

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

MÁRIO HENRIQUE GIRÃO FARIA

ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO DAS ALTERAÇÕES  
MOLECULARES NOS TUMORES ASTROCÍTICOS:  
VIAS TUMORIGÊNICAS E INDICADORES DE RESISTÊNCIA

FORTALEZA – CEARÁ – BRASIL

2005

MÁRIO HENRIQUE GIRÃO FARIA

ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO DAS ALTERAÇÕES  
MOLECULARES NOS TUMORES ASTROCÍTICOS:  
VIAS TUMORIGÊNICAS E INDICADORES DE RESISTÊNCIA

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador:  
Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho

Co-Orientadora:  
Profa. Dra. Silvia Helena Barem Rabenhorst

FORTALEZA – CEARÁ – BRASIL

2005

F235e

Faria, Mário Henrique Girão

Estudo imuno-histoquímico das alterações moleculares nos tumores astrocíticos: vias tumorigênicas e indicadores de resistência / Mário Henrique Girão Faria. – Fortaleza, 2005.

188f. : il.

Orientador: Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho.

Co-Orientador: Dra. Silvia Helena Barem Rabenhorst.

Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Astrocitoma. 2. Marcadores moleculares. 3. Tumorigênese. 4. Resistência tumoral. I. Título.

CDD 617.481

**MÁRIO HENRIQUE GIRÃO FARIA**

**ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO DAS ALTERAÇÕES  
MOLECULARES NOS TUMORES ASTROCÍTICOS:  
VIAS TUMORIGÊNICAS E INDICADORES DE RESISTÊNCIA**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Aprovada em **03 de junho de 2005**.

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho**  
Orientador

Professor Adjunto IV - Departamento de Fisiologia e Farmacologia  
Universidade Federal do Ceará - UFC

---

**Profª. Dra. Silvia Helena Barem Rabenhorst**  
Co-Orientador

Professor Adjunto IV - Departamento de Patologia e Medicina Legal  
Universidade Federal do Ceará - UFC

---

**Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro**

Professor Adjunto IV - Departamento de Fisiologia e Farmacologia  
Universidade Federal do Ceará - UFC

---

**Profª. Dra. Leila Maria Cardão Chimelli**

Professor Titular - Departamento de Patologia  
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Ao meu grande sonho, a **NEUROCIRURGIA**,  
na intenção de que essa pesquisa configure  
mais um passo em sua direção.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos **PACIENTES** portadores de neoplasias cerebrais, fontes do precioso material de estudo, indivíduos que consistem no princípio e fim desta investigação.

Ao **Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho**, pela confiança a mim concedida, além da amizade sincera e do incentivo constante.

A **Profa. Dra. Silvia Helena Barem Rabenhorst**, pela dedicação, pelo carinho e pelo empenho na formatação e execução desta pesquisa, assim como na minha formação científica.

A **Profa. Dra. Leila Maria Cardão Chimelli**, pela honrosa participação na Banca Examinadora.

Ao **Prof. Dr. Ronaldo Albuquerque Ribeiro**, pelo exemplo encorajador de conciliação entre a pesquisa básica e a prática oncológica.

Ao **Prof. Dr. Carlos Maurício de Castro Costa**, pela influência exercida, mesmo que indiretamente, sobre minha formação como pesquisador e admirador da neurociência.

A **Profa. Dra. Régia Maria do Socorro Vidal do Patrocínio**, pela inestimável colaboração, pela amizade e pelos ensinamentos em neuropatologia.

Ao Acadêmico de Medicina **Bronner Pamplona Augusto Gonçalves**, pelo devotamento no auxílio aos procedimentos experimentais e pela amizade fraterna.

Ao **Prof. Dr. Fernando de Carvalho Gomes**, pela atenção, pela paciência e pelo empenho dispensados durante a avaliação dos dados deste ensaio.

Aos diretores e amigos do **Laboratório BIOPSE<sup>®</sup>**, pelo acesso irrestrito aos arquivos histopatológicos e pelo apoio técnico na confecção das lâminas.

Aos **Neurocirurgiões**, aqui representados pelo **Prof. Dr. José Arnaldo Motta de Arruda**, pela coleta dos tumores – muitas vezes o único recurso terapêutico e fonte indissociável do material estudado.

Ao **Departamento de Patologia e Medicina Legal - UFC**, pelo assentimento no fornecimento de tecidos-controle para os experimento, pelo custeio de parte do material de consumo em histologia e pelo carinho sempre dispensado por parte de professores, residentes e funcionários.

Aos amigos do **Laboratório de Genética Molecular – LABGEM**, pelo apoio, pelo companheirismo e pelo incentivo nos momentos de insegurança.

Aos professores e pesquisadores do **Laboratório de Oncologia Experimental – LOE**, pela introdução ao estudo do câncer e da prática laboratorial.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**, representado pelos eminentes **docentes** e pelos estimados colegas **discentes**, pelo acolhimento e pela dedicação na formação científica de seus pós-graduandos.

As funcionárias **Silvia Maria Azevedo Lima, Aura Rhanes Farias Nogueira, Maria Rosilene Matias Ferreira, Flávia Maria Martins Aguiar e Maria Teresa Rocha**, pelos incontáveis e prestimosos auxílios.

A **Tânia Maria Galdino de Souza e Margareth Gonçalves Maia** pela dedicação, pelo esmero e pela prontidão no preparo dos cortes histológicos.

A **BIOGEN<sup>®</sup>**, representante da **DakoCytomation<sup>®</sup>** no Brasil, pelo apoio técnico e pelo fornecimento de parte dos anticorpos.

Ao **Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq**, pelo financiamento parcial desta pesquisa.

A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES**, pelo crédito a mim ofertado no Curso de Mestrado.

A minha **Família**, pela oportunidade de realizar meus estudos, mesmo transpondo inúmeros obstáculos, e pela inspiração vocacional.

Ao amigo **Marco Aurélio Rabenhorst Saliba**, pela prontidão na assistência quanto ao uso da língua inglesa.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

A **DEUS**, pelo dom da ciência, pela dádiva da habilidade médica, pela esperança nos meus sonhos e pelo discernimento ofertado nas horas extenuantes.



*“Houve um tempo em que se fazia ciência  
a partir de quatro elementos:  
água, terra, fogo e ar.  
Naquele tempo não se sabia que é possível  
fazer qualquer coisa com apenas dois:  
vontade e imaginação.”*

***Martha Reis***

## RESUMO

O presente estudo objetivou avaliar a expressão de genes envolvidos no processo tumorigênico e nos mecanismos de quimiorresistência dos tumores astrocíticos. Procedeu-se análise clínico-epidemiológica, avaliação histopatológica e estudo imuno-histoquímico das proteínas Ki-67, c-Myc, GFAP, p53, p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, p27<sup>KIP1</sup>, Bcl-2, Bax, EGFR, erbB-2, p21<sup>Ras</sup>, MGMT, GST $\pi$ , TS e TopoII $\alpha$  pelo método da estreptoavidina-biotina-peroxidase em 55 astrocitomas de diferentes gradações (OMS) (13 grau I, 14 grau II, 7 grau III e 21 grau IV) e 05 amostras de tecido cerebral não-tumoral (grupo controle). A distribuição por idade, por sexo e pela localização tumoral dos portadores dessas neoplasias reproduziu, de um modo geral, as tendências mundiais. Os achados histopatológicos avaliados segundo critérios semiquantitativos confirmaram os parâmetros de classificação dos astrocitomas estabelecidos pela OMS. A marcação para o antígeno Ki-67 aumentou conforme a progressão dos tumores astrocíticos, sendo que sua detecção em mais de 8,0% das células tumorais distinguiu os Astrocitomas Grau IV, índices entre 1,5 e 8,0% diferenciaram os Astrocitomas Grau III e valores abaixo de 1,5% discriminaram os tumores de baixo grau (I e II). A expressão das proteínas TopoII $\alpha$  e c-Myc (nuclear) demonstraram associação com a proliferação celular nos astrocitomas, todavia de maneira não exclusiva. A positividade citoplasmática para proteína c-Myc foi maior entre os tumores de alto grau (71,43%), com escores de expressão máximos nos Astrocitomas Grau IV (LI médio=15,57; H médio=24,42). Em média, 76,9% das células tumorais dos Astrocitomas Grau IV manifestaram moderada positividade para GFAP. A positividade e os escores de marcação para as proteínas p53 e p27<sup>KIP1</sup> (nuclear e citoplasmática) demonstraram tendência de aumento conforme a progressão dos tumores astrocíticos, enquanto a detecção do p21<sup>WAF1/CIP1</sup> mostrou orientação oposta (exceto no grau IV). A porcentagem de tumores positivos para Bcl-2 e Bax aumentou conforme a gradação dos astrocitomas, com positividade geral de 43,26% e 24,67%, respectivamente. Os escores de marcação para Bcl-2 demonstraram propensão ao acréscimo segundo a evolução tumoral, enquanto os índices para Bax foram semelhantes nas diversas gradações. A expressão da proteína erbB2 foi evidenciada apenas entre os Astrocitomas Grau IV (positividade=14,28%), enquanto a superexpressão da proteína EGFR destacou-se nos tumores astrocíticos dos graus I e IV, com respectivamente 46,15% e 61,90% de casos positivos. A detecção da proteína p21<sup>Ras</sup> foi preponderante entre os Astrocitomas Grau II (positividade=37,71%), estando ausente nos tumores de alto grau (III e IV). A superexpressão do EGFR e a mutação do p53 configuraram eventos mutuamente exclusivos nos astrocitomas, assim como a superexpressão da proteína p21<sup>Ras</sup> e dos receptores da família ErbB. Constatou-se elevada positividade para as enzimas GST $\pi$ , TS e MGMT nos tumores astrocíticos. Os índices de expressão da MGMT mostraram-se elevados e constantes entre as diferentes categorias histológicas, incluindo os espécimes não-tumorais (LI médio=69,43). Os escores para GST $\pi$  demonstraram tendência à redução de acordo com evolução maligna dos astrocitomas, enquanto os índices para TS atingiram níveis mais elevados entre os Astrocitomas Grau IV (H médio=63,33). A positividade para enzima TopoII $\alpha$  apresentou propensão ao aumento conforme a progressão dos tumores astrocíticos, ao passo que os escores de marcação foram semelhantes nos astrocitomas dos graus II, III e IV (LI médio=27,71). Os resultados obtidos pela corrente investigação apontaram o antígeno Ki-67 como o melhor marcador de proliferação celular nos tumores astrocíticos. A mutação do p53 configurou evento inicial, relevante e potencialmente indicador de progressão tumoral nos astrocitomas. A detecção do supressor tumoral p21<sup>WAF1/CIP1</sup> representou importante recurso para a dedução da situação funcional do gene p53, enquanto a ativação funcional do p27<sup>KIP1</sup> não foi comprometida pelo processo tumorigênico nos astrocitomas. A relação Bcl-2/Bax nos astrocitomas revelou a crescente orientação à sobrevida celular conforme a evolução maligna desses tumores. A superexpressão da proteína p21<sup>Ras</sup> destacou-se como um evento molecular típico do grau II e virtual indicador de não-progressão tumoral. O acúmulo citoplasmático da proteína c-Myc configurou fenômeno inicial e significativo na tumorigênese dos astrocitomas, sendo reflexo direto da expressão nuclear do gene c-myc e da malignidade tumoral. A análise conjunta dos marcadores moleculares investigados confirmou a mutação do gene p53 como a principal via tumorigênica dos astrocitomas, ainda que a superexpressão do EGFR tenha sido a alteração predominante nos tumores do grau IV e a expressão do gene c-myc tenha representado uma via molecular distinta e alternativa às demais nas diferentes gradações tumorais. A marcante presença das enzimas MGMT, GST $\pi$  e TS configurou virtual indicação de quimiorresistência para diversos agentes antineoplásicos, enquanto a elevada expressão da TopoII $\alpha$  revelou esta enzima como potencial alvo terapêutico nos tumores astrocíticos.

Palavras-Chave: astrocitoma; imuno-histoquímica; marcadores moleculares; tumorigênese; resistência tumoral.

## ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the expression of genes involved in the tumorigenic process and in the chemoresistance mechanisms of the astrocytic tumors. A clinical and epidemiological analysis, histopathological evaluation and immunohistochemical study of the proteins Ki-67, c-Myc, GFAP, p53, p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, p27<sup>KIP1</sup>, Bcl-2, Bax, EGFR, erbB-2, p21<sup>Ras</sup>, MGMT, GST $\pi$ , TS and TopoII $\alpha$  using streptoavidin-biotin-peroxidase method were performed in 55 different graduations of astrocytomas (WHO) (13 grade I, 14 grade II, 7 grade III, 21 grade IV) and 05 samples of non-tumoral tissue (control group). The distribution by age, sex and tumoral localization of astrocytomas patients in Fortaleza reproduced, in a general way, the worldwide trends. The histopathological findings evaluated with semiquantitative criteria confirmed the classification parameters for astrocytomas established by WHO. The stain for Ki-67 antigen increased as according to astrocytic tumors progression; its detection in more than 8.0% of the tumoral cells distinguished Astrocytomas Grade IV, labeled index between 1.5 and 8.0% differentiated Astrocytomas Grade III and values below 1.5% discriminated low-grade tumors (I and II). The TopoII $\alpha$  and c-Myc (nuclear) expression demonstrated association with cellular proliferation in astrocytomas, however not in a exclusive way. The c-Myc protein cytoplasmic positive index was bigger among high-grade tumors (71.43%), with maximum expression scores in Astrocytomas Grade IV (LI mean=15.57; H mean=24.42). In general, 76.9% of the Astrocytomas Grade IV tumoral cells revealed moderate positive index for GFAP. The positive index and expression scores for p53 and p27<sup>KIP1</sup> (nuclear and cytoplasmic) proteins showed a tendency to increase with the astrocytic tumors progression, while the p21<sup>WAF1/CIP1</sup> tumor suppressor detection demonstrated opposite orientation (except in grade IV). The percentage of Bcl-2 and Bax positive tumors increased in accordance with histological grade of astrocytomas, with general positive index of 43.26% and 24.67%, respectively. Bcl-2 staining scores demonstrated propensity to addition according to tumoral evolution, while the scores for Bax was similar in all graduations. The erbB2 protein expression was evidenced only between Astrocytomas Grade IV (positive index=14.28%), while the overexpression of EGFR protein was distinguished in grade I and IV astrocytic tumors, with respectively 46.15% and 61.90% of positive cases. p21<sup>Ras</sup> protein detection was preponderant in Astrocytomas Grade II (positive index=37.71%), being absent in high-grade tumors (III and IV). The EGFR overexpression and p53 mutation configured mutually exclusive events in astrocytomas tumorigenesis, as well as p21<sup>Ras</sup> protein and ErbB receptors family overexpression. High positive index for enzymes MGMT, GST $\pi$  and TS was evidenced in astrocytic tumors. MGMT expression scores were high and constant among different histological categories, including non-tumoral specimens (LI mean = 69.43). GST $\pi$  scores demonstrated tendency to reduction in accordance with malignant evolution of astrocytomas, while the values for TS reached higher levels on Astrocytomas Grade IV (H mean=63.33). TopoII $\alpha$  positive index demonstrated inclination to augment in agreement with the progression of astrocytic tumors, whereas the staining scores had been similar in grade II, III and IV astrocytomas (LI mean=27.71). The results obtained by current investigation indicated Ki-67 antigen as the best cell proliferation marker. The p53 mutation configured an initial and relevant event in astrocytomas, as well as potential indicative of tumor progression. p21<sup>WAF1/CIP1</sup> tumor suppressor detection represented important resource for deduction of functional situation of p53 gene, while the p27<sup>KIP1</sup> functional activation was not compromised by astrocytomas tumorigenic process. Astrocytomas Bcl-2/Bax ratio denoted increasing of cellular survival orientation in accordance with malignant evolution of these tumors. p21<sup>Ras</sup> protein overexpression was distinguished as a grade II typical molecular event and a virtual marker of tumor not-progression. c-Myc protein cytoplasmic accumulation configured initial and significant phenomenon in astrocytomas tumorigenesis, being a direct reflex of the nuclear expression of c-myc gene and the tumoral malignance. The combined analysis of the investigated molecular markers confirmed p53 gene mutation as the main tumorigenic pathway of astrocytomas, even though EGFR overexpression has been the predominant alteration in grade IV tumors and the c-myc gene expression has represented a distinct and alternative molecular pathway to different tumor graduations. The remarkable presence of MGMT, GST $\pi$  and TS enzymes configured virtual indication of chemoresistance for many antineoplastic agents, while the high expression of TopoII $\alpha$  revealed this enzyme as a potential therapeutic target in the astrocytic tumors.

**Key Words:** astrocytoma; immunohistochemistry; molecular markers; tumorigenesis; tumoral resistance.

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 01</b>	Representação esquemática do fluxo “normal” da informação celular.	pág. <b>026</b>
<b>FIGURA 02</b>	Representação esquemática da regulação do ciclo celular.	pág. <b>028</b>
<b>FIGURA 03</b>	Representação esquemática das vias apoptóticas mediadas pela ativação do receptor CD95/FAS.	pág. <b>031</b>
<b>FIGURA 04</b>	Distribuição percentual dos tumores primários do SNC diagnosticados nos EUA no período de 1995 a 1999 segundo a histopatologia (n=37.788).	pág. <b>035</b>
<b>FIGURA 05</b>	Ilustração representativa da interação entre as células gliais (astrócitos e oligodendrócitos) e os neurônios.	pág. <b>035</b>
<b>FIGURA 06</b>	Histopatologia dos tumores astrocíticos (HE, 400X).	pág. <b>040</b>
<b>FIGURA 07</b>	Características histopatológicas dos Astrocitomas Grau IV (Glioblastoma Multiforme).	pág. <b>041</b>
<b>FIGURA 08</b>	Estudos tomográficos por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) representativos dos tumores astrocíticos.	pág. <b>042</b>
<b>FIGURA 09</b>	Diagrama representativo das alterações genéticas envolvidas na progressão maligna dos astrocitomas.	pág. <b>049</b>
<b>FIGURA 10</b>	Expressão de GFAP detectada por imuno-histoquímica (400X).	pág. <b>052</b>
<b>FIGURA 11</b>	Representação simplificada da atuação das proteínas da família bcl-2 na regulação da cascata apoptótica mitocondrial.	pág. <b>056</b>
<b>FIGURA 12</b>	Representação esquemática dos subtipos e do mecanismo de ativação dos receptores ErbB.	pág. <b>057</b>
<b>FIGURA 13</b>	Modelo esquemático da atuação das proteínas Ras “normal” (A) e mutante (B) na sinalização intracelular.	pág. <b>059</b>
<b>FIGURA 14</b>	Estrutura, funções e ligantes da proteína c-Myc.	pág. <b>061</b>
<b>FIGURA 15</b>	Representação parcial e simplificada da atuação do c-myc nas vias moleculares reguladoras do ciclo celular em organismos.	pág. <b>063</b>
<b>FIGURA 16</b>	Vias apoptóticas mediadas pela proteína c-Myc.	pág. <b>064</b>

<b>FIGURA 17</b>	Modelo esquemático da regulação e do mecanismo de ação da Glutationa-S-Transferase (GST).	pág. <b>066</b>
<b>FIGURA 18</b>	Mecanismo de inibição da Timidilato Sintase pelo 5-Fluorouracil.	pág. <b>068</b>
<b>FIGURA 19</b>	Representação esquemática do mecanismo de ação da O <sup>6</sup> -Metilguanossina-DNA-Metiltransferase (MGMT).	pág. <b>069</b>
<b>FIGURA 20</b>	Representação do mecanismo de descompactação das fitas de DNA catalisada pela enzima DNA Topoisomerase II (TopoII).	pág. <b>069</b>
<b>FIGURA 21</b>	Modelo esquemático de uma árvore de decisão.	pág. <b>073</b>
<b>FIGURA 22</b>	Distribuição quantitativa dos casos (não-tumoral e astrocitomas) selecionados para o estudo segundo a classificação histológica (n=60).	pág. <b>086</b>
<b>FIGURA 23</b>	Distribuição quantitativa dos casos (não-tumoral e astrocitomas) selecionados para o estudo segundo a faixa etária dos pacientes (n=60).	pág. <b>086</b>
<b>FIGURA 24</b>	Distribuição percentual dos astrocitomas avaliados segundo o sexo dos pacientes (n=55).	pág. <b>086</b>
<b>FIGURA 25</b>	Distribuição percentual dos astrocitomas avaliados segundo a localização tumoral (n=55).	pág. <b>087</b>
<b>FIGURA 26</b>	Médias dos escores atribuídos aos parâmetros histopatológicos segundo a classificação histológica dos casos avaliados.	pág. <b>088</b>
<b>FIGURA 27</b>	Médias dos escores atribuídos à presença de células gigantes e de gemistócitos segundo a classificação histológica dos casos avaliados.	pág. <b>088</b>
<b>FIGURA 28</b>	Árvore de decisão fornecida pelo método CART referente à análise dos parâmetros histopatológicos de acordo com a classificação histológica dos casos avaliados.	pág. <b>089</b>
<b>FIGURA 29</b>	Expressão dos marcadores de proliferação celular Ki-67 [a, b, c, d] e Topoisomerase II $\alpha$ [e, f] detectada por imuno-histoquímica (400X).	pág. <b>090</b>
<b>FIGURA 30</b>	Expressão de c-Myc detectada por imuno-histoquímica (400X).	pág. <b>091</b>
<b>FIGURA 31</b>	Percentuais de positividade imuno-histoquímica para os marcadores relacionados à proliferação celular Ki-67, TopoII $\alpha$ e c-Myc (nuclear) segundo a classificação histológica dos casos avaliados.	pág. <b>091</b>

<b>FIGURA 32</b>	Médias dos escores atribuídos aos parâmetros relacionados à proliferação celular [índice mitótico, Ki-67 (LI), TopoII $\alpha$ (LI), c-Myc nuclear (LI)] segundo a classificação histológica dos casos avaliados.	pág. <b>092</b>
<b>FIGURA 33</b>	Árvore de decisão fornecida pelo método CART referente à análise da expressão do antígeno Ki-67 detectada por imuno-histoquímica de acordo com as diferentes gradações dos astrocitomas avaliados.	pág. <b>093</b>
<b>FIGURA 34</b>	Médias dos escores atribuídos à expressão de GFAP detectada por imuno-histoquímica segundo a classificação histológica dos casos avaliados.	pág. <b>093</b>
<b>FIGURA 35</b>	Expressão dos supressores tumorais p53 [a, b], p21 [c] e p27 [d] detectada por imuno-histoquímica (400X).	pág. <b>095</b>
<b>FIGURA 36</b>	Percentuais de positividade imuno-histoquímica para os supressores tumorais p53, p21 e p27 (nuclear) segundo a classificação histológica dos casos avaliados.	pág. <b>095</b>
<b>FIGURA 37</b>	Médias dos escores atribuídos à expressão dos supressores tumorais [p53 (LI), p21 (LI) e p27 nuclear (LI)] detectada por imuno-histoquímica segundo a classificação histológica dos casos avaliados.	pág. <b>096</b>
<b>FIGURA 38</b>	Distribuição percentual das diferentes gradações dos astrocitomas segundo a relação entre a expressão imuno-histoquímica das proteínas p53 e p21.	pág. <b>096</b>
<b>FIGURA 39</b>	Percentuais de positividade imuno-histoquímica para o supressor tumoral p27 (nuclear e citoplasmático) segundo a classificação histológica dos casos avaliados.	pág. <b>097</b>
<b>FIGURA 40</b>	Médias dos escores atribuídos à expressão de p27 nuclear (LI) e citoplasmático (LI e H) detectada por imuno-histoquímica segundo a classificação histológica dos casos avaliados.	pág. <b>097</b>
<b>FIGURA 41</b>	Expressão dos supressores tumorais p53 [a], p21 [b] e p27 [c] detectada por imuno-histoquímica (400X).	pág. <b>098</b>
<b>FIGURA 42</b>	Expressão dos marcadores relacionados à apoptose Bax [a, b, c] e Bcl-2 [d, e, f] detectada por imuno-histoquímica (400X).	pág. <b>099</b>
<b>FIGURA 43</b>	Percentuais de positividade imuno-histoquímica para Bcl-2 e Bax segundo a classificação histológica dos casos avaliados.	pág. <b>099</b>

<b>FIGURA 44</b>	Médias dos escores atribuídos à expressão de Bcl-2 e Bax (LI e H) detectada por imuno-histoquímica segundo a classificação histológica dos casos avaliados.	pág. <b>100</b>
<b>FIGURA 45</b>	Distribuição percentual das diferentes classificações histológicas segundo a tendência à sobrevida estimada pelo balanço entre a expressão de Bcl-2 e Bax detectada por imuno-histoquímica.	pág. <b>101</b>
<b>FIGURA 46</b>	Expressão dos receptores de membrana EGFR [a, b, c] e ErbB2 [d] detectada por imuno-histoquímica.	pág. <b>102</b>
<b>FIGURA 47</b>	Percentuais de positividade imuno-histoquímica para EGFR e ErbB2 segundo a classificação histológica dos casos avaliados.	pág. <b>102</b>
<b>FIGURA 48</b>	Médias dos escores atribuídos à expressão de EGFR (H) e ErbB2 (H) detectada por imuno-histoquímica segundo a classificação histológica dos casos avaliados.	pág. <b>103</b>
<b>FIGURA 49</b>	Distribuição percentual das diferentes gradações dos astrocitomas segundo a situação funcional dos genes p53 e EGFR estimada pela detecção imuno-histoquímica de suas respectivas proteínas.	pág. <b>104</b>
<b>FIGURA 50</b>	Expressão de Ras detectada por imuno-histoquímica (400X).	pág. <b>104</b>
<b>FIGURA 51</b>	Percentual de positividade imuno-histoquímica para p21 <sup>ras</sup> segundo a classificação histológica dos casos avaliados.	pág. <b>105</b>
<b>FIGURA 52</b>	Médias dos escores atribuídos à expressão de Ras (LI e H) detectada por imuno-histoquímica segundo a classificação histológica dos casos avaliados.	pág. <b>106</b>
<b>FIGURA 53</b>	Expressão de c-Myc detectada por imuno-histoquímica (400X).	pág. <b>106</b>
<b>FIGURA 54</b>	Percentuais de positividade imuno-histoquímica para o fator de transcrição c-Myc (nuclear e citoplasmático) segundo a classificação histológica dos casos avaliados.	pág. <b>107</b>
<b>FIGURA 55</b>	Médias dos escores atribuídos à expressão de c-Myc detectada por imuno-histoquímica segundo a classificação histológica dos casos avaliados.	pág. <b>107</b>
<b>FIGURA 56</b>	Percentuais de concordância (+/+ ou -/-) e concomitância (+/+) entre as marcações nuclear e citoplasmática para c-Myc detectadas por imuno-histoquímica segundo a classificação histológica dos astrocitomas avaliados.	pág. <b>108</b>

