J, Wu X, et al. p53R2 inhibits the proliferation of human cancer cells in association with cell-cycle arrest. *Mol Cancer Ther*. 2011; 10:269-278.
17. Gugelmin ES. Tumores do Plexo Coroide: Aplicação da técnica de tissue microarray (TMA) no estudo comparativo entre 36 carcinomas e 8 papilomas em crianças. PhD Thesis, Universidade Federal do Paraná (UFPR). 2005.
18. Soussi T, Lozano G. p53 mutation heterogeneity in cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 331:834-842.
19. Muller PA, Vousden KH, Norman JC. p53 and its mutants in tumor cell migration and invasion. *J Cell Biol*. 2011; 192:209-218.
20. Li T, Kon N, Tan M, et al. Tumor Suppression in the Absence of p53-Mediated Cell-Cycle Arrest, Apoptosis, and Senescence. *Cell*. 2012; 149:1269-1283.
21. Fontecave M, Lepoivre M, Elleingand E, et al. Resveratrol, a remarkable inhibitor of ribonucleotide reductase. *FEBS Lett*. 1998; 421:277-279.
22. Nakamura Y. Isolation of p53-target genes and their functional analysis. *Cancer Sci*. 2004; 95:7-11.
23. Chang L, Zhou B, Hu S, et al. ATM-mediated serine 72 phosphorylation stabilizes ribonucleotide reductase small subunit p53R2 protein against MDM2 to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci*. 2008; 105:18519-18524.
24. Pontarin G, Ferraro P, Håkansson P, et al. p53R2-dependent ribonucleotide reduction provides deoxyribonucleotides in quiescent human fibroblasts in the absence of induced DNA damage. *J Biol Chem*. 2007; 282:16820-16828.

25. Okumura H, Natsugoe S, Yokomakura N, et al. Expression of p53R2 is Related to Prognosis in Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Clinical Cancer Res.* 2006; 12:3740-3745.
26. Matsushita S, Ikeda R, Fukushige T, et al. p53R2 is a prognostic factor of melanoma and regulates proliferation and chemosensitivity of melanoma cells. *Journal of Dermatological Science.* 2012; 68:19-24.
27. Yamaguchi T, Matsuda K, Sagiya Y, et al. p53R2-dependent pathway for DNA synthesis in a p53-regulated cell cycle checkpoint. *Cancer Res.* 2001;61: 8256-8262.
28. Hsu NY, Wu JY, Liu X, et al. Expression status of ribonucleotide reductase small subunits hRRM2/p53R2 as prognostic biomarkers in stage I and II non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.* 2011; 31:3475-34781.
29. Yousefi B, Rahmati M, Ahmadi Y. The roles of p53R2 in cancer progression based on the new function of mutant p53 and cytoplasmic p21. *Life Sci.* 2014; 99:14-17.

4.2 ARTIGO 2

Expressão Imunoistoquímica da Parquina em Tumores de Plexo Coroide

Guilherme Ribas Taques¹; Cleber Machado de Souza¹; Elizabeth Schneider Gugelmin²; Maria Dirlei Ferreira de Souza Begnami³; Gislaine Custódio⁴; Luiz Fernando Bleggi-Torres⁴; Bonald Cavalcanti de Figueiredo⁴; Lucia de Noronha^{1*}

¹ Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Escola de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba-Paraná, Brasil.

² Hospital Infantil Pequeno Príncipe, Curitiba-Paraná, Brasil.

³ Serviço de Anatomia Patológica do Hospital A. C. Camargo, São Paulo, Brasil.

⁴ Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Aplicada a Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdades Pequeno Príncipe, Curitiba-Paraná, Brasil.

* Corresponding Author:

Lúcia de Noronha.

Pontifical Catholic University of Paraná

Rua Imaculada Conceição, 1155, Prado Velho Curitiba-Paraná, Brazil.

Phone/Fax: +55 (41) 3271-2264

E-mail: lnno.noronha@gmail.com

RESUMO

Os Carcinomas de plexo coroide (CPC) são neoplasias raras do sistema nervoso central afetando principalmente crianças abaixo dos 3 anos de idade, com uma alta mortalidade. No sul do Brasil há uma incidência elevada de CPC, que foi associada a mutação R337H no gene *TP53*. A parquina foi descrita em neoplasias como mama, ovário, colón, entre outros e é uma proteína codificada no gene *PRKN*, que no câncer pode estar mutado ou deletado. A parquina que está envolvida em muitos processos de apoptose e crescimento celular e pode agir como supressora tumoral. Além disto, alterações no *TP53* podem contribuir para a desregulação da expressão do *PRKN*, resultando na sua baixa transcrição. Com isto, avaliamos a expressão imunoistoquímica da parquina em 29 casos de CPC com e sem a mutação R337H no gene *TP53*. Além de correlacionar a imunoexpressão da parquina com Ciclina D1, Ciclina E1, p53, p53R2 e sobrevida. Quando comparamos os pacientes com e sem mutação R337H no gene *TP53*, observamos que pacientes com esta mutação parecem ter mais parquina (tendência estatística, $p = 0,097$). Encontramos uma correlação positiva entre a expressão tecidual citoplasmática de parquina e a proteína p53R2 (+43%; $p = 0,019$). Este estudo aponta para uma possível ação protetora da parquina em conjunto com a p53R2 na tentativa de manutenção do controle do ciclo celular nos CPC, especialmente em indivíduos com *TP53* mutado.

Palavras chaves: Carcinoma de plexo coroide, p53, R337H, *PRKN*, parquina

INTRODUÇÃO

Tumores de plexo coroide são tumores raros primários do sistema nervoso central, derivados do plexo coroide, correspondendo apenas a 0,4 a 0,6% dos tumores intracranianos, afetando geralmente crianças abaixo dos três anos de idade.^{1,2,3,4}

Os tumores de plexo coroide são classificados baseados em critérios histológicos como papilomas de plexo coroide (grau I da OMS), carcinomas de plexo coroide (grau III da OMS) e uma forma intermediária denominada como papilomas de plexo coroide atípicos (grau II da OMS).^{1,2,4,5} O diagnóstico entre carcinoma e papiloma torna-se muitas vezes difícil e isso leva o patologista a optar por essa classificação intermediária de papiloma atípico. A possibilidade de usar a biologia molecular para ajudar nesta dificuldade, poderia suscitar diagnósticos mais precisos, e conseqüentemente, estabelecer melhorias no tratamento e prognóstico desses pacientes.^{5,6,7,8}

No Brasil, uma mutação no gene *TP53* tem sido relatada em uma proporção significativa nos pacientes com tumores de plexo coroide. Esta mutação ocorre no exon 10 e é conhecida por R337H, sendo que é uma troca do nucleotídeo G para nucleotídeo A o que traz uma mudança no códon 337 de CGC para CAC, o que resulta na troca da arginina pela histidina. O resíduo de arginina no códon 337 é parte de uma importante alfa-hélice envolvida na oligomerização da p53, sendo que a substituição por histidina não favorece o processo final de oligomerização e, assim, essa mutação compromete a função da p53.⁹ Essa mutação foi inicialmente identificada em crianças brasileiras com carcinoma adrenocortical.^{10,11} Custodio e colaboradores (2011) observaram a presença da mutação R337H no gene *TP53* em 63% dos carcinomas de plexo coroide analisados no Sul do Brasil.^{12,13}

Notavelmente, genes como *TP53*, são frequentemente alvo de mutações nas células neoplásicas, podendo o *PRKN* ser como estes genes.¹⁴ Além disto, já tem sido descrito que mutações no *TP53* podem contribuir para a desregulação da expressão do *PRKN*, resultando na sua baixa transcrição.¹⁵

PRKN codifica a proteína parkina que está envolvida em degradação proteossômica, xenofagia, controle do ciclo, proliferação e migração celular, resposta a estresse oxidativo, homeostase mitocondrial e supressor tumoral.¹⁵

Um dos mecanismos de ação descritos para a parquina é a regulação do ciclo celular através da degradação controlada da Ciclina D1 e E1, que pode estar relacionada a supressão tumoral.¹⁵

A relação genética entre o gene *PRKN* e as proteínas Ciclina D1, Ciclina E1 e Kinase 4 dependente de Ciclina (CDK4) já foi descrita. Ciclina D1, Ciclina E1 e CDK4 são proteínas que controlam a progressão da fase G1 para a fase S, resultando em proliferação celular e são todas codificadas por genes (*CCND1*, *CCNE1* e *CDK4* respectivamente) que estão frequentemente amplificados em muitos tipos de neoplasias. Uma possibilidade é que, a perda do gene *PRKN* tem função similar ao ganho de cópias dos genes *CCND1*, *CCNE1* e *CDK4*. A depleção do gene *PRKN* resultaria, então, em super-regulação destes genes associados com o crescimento e proliferação celular. A relação genética entre os genes *PRKN*, *CCND1*, *CCNE1* e *CDK4*, está, portanto, relacionada com desregulação do controle do ciclo celular em células neoplásicas. Sendo assim, alguns autores observaram, como resultado da deleção do *PRKN*, acúmulo das proteínas Ciclina D1 e Ciclina E1, mas não de outros efetores do ciclo celular. Além disso, a superexpressão da parquina resulta numa diminuição coordenada nos níveis de Ciclina D1 e Ciclina E1.¹⁴

Este trabalho tem como objetivo avaliar a expressão tecidual imunoistoquímica da parquina em tumores de plexo coroide com e sem a mutação R337H no gene *TP53*, correlacionando esta expressão com o tipo histológico e o desfecho dos pacientes. Além disso, visa correlacionar a expressão tecidual imunoistoquímica de parquina nestes tumores com a expressão tecidual de Ciclina D1, Ciclina E1, p53 e p53R2.

MÉTODOS

Seleção da amostra:

O presente trabalho baseia-se no estudo de 35 pacientes portadores de tumores de plexo coroide submetidos à craniotomia em um hospital infantil terciário de referência no sul do Brasil no período de 1992 a 2010. Sendo que deste total, 6 foram diagnosticados como tendo papilomas de plexo coroide e 29 carcinomas de plexo coroide. Entretanto, 2 casos de papiloma tiveram que ser

excluídos, devido a pequena quantidade de material tumoral nos blocos de parafina, resultando num total de 33 casos sendo 4 papilomas e 29 carcinomas de plexo coroide. Destes casos nós temos a pesquisa para a mutação R337H no gene *TP53* em 24 casos, sendo 20 carcinomas de plexo coroide e 4 papilomas de plexo coroide.¹² Dados clínicos como: idade, sexo e desfecho foram retirados dos prontuários médicos.^{12,16}

O estudo proposto faz parte do projeto aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa do Hospital Pequeno Príncipe, bem como pelo conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP - 677/2009), sob o título de “Triagem Neonatal, mapeamento da prevalência da mutação *TP53* R337H por município, histórico de câncer, perfil socioeconômico e alterações moleculares associadas com tumores de famílias do Estado do Paraná”.^{12,16}

Avaliação da mutação R337H:

O DNA tumoral e sanguíneo foi extraído e analisado usando PCR-RFLP e os resultados foram confirmados pelo sequenciamento de 240 pares de bases do exon 10 do gene *TP53*. Os pacientes, todos os pais e alguns familiares foram submetidos a análise do DNA de amostras de sangue. Foi avaliada a presença da mutação no DNA de amostras tumorais em blocos de parafina, sendo avaliado a perda da heterozigose.^{12,16}

Imunoistoquímica

As amostras em parafina foram selecionadas para a confecção de blocos de microarranjo tecidual (TMA), cada tumor teve 2 áreas amostradas, com 3mm de diâmetro para cada amostra. Os TMAs foram submetidos às reações de imunoistoquímica utilizando-se anticorpos monoclonais para os seguintes biomarcadores: p53 (DO-7, Dako, Dinamarca), p53R2 (N-16, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA), Ciclina D1 (DCS-6, Dako, Dinamarca), Ciclina E1 (T77, Abcam, Cambridge, Reino Unido) e Parquina (PRK8, Abcam, Cambridge, Reino Unido).^{16,17}

Para a avaliação semiquantitativa da expressão tecidual imunoistoquímica das Ciclinas D1 e E1 e da p53 foi utilizado o escore de Allred baseado na marcação nuclear que estas proteínas exibem. Um escore de Allred

modificado também foi utilizado para avaliar, de forma semiquantitativa, a expressão tecidual de parquina e p53R2, pois estas proteínas exibem marcação citoplasmática e nuclear. Escore de Allred representa a soma dos escores de distribuição da imunopositividade com os escores de intensidade da positividade, sendo que pode variar de 0 a 8, onde 8 são os valores mais altos de imunopositividade, tanto na distribuição como na intensidade. A distribuição está assim classificada: 0 – ausente, 1 – até 1% das células positivas, 2 – até 10% das células positivas, 3 – até 33% das células positivas, 4 – até 66% das células positivas, 5 – acima de 66% das células positivas. A intensidade da imunopositividade está assim distribuída: 0 – ausente, 1 – discreta intensidade, 2 – moderada, 3 – acentuada intensidade.^{16,18,19}

A técnica de morfometria também foi utilizada para avaliação quantitativa da parquina. As lâminas de imunoistoquímica foram escaneadas usando o scanner Axio Scan.Z1® (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Isto produziu um mosaico de imagens, as quais foram fragmentadas gerando centenas de imagens para cada amostras. Foram excluídas as imagens que apresentavam artefatos, estavam fora de foco ou não eram representativas de tumor na sua totalidade. No final desta seleção, restaram em média 20 imagens, representativas de campos de magnificação media (objetivas de 20X), para cada amostra de 3mm. Todas estas imagens foram avaliadas utilizando o software Image-Pro Plus 4.5® (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA) usando a ferramenta de morfometria de cores. Uma máscara de identificação das áreas imunopositivas foi gerada usando a amostra controle com a positividade apropriada de parquina. Esta máscara foi aplicada em todas as amostras. Após sobreposição da máscara nas imagens selecionadas, o software determinou a porcentagem de área imunopositiva para Parquina de cada imagem. Uma média de imunopositividade tecidual de Parquina foi calculada para cada amostra.¹⁹

Análise estatística

Os resultados de variáveis quantitativas foram descritos por medianas, valores mínimos, valores máximos e quartis. Variáveis qualitativas foram descritas por frequências e percentuais. Para a comparação de dois grupos em relação a variáveis qualitativas ordinais e quantitativas, foi usado o teste não-

paramétrico de Mann-Whitney. Em relação a variáveis qualitativas, essas comparações foram feitas considerando-se o teste exato de Fisher. Para avaliação da correlação entre duas variáveis quantitativas foi estimado o coeficiente de correlação de Spearman. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística. Os dados foram analisados com o programa computacional SPSS v.20.0

RESULTADOS

A tabela 1, apresenta a lista dos 29 casos de carcinomas de plexo coroide e 4 papilomas de plexo coroide, contendo os seguintes dados: sexo, idade, presença da mutação R337H e desfecho dos pacientes. Dentre os carcinomas de plexo coroide: 19 acometeram o sexo masculino (65,5%) e 22 crianças tinham até 3 anos de idade (81,5%). Obtivemos a informação de desfecho/sobrevida de 23 casos de carcinomas de plexo coroide, dos quais 13 (56,5%) evoluíram para o óbito, 2 (8,7%) estão vivos há mais de 1 ano, 5 (21,7%) há mais de 5 anos e 2 (8,7%) há mais de 10 anos.

A avaliação da mutação R337H foi possível em 20 CPC, estando presente em 13 pacientes, sendo que destes, apenas um era homozigoto (Tabela 1).

TABELA 1: Lista de pacientes com tumores de plexo coroide, diagnóstico, presença da mutação R337H e sobrevida/desfecho.