- FIGURA 57** Distribuição percentual das diferentes gradações dos astrocitomas segundo o principal evento tumorigênico (mutação do p53, superexpressão do EGFR, expressão de c-Myc) estimado pela detecção imuno-histoquímica das proteínas correlatas. pág. **109**
- FIGURA 58** Expressão das enzimas relacionados à quimiorresistência GST $\pi$  [a, b], TS [c, d] e MGMT [e, f] detectada por imuno-histoquímica (400X). pág. **110**
- FIGURA 59** Percentuais de positividade imuno-histoquímica para as enzimas MGMT, GST $\pi$ , TopoII $\alpha$  e TS segundo a classificação histológica dos casos avaliados. pág. **111**
- FIGURA 60** Médias dos escores atribuídos à expressão das enzimas relacionadas à quimiorresistência [MGMT (LI), GST $\pi$  (LI), TopoII $\alpha$  (LI) e TS (LI e H)] detectada por imuno-histoquímica segundo a classificação histológica dos casos avaliados. pág. **111**



## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 01</b>	Tumores de origem neuroepitelial - representação parcial (tumores astrocíticos e correlatos) da classificação segundo a OMS	pág. <b>036</b>
<b>TABELA 02</b>	Dados epidemiológicos referentes aos tumores astrocíticos diagnosticados nos EUA no período de 1995 a 1999, distribuídos de acordo com a graduação histológica da OMS	pág. <b>041</b>
<b>TABELA 03</b>	Significado dos escores utilizados na análise dos parâmetros histopatológicos	pág. <b>081</b>
<b>TABELA 04</b>	Sítio(s) de expressão celular das diferentes proteínas estudadas	pág. <b>081</b>
<b>TABELA 05</b>	Valores referentes ao somatório dos escores atribuídos aos parâmetros histopatológicos adotados como critérios para graduação tumoral dos astrocitomas pela OMS (pleomorfismo celular, atipia nuclear, índice mitótico, hiperplasia vascular e necrose) segundo a classificação histológica dos casos avaliados	pág. <b>089</b>
<b>TABELA 06</b>	Valores referentes aos escores atribuídos à expressão do antígeno Ki-67 (LI) detectada por imuno-histoquímica segundo a classificação histológica dos casos avaliados	pág. <b>093</b>
<b>TABELA 07</b>	Índices de marcação imuno-histoquímica (LI) para o antígeno Ki-67 nas diferentes gradações dos tumores astrocíticos (embebidos em parafina) segundo diversas referências, incluindo o presente estudo	pág. <b>095</b>
<b>TABELA 08</b>	Percentuais de positividade imuno-histoquímica para p53 nas diferentes gradações dos tumores astrocíticos segundo diversas referências, incluindo o presente estudo	pág. <b>124</b>
<b>TABELA 09</b>	Percentuais de mutação do gene p53 nas diferentes gradações dos tumores astrocíticos segundo diversas referências, incluindo o presente estudo	pág. <b>129</b>
<b>TABELA 10</b>	Percentuais de positividade imuno-histoquímica para EGFR nas diferentes gradações dos tumores astrocíticos segundo diversas referências, incluindo o presente estudo	pág. <b>135</b>
<b>TABELA 11</b>	Distribuição percentual dos Astrocitomas Grau IV (OMS) de acordo com a situação funcional dos genes p53 e EGFR estimada por imuno-histoquímica e/ou técnicas moleculares segundo diversas referências, incluindo o presente estudo	pág. <b>140</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	grau centígrado
a.C.	antes de Cristo
ATP	adenosina trifosfato
CART	árvore de classificação e regressão
CDK	quinase dependente de ciclina
DATASUS	Departamento de Informação e Informática do Sistema Único de Saúde Ministério da Saúde/Brasil
EUA	Estados Unidos da América
ex.	exemplo
g	grama
GFAP	proteína ácida glio-fibrilar
GST $\pi$	glutathione-S-transferase subtipo pi
HE	coloração pela hematoxilina-eosina
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INCA	Instituto Nacional do Câncer
kDa	kilodalton
mg	miligrama ( $10^{-3}$ grama)
mL	mililitro ( $10^{-3}$ litro)
$\mu$ L	microlitro ( $10^{-6}$ litro)
mm	milímetro ( $10^{-3}$ metro)
mM	milimolar ( $10^{-3}$ molar)
MGMT	O <sup>6</sup> -metilguanossina-DNA-metiltransferase
OMS	Organização Mundial da Saúde
pH	potencial hidrogeniônico
RMN	ressonância magnética nuclear
SNC	sistema nervoso central
TopoII $\alpha$	DNA Topoisomerase II subtipo alfa
TS	timidilato sintase
X	vezes (referindo-se ao aumento por microscopia óptica)

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	pág. <b>023</b>
1.1. CÂNCER .....	pág. <b>023</b>
1.1.1. Definições em Oncologia .....	pág. <b>024</b>
1.1.2. Bases Moleculares do Câncer .....	pág. <b>025</b>
1.2. TUMORES PRIMÁRIOS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL .....	pág. <b>031</b>
1.2.1. Epidemiologia .....	pág. <b>031</b>
1.2.2. Etiologia .....	pág. <b>032</b>
1.2.3. Classificação Histopatológica .....	pág. <b>033</b>
1.3. ASTROCITOMAS .....	pág. <b>034</b>
1.3.1. Classificação e Graduação dos Astrocitomas .....	pág. <b>036</b>
1.3.2. Caracterização dos Astrocitomas .....	pág. <b>037</b>
1.3.3. Aspectos Clínicos dos Astrocitomas .....	pág. <b>043</b>
1.3.4. Terapêutica dos Astrocitomas .....	pág. <b>044</b>
1.4. ALTERAÇÕES GENÉTICAS NOS ASTROCITOMAS .....	pág. <b>045</b>
1.5. MARCADORES MOLECULARES .....	pág. <b>049</b>
1.5.1. Proliferação Celular .....	pág. <b>050</b>
1.5.2. Diferenciação Astrocítica .....	pág. <b>052</b>
1.5.3. Supressores Tumorais .....	pág. <b>053</b>
1.5.4. Apoptose .....	pág. <b>054</b>
1.5.5. Receptores da Família ErbB .....	pág. <b>055</b>
1.5.6. Sinalização Intracelular .....	pág. <b>058</b>

1.5.7. O Fator de Transcrição c-Myc .....	pág. 059
1.5.8. Enzimas relacionadas à Quimiorresistência .....	pág. 065
1.6. A BIOLOGIA MOLECULAR COMO FERRAMENTA	
FARMACOLÓGICA .....	pág. 070
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	pág. 074
2.1. GERAL .....	pág. 074
2.2. ESPECÍFICOS .....	pág. 074
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	pág. 075
3.1. REAGENTES E SOLUÇÕES .....	pág. 075
3.2. EQUIPAMENTOS .....	pág. 076
3.3. VIDRARIA .....	pág. 077
3.4. PROGRAMAS COMPUTACIONAIS .....	pág. 077
3.5. OUTROS MATERIAIS .....	pág. 077
3.6. CASUÍSTICA .....	pág. 078
3.7. PREPARO DAS LÂMINAS E DOS CORTES HISTOLÓGICOS	pág. 079
3.8. IMUNO-HISTOQUÍMICA .....	pág. 079
3.9. ANÁLISES HISTOPATOLÓGICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA	pág. 080
3.9.1. Análise Histopatológica .....	pág. 080
3.9.2. Análise Imuno-Histoquímica .....	pág. 080
3.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	pág. 082
<b>4. RESULTADOS</b> .....	pág. 085
4.1. ANÁLISE CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA .....	pág. 085
4.2. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA .....	pág. 087
4.3. ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA .....	pág. 090

4.3.1. Proliferação Celular .....	pág. 090
4.3.2. Diferenciação Astrocítica .....	pág. 092
4.3.3. Supressores Tumorais .....	pág. 094
4.3.4. Apoptose .....	pág. 098
4.3.5. Receptores da Família ErbB .....	pág. 101
4.3.6. Sinalização Intracelular .....	pág. 104
4.3.7. O Fator de Transcrição c-Myc .....	pág. 106
4.3.8. Vias Tumorigênicas .....	pág. 108
4.3.9. Enzimas relacionadas à Quimiorresistência .....	pág. 109
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>pág. 112</b>
5.1. ANÁLISE CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA .....	pág. 112
5.2. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA .....	pág. 114
5.3. ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA .....	pág. 116
5.3.1. Proliferação Celular .....	pág. 116
5.3.2. Diferenciação Astrocítica .....	pág. 123
5.3.3. Supressores Tumorais .....	pág. 124
5.3.4. Apoptose .....	pág. 132
5.3.5. Receptores da Família ErbB .....	pág. 134
5.3.6. Sinalização Intracelular .....	pág. 140
5.3.7. O Fator de Transcrição c-Myc .....	pág. 142
5.3.8. Enzimas relacionadas à Quimiorresistência .....	pág. 147
5.3.9. Potenciais Alvos Moleculares .....	pág. 154
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>pág. 159</b>
<b>7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>pág. 162</b>
<b>8. LIMITAÇÕES &amp; COMENTÁRIOS .....</b>	<b>pág. 163</b>

<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>pág. 164</b>
<b>10. ANEXOS .....</b>	<b>pág. 185</b>
ANEXO I – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	pág. 186
ANEXO II – ORÇAMENTO GERAL .....	pág. 187
ANEXO III – FONTES DE FINANCIAMENTO .....	pág. 188
ANEXO IV – DADOS GERAIS .....	pág. 189

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. CÂNCER

Se examinares um enfermo que padeça com tumores em sua mama e verificares que a intumescência alastra-se por sua mama; se puseres tua mão sobre sua mama, por cima desses tumores, e os perceberes muito frios, não existindo febre naquele lugar quando tua mão o tocar; se não apresentarem granulações, não formarem fluidos, não gerarem secreções líquidas e forem salientes ao teu toque. Deverás dizer-lhe a seu respeito: “Tens tumores! Uma doença com a qual não poderei lutar”. Não há tratamento. (Breasted, 1980, p. 388).

Admite-se que o trecho acima, retirado do papiro egípcio de Edwin Smith (1.600 a.C.), configure o primeiro relato histórico do câncer (do grego *karkinos*, caranguejo). Sua conclusão diagnóstica revela o caráter sentencial, a impotência e o temor que esta doença viria despertar pelos milênios subseqüentes.

Atualmente, mesmo após importantes avanços no entendimento das neoplasias, o câncer representa a segunda principal causa de mortalidade por doença no mundo, sendo diagnosticados cerca de 10 milhões de novos casos a cada ano (Schottenfeld & Beebe-Dimmer, 2005). No Brasil, para o ano de 2005, estão previstos 467.440 novos casos de câncer (Brasil/INCA, 2004), além de 585.000 internações hospitalares na rede pública e cerca de 130.000 mortes por neoplasias (Brasil/DATASUS, 2005).

### 1.1.1. Definições em Oncologia

Um ser humano adulto é composto de aproximadamente  $10^{15}$  células. Os processos fisiológicos necessitam que muitas destas se dividam e/ou se diferenciem como condição para a manutenção do funcionamento do organismo. Apesar da enorme produção de novas células, os organismos mantêm rígido controle sobre a proliferação celular e, por outro lado, sobre a morte programada das células (apoptose) através de complexos mecanismos moleculares (Bertram, 2001).

Qualquer fator que altere esses mecanismos no sentido da promoção da proliferação e/ou sobrevivência celulares pode desencadear a neoplasia, literalmente um *crescimento novo*. De forma didática, tais fatores são categorizados em ambientais (químicos, físicos e biológicos), genéticos (mutações, ampliações, deleções e rearranjos) e epigenéticos (alterações da expressão gênica), interagindo mutuamente na promoção e progressão tumoral (Cotran *et al.*, 2000).

Considera-se ainda a palavra **câncer** como termo a ser empregado exclusivamente para tumores malignos, ou seja, aqueles capazes de se implantarem de forma descontínua em relação ao tumor primário (metastatização). Assim, o termo **neoplasia** referir-se-ia mais apropriadamente, de modo mais abrangente, aos distúrbios da proliferação celular. A expressão **tumor** é admitida como sinônimo para neoplasia.

Dessa forma, define-se a transformação neoplásica como um processo multicausal no qual os controles normais da proliferação celular, da apoptose e da interação célula-célula são perdidos (Louis & Cavenee, 1997).

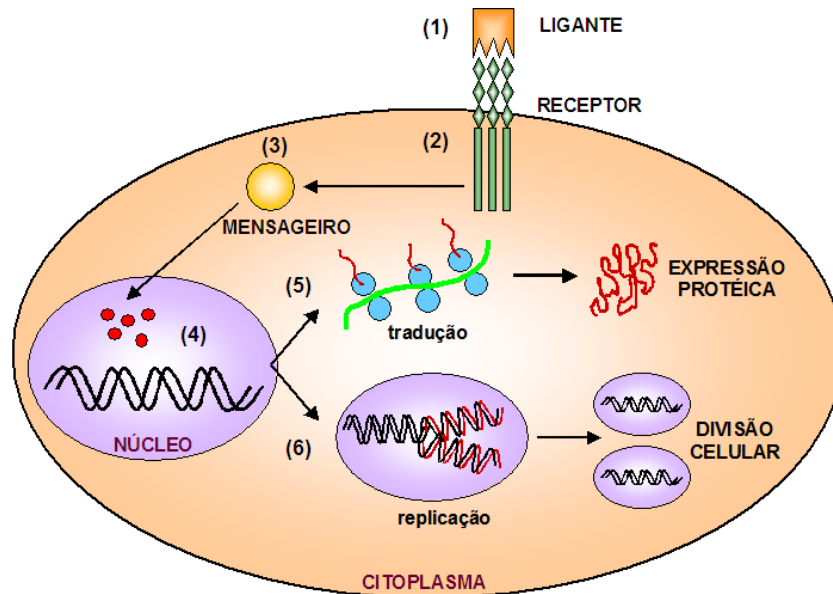


### 1.1.2. Bases Moleculares do Câncer

A hipótese molecular do câncer caracteriza a **lesão genética não-letal** como o cerne do processo tumorigênico. Usualmente, um conjunto de alterações moleculares em diferentes níveis de regulação é o responsável pelo estabelecimento do câncer, de modo que uma simples modificação numa célula normal raramente é suficiente para deflagrar o surgimento da neoplasia. Os principais alvos dessas lesões correspondem a três classes de genes reguladores normais: os oncogenes, os genes supressores tumorais e os genes reguladores da apoptose (Cotran *et al.*, 2000).