Paciente	Sexo/Idade	Diagnóstico	Mutação R337H (Tumor/ Sangue)	Mutação R337H (sangue pais)	Sobrevida/ desfecho
1	F/*	CPC	*	*	*
2	M/2a	CPC	*	*	*
3	F/7a	CPC	Normal	Normal	> 10 anos
4	M/*	PPC	Normal	Normal	> 10 anos
5	M/5m	CPC	*	*	*
6	F/8m	CPC	*	*	ÓBITO
7	M/10m	CPC	*	*	*
8	F/1a	CPC	*	*	*
9	M/16m	CPC	*	*	ÓBITO
10	M/1a	CPC	Normal	Normal	ÓBITO
11	M/11m	CPC	Normal	Normal	ÓBITO
12	F/10m	PPC	Normal	Normal	ÓBITO
13	M/3m	CPC	Normal	Normal	ÓBITO
14	M/1a	CPC	MUT	MUT	ÓBITO
15	F/5m	CPC	MUT	MUT	ÓBITO
16	M/10a	CPC	MUT	MUT	ÓBITO
17	F/3a	CPC	Normal	Normal	ÓBITO
18	M/10m	CPC	MUT	MUT	> 10 anos
19	M/2a	CPC	MUT	MUT	ÓBITO
20	M/3a	CPC	MUT	MUT	ÓBITO
21	M/4m	CPC	Normal	Normal	> 5 anos
22	M/4m	CPC	Normal	Normal	> 5 anos
23	M/6m	PPC	Normal	Normal	> 5 anos
24	M/3a	CPC	MUT	MUT	> 5 anos
25	F/17m	CPC	MUT	MUT	> 5 anos
26	M/4m	CPC	*	*	*
27	M/1a	CPC	MUT	MUT	ÓBITO
28	F/5a	CPC	MUT	MUT	> 5 anos
29	F/13a	CPC	MUT	MUT	ÓBITO
30	M/24a	PPC	Normal	Normal	> 5 anos
31	M/4a	CPC	MUT(Homozigoto)	MUT	> 1 ano
32	F/*	CPC	*	*	ÓBITO
33	M/8m	CPC	MUT	MUT	> 1 ano

Legenda: *Amostras com dados não disponíveis. CPC – Carcinomas de Plexo coroide. PPC- Papilomas de Plexo Coroide. MUT – mutado.

A comparação da expressão tecidual da parquina entre os papilomas e os carcinomas de plexo coroide não demonstrou diferença significativa entre os dois grupos, foi avaliada a positividade nuclear (escore de Allred), a positividade citoplasmática (escore de Allred) e análise morfométrica desta proteína (Tabela 2).

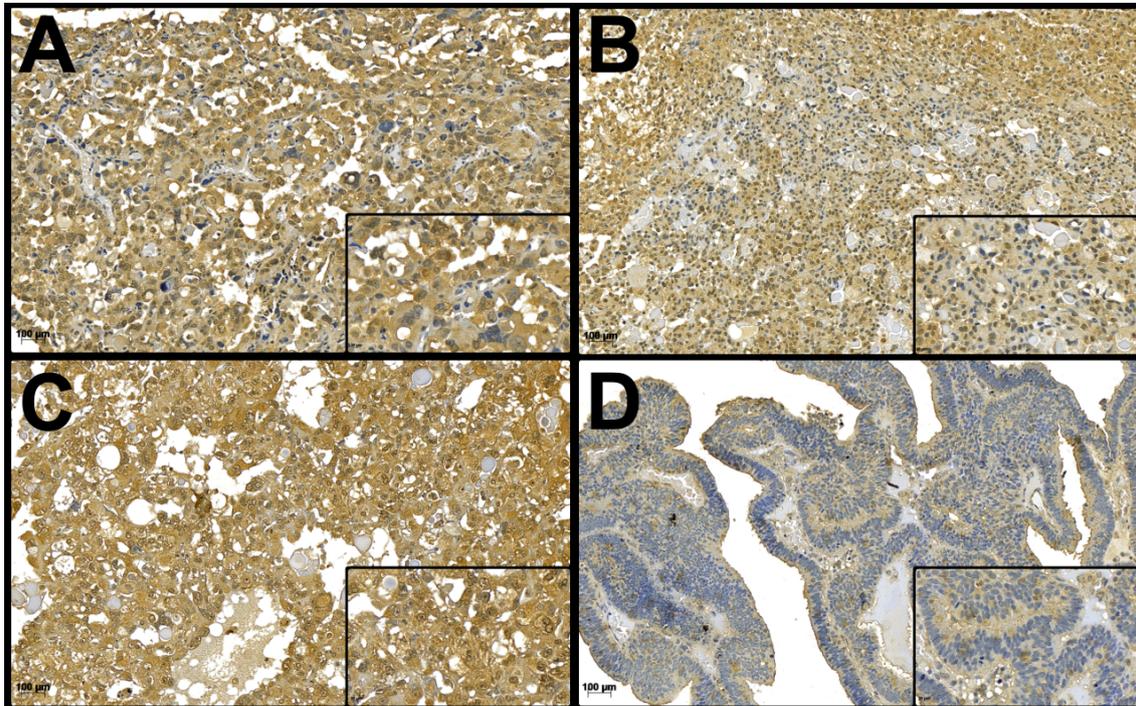
TABELA 2: Comparação da expressão imunohistoquímica tecidual da parquina entre papilomas e carcinomas de plexo coroide através dos métodos de escore de Allred e morfometria.

Variável	Diagnóstico	n	Mediana (mín/máx)	Valor de p^*
Parquina nuclear – (escore de Allred)*	CPC	29	8 (0/8)	0,613
	PPC	4	8 (7/8)	
Parquina citoplasmática – (escore de Allred)*	CPC	29	8 (6/8)	0,348
	PPC	4	8 (8/8)	
Parquina total em porcentagem por campo de médio aumento (Morfometria)	CPC	29	33,3 (0/50,8)	0,270
	PPC	4	41,6 (23,4/64,6)	

Legenda: * teste não-paramétrico de Mann-Whitney. CPC – Carcinomas de Plexo coroide. PPC- Papilomas de Plexo Coroide. Escore de Allred representa a soma dos escores de distribuição da imunopositividade com os escores de intensidade da imunopositividade.

A parquina está expressa no citoplasma e núcleo de todos papilomas de plexo coroide analisados. Embora a maioria dos carcinomas de plexo coroide apresentou expressão semelhante aos papilomas de plexo coroide, um caso foi negativo para parquina no núcleo (Figura 1)

FIGURA 1: Fotomicrografias da expressão citoplasmática e nuclear da parquima em carcinomas de plexo coroide (CPC).



Legenda: A-Imunopositividade forte da parquima no citoplasma das células tumorais de CPC (100x e 400x - detalhe). B-Imunopositividade fraca da parquima no citoplasma das células tumorais do CPC (100x e 400x - detalhe). C- Expressão tecidual positiva da parquima no núcleo das células tumorais de CPC (100x e 400x - detalhe). D- Expressão tecidual completamente negativa da parquima no núcleo das células neoplásicas de CPC (100x e 400x - detalhe).

A imunopositividade da parquina em carcinomas de plexo coroide pelo método semiquantitativo não apresentou diferenças estatisticamente significativas quando correlacionada com a presença/ausência da mutação R337H no gene *TP53*. Já quando comparamos a expressão tecidual de Parquina pelo método morfométrico, observamos que os casos com a mutação apresentam mais Parquina (tendência estatística $p = 0,097$). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas quando comparamos a imunopositividade de parquina com o desfecho dos pacientes (Tabela 3).

TABELA 3: Correlação da expressão tecidual de parquina em carcinomas de plexo coroide com a presença da mutação R337H no gene *TP53* e com o desfecho dos pacientes.

		Parquina Nuclear Escore de Allred		Parquina Citoplasmática Escore de Allred		Morfometria Porcentagem por Campo de Médio Aumento		
		N	Mediana (mín/ máx)	Valor de p^*	Mediana (mín/ máx)	Valor de p^*	Mediana (mín/ máx)	Valor de p^*
Mutação R337H	Presente	13	8 (8/8)	0,938	8 (8/8)	0,817	50 (38,3/ 43,8)	0,097
	Ausente	7	8 (8/8)		8 (8/8)		28,9 (19,1/28,4)	
Óbito	Não	9	8 (0/8)	0,643	8 (6/8)	0,829	26,2 (0/46,2)	0,926
	Sim	14	8 (6/8)		8 (6/8)		33,3 (0/50)	

Legenda: *Teste não-paramétrico de Mann-Whitney, $p < 0,05$. Escore de Allred representa a soma dos escores de distribuição da imunopositividade com os escores de intensidade da imunopositividade.

A Tabela 4 traz a avaliação da expressão da parquina, em conjunto com outros marcadores imunoistoquímicos, em carcinomas de plexo coroide. Observou-se uma correlação positiva entre a expressão tecidual citoplasmática de parquina e a expressão de Ciclina E1 (+42%; $p = 0,024$) e de p53R2 (+43%; $p = 0,019$). O mesmo não ocorreu quando avaliamos a expressão nuclear da parquina ou expressão da Ciclina D1 e p53.

TABELA 4: Correlação da expressão semiquantitativa tecidual da parquina com expressão semiquantitativa tecidual da Ciclina E1, Ciclina D1, p53 e p53R2 nos carcinomas de plexo coroide, pelo escore de Allred.

	Parquina nuclear Escore de Allred			Parquina citoplasmática Escore de Allred		
	N	*Coeficiente	Valor de <i>p</i>	N	*Coeficiente	Valor de <i>p</i>
CICLINA E1	29	0,18	0,353	29	0,42	0,024
CICLINA D1	29	0,14	0,475	29	0,12	0,534
p53	29	0,23	0,233	29	0,21	0,27
p53R2	29	0,36	0,256	29	0,43	0,019

Legenda: * Coeficiente de correlação de Spearman.

DISCUSSÃO

Neste estudo observacional foi relatada a expressão tecidual de parquina em células neoplásicas de tumores de plexo coroide, além das suas relações com a presença de mutação R337H no gene *TP53*, sobrevida/desfecho dos pacientes e imunoexpressão de Ciclina E1, Ciclina D1, p53 e p53R2.

Os tumores de plexo coroide são tumores do sistema nervoso central, afetando geralmente crianças muito pequenas.^{1,2,4} O carcinoma de plexo coroide corresponde à forma maligna desses tumores, ocorrendo na razão de 1:5 em relação aos papilomas em várias partes do mundo.^{5,6} Bleggi e colaboradores (2004) demonstraram uma inversão desta incidência nos casos de carcinoma de plexo coroide no sul do Brasil, correspondendo a 66,3% (24 carcinomas de plexo coroide em 38 tumores de plexo coroide analisados) dos casos de tumores de plexo coroide, na cidade de Curitiba.⁵

Neste estudo não foram observadas diferenças estatisticamente significativas quando comparamos a expressão de parquina entre carcinomas e papilomas de plexo coroide, sendo que a parquina não seria um bom biomarcador a ser utilizado para diferenciação diagnóstica entre estas duas neoplasias. Fato muito diferente foi encontrado por Taques e colaboradores em relação a expressão tecidual da p53 e a presença da mutação R337H, as quais são muito mais prevalentes em carcinomas do que papilomas de plexo coroide,

resultando em bons biomarcadores para diferenciação entre estas duas entidades.¹⁶

A nossa casuística conta com um escasso número de casos de papiloma de plexo coroide (n = 4), fato que é observado com mais frequência no sul do Brasil quando comparado com outras partes do mundo, provavelmente devido a mutação R337H do gene *TP53*.^{12,16} A mutação R337H causa uma perda de função da proteína p53, pois envolve a substituição de um aminoácido localizado no domínio de tetramerização, inativando esta etapa na proteína. A tetramerização da p53 é um passo essencial para sua transativação e consequente atuação como proteína pró apoptótica.²⁰ Em vista disto, os tumores de plexo coroide com a mutação R337H provavelmente se tornam mais agressivos precocemente, aumentando o risco de desenvolvimento de carcinomas de plexo coroide.^{12,16} Neste estudo realizamos nossas análises de expressão de parquina comparada com outras variáveis como presença de mutação R337H no gene *TP53*, relação com expressão de ciclinas e p53R2, e desfecho, apenas nos carcinomas de plexo coroide (n = 29).

Custodio e colaboradores (2011) observaram a presença da mutação R337H no gene *TP53* em 63% dos carcinomas de plexo coroide analisados no Sul do Brasil.^{12,21,22} Quando comparamos os pacientes com e sem mutação R337H no gene *TP53*, observamos que pacientes com esta mutação parecem ter mais Parquina (tendência estatística; $p = 0,097$). O *PRKN* é um gene supressor de tumor e a parquina parece estar intimamente envolvida com o controle do ciclo celular. Sendo assim, o aumento da expressão tecidual desta proteína nos casos com mutação no *TP53* pode estar associado a uma tentativa compensatória, uma vez que a principal proteína supressora de tumor, a p53, não está exercendo este papel pois está mutada.^{15,19,23,24,25,26,27,28,29}

Além disto, a proteína pró-apoptótica p53, tanto mutada quanto selvagem, quando em altas concentrações parece se tornar instável, fato este, que poderia ocasionar-lhe um ganho de função reversa anti-apoptótica por meio da inibição da caspase-9.^{20,30} Já tem sido descrito o acúmulo da p53 nas células de carcinoma de plexo coroide, com e sem mutação R337H, sendo que este acúmulo, poderia ocorrer por aumento da sua meia vida.^{12,16,20} Em vista disto, tanto a diminuição da sua transativação (perda da função pró-apoptótica)

ocasionada pela mutação R337H, como a sua instabilidade ocasionada pelo seu acúmulo (ganho da função anti-apoptótica) poderiam ser os responsáveis pelo descontrole do ciclo celular, o que ocasionaria o aumento compensatório da parkina nas células.²⁰

Estudos também tem relacionado a p53 com uma propriedade de cegar a proteína Bcl-xL, permitindo um aumento da ativação da proteína pró-apoptótica Bax, controlando o ciclo celular. A perda da função da p53 poderia manter a função da Bcl-xL, inibindo a apoptose e desregulando o ciclo celular. Por outro lado, o aumento dos níveis de parkina incrementam a degradação da Bcl-xL, mantendo o controle sobre o ciclo celular através do ganho de função apoptótica da Bax, já que esta é uma das funções desta proteína.^{20,24}

Outros autores, têm relatado uma função mitocondrial da p53 em regular a fosforilação oxidativa e defesa anti-oxidante, evitando stress oxidativo celular. Sendo assim, a p53 mutada poderia gerar uma deficiência da fosforilação oxidativa mitocondrial aumentando a glicólise e alterando o balanço oxidativo, gerando stress oxidativo celular (efeito Warburg). A parkina, por outro lado, foi recentemente descrita como uma reguladora do estresse oxidativo e da fosforilação mitocondrial. Os aumentos dos níveis de parkina correlacionados com a mutação R337H no gene *TP53* nos carcinomas de plexo coroide, neste estudo, pode também estar relacionada a este efeito.³¹

A função mais conhecida da parkina seria o seu controle sobre o ciclo celular através da ubiquitinação de ciclinas e sua conseqüente degradação pelo proteossoma. Em conformidade com o acima exposto, Gong e colaboradores descreveram em neoplasias de ovário e mama, uma correlação negativa entre parkina e ciclinas, isto é, uma diminuição da expressão de parkina relacionado a um aumento da expressão das Ciclinas D1 e E1. Já nos nossos casos de carcinomas de plexo coroide, encontramos uma correlação positiva entre a Ciclina E1 e a parkina citoplasmática (42%; $p = 0,024$). Sendo assim, uma explicação para os nossos achados, seria que nos casos de carcinomas de plexo coroide a parkina estaria exercendo uma função protetora, acumulando-se nas células neoplásicas a fim de degradar o excesso de Ciclina E1 que estaria estimulando a replicação celular.^{14,15,19,24,25,26}

Por outro lado, autores tem descrito uma função não protetora da parquina. A parquina seria responsável pela degradação da p21, a qual é bem conhecida como uma lentificadora de progressão do ciclo celular por meio de inibição de formação de complexos ativados de ciclinas. Sendo assim, altos níveis de parquina seriam responsáveis por baixos níveis de p21 e consequente aumento da velocidade de ciclagem da célula.³² Em vista disso, o aumento de parquina nos nossos casos de carcinoma de plexo coróide poderia estar levando a uma diminuição de p21 e consequentemente a um aumento da formação de complexos ativados de ciclina os quais aceleram o ciclo celular. Este fato poderia explicar a correlação positiva entre a expressão tecidual de parquina e ciclina E1, já que o anticorpo poderia se ligar tanto as ciclinas complexadas como as livres.