Os **oncogenes** derivam dos *proto-oncogenes* – os genes responsáveis pelo crescimento e diferenciação celulares normais. A ativação desses genes, secundária a alterações genéticas (deleção, mutação, amplificação, rearranjo cromossômico, inserção viral, entre outras), promovem a expressão das chamadas *oncoproteínas*. Essas proteínas são semelhantes aos produtos normais esperados dos proto-oncogenes, mas apresentam-se destituídas de elementos regulatórios efetivos e não dependem da liberação de fatores de crescimento ou de outros sinais externos para sua expressão (Hanahan & Weinberg, 2000).

Observando os elementos implicados no fluxo normal da informação celular (Figura 01), podemos facilmente perceber as possíveis repercussões de versões protéicas alteradas na indução da proliferação celular e na expressão diferencial protéica. A superexpressão de fatores de crescimento, a superexpressão/hiperativação autônoma dos receptores de fatores de crescimento, a hiperativação de proteínas transdutoras de sinal e a ativação aberrante de fatores de transcrição são exemplos de alterações resultantes da expressão de oncoproteínas e que acabam por sensibilizar o processo de ativação do crescimento celular (Rabenhorst *et al.*, 1994).



**FIGURA 01 – Representação esquemática do fluxo “normal” da informação celular.** (1) Ligação do fator de crescimento ao seu receptor específico na membrana celular; (2) Ativação transitória e limitada do receptor do fator de crescimento que, por sua vez, induz a (3) liberação de proteínas transdutoras de sinal na parte interna da membrana citoplasmática; (4) Ativação de fatores de transcrição nucleares que podem levar à (5) expressão de proteínas necessárias para o funcionamento celular e/ou à (6) replicação, com conseqüente divisão celular.

O resultado final de todos esses estímulos consiste na ativação das células quiescentes (fase G<sub>0</sub>), promovendo a progressão das células através das diversas fases (G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> e M) do **ciclo celular**. Durante a fase G<sub>1</sub> (de *gap 1*), a célula está responsiva a sinais inibitórios ou ativadores do crescimento. Logo depois, segue-se à fase S (de *synthesis*), onde ocorre a replicação do DNA. Esta é imediatamente seguida pela fase G<sub>2</sub> (de *gap 2*), na qual a integridade do DNA é verificada. Por fim, a célula entra na fase M (de *mitosis*), dando origem a duas células filhas (Sandhu & Slingerland, 2000).

A entrada e o seguimento no ciclo celular, por sua vez, são regulados por famílias de proteínas denominadas quinases dependentes de ciclinas (CDK, de *cyclin-dependent kinase*), ciclinas e inibidores das CDKs. As CDKs compõem-se de um grupo de proteíno-quinases do tipo serina-treonina, nomeadas de 1 a 9, que são expressas de modo constitutivo na célula, porém na forma inativa. Estas são ativadas através da ligação às ciclinas (A, B, C e D) que, ao

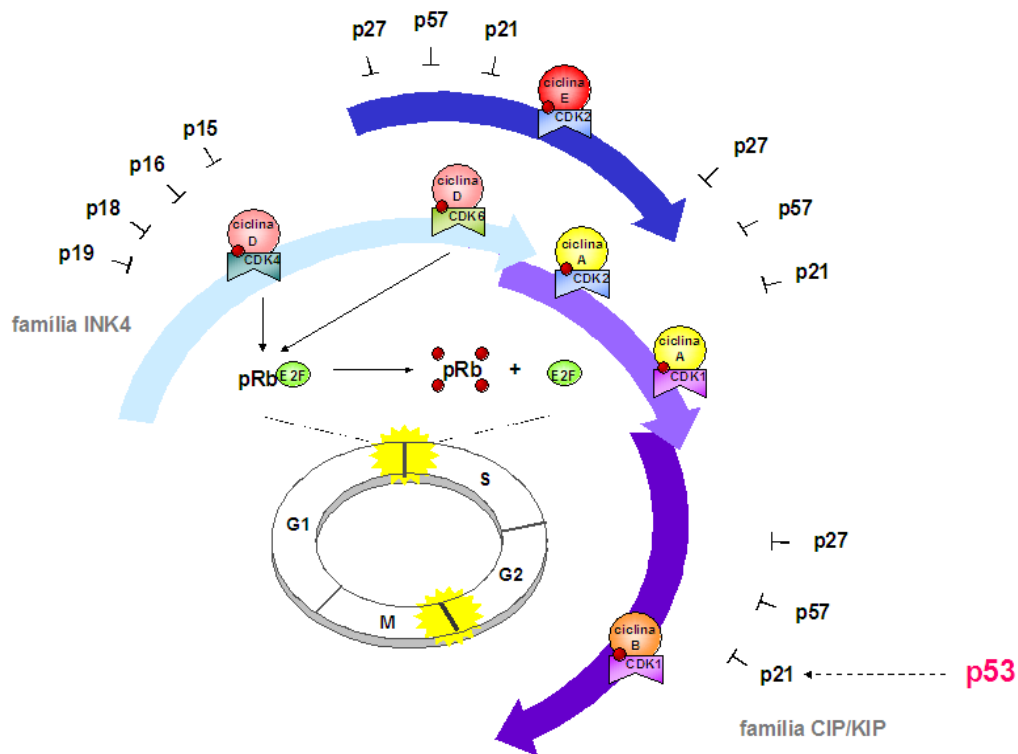
contrário das CDKs, são sintetizadas somente durante fases específicas do ciclo celular. Enquanto as ciclinas estimulam as CDKs, seus inibidores as silenciam e, por conseguinte, exercem efeito inibitório no controle do ciclo celular (Cotran *et al.*, 2000).

Embora todas as fases do ciclo celular sejam cuidadosamente monitoradas (Figura 02), a transição G1-S representa um importante marco regulatório, visto que aquelas células que atravessam esse ponto de checagem estão definitivamente comprometidas com a progressão à fase S. Após o recebimento dos sinais que promovem seu crescimento, ocorre síntese de ciclinas do tipo D, que se ligam às CDK4 e CDK6 (início de G1). Um pouco depois ocorre a síntese de ciclina E que, por sua vez, liga-se a CDK2. Os complexos ciclina D/CDK4 ou CDK6 e ciclina E/CDK2 fosforilam a proteína do retinoblastoma (pRb). Trata-se de uma reação crítica: a pRb não fosforilada retém os fatores de transcrição da família E2F, todavia sua fosforilação promove a liberação desses fatores. As proteínas E2F ativam a transcrição de vários genes cujos produtos são essenciais para a progressão das células através da fase S (DNA-polimerases, dihidrofolato-redutase, timidilato sintase, entre outros) (Kamb, 1995).

A progressão S-G2 é facilitada pela ativação da CDK2 e CDK1 pela ciclina A. Os alvos da fosforilação promovida pelos complexos ciclina A/CDK2 ou CDK6 não são completamente conhecidos. No início da fase G2 surge a ciclina B que, ao formar complexos com a CDK1, ajuda a progressão G2-M através da fosforilação de várias proteínas essenciais para a mitose (Malumbres & Barbacid, 2001).

A atividade das CDKs é regulada por duas famílias de inibidores do ciclo celular: a família INK4 (de *inhibitor of CDK4*), composta pelas proteínas p15<sup>INK4b</sup>, p16<sup>INK4a</sup>, p17<sup>INK4c</sup> e p18<sup>INK4d</sup>, que inibem seletivamente os complexos ciclina D/CDK4 ou CDK6, e a família CIP1/KIP1 (de *CDK2 interacting protein 1/kinase inhibitory protein 1*), composta pelas proteínas p27<sup>KIP1</sup>, p57<sup>KIP1</sup> e p21<sup>CIP1</sup>, que inibem as CDKs de um modo geral. A proteína

p21<sup>WAF1/CIP1</sup> é codificada pelo gene WAF1 (de *wild-type p53 activated fragment 1*), sendo produzida mediante ativação do fator de transcrição p53 (Sandhu & Slingerland, 2000).



**FIGURA 02 – Representação esquemática da regulação do ciclo celular.** Os complexos ciclina/CDK atuam de forma específica quanto às fases do ciclo celular, conforme ilustrado pelas setas maiores (em tons de azul). O principal evento da transição G1-S é representado pela fosforilação da pRb, com conseqüente liberação dos fatores de transcrição E2F. A família CIP/KIP de inibidores de CDKs pode atuar em todas as fases do ciclo, enquanto a família INK4 age somente na fase G1. A proteína p53 atua como ativadora transcrricional da proteína p21. Adaptado de Cotran *et al.* (2000).

A partir desses conceitos, torna-se fácil perceber que as alterações que promovem a ativação das CDKs favorecem a proliferação celular. Sabidamente, muitos tipos de câncer demonstram hiperexpressão dos genes das ciclinas ou mesmo das CDKs. Há também a constatação da menor expressão ou ausência dos inibidores das CDKs contribuírem para a instalação do processo neoplásico, visto que os sinais impeditivos da progressão do ciclo celular estariam comprometidos. Por esta atividade, os genes dos inibidores de CDKs compõe a classe dos **supressores tumorais**, às quais somam-se os genes p53 e Rb (MacLeod, 2000).

As vias inibitórias do crescimento são menos compreendidas do que aquelas implicadas na sua promoção, sendo sugerido que estas seguiriam passos semelhantes às cascatas mitogênicas (Figura 01). O estímulo proviria do ambiente extracelular, atuaria através receptores de superfície celular específicos [como o receptor do fator de crescimento tissular (TGF- $\beta$ , de *tissue growth factor*),], modulando a expressão de proteínas transdutoras de sinal [como a neurofibromina (produto do gene NF-1)], que regulariam a expressão das moléculas controladoras do ciclo celular, descritas anteriormente, coibindo a transcrição ou a replicação do DNA (Malumbres & Barbacid, 2001).

A identificação de novos genes supressores tumorais, assim como o melhor delineamento das funções de vários outros genes que atuam virtualmente como tal, tende a aumentar quantitativa e qualitativamente o entendimento das complexas e intrincadas vias inibitórias ativadas pelos supressores tumorais. A detecção de deleções cromossômicas, os estudos de perda de heterozigose (LOH, de *loss of heterozigosity*) e a análise de mecanismos de regulação pós-transcricional em células neoplásicas são exemplos de abordagens que freqüentemente apontam potenciais genes supressores tumorais (MacLeod, 2000).

O conjunto das proteínas supressoras tumorais é responsável pela regulação rotineira da atividade proliferativa. Por outro lado, situações onde estão presentes mecanismos impeditivos da expressão ou da atuação dessas moléculas podem resultar no descontrole da função proliferativa, desencadeando o processo neoplásico (Louro *et al.*, 2002).

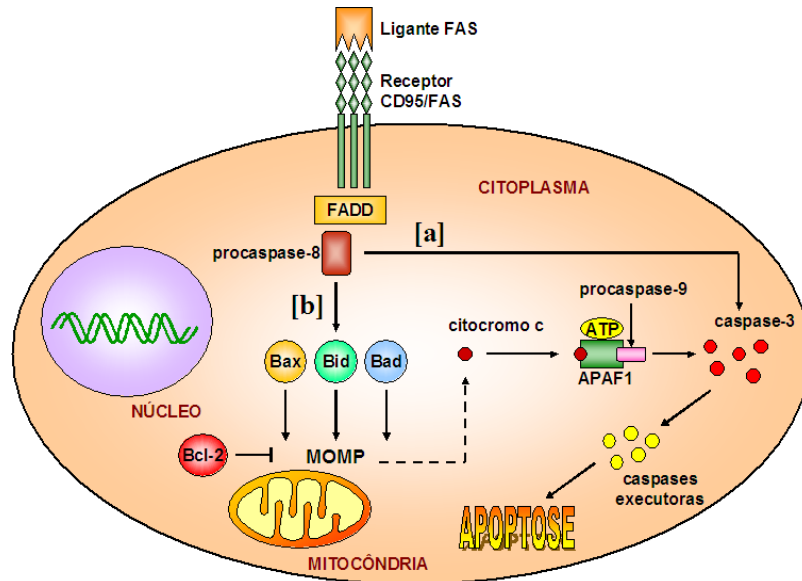
A ativação dos supressores tumorais ocorre frente à constatação de lesões no material genético das células e objetiva a promoção dos sistemas de reparo. Caso os danos sejam inexoráveis, são ativadas vias indutoras de morte celular programada – a **apoptose**. A maquinaria bioquímica responsável pela apoptose depende de uma família de proteases denominadas caspases. Estas são sintetizadas a partir de seus precursores inativos, ou procaspases. Uma vez ativadas, as caspases clivam (e assim ativam) outras procaspases,

resultando na amplificação da cascata proteolítica. Este mecanismo, além de destrutivo e autopropagado, é também irreversível (Alberts *et al.*, 2002)

A ativação das caspases pode ser deflagrada não só através de estímulos intracelulares, conforme já descrito, como também por incentivos extracelulares (Figura 03). Células normais, como os linfócitos T *killer*, podem induzir a apoptose de células tumorais pela produção de FAS (também conhecido por APO-1, de *apoptosis inducing protein 1*), um ligante específico dos receptores CD95. A ligação FAS-CD95 ativa o receptor, que se acopla à proteína FADD (de *FAS-associated death domain*), uma carreadora da procaspase iniciadora tipo 8. Essa interação permite a liberação das procaspases que, após sofrerem auto-ativação, desencadeiam a liberação de caspases executoras (Pelengaris *et al.*, 2002).