A alteração genética do *PRKN* é comum em muitas neoplasias em humanos e também na doença de Parkinson hereditária.^{33,34} No câncer, o gene *PRKN* está mutado e/ou deletado, sendo que a perda do número de cópias deste gene parece ser o modo de alteração primário. Gong e colaboradores (2014) examinaram o padrão de deleção do *PRKN* através de 4934 tumores abrangendo 11 tipos de câncer. A deleção focal da *PRKN* ocorreu em 11% dos tumores entre todas as linhagens e a perda de todo braço do cromossomo ocorreu em 19% das amostras, resultando numa taxa geral de 30% de perda. Deleções do *PRKN* são as mais comuns em tumores serosos do ovário, bexiga e carcinomas de mama (60%, 38% e 32% de taxa de deleção, respectivamente). Estes dados indicam que o *PRKN* é um dos genes mais frequentemente deletado no câncer humano.¹⁴ No nosso estudo, sabemos que há expressão tecidual de parquina em todos os casos de carcinomas de plexo coróide, com exceção de um caso que manteve a positividade citoplasmática, mas a nuclear estava completamente ausente (Figura 1). Porém não sabemos se esta proteína está mutada ou não, sendo esta uma das principais limitações deste estudo.

PRKN pode inibir a via de sinalização e crescimento celular conhecida como JAK2/STAT3/VEGF, regulando a rede de vias de proliferação celular, se tornando um supressor tumoral vital. Estudos têm indicado que depleção de *PRKN* promove a inativação de *PTEN*.³⁵ A inativação do gene *PTEN* tem sido encontrada em muitas linhagens tumorais em humanos. A inativação de *PTEN*

promove ativação dos sinais proliferativos das quinases, promovendo assim a sobrevivência de células neoplásicas, crescimento, estimulação de ciclo celular, angiogênese, síntese proteica entre outros processos celulares.^{26,35}

Encontramos a correlação positiva entre a parquina citoplasmática (43%; $p = 0,019$) e a proteína conhecida por p53R2. A p53R2 é uma proteína homóloga a RRM2, um dos componentes do sistema ribonucleotideo-redutase (RR), sendo que este sistema RR é composto por RRM1 (R1) e RRM2 (R2), que atuam associados no reparo do DNA. A presença da p53R2 em tumores é importante, pois a expressão da mesma é regulada por uma ligação com a p53, o que estimula sua transcrição, em resposta aos danos no DNA. A p53R2, sendo muito semelhante á RRM2, pode se associar-se a RRM1 e prover nucleotídeos para o reparo do DNA, principalmente nas fases G1 e G2 do ciclo celular.^{36,37,38} Zhang et al sugere que a p53R2 pode suprimir a proliferação de células cancerosas independente do estado da p53, desta forma se tornando uma peça chave na terapêutica contra o câncer, principalmente nos casos com mutação no gene *TP53*.³⁹ A correlação positiva entre a p53R2 e a parquina poderia indicar uma ação sinérgica protetora entre estas duas proteínas, principalmente considerando a quantidade de pacientes com mutação R337H no gene *TP53* entre os casos de carcinoma de plexo coroide. A ausência de p53R2 em indivíduos que evoluíram para o óbito já tem sido descrita em vários tumores.^{39,40} O nosso estudo anterior encontrou também uma correlação positiva entre a ausência da p53R2 em carcinomas de plexo coroide de pacientes que evoluíram para o óbito, confirmando a ação protetora da mesma.¹⁶

A imunopositividade da parquina em carcinomas de plexo coroide não apresentou significância estatística quando correlacionada com o desfecho de óbito dos pacientes. Silva-Camargo e colaboradores encontraram um cenário completamente diferente em carcinomas colônicos de alto grau, onde a maior expressão de parquina parece ter impacto na sobrevida destes pacientes.¹⁹

CONCLUSÃO

Em conclusão, este estudo aponta para uma possível ação protetora da parquina em conjunto com a p53R2 na tentativa de manutenção do controle do ciclo celular nos carcinomas de plexo coroide, especialmente em indivíduos com

p53 mutada. Entretanto, novos estudos são necessários para comprovar papel da parquina na oncogênese dos tumores de plexo coroide.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA:

1. HASSELBLATT M., MERTSH S., KOOS B., RIESMEIER B., STEGEMANN H., JEIBMANN A., TOMM M., SCHMITZ N., WRESW B., WOLFF J. E., ZHENG W., PAULUS W.; **Twist-1 is overexpressed in Neoplastic Choroid Plexus Epithelial Cells and Promotes Proliferation and Invasion.** Cancer Res, março (6), 2219-23, 2009.
2. KOOS B., PAULSSON J., JARVIUS M., SANCHEZ B. C., WREDE B., MERTSCH S., JEIBMANN A., KRUSE A., PETERS O., WOLFF J. E. A., GALLA H., SÖDERBERG O., PAULUS W., ÖSTMAN A., HASSELBLATT M.; **Platelet-Derived Growth Factor Receptor Expression and Activation in Choroid Plexus Tumors.** The American Journal of pathology, vol 175, outubro, 1631-37, 2009.
3. LAM, S.; LIN, Y.; CHERIAN, J.; QADRI, U.; HARRIS, D.A.; MELKONIAN, S.; JEA, A.; **Choroid Plexus Tumors in Children: A Population-Based Study,** Pediatric Neurosurgery, dezembro 4, p331-338, 2014.
4. TABORI U., SHLIEN A., BASKIN B., LEVITT S., RAY P., ALON N., HAWKINS C., BOUFFET E., PIENKOWSKA M., LAFAY-COUSIN L., GOZALI A., ZHUKOVA N., SHANE L., GONZALEZ I., FINLAY J., MALKIN D.; **TP53 Alterations Determine Clinical Subgroups and Survival of Patients with Choroid Plexus Tumors.** Journal of Clinical Oncology, março (22), 1-9, 2010.
5. BLEGGI-TORRES L.F., NORONHA L., SCHEFFEL D.L.H., PINHEIRO D.L., GUGELMIN E.; **Tumores de plexo coroide: estudo epidemiológico comparativo de 24 casos.** Arq. Neuropsiquiatr.,62(1), 127-130, 2004.
6. CROCKETTI E., TRAMA A., STILLER C., CALDARELLA A., SOFFIETTI R., JAAL J., WEBER D. C., RICARDI U. SLOWINSKI J., BRANDES A.; **Epidemiology of glial and non-glial brain tumours in Europe.** European Journal of Cancer, 48, 1532-1542, 2012.
7. TENA-SUCK M.L., SALINAS-LARA C., REMBAO-BOJÓRQUEZ D., CASTILLEJOS M., **Clinicopathologic and immunohistochemical study of choroid plexus tumors:single-institution experience em Mexican population.** J Neurooncol, 16 de janeiro de 2010, publicado online, 2010.
8. WREDE B., LIU J., WOLFF J.E.A.; **Chemotherapy improves the survival of patients with choroid plexus carcinomas: a meta-analysis of individual cases with choroid plexus tumors.** J.Neurooncol., junho , vol 85, 345-351, 2007.

9. ACHATZ M. I. W., OLIVER M., CALVEZ F. L., MARTEL-PLANCHE G., LOPES A., ROSSI B. M., ASHTON-PROLLA P., GIUGLIANI R., PALMERO E. I., VARGAS F. R., ROCHA J. C. C. D., VETTORE A. L., HAINAUT P.; **The TP53 mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-Like syndromes in Brazilian families.** Cancer Letters, 245, 96- 102, 2007.
10. FIGUEIREDO, B. C.; SANDRINI, R.; ZAMBETTI, G. P.; PEREIRA, R. M.; CHENG, C.; **Penetrance of Adrenocortical Tumors associated with germline TP53 R337H mutation.** J. Med. Genet., 91-96, 2006.
11. WHIBLEY C., PHAROAH P. D.P., HOLLSTEIN M.; **p53 polymorphisms: cancer implications.** Nature Reviews, 95-105, fevereiro, 2009.
12. CUSTODIO G., TAQUES G.R., FIGUEIREDO B. C., GUGELMIN E. S., FIGUEIREDO M. M. O., WATANABE F., PANTAROLO R., LALLI E., BLEGGI-TORRES L. F.; **Incrised Incidence of Choroid Plexus Carcinoma Due to the Germline TP53 R337H Mutation in Southern Brazil.** Plos One, 6, março, 1-7, 2011.
13. ACHATZ M. I., ZAMBETTI G.P.; **The Inherited p53 Mutation in Brazilian Population.** Cold Spring Harb Perspect Med 2015, pag.1-9.
14. GONG Y., ZACK T.I., MORRIS L. G.T., HUKKELHOVEN E., RAHEJA R., TAN I., VEERIAH S., MENG S., VIALE A., SCHUMACHER S. E., PALMEDO P., BEROUKHIM R., CHAN T. A. ; **Pan- cancer genetic analysis identifies PARK2 as a master regulator of G1/S cyclins.** Nature Genetics, p. 1-8, 2014.
15. KLIMCZAK, P. F.; VENTURY, D. H.; FAUCZ, F. R.; SETTAS, N.; SOUZA, C.M.; SOTOMAIOR, V.S.; **Association of a PARK2 Germline Variant abd Epithelial Ovarian Cancer in a Southern Brazilian Population,** Oncology, june 10, 1-5, 2016
16. TAQUES G. R., DE SOUZA C. M., GUGELMIN E. S., BEGNAMI M. D. F. S., CUSTÓDIO G., BLEGGI-TORRES L. F., FIGUEIREDO B. C., NORONHA L.; **Mutation of the TP53 Gene and Expression of the p53 and p53R2 Proteins in Choroid Plexus Carcinomas.** International Journal of Science and Research (IJSR) ISSN (Online): 2319-7064, 2017.
17. GUGELMIN E. S.; **Tumores do Plexo Coroide: Aplicação da técnica de *tissue microarray* (TMA) no estudo comparativo entre 36 carcinomas e 8 papilomas em crianças.** Tese de Doutorado, 2005.
18. ALLRED D. C.; HARVEY J.M.; BERARDO, M.; CLARK, G. M.; **Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis.** Modern Pathol, v. 11, p. 155-168, 1998.
19. DA SILVA-CAMARGO C. C. V., BALDIN R. K. S., COSTACURTA POLLI N. L., AGOSTINHO A. P., OLANDOSK M., DE NORONHA L., SOTOMAIOR V.

S.; **Parkin protein expression and its impact on survival of patients with advanced colorectal cancer.** *Cancer Biol Med.* 2018; 15:61-69.

20. CHEE J.L.Y., SANDI S., LANE D.P., LEONG S.M., NOLL J. E., NEILSEN P.M., PHUA Y.T., GABRA H., LIM T.M.; **Wild-type and mutant p53 mediate cisplatin resistance through interaction and inhibition of active caspase-9.** *Cell Cycle*, volume 12, 278-288, 2013

21. CUSTÓDIO G., PARISE G.A., KIESEL FILHO N., et al. **Impact of neonatal screening and surveillance for the TP53 R337H mutation on early detection of childhood adrenocortical tumors.** *J Clin Oncol.* 2013; 31:2619- 2626.

22. LV S., SONG Y., XU J., SHU H., ZHOU Z., AN N., HUANG Q., YANG H.; **A novel TP53 somatic mutation involved in the pathogenesis of pediatric choroid plexus carcinoma.** *Med sci Monit*, 18 (5), 37-41, 2012.

23. GAZOLI A. E., BRITT B., SHANE L., GONZALEZ I., GILLES F., MCCOMB J. G., KRIEGER M. D., LAVEY R. S., SHLIEN A., VILLABLANCA J. G., ERDREICH-EPSTEIN A., DHALL G., JUBRAN R., TABORI U., MALKIN D., FINLAY J. L.; **Choroid Plexus Tumors; Manegement, Outcome, and Associatiopn with the Li-Fraumeni Syndrome: The Children's Hospital Los Angeles (CHLA) Experience, 1991-2010.** *Pediatric Blood Cancer*, outubro, 905-909, 2012.

24. GONG, Y.; SCHUMACHER, S.; WU. W. H.; TANG, F.; BEROUKHIN, R.; CHAN. T. A.; **Pan-Cancer Analysis Links PARK2 to BCL-XL- Dependent Control of Apoptosis;** *Neoplasia*, volume 19, 75-83, 2017

25. LEE, S. B.; SHE, J.; DENG, B.; KIM, J.J.; ANDRADE, M.; NA, J.; WAMPER, J. A.; CUNNINGHAM, J.M.; WU,Y.; LIMPER, A. H.; AUBRY, M. C.; WENDT, C.; BITERMAN, P.; YANG, P.; LOU, .; **Multiple-level validation identify PARK2 in the development of lung cancer and chronic obstructive pulmonary disease,** *Oncotarget*, volume 7, No.28, 44211- 44223, 2016

26. LEI Z., DUAN H., ZHAO T., ZHANG Y., LI G., MENG J., ZHANG S., YAN W.; **PARK2 inhibits osteosarcoma cell growth through the JAK2/STAT3/VEGF signaling pathway;** *Cell Death and Disease* 9:375 DOI 10.1038/s41419-018-0401-8, 2018

27. LI T., KON N., TAN M., LUDWIG T., ZHAO Y., BAER R., GU W., **Tumor Suppression in the Absence of p53-Mediated Cell-Cycle Arrest, Apoptosis, and Senescence.** *Cell*, 149, junho, 1269-1283, 2012.

28. MULLER P.A., VOUSDEN K.H., NORMAN J.C., **p53 and its mutants in tumor cell migration and invasion.** *J Cell Biol.* 2011; 192:209-218.

29. TOMKOVA K., TOMKA M., ZAJAC V.; **Contribution of p53, p63 and p73 to developmental diseases and cancer.** Neoplasma, vol 55(3),177-181, 2008.
30. PARK J. H., WANG P.Y., HWANG P.M.; **Modeling the prevalent germline TP53 R337H mutation in mouse.** Oncotarget, 2019, volume 10, n°6, pag. 631-632.
31. LIANG Y., LIU J., FENG Z.; **The regulation of cellular metabolism by tumor suppressor p53.** Cell & Bioscience, 1-10, 2013.
32. PARK R., YUN J.S., PARK M. H., JUNG Y. Y., YEO I. J., NAM K.T., KIM H. D., SONG J. K., CHOI D.Y., PARK P., HAN S. H., YUN H. M., HONG J.T.; **Loss of parkin reduces lung tumor development by blocking p21 degradation.** Plos one, maio, 1-16, 2019.
33. VEERIAH, S.; ET AL.; **Somatic mutations of the Parkinson's disease-associated gene PARK2 in glioblastoma and other human malignancies;** Nature Genetics, 42, p. 77-82, 2010.
34. VEERIAH, S.; MORRIS, L., CHAN, T. A.; **The familial Parkinson disease gene PARK2 is multisite tumor suppressor on chromosome 6q25.2-27 that regulates cyclin.** Cell Cyclen 9, 1451-1452, 2010.
35. GUPTAA., ANJOMANI-VIRMOUNI S., KOUNDOUROS N., POULOGIANNIS G.; **PARK2 loss promotes cancer progression via redox-mediated inactivation of PTEN,** Molecular & Cellular Oncology, 2372-3556 (Online), dx.doi.org/10.1080/23723556.2017.1329692, maio, 2017.
36. HSU N.Y., WU J.Y., LIU X., et al. **Expression status of ribonucleotide reductase small subunits hRRM2/p53R2 as prognostic biomarkers in stage I and II non-small cell lung cancer.** Anticancer Res. 2011; 31:3475-34781.
37. CHANG L., ZHOU B., HU S., et al. **ATM-mediated serine 72 phosphorylation stabilizes ribonucleotide reductase small subunit p53R2 protein against MDM2 to DNA damage.** Proc Natl Acad Sci. 2008; 105:18519-18524.
38. MATSUSHITA S., IKEDAR., FUKUSHIGE T., et al. **p53R2 is a prognostic factor of melanoma and regulates proliferation and chemosensitivity of melanoma cells.** Journal of Dermatological Science. 2012; 68:19-24
39. ZHANG K., WU J., WU X., et al.; **p53R2 inhibits the proliferation of human cancer cells in association with cell-cycle arrest.** Mol Cancer Ther. 2011; 10:269-278.
40. YOUSEFI B., RAHMATI M., AHMADI Y.; **The roles of p53R2 in cancer progression based on the new function of mutant p53 and cytoplasmic p21.** Life Sci. 2014; 99:14- 17.