A caspase-8 também pode ativar proteínas pró-apoptóticas (Bax, Bid, Bad, entre outras) que promovem a formação de poros na membrana externa mitocondrial, denominada fenômeno MOMP (de *mitochondrial-outer-membrane permeabilization*). Isto ativa a liberação do citocromo c no citoplasma que, associado ao APAF1 (de *apoptotic protease-activating factor 1*) e à procaspase-9, formam o chamado apoptosomo. Na presença de ATP, a procaspase-9 é ativada, levando à liberação em cadeia de caspases executoras, incluindo a caspase-3. A proteína anti-apoptótica Bcl-2 inibe o fenômeno MOMP, modulando a ativação em série das caspases (Amarante-Mendes & Green, 1999).

A morte celular mediada por caspases difere da necrose em diversos aspectos, principalmente por suas características morfológicas. Ao receber o sinal apoptótico, a célula encolhe de tamanho, degrada sua cromatina e entra em colapso estrutural, mas sem ruptura brusca da membrana, evitando o surgimento de edema e a ativação do processo inflamatório – as principais peculiaridades do processo necrótico (Cotran *et al.*, 2000).



**FIGURA 03 – Representação esquemática das vias apoptóticas mediadas pela ativação do receptor CD95/FAS.** A liberação de caspases executoras pode se dar através de indução [a] direta, pela caspase-8 (procaspase-8 auto-ativada), ou [b] indireta, pelo surgimento do fenômeno MOMP, secundário a ativação de proteínas pró-apoptóticas também pela caspase-8. Adaptado de Pelengaris *et al.* (2002).

## 1.2. TUMORES PRIMÁRIOS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

### 1.2.1. Epidemiologia

Os tumores primários do Sistema Nervoso Central (SNC) correspondem a menos de 2% de todas as neoplasias humanas. A incidência anual desses tumores varia entre 4,9 a 16/100.000, sendo os maiores índices geralmente verificados em países desenvolvidos devido a maior cobertura em saúde e tecnologia (neuroimagem de alta resolução), além de organizados e confiáveis registros de câncer (Pekmezovic *et al.*, 2002). No Brasil não existem registros epidemiológicos específicos para os tumores originários do SNC. Os únicos dados disponíveis dizem respeito ao município de São Paulo, onde se estima uma incidência de 5,4/100.000 para as mulheres e 6,7/100.000 para os homens a cada ano (Mirra *et al.*, 2001).

Nos Estados Unidos da América (EUA), a prevalência dos tumores do SNC aproxima-se de 130/100.000, sendo diagnosticados anualmente cerca de 40.000 novos casos de tumores benignos (42,5%) e malignos (57,5%) do SNC. Os caucasianos representam o grupo étnico mais freqüentemente afetado, em comparação aos descendentes de origem africana ou asiática. Ainda nesse país, cerca de 13.000 mortes foram catalogadas no ano de 2002 decorrentes somente dos tumores malignos (CBTRUS, 2002).

A despeito da baixa incidência, os tumores primários do SNC representam os mais freqüentes tumores sólidos da infância e a segunda causa de mortalidade por neoplasias nesta faixa etária, ficando atrás somente das leucemias. Nos adultos, a sobrevida média após cinco anos do diagnóstico de tumor maligno primário do SNC é de 32%, constituindo a terceira e quarta causa de mortalidade por câncer entre homens e mulheres, respectivamente (Schottenfeld & Beebe-Dimmer, 2005).

### **1.2.2. Etiologia**

Apesar dos enormes esforços empreendidos na tentativa de se detectar correlações epidemiológicas entre exposição ocupacional, dieta e hábitos de vida dos pacientes e o surgimento de tumores do SNC, nenhum destes fatores demonstrou significância estatística. A etiologia dos tumores originados no SNC ainda é pouco compreendida, à exceção do impacto das síndromes neoplásicas hereditárias (Neurofibromatose, Li-Fraumeni, Turcot, entre outras) (Greenberg *et al.*, 1996).

Inúmeros trabalhos sugerem a possibilidade de substâncias químicas (formaldeído, cloreto de vinil, solventes orgânicos), campos eletromagnéticos (telefones móveis, linhas de transmissão), alimentos (conservantes nitrosos), traumatismos cranianos, tabagismo, drogas



(barbituratos) desencadearem a formação de tumores no SNC, entretanto todos estes carecem de consistência epidemiológica e comprovação multicêntrica (Adams *et al.*, 1998).

O único fator ambiental inequivocamente associado ao maior risco de desenvolvimento de tumores do SNC consiste na **exposição à radiação** (radiografias, radioterapia). Estudos experimentais apontam ainda alguns vírus como potenciais agentes etiológicos, todavia não se observa aumento da incidência de tumores do SNC em populações sabidamente mais expostas aos patógenos relacionados. Relata-se ainda que estados de imunossupressão (síndrome da imunodeficiência adquirida, pós-transplantados) predisporiam à manifestação de tumores próprios do SNC, contudo essa correlação só foi comprovada no caso dos linfomas primários do SNC (Lantos *et al.*, 2002).

### **1.2.3. Classificação Histopatológica**

Os tumores primários do SNC exibem diversas apresentações histológicas e origens citológicas, refletindo a complexidade tecidual e a variedade de tipos celulares características do sistema nervoso. À multiplicidade morfológica dessas neoplasias acrescenta-se ainda a diversidade de manifestações radiológicas e de comportamentos biológicos. Todos esses fatores explicam as grandes dificuldades encontradas para a formatação de uma classificação dos tumores do SNC com linguagem e aceitação universais (Kleihues & Cavenee, 2000).

O árduo trabalho na elaboração de critérios para classificação dos tumores primários do SNC, iniciado ainda no século XIX por Virchow, culminou com a *Classificação Histológica dos Tumores do Sistema Nervoso Central*, parte integrante da *Classificação Histológica Internacional dos Tumores*, publicada em 1979 pela Organização Mundial da

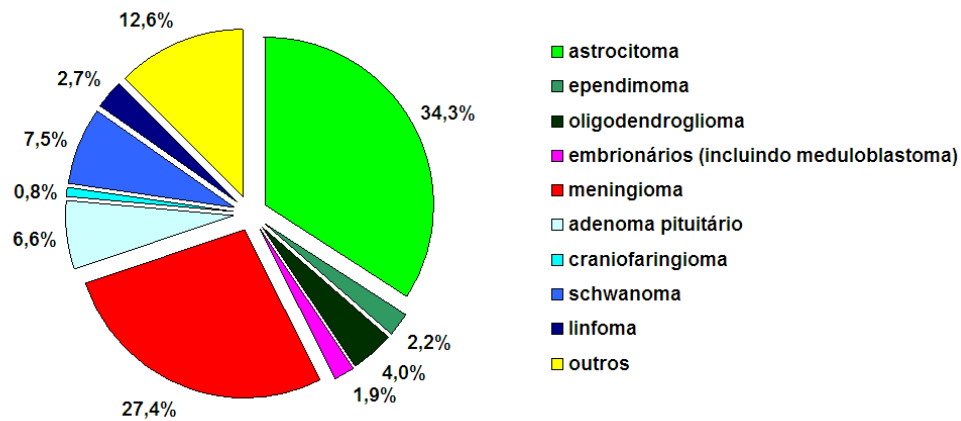
Saúde (OMS). Este sistema adotou o princípio básico da **tipificação histológica**: as entidades tumorais seriam definidas primariamente pela morfologia das células e pela sua disposição tecidual (Zülch, 1979).

Os novos conhecimentos sobre a histogênese do sistema nervoso e a genética do câncer, obtidos principalmente a partir do emprego de técnicas imuno-histoquímicas e/ou moleculares, suscitaram revisões à classificação original nos anos de 1993, 1997 e 1999. Assim, os grandes debates internacionais acerca da classificação da OMS resultaram no seu aprimoramento e consolidaram sua adoção mundial (Kleihues & Cavenee, 2000).

### **1.3. ASTROCITOMAS**

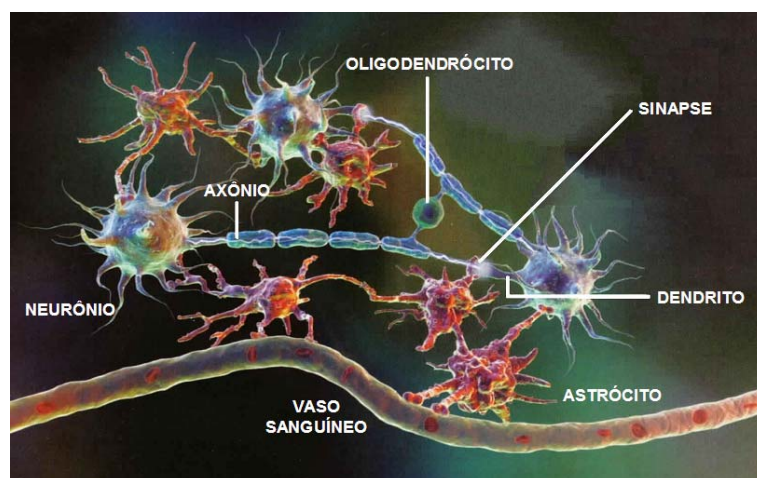
Os astrocitomas constituem o principal tipo histológico dentre os tumores primários do SNC (Figura 04). O termo astrocitoma foi cunhado por Virchow (1863) para designar os tumores compostos predominantemente por astrócitos atípicos (núcleos aumentados, alongados ou hipercromáticos com citoplasmas escassos, poucos definidos), porém só foi empregado definitivamente na classificação proposta por Bailey e Cushing, em 1926.

Os astrócitos fazem parte das **células gliais** (Figura 05) – elementos celulares responsáveis pelo suporte tecidual, nutrição, equilíbrio iônico, metabolismo de neurotransmissores e defesa imunológica dos neurônios. Estas células são representadas, além dos astrócitos, pelos oligodendrócitos, pelos endotélio e pelas células da micróglia (Gray *et al.*, 2004).



**FIGURA 04 – Distribuição percentual dos tumores primários do SNC diagnosticados nos EUA no período de 1995 a 1999 segundo a histopatologia (n=37.788).** Fonte: CBTRUS - *Central Brain Tumor Registry of the United States* (2002).

Recentes evidências sugerem ainda que as células astrocíticas, nove vezes mais numerosas que os neurônios, comunicam-se entre si através de sinais químicos, formando uma rede independente e paralela à neuronal. Esta comunicação neurônio-glia influenciaria a formação de sinapses e indicaria quais conexões neuronais se fortaleceriam ou enfraqueceriam com o tempo – fatores determinantes na fisiologia do aprendizado e do armazenamento da memória duradoura (Fields & Stevens-Grahan, 2002).



**FIGURA 05 – Ilustração representativa da interação entre as células gliais (astrócitos e oligodendrócitos) e os neurônios.** Os astrócitos nutrem os neurônios, além de envolver e regular as sinapses. Os oligodendrócitos produzem a mielina que recobre os axônios. Adaptado de Fields (2004).

### 1.3.1. Classificação e Gradação dos Astrocitomas

Na recente classificação histopatológica da OMS para os tumores próprios do SNC, admite-se que as diversas apresentações histológicas dos astrocitomas possam ser divididas em diferentes graus de malignidade, variando de I a IV (Tabela 01).

**TABELA 01 – Tumores de origem neuroepitelial - representação parcial (tumores astrocíticos e correlatos) da classificação segundo a OMS**

<b>TUMORES DE ORIGEM NEUROEPITELIAL</b>		<b>código ICD-O / SNOMED<sup>1</sup></b>	<b>comportamento biológico<sup>2</sup></b>
<b>Tumores Astrocíticos</b>			
GRAU I	Astrocitoma Pilocítico	9421	1
GRAU II	Astrocitoma Difuso	9400	3
	Astrocitoma Fibrilar	9420	3
	Astrocitoma Protoplásmico	9410	3
	Astrocitoma Gemistocítico	9411	3
GRAU III	Astrocitoma Anaplásico	9401	3
GRAU IV	Glioblastoma (Multiforme)	9440	3
	Glioblastoma de Células Gigantes	9441	3
	Gliosarcoma	9442	3
<b>Outras Variantes</b>			
	Xantastrocitoma Pleomórfico (Grau II ou III)	9424	3
	Astrocitoma Subependimário de Células Gigantes (Grau I)	9384	1
<b>Gliomas Mistos</b>			
	Oligoastrocitoma (Grau II)	9382	3
	Oligoastrocitoma Anaplásico (Grau III)	9382	3
<b>Tumores Neurais e Neuro-Gliais</b>			
	Astrocitoma Infantil Desmoplásico (Grau I)	9412	1

<sup>1</sup> Código adotado pela Classificação Internacional de Doenças para Oncologia (ICD-O) e pela Nomenclatura Sistematizada em Medicina (SNOMED). <sup>2</sup> O comportamento biológico tumoral é qualificado em (0) benigno, (1) malignidade baixa, limítrofe ou incerta, (2) lesões *in situ* e (3) maligno. Adaptado de Kleihues *et al.* (2002).

Essa gradação resulta do reconhecimento, através da análise histológica rotineira por microscopia óptica, de indicadores de anaplasia (atipia nuclear, pleomorfismo, atividade mitótica, hiperplasia endotelial e necrose) típicos de cada variante tumoral. Como regra geral, o grau tumoral é baseado nas áreas de maior atipia, assumindo que esta população de células é

a que determina o curso da doença. Além de manifestar o comportamento biológico tumoral, permitindo inferências prognósticas, o acúmulo de achados anaplásicos parece refletir a progressão das alterações moleculares adquiridas durante o processo de transformação neoplásica (Kleihues & Cavenee, 2000).

No esquema de graduação adotado pela OMS, a presença de atividade mitótica define os tumores de alto grau (III e IV). A presença de necrose tumoral, acompanhada ou não por hiperplasia endotelial, delimita o grau IV. A detecção unicamente de atipia citológica (pleomorfismo celular e/ou atipia nuclear) estabelece o grau II. Os tumores do grau I consistem em entidades distintas: além da ausência de anaplasia, tem sua graduação definida ainda por parâmetros clínicos (idade do(a) paciente, localização tumoral, aspecto radiológico) (Burger *et al.*, 2002).

### **1.3.2. Caracterização dos Astrocitomas**

ASTROCITOMAS GRAU I (OMS) – *ASTROCITOMA PILOCÍTICO*. São tumores de crescimento lento, geralmente de origem cerebelar (>80%). Macroscopicamente, apresentam-se como massas bem delimitadas, na maioria das vezes císticas, sem infiltração dos tecidos subjacentes. Microscopicamente, são constituídos por células pilóides bipolares que se organizam numa densa rede fibrilar, muitas vezes com microcistos de conteúdo mucinoso. A distribuição radial do tecido tumoral ao redor de vasos sanguíneos origina o aspecto de “pseudo-rosetas” perivascularares. A degeneração dos processos fibrilares resulta na deposição de corpos eosinofílicos brilhantes, classicamente descritos como em “forma de salsicha” – as fibras de Rosenthal, típicas desses tumores. Pode haver considerável pleomorfismo nuclear, todavia este não está associado com fenômenos anaplásicos ou aumento de celularidade.

Mitoses são raras, comumente ausentes. A proliferação vascular pode ser extensa, contudo sua presença não representa malignidade nesses tumores (Figura 06[b]) (Louis & Cavenee, 1997).

ASTROCITOMAS GRAU II (OMS). São neoplasias com alto grau de diferenciação celular, baixo crescimento e potencial infiltrativo sobre estruturas contíguas. Podem ser localizados em qualquer parte do SNC. Mostram-se como massas homogêneas, de bordos mal-definidos, ocasionalmente com a formação de cistos. A histopatologia demonstra aumento irregular da densidade celular com atipia nuclear e pleomorfismo proeminentes. Nas áreas mais compactas, os processos citoplasmáticos formam uma rede fibrilar, de aspecto microcístico. Usualmente, não são visualizadas figuras mitóticas. De acordo com o tipo celular predominante, três variantes podem ser distinguidas: (1) Fibrilar, a mais freqüente, com citoplasma escasso e núcleos hipercromáticos anômalos; (2) Gemistocítico, onde predominam células de citoplasma abundante e eosinofílico, com núcleos excêntricos, repousando sobre denso fundo fibrilar (denominadas por gemistócitos) e (3) Protoplásmico, a mais rara, formada por pequenos astrócitos neoplásicos com discretos processos filamentosos (Figura 06[c e d]) (Ironsides *et al.*, 2002).

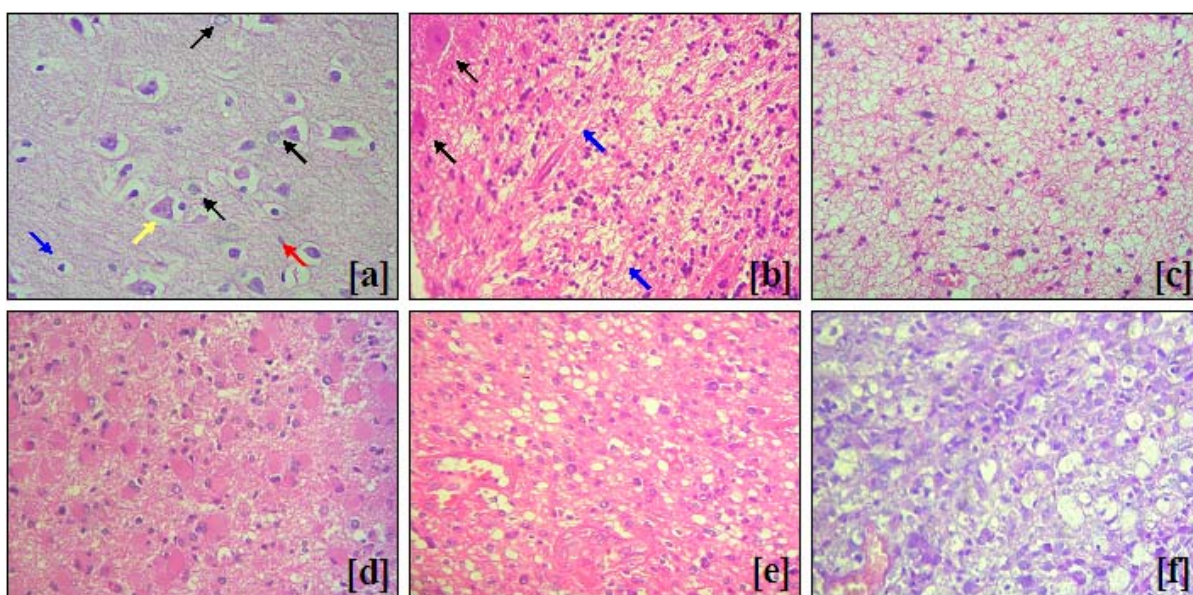
ASTROCITOMAS GRAU III (OMS) – *ASTROCITOMA ANAPLÁSICO*. Apresentam-se como tumores de contornos irregulares com tendência infiltrativa. Surgem em qualquer local do SNC e demonstram rápido crescimento. Microscopicamente, observa-se aumento da celularidade (multifocal ou difuso) associado a marcante pleomorfismo e atipia nuclear. Detectam-se ainda células astrocíticas pouco diferenciadas e freqüentes figuras mitóticas. Podem ocorrer pequenos focos de necrose e de proliferação endotelial, indicando potencial progressão ao grau IV (Figura 06 [e]) (Vinters *et al.*, 1998).

ASTROCITOMAS GRAU IV (OMS) – *GLIOBLASTOMA MULTIFORME*. Representam os mais malignos neoplasmas de origem astrocítica. Podem se desenvolver a partir de astrocitomas grau II ou III, quando são designados de “secundários”, ou surgirem *de*

*novo*, sem evidências de lesões precursoras, sendo denominados de “primários”. Localizam-se preferencialmente nos hemisférios cerebrais, particularmente nas regiões fronto-temporal e parietal. Apesar do rápido crescimento e do grande potencial infiltrativo, raramente invadem o espaço subaracnóideo e, assim, dificilmente produzem metástases. Histologicamente, demonstram grande heterogeneidade. O exuberante pleomorfismo celular manifesta-se através de células bipolares, fusiformes, fasciculadas, pequenas (indiferenciadas) ou gigantes, contendo inclusões lipídicas e granulações citoplasmáticas. Os núcleos são comumente aberrantes, por vezes múltiplos. A presença de necrose (secundária ao insuficiente suprimento sanguíneo tumoral) ocorre de duas formas distintas: em grandes áreas necróticas, com focos hemorrágicos dispersos, ou em pequenas clareiras irregulares, múltiplas, rodeadas por pequenas células tumorais fusiformes. Esta última, designada como necrose geográfica ou em pseudopaliçada, configura achado típico dos glioblastomas. A proliferação microvascular é outra marca histológica dos tumores do grau IV, aparecendo como tufo de aspecto glomerulóide rodeando as áreas necróticas. Admite-se que a hiperplasia endotelial resulta de estímulos neoangiogênicos sobre capilares pré-existentes e/ou do remodelamento vascular, através da mobilização de pericitos e células musculares lisas. Podem ainda ocorrer focos de metaplasia epitelial, exibindo rolhas queratínicas, bem como aglomerados de linfócitos perivasculares. As duas variantes histológicas desses tumores são (1) o glioblastoma de células gigantes, com o predomínio de células gigantes multinucleadas bizarras assentadas sobre estroma rico em reticulina, e (2) o gliossarcoma, com áreas tumorais variando entre o aspecto gliomatoso e o mesenquimal, manifestando diferenciação condróide, osteóide, rabdóide, entre outras (Figuras 06[f] e 07) (Lantos *et al.*, 2002).

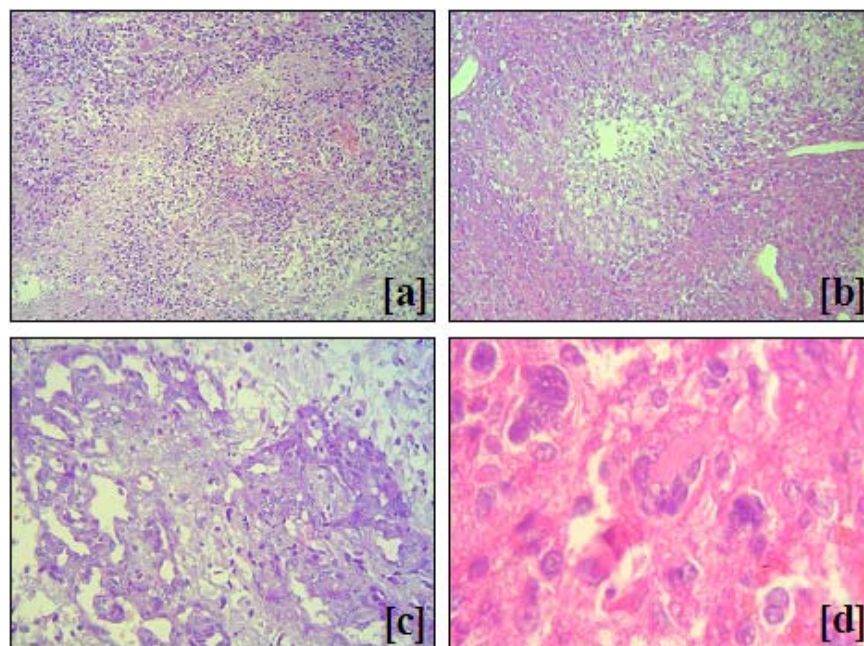
**OUTROS TIPOS HISTOLÓGICOS.** O *Xantastrocitoma Pleomórfico* é uma variante rara, caracterizada pela presença de células pleomórficas com inclusões lipídicas, geralmente envolvidas por fibras reticulínicas. O *Astrocitoma Subependimário de Células Gigantes*

constitui entidade benigna, derivada das lesões hamartomatosas associadas à esclerose tuberosa, sendo caracterizada pela mistura de populações celulares heterogêneas sobre uma matriz fibrilar. Os *Tumores Mistos* (oligo-astrocíticos) representam a “colisão” entre fenótipos tumorais astrocíticos e oligodendrocíticos. Já o *Astrocitoma Infantil Desmoplásico* é formado por um agregado de células pouco diferenciadas, com predomínio de astrócitos neoplásicos, distribuído sobre abundante matriz conjuntiva (Taillibert *et al.*, 2004).



**FIGURA 06 – Histopatologia dos tumores astrocíticos (HE, 400X).** [a] Caso n°. 0.3 - Córtex Cerebral Não-Tumoral: observam-se corpos celulares de neurônios piramidais, de formato triangular (seta amarela); astrócitos normais, com núcleos grandes, arredondados e mais “frouxos” (setas pretas); células da micróglia, de núcleos densos, alongados e em forma de vírgula (seta vermelha) e oligodendrócitos, com núcleos redondos (menores que os dos astrócitos), densos e circundados por um halo claro, resultado da tumefação artefactual típica desses componentes gliais (seta azul). [b] Caso n°. 04 - Astrocitoma Pilocítico Cerebelar, grau II (OMS): percebe-se proliferação de astrócitos discretamente atípicos sob densa matriz fibrilar, com áreas de degeneração microcística, onde figuram fibras de Rosenthal (setas azuis). O tecido tumoral desenvolve-se entre o tecido cerebelar não-tumoral, sendo visualizadas células de Purkinje (setas pretas). [c] Caso n°. 16 - Astrocitoma Fibrilar, grau II (OMS): evidencia-se baixa celularidade, com núcleos ovais e hiper cromáticos sob fundo fibrilar. [d] Caso n°. 15 - Astrocitoma Gemistocítico, grau II (OMS): predominam células de citoplasma abundante e eosinofílico, com núcleos excêntricos, repousando sobre compacta matriz fibrilar. [e] Caso n°. 30 - Astrocitoma Anaplásico, grau III (OMS): nota-se moderada celularidade, composta por astrócitos atípicos, pleomórficos, com núcleos irregulares e hiper cromáticos. Há ainda discreta proliferação endotelial, raras mitoses e degeneração microcística. [f] Caso n°. 54 - Glioblastoma Multifforme, grau IV (OMS): percebe-se marcante pleomorfismo celular, com núcleos gigantes, hiper cromáticos (por vezes múltiplos), sendo observadas figuras mitóticas, proliferação micro-vascular e áreas de necrose. Para maiores detalhes sobre os casos, consultar Anexo IV.





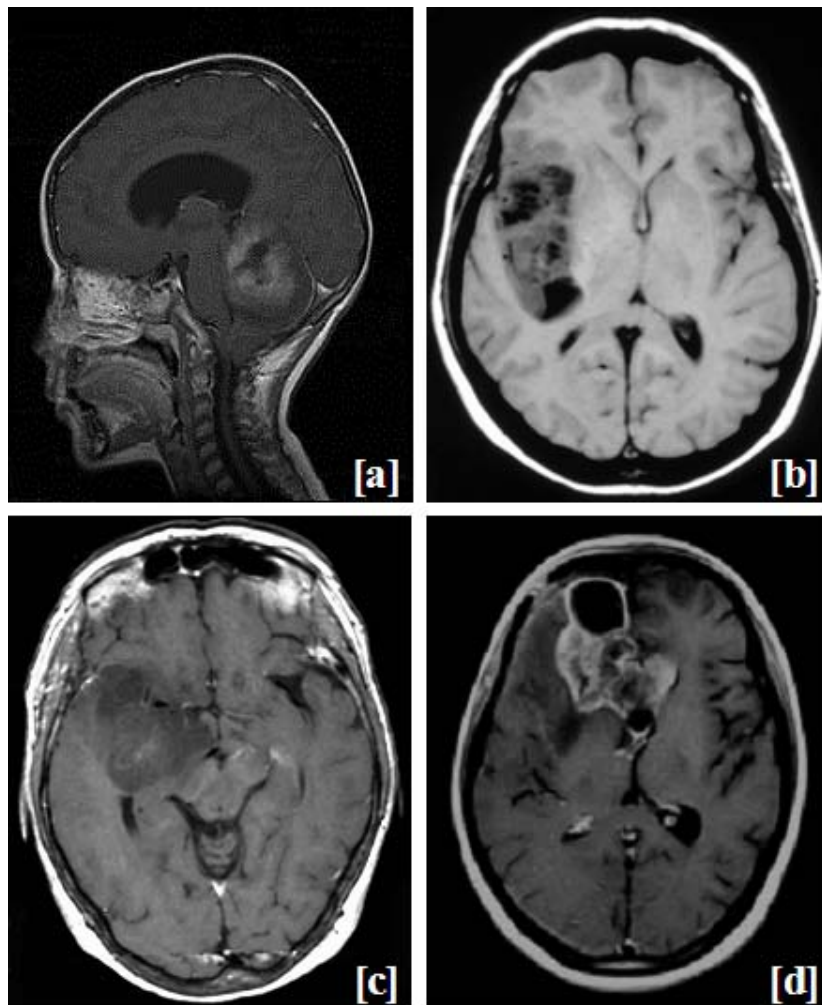
**FIGURA 07 – Características histopatológicas dos Astrocitomas Grau IV (Glioblastoma Multiforme).** [a] Visão Geral. Há significativo aumento da celularidade, expressivo pleomorfismo celular, áreas de proliferação endotelial e abundante necrose (Caso n°. 45, HE, 200X); [b] Área de necrose em pseudopaliçada (Caso n°. 53, HE, 200X); [c] Proliferação endotelial de aspecto glomerulóide (Caso n°. 45, HE, 400X); [d] Células gigantes multinucleadas (Caso n°. 35, HE, 1.000X). Para maiores detalhes sobre os casos, consultar Anexo IV.

Apesar das distinções entre os diferentes graus dos astrocitomas serem também sugeridas por particularidades epidemiológicas (Tabela 02) e radiológicas (Figura 08), a rotina diagnóstica histopatológica permanece extremamente laboriosa, sendo marcada pela subjetividade e pela imprecisão.

**TABELA 02 – Dados epidemiológicos referentes aos tumores astrocíticos diagnosticados nos EUA no período de 1995 a 1999, distribuídos de acordo com a graduação histológica da OMS**

Grau Histológico (OMS)	Percentual (%) entre os tumores primários do SNC	Percentual (%) entre os astrocitomas	Média de idade ao diagnóstico	Proporção Masculino / Feminino	Percentual médio (%) de sobrevivência em 5 (cinco) anos	Incidência anual (por 100.000 habitantes)
I	2,10	6,08	13	1,09	88,90	0,29
II	5,50	15,80	44	1,36	39,10	0,77
III	3,70	10,76	52	1,20	28,00	0,51
IV	23,00	67,36	65	1,26	2,90	3,24
<b>TOTAL</b>	<b>34,30</b>	<b>100,00</b>	<b>43</b>	<b>1,26</b>	<b>32,00</b>	<b>4,81</b>

Fonte: CBTRUS - *Central Brain Tumor Registry of the United States* (2002).



**FIGURA 08 – Estudos tomográficos por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) representativos dos tumores astrocíticos.** [a] Caso n.º. 06 - Astrocitoma Pilocítico, grau I (OMS): corte sagital em T1 com contraste paramagnético (gadolínio) demonstrando massa cística cerebelar isointensa com nodulações discretamente captantes; há deslocamento anterior do tronco cerebral e hidrocefalia obstrutiva. [b] Caso n.º. 24 - Astrocitoma Fibrilar, grau II (OMS): corte axial em T1 revela lesão frontoinsular hipointensa à direita, mal-definida, com componentes císticos; percebe-se deslocamento e compressão do lobo frontal direito. [c] Caso n.º. 31 - Astrocitoma Anaplásico, grau III (OMS): corte axial em T1 mostra massa fronto-parietal hipodensa, mal delimitada; observa-se edema peritumoral com deslocamento da linha média. [d] Caso n.º. 49 - Glioblastoma Multiforme, grau IV (OMS): corte axial em T1 após contraste paramagnético (gadolínio) exibindo lesão frontal bilateral (predomínio à direita), irregular, com captação de contraste (aspecto anelar multifocal); as áreas centrais hipointensas correspondem à necrose. Para maiores detalhes sobre os casos, consultar Anexo IV.

### 1.3.3. Aspectos Clínicos dos Astrocitomas

Enquanto a duração da história clínica e as perspectivas de sobrevida estão mais diretamente relacionadas ao comportamento biológico do tipo tumoral, os sintomas determinados pelos astrocitomas dependem primariamente da localização dessas neoplasias no SNC (Greenberg *et al.*, 1996).

Os astrocitomas cerebelares geralmente cursam com ataxia, náuseas e disfunções dos pares cranianos. Nos gliomas do nervo óptico podem ser observadas redução da acuidade visual e irregularidades no campo visual. Neoplasias do tronco cerebral promovem déficits relacionados aos nervos cranianos. O acometimento neoplásico hipotalâmico é tipicamente associado a síndromes endócrinas (puberdade precoce, diabetes *insipidus*, entre outras), desequilíbrio hidro-eletrolítico e desregulação autonômica (Lantos *et al.*, 2002).

Entre os tumores supratentoriais, aqueles que se manifestam nos lobos frontais e/ou parietais costumam ocasionar epilepsia, hemiparesia e transtornos de personalidade. Já os temporais, além de crises convulsivas, favorecem o aparecimento de distúrbios da fala e da linguagem. Qualquer uma dessas lesões que promova oclusão ou obstrução das vias de drenagem do fluido cérebro-espinhal pode desencadear aumento da pressão intracraniana, levando ao aparecimento de cefaléia, papiledema e vômitos (Adams *et al.*, 1998).

### 1.3.4. Terapêutica dos Astrocitomas

A **remoção cirúrgica**, total ou parcial, continua sendo a principal abordagem terapêutica contra os tumores do SNC. A máxima extirpação do tecido tumoral, o mais precocemente possível, pode resultar em cura. Outros benefícios da terapia cirúrgica

consistem na possibilidade de definição precisa do diagnóstico histopatológico, na reversão dos déficits neurológicos instalados e na minimização dos riscos de progressão tumoral. Contudo, o potencial infiltrativo da maioria dos astrocitomas, bem como a capacidade de migração local das células tumorais, pode tornar a intervenção cirúrgica inexequível ou ineficaz. Além disso, a cirurgia pode agravar ou mesmo desencadear morbidades neurológicas (Ellison *et al.*, 2004).

A **radioterapia** é usualmente empregada no tratamento dos astrocitomas de alto grau (III e IV), ao passo que seus benefícios no tratamento de tumores de baixo grau (I e II) despertam controvérsia. Considerando os efeitos deletérios da radiação sobre tecidos saudáveis, a prática atual restringe o uso da radiação focal somente para tumores de limites precisos, utilizando em média 60 Grays como dose total (Zalutsky, 2004).

A **quimioterapia** tem demonstrado importante papel adjuvante no tratamento de tumores astrocíticos de baixo grau em crianças (Castello *et al.*, 1998). Todavia, agentes quimioterápicos isoladamente ou associados à radioterapia não têm revelado aumentos significativos na sobrevida dos pacientes. As principais drogas utilizadas em esquemas contra os astrocitomas constam de nitrosuréias (ACNU; BCNU; CCNU), demais alquilantes (procarbazina; temozolomida), alcalóides (vincristina), compostos platínicos (carboplatina; cisplatina) e inibidores da Topoisomerase I (topotecano; irinotecano). A pouca eficácia da quimioterapia no tratamento dos tumores do SNC tem sido apontada como resultado da baixa penetração dos fármacos nos tecidos (causada pela seletividade da barreira hematoencefálica e pela coesão dos conjuntos celulares adjacentes aos tumores), bem como pela resistência primária ou adquirida aos diferentes quimioterápicos (Stupp & Regg, 2003).

Há ainda uma significativa proporção de pacientes portadores de astrocitomas de baixo grau que são seguidos conservadoramente, sendo tratados unicamente com anticonvulsivantes e acompanhados por neuro-radiologia.

Quanto aos tumores de alto grau recidivantes, 20% dos pacientes são candidatos à nova cirurgia. Novas radiações são limitadas pela toxicidade, mas os pacientes podem ser conduzidos à radiocirurgia por esterotaxia (*gamma knife*, implantes radioativos) ou braquiterapia intersticial (Nwokedi *et al.*, 2002).

No Estado do Ceará, a abordagem cirúrgica prevalece ainda mais sobre a radioterapia e a quimioterapia no tratamento dos tumores astrocíticos. O difícil acesso aos serviços especializados, assim como aos métodos de neuroimagem, resultam em freqüente retardamento diagnóstico. Por sua vez, este atraso corrobora para redução das possibilidades quanto ao uso da radiação ou mesmo da ressecabilidade tumoral. Raros casos são designados à quimioterapia devido ao insucesso e, por vezes, à indisponibilidade das drogas específicas dos esquemas contra tumores do SNC. Recursos mais avançados, como radiocirurgia e neuronavegação, são atualmente indisponíveis.

#### **1.4. ALTERAÇÕES GENÉTICAS NOS ASTROCITOMAS**

Os recentes avanços na área da biologia molecular apontam as distinções entre os diferentes graus dos astrocitomas como reflexo de alterações genéticas específicas. Tais eventos moleculares seriam responsáveis não só pela promoção, mas também pela progressão tumoral em malignidade, conduzindo fenótipos de baixa gradação a categorias mais elevadas.

Os Astrocitomas Grau I exibem irregularidades genéticas distintas dos demais graus, o que reforça a teoria de rara progressão para fenótipos mais malignos. Estudos citogenéticos demonstram variação cariotípica de normal a aberrante, com ganho dos cromossomos 7, 8 e 22 e ganho ou deleção do cromossomo 19. Ocasionalmente, detectam-se perdas no cromossomo 17q, incluindo a região codificadora do gene NF1. A neurofibromina, produto do

gene NF1, possui funções supressoras tumorais, fazendo crer que a desregulação desse gene poderia assumir papel relevante na evolução para o astrocitoma pilocítico (Kleihues & Cavenee, 2000).

A formação do Astrocitoma Grau II é associada a, pelo menos, três alterações: inativação do gene supressor tumoral p53, perda do cromossomo 22q e ativação do fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF, de *platelet-derived growth factor*) e/ou do seu receptor (Torsten & Wiestler, 1997).

A alteração do p53 foi um dos primeiros eventos identificados na tumorigênese dos astrocitomas, sendo considerada uma etapa inicial. O gene p53 (cromossomo 17p) codifica o fator de transcrição homônimo que participa de inúmeros programas celulares, incluindo a regulação do ciclo celular, a resposta aos danos ao DNA e a apoptose. Sua inativação, usualmente por mutação de uma cópia e perda cromossômica do alelo restante, é descrita em aproximadamente 60% de todos os tumores astrocíticos (Chosdol *et al.*, 2002).

A perda do cromossomo 22q é detectada em 20-30% dos astrocitomas, sugerindo a possível localização de um gene supressor tumoral neste cromossomo. Análises com hibridação genômica comparativa (CGH, de *comparative genomic hybridisation*) destacam outras alterações cromossômicas (ganho do 7q, amplificação do 8 e deleção do 6) como potencialmente envolvidas no surgimento dos astrocitomas (Louis & Cavenee, 1997).

Dos vários fatores de crescimento expressos pelos astrocitomas, o PDGF é o mais claramente implicado no processo tumorigênico, especialmente nos tumores do grau II. O mecanismo de superexpressão do PDGF, bem como de seu receptor (PDGFR), ainda não foi totalmente esclarecido, embora alguns tumores demonstrem amplificação do gene codificador do PDGFR subtipo alfa. A expressão de PDGF também se correlaciona com a inativação do p53 (Louis, 1997).

A transição para o Astrocitoma Grau III é vinculada à inativação de genes supressores tumorais nos cromossomos 9p e 13q, bem como à amplificação do cromossomo 12q. Todas essas alterações parecem convergir no sentido da não-expressão ou da ativação por fosforilação proteína Rb (pRb), provocando a liberação de fatores de transcrição E2F (promotores da transição G1-S) (Korshunov *et al.*, 2002).

A perda do cromossomo 13q é observada em um terço dos astrocitomas, sendo o sítio 13q13 o local do gene codificador da pRb. A perda ou mutação dos genes supressores tumorais p16 (CDKN2A) e p15 (CDKN2B) (localizados no cromossomo 9p21), bem como o aumento da expressão ou amplificação do gene da CDK4 (situado no cromossomo 12q), resultam no aumento da fosforilação da pRb (Figura 02).

Outro gene associado à progressão para o grau III consiste num suposto supressor tumoral localizado no cromossomo 19q. A perda do cromossomo 19q parece ocorrer exclusivamente em tumores gliais, sendo detectada em todos os graus dos astrocitomas, especialmente no Astrocitoma Grau III (44%) (Chosdol *et al.*, 2002).

Distintas vias moleculares podem caracterizar a progressão para o Glioblastoma: uma comumente observada em pacientes jovens, a partir dos astrocitomas grau II ou III (Astrocitoma Grau IV Secundário), e outra típica em pacientes idosos, sem história de astrocitoma de baixo grau precedente, originada diretamente das células precursoras (Astrocitoma Grau IV Primário). Todavia, a perda do cromossomo 10 é relatada como um evento comum a todos os Astrocitomas Grau IV, sendo encontrada em 60-85% desses tumores (Hilton & Melling, 2004).

O Astrocitoma Grau IV Secundário demonstra perda de heterozigose em grandes regiões do cromossomo 10 (10p, 10q23 e 25-26). O gene supressor tumoral PTEN/MMAC1 (de *phosphatase and tensin homology / mutated in multiple advanced cancer 1*), situado no cromossomo 10q23, também pode aparecer mutado nos tumores grau IV. O gene DCC (de

*deleted in colon cancer*), outro supressor tumoral localizado no cromossomo 18q21, está ausente em 7% dos astrocitomas de baixo grau e em 53% dos glioblastomas, sugerindo sua participação na gênese desses tumores. O gene DMBT1 (de *deleted in malignant brain tumours 1*), situado no cromossomo 10q25-26, encontra-se deletado em 23-38% dos astrocitomas grau IV secundários, sendo considerado mais um candidato a supressor tumoral (Kleihues & Cavenee, 2000).

No Astrocitoma Grau IV Primário ocorre a amplificação do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR, de *epidermal growth factor receptor*) na maioria dos casos, simultaneamente à perda do cromossomo 10. O EGFR consiste num receptor de membrana do tipo tirosino-quinase envolvido no controle da proliferação celular (Louis *et al.*, 2002).

Julga-se que menos de 10% dos glioblastomas primários exibam mutação do p53, não sendo verificada concomitância entre esta e a superexpressão de EGFR. Tal fato indica que esses eventos são mutuamente exclusivos, reiterando a diferença entre a progressão para os tumores *de novo* e para os secundários, sendo nestes últimos tipicamente detectada a mutação do p53. Entretanto, a atividade transcricional da proteína p53 nos astrocitomas grau IV primários está algumas vezes abolida, visto a formação de complexos com a proteína MDM2 (de *murine double minute clone 2*). O gene MDM2, encontrado no cromossomo 12q13-14, é descrito como superexpresso em 50% dos glioblastomas primários (Chosdol *et al.*, 2002).

Ainda quanto à progressão para os tumores grau IV, a desregulação do gene CDKN2A ocasiona a perda da expressão do supressor tumoral p16 o que, por sua vez, promove a superexpressão/amplificação de CDKs e a ativação da pRb. A promoção destas vias é observada em 36% dos astrocitomas grau IV primários, contrastando com 4% nos tumores secundários. Outro subconjunto dos glioblastomas é formado por aqueles provenientes da evolução de oligodendrogliomas e oligoastrocitomas, caracterizados pela perda dos cromossomos 19q e 1p, além do 10 (Louis & Gusella, 1995).



Resumidamente, os astrocitomas malignos podem se originar através de diferentes caminhos moleculares: a partir de astrocitomas de baixo grau, via inativação do p53; *de novo*, no decurso da ativação do EGFR; de neoplasmas oligodendrogliais; ou ainda por direções até então não definidas (Figura 09).

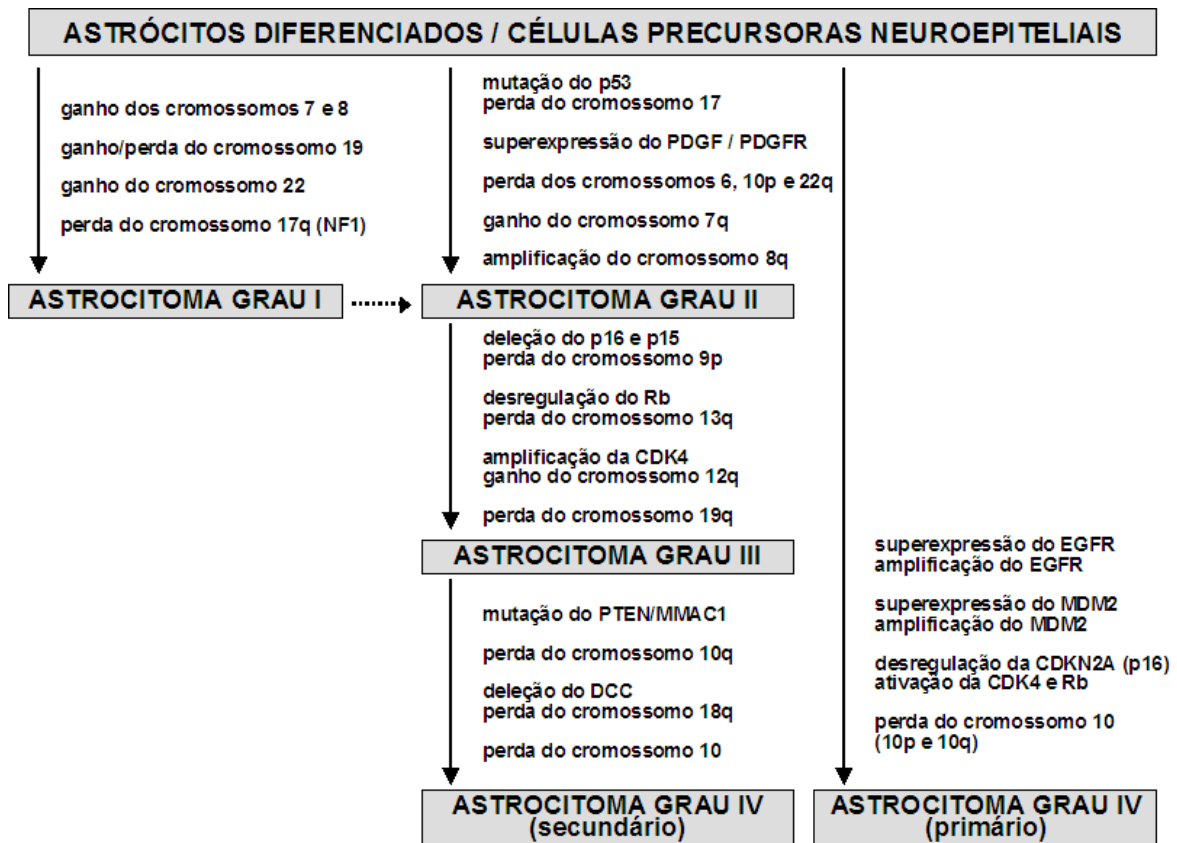


FIGURA 09 – Diagrama representativo das alterações genéticas envolvidas na progressão maligna dos astrocitomas. Adaptado de Kleihues & Cavenee (2000).

## 1.5. MARCADORES MOLECULARES

Apesar das recentes descobertas sobre os eventos moleculares implicados na tumorigênese dos astrocitomas, a análise histopatológica convencional permanece como o melhor método diagnóstico e razoável indicador prognóstico para esses tumores. Tal fato

deve-se à ausência de correlação clínica direta entre as alterações genéticas detectadas e o comportamento biológico dos tumores astrocíticos, especialmente na definição de conjecturas prognósticas (Dietrich & Tribolet, 1997).

Um dos principais desafios da neuro-oncologia quanto ao estudo dos astrocitomas, portanto, consiste na identificação de marcadores moleculares específicos, que efetivamente caracterizem os diversos tipos de neoplasias, possibilitando o entendimento funcional das vias tumorigênicas e fornecendo informações relevantes acerca do diagnóstico, da resposta terapêutica e do prognóstico desses tumores (Grzybicki & Moore, 1999).

Neste contexto, marcadores de proliferação celular (Ki-67, Topoisomerase II $\alpha$ , c-Myc), diferenciação astrocítica (GFAP), supressores tumorais (p53, p21, p27), apoptose (Bax, Bcl-2, c-Myc), receptores de membrana (EGFR, ErbB-2), transdutores de sinal (p21<sup>ras</sup>) e enzimas relacionadas à quimiorresistência (O<sup>6</sup>-Metilguanossina-DNA-Metiltransferase, Glutathione-S-Transferase  $\pi$ , Timidilato Sintase, Topoisomerase II $\alpha$ ) mostram-se como potenciais ferramentas a serem utilizadas na investigação das modificações moleculares resultantes do processo tumorigênico nos astrocitomas, demonstrando virtual valor diagnóstico e prognóstico.

### **1.5.1. Proliferação Celular**

A atividade proliferativa de um tecido, sadio ou tumoral, é resultado do balanço entre a fração de células em duplicação, o tempo dispensado durante o ciclo celular e as perdas por apoptose. Apesar da complexidade concernente ao crescimento celular, a medida do potencial proliferativo das neoplasias tem demonstrado forte correlação com o grau de malignidade, principalmente nos tumores sólidos (Brown & Gatter, 2002).

O progresso no reconhecimento dos mecanismos reguladores do ciclo celular propiciou a descoberta de moléculas expressas diferencialmente em células proliferantes. Dentre essas, destacam-se o antígeno Ki-67 e a enzima Topoisomerase II $\alpha$ .

O antígeno **Ki-67** é expresso durante todas as fases do ciclo celular (G1-S-G2-M). Este consiste numa proteína nuclear do tipo não-histona, formada por cadeias polipeptídicas com pesos moleculares variando entre 345 e 395kDa (Gerdes *et al.*, 1991). O gene codificador do antígeno Ki-67 foi localizado no cromossomo 10q25. A função dessa proteína permanece desconhecida, embora sua estrutura sugira que sua expressão seja regulada por vias proteolíticas (Fonatsch *et al.*, 1991). Cattoretti *et al.*, em 1992, padronizou a detecção imunohistoquímica do Ki-67 em tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina, utilizando pela primeira vez o anticorpo monoclonal de camundongo designado MIB-1 (de *Molecular Immunology Borstel 1*).

As topoisomerasas, por sua vez, são enzimas que regulam as interconversões topológicas do DNA através da quebra reversível da fita simples (tipo I) ou dupla (tipo II) do DNA. A topoisomerase II revela-se essencial em vários processos celulares, incluindo a replicação do DNA, a segregação dos cromossomos, a manutenção da estrutura cromossômica e a prevenção do superenovelamento do DNA (Bakshi *et al.*, 2001).

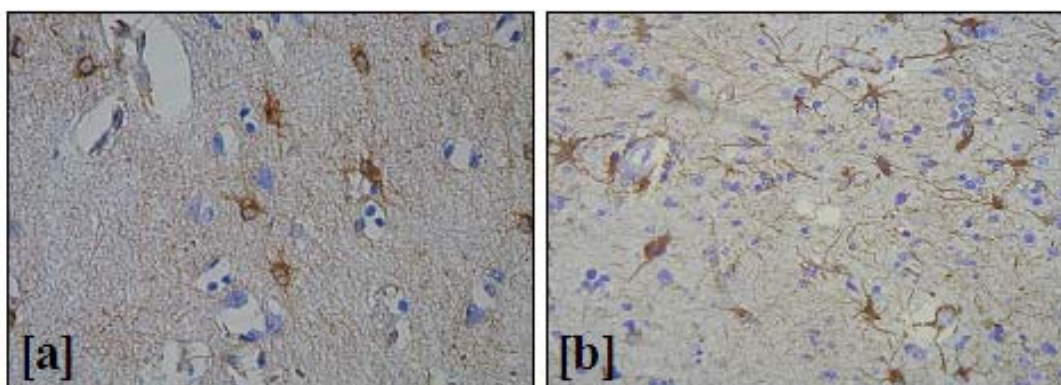
Recentemente, duas isoformas da topoisomerase II foram identificadas: a alfa ( $\alpha$ ) e a beta ( $\beta$ ), com 170 e 180kDa respectivamente. Apesar do alto grau de homologia, essas duas variantes são diferentemente reguladas. A **Topoisomerase II $\alpha$**  (subtipo predominante) é descrita como expressa somente em células proliferantes, no intervalo entre o desfecho da fase S e a conclusão da fase M. (Taniguchi *et al.*, 1999).

### 1.5.2. Diferenciação Astrocítica

A proteína ácida glio-fibrilar (GFAP, de *glial fibrillary acidic protein*) participa da constituição do citoesqueleto dos astrócitos, conferindo-lhes estabilidade estrutural e mobilidade. Até o presente momento, a GFAP é considerada o marcador mais específico para detecção de células de origem astrocítica (Figura 10) (Rutka *et al.*, 1997).

Traumatismos no SNC, doenças neurodegenerativas, infecções, intoxicações químicas e radiação podem induzir a proliferação astrocítica, elevando a expressão de GFAP. Tumores mistos oligo-astrocíticos são distinguidos pela detecção diferencial da GFAP nos astrócitos neoplásicos (Eng *et al.*, 2000).

A marcação para GFAP tende a diminuir com a progressão maligna dos astrocitomas. Nos glioblastomas, a extensão e o aspecto da imuno-expressão dessa proteína é altamente variável. Células gigantes multinucleadas exibem marcação heterogênea. Células correlatas aos astrócitos, como os gemistócitos, demonstram forte positividade, enquanto células indiferenciadas mostram propensão à negatividade ou à fraca expressão de GFAP