5 CONCLUSÃO

A parquina é uma proteína capaz de controlar uma série de proteínas ligadas ao ciclo celular, desta forma agindo como supressor tumoral. Dentro dos tumores de plexo coroide ela está expressa no núcleo e citoplasma, tanto dos carcinomas de plexo coroide, como nos papilomas de plexo coroide.

A expressão tecidual da parquina apresentou uma associação positiva com a Ciclina E1 e proteína p53R2.

A p53 e a Ciclina D1 não apresentaram associação significativa com a parquina.

Observamos uma tendência estatística de associação da expressão da parquina com a presença da mutação R337H no gene *TP53*, sendo que pacientes com a mutação parecem apresentar mais parquina.

Houve também uma associação entre a expressão tecidual de p53R2 e a sobrevida dos pacientes com CPC, sendo que todos os pacientes negativos para p53R2 foram a óbito.

Tanto a expressão de p53 como a presença da mutação R337H no gene *TP53* foram negativas nos seis papilomas estudados, sugerindo que estes dois biomarcadores possam ser usados no diagnóstico diferencial entre papilomas e carcinomas de plexo coroide.

Novos estudos são necessários envolvendo a parquina e o carcinoma de plexo coroide, para definir o papel desta molécula nas neoplasias de plexo coroide. Assim como, avaliar o seu potencial prognóstico e terapêutico.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA TESE

1. ACHATZ M. I. W., OLIVER M., CALVEZ F. L., MARTEL-PLANCHE G., LOPES A., ROSSI B. M., ASHTON-PROLLA P., GIUGLIANI R., PALMERO E. I., VARGAS F. R., ROCHA J. C. C. D., VETTORE A. L., HAINAUT P.; **The TP53 mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-Like syndromes in Brazilian families.** Cancer Letters, 245, 96- 102, 2007.
2. ALLRED D. C.; HARVEY J.M.; BERARDO, M.; CLARK, G. M.; **Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis.** Modern Pathol, v. 11, p. 155-168, 1998.
3. BLEGGI-TORRES L.F., URBAN L.A.B.D., ANTONIUK A., CARBONI P., RAMINA R., GUGELMIN E., **Carcinoma de plexo coroide: relato de quinze casos.** Arq Neuropsiquiatr (58), 505-511, 2000.
4. BLEGGI-TORRES L.F., NORONHA L., SCHEFFEL D.L.H., PINHEIRO D.L., GUGELMIN E.; **Tumores de plexo coroide: estudo epidemiológico comparativo de 24 casos.** Arq. Neuropsiquiatr.,62(1), 127-130, 2004.
5. CAMP, R. L.; CHARAETTE, L. A.; RIMM, D. L.; **Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma.** Lab. Invest., v. 80, p. 1943- 1949, 2000.
6. CHANG L., ZHOU B., HU S., et al. **ATM-mediated serine 72 phosphorylation stabilizes ribonucleotide reductase small subunit p53R2 protein against MDM2 to DNA damage.** Proc Natl Acad Sci. 2008; 105:18519-18524.
7. CHO E.C.; YEN Y.; **Novel regulators and molecular mechanisms of p53R2 and its disease relevance,** Biochimie 123, 81-84, 2016.
8. CROCKETTI E., TRAMAA., STILLER C., CALDARELLA A., SOFFIETTI R., JAAL J., WEBER D. C., RICARDI U. SLOWINSKI J., BRANDES A.; **Epidemiology of glial and non-glial brain tumors in Europe.** European Journal of Cancer, 48, 1532-1542, 2012.
9. CUSTÓDIO G., PARISE G.A., KIESEL FILHO N., et al. **Impact of neonatal screening and surveillance for the TP53 R337H mutation on early detection of childhood adrenocortical tumors.** J Clin Oncol. 2013; 31:2619-2626.
10. CUSTODIO G., TAQUES G.R., FIGUEIREDO B. C., GUGELMIN E. S., FIGUEIREDO M. M. O., WATANABE F., PANTAROLO R., LALLI E., BLEGGI-TORRES L. F.; **Increased Incidence of Choroid Plexus Carcinoma Due to the Germline TP53 R337H Mutation in Southern Brazil.** Plos One, 6, março, 1-7, 2011.
11. FIGUEIREDO, B. C.; SANDRINI, R.; ZAMBETTI, G. P.; PEREIRA, R. M.; CHENG, C.; **Penetrance of Adrenocortical Tumors associated with germline TP53 R337H mutation.** J. Med. Genet., 91-96, 2006.
12. FONTECAVE M., LEPROIVRE M., ELLEINGAND E., et al. Resveratrol, a remarkable inhibitor of ribonucleotide reductase. FEBS Lett. 1998; 421:277-279.
13. GONG Y., ZACK T.I., MORRIS L. G.T., HUKKELHOVEN E., RAHEJA R., TAN I., VEERIAH S., MENG S., VIALE A., SCHUMACHER S. E., PALMEDO P., BEROUKHIM R., CHAN T. A.; **Pan- cancer genetic analysis identifies PARK2 as a master regulator of G1/S cyclins.** Nature Genetics, p. 1-8, 2014.
14. GONG, Y.; SCHUMACHER, S.; WU. W. H.; TANG, F.; BEROUKHIN, R.; CHAN. T. A.; **Pan-Cancer Analysis Links PARK2 to BCL-XL- Dependent Control of Apoptosis;** Neoplasia, volume 19, 75-83, 2017

15. GUGELMIN E. S.; **Tumores do Plexo Coroide: Aplicação da técnica de *tissue microarray* (TMA) no estudo comparativo entre 36 carcinomas e 8 papilomas em crianças.** Tese de Doutorado, 2005.
16. GUPTA A., ANJOMANI-VIRMOUNI S., KOUNDOUROS N., POULOGIANNIS G.; **PARK2 loss promotes cancer progression via redox-mediated inactivation of PTEN**, *Molecular & Cellular Oncology*, 2372-3556 (Online), dx.doi.org/10.1080/23723556.2017.1329692, maio, 2017.
17. GUPTA N.; **Choroid plexus tumors in children.** *Neurosurg. Clin. N. Am.* (14), 621-631, 2003.
18. HASSELBLATT M., MERTSH S., KOOS B., RIESMEIER B., STEGEMANN H., JEIBMANN A., TOMM M., SCHMITZ N., WRESW B., WOLFF J. E., ZHENG W., PAULUS W.; **Twist-1 is overexpressed in Neoplastic Choroid Plexus Epithelial Cells and Promotes Proliferation and Invasion.** *Cancer Res*, março (6), 2219-23, 2009.
19. HASSELBLATT M., BOHM C., TATENHORST L., DINH V., NEWRZELLA D., KEYVANI K., JEIBMANN A., BUERGER H., RICKERT C. H., PAULUS W.; **Identification of Novel Diagnostic Markers for Choroid Plexus Tumors.** *Am J Surg Pathol*, janeiro (1),66-74, 2006.
20. HSU N.Y., WU J.Y., LIU X., et al. **Expression status of ribonucleotide reductase small subunits hRRM2/p53R2 as prognostic biomarkers in stage I and II non-small cell lung cancer.** *Anticancer Res.* 2011; 31:3475-34781.
21. HEDVAT, C. V.; HEGDE, A.; CHAGANTI, R. S. K.; CHEN, B.; QIN, J.; FILIPPA, D. A.; NIMER, S. D.; TERUYA-FELDSTEIN, J.; **Application of Tissue Microarray Technology to the Study of Non-Hodgkin's and Hodgkin's Lymphoma.** *Human Pathol.*, v. 33, p. 968-975, 2002.
22. KLIMCZAK, P. F.; VENTURY, D. H.; FAUCZ, F. R.; SETTAS, N.; SOUZA, C.M.; SOTOMAIOR, V.S.; **Association of a *PARK2* Germline Variant and Epithelial Ovarian Cancer in a Southern Brazilian Population**, *Oncology*, june 10, 1-5, 2016
23. KOOS B., PAULSSON J., JARVIUS M., SANCHEZ B. C., WREDE B., MERTSCH S., JEIBMANN A., KRUSE A., PETERS O., WOLFF J. E. A., GALLA H., SÖDERBERG O., PAULUS W., ÖSTMAN A., HASSELBLATT M.; **Platelet-Derived Growth Factor Receptor Expression and Activation in Choroid Plexus Tumors.** *The American Journal of pathology*, vol 175, outubro, 1631-37, 2009.
24. LAM, S.; LIN, Y.; CHERIAN, J.; QADRI, U.; HARRIS, D.A.; MELKONIAN, S.; JEA, A.; **Choroid Plexus Tumors in Children: A Population-Based Study**, *Pediatric Neurosurgery*, dezembro 4, p331-338, 2014.
25. LATRONICO A.C., PINTO E.M., DOMENICE S., et al. **An inherited mutation outside the highly conserved DNA-binding domain of the p53 tumor suppressor protein in children and adults with sporadic adrenocortical tumors.** *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86:4970-4973.
26. LEE, S. B.; SHE, J.; DENG, B.; KIM, J.J.; ANDRADE, M.; NA, J.; WAMPER, J. A.; CUNNINGHAM, J.M.; WU,Y.; LIMPER, A. H.; AUBRY, M. C.; WENDT, C.; BITERMAN, P.; YANG, P.; LOU, .; **Multiple-level validation identities *PARK2* in the development of lung cancer and chronic obstructive pulmonary disease**, *Oncotarget*, volume 7, No.28, 44211- 44223, 2016
27. LEI Z., DUAN H., ZHAO T., ZHANG Y., LI G., MENG J., ZHANG S., YAN W.; **PARK2 inhibits osteosarcoma cell growth through the**

JAK2/STAT3/VEGF signaling pathway; Cell Death and Disease 9:375 DOI 10.1038/s41419-018-0401-8, 2018

28. LI T., KON N., TAN M., LUDWIG T., ZHAO Y., BAER R., GU W., **Tumor Suppression in the Absence of p53-Mediated Cell-Cycle Arrest, Apoptosis, and Senescence.** Cell, 149, junho, 1269-1283, 2012.

29. LOUIS D.L.; OHGAKI H.; WIESTLER O.D.; CAVENEE W.K.; ELLISON D.W.; FIGARELLA-BRANGER D.; PERRY A.; REIFENBERGER G.; DEIMLING A.V.; WHO Classification of Tumours of the Central Nervus System. WHO 2016; 123-129.

30. LV S., SONG Y., XU J., SHU H., ZHOU Z., AN N., HUANG Q., YANG H.; **A novel TP53 somatic mutation involved in the pathogenesis of pediatric choroid plexus carcinoma.** Med sci Monit, 18 (5), 37-41, 2012.

31. MATSUSHITA S., IKEDA R., FUKUSHIGE T., et al. **p53R2 is a prognostic factor of melanoma and regulates proliferation and chemosensitivity of melanoma cells.** Journal of Dermatological Science. 2012; 68:19-24

32. MILANES-YEARSLEY, M.; ELIZABETH, M., HAMMOND, H.; PAJAK, T. F.; COOPER, J. S.; CHANG, C.; GRIFFIN, T.; NELSON, D. LARAMORE, G.; **Tissue Microarray: A cost and Time-Effective Method for Correlative Studies by Regional and National Cancer Center Study Groups.** Modern Pathol., v.15, p. 1366-1373, 2002.

33. NAKAMURA Y., **Isolation of p53-target genes and their functional analysis.** Cancer Sci. 2004; 95:7-11.

34. OKUMURA H., NATSUGOES S., YOKOMAKURA N., et al. **Expression of p53R2 is Related to Prognosis in Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma.** Clinical Cancer Res. 2006; 12:3740-3745.

35. PARK R., YUN J.S., PARK M. H., JUNG Y. Y., YEO I. J., NAM K.T., KIM H. D., SONG J. K., CHOI D.Y., PARK P., HAN S. H., YUN H. M., HONG J.T.; **Loss of parkin reduces lung tumor development by blocking p21 degradation.** Plos one, maio, 1-16, 2019.

36. PATRICK T. A., KRANZ D. M., DYKE T. E., ROY E.J.; **Folate receptors as potential therapeutic targets in choroid plexus tumors of SV40 transgenic mice.** Journal of Neuro-Oncology, volume 32, 111-123, 1997.

37. PONTARIN G., FERRARO P., HÅKANSSON P., et al. **p53R2- dependent ribonucleotide reduction provides deoxyribonucleotides in quiescent human fibroblasts in the absence of induced DNA damage.** J Biol Chem 2007; 282:16820-16828.

38. RIBEIRO R.C., SANDRINI F., FIGUEIREDO B., **An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma.** Proc Natl Acad Sci USA. 2001; 98:9330-9335.

39. RUBIN, M. A.; DUNN, R.; STRAWDERMAN, M.; PIENTA, K. J.; **Tissue Microarray Sampling Strategy for Prostatic Cancer Biomarker Analysis.** Moden Pathol., v. 26, p. 312-319, 2002.

40. SOUSSI T., LONZANO G.; **p53 mutation heterogeneity in cancer.** Biochem Biophys Res Commun. 2005;331:834- 842.

41. TABORI U., SHLIEN A., BASKIN B., LEVITT S., RAY P., ALON N., HAWKINS C., BOUFFET E., PIENKOWSKA M., LAFAY-COUSIN L., GOZALI A., ZHUKOVA N., SHANE L., GONZALEZ I., FINLAY J., MALKIN D.; **TP53 Alterations Determine Clinical Subgroups and Survival of Patients with Choroid Plexus Tumors.** Journal of Clinical Oncology, março (22), 1-9, 2010.

42. TENA-SUCK M.L., SALINAS-LARA C., REMBAO-BOJÓRQUEZ D., CASTILLEJOS M., **Clinicopathologic and immunohistochemical study of choroid plexus tumors: single-institution experience in Mexican population.** J Neurooncol, 16 de janeiro de 2010, publicado online, 2010.
43. VEERIAH, S.; ET AL.; **Somatic mutations of the Parkinson's disease-associated gene *PARK2* in glioblastoma and other human malignancies;** Nature Genetics, 42, p. 77-82, 2010.
44. VEERIAH, S.; MORRIS, L., CHAN, T. A.; **The familial Parkinson disease gene *PARK2* is multisite tumor suppressor on chromosome 6q25.2-27 that regulates cyclin.** Cell Cyclen 9, 1451-1452, 2010.
45. WOLFF J., SAJEDI M., COPPES M.J., EGELER R.M.; **Choroid plexus tumors.** British Journal of Cancer (87), 1086-1091, 2002.
46. WREDE B., LIU J., WOLFF J.E.A.; **Chemotherapy improves the survival of patients with choroid plexus carcinomas: a meta-analysis of individual cases with choroid plexus tumors.** J.Neurooncol., junho , vol 85, 345-351, 2007.
47. WHIBLEY C., PHAROAH P. D.P., HOLLSTEIN M.; **p53 polymorphisms: cancer implications.** Nature Reviews, 95-105, fevereiro, 2009.
48. YAMAGUCHI T., MATSUDA K., SAGIVA T., et al.; **p53R2- dependent pathway for DNA synthesis in a p53-regulated cell cycle checkpoint.** Cancer Res. 2001;61: 8256-8262.
49. YOUSEFI B., RAHMATI M., AHMADI Y.; **The roles of p53R2 in cancer progression based on the new function of mutant p53 and cytoplasmic p21.** Life Sci. 2014; 99:14- 17.
50. ZHANG K., WU J., WU X., et al.; **p53R2 inhibits the proliferation of human cancer cells in association with cell-cycle arrest.** Mol Cancer Ther. 2011; 10:269-278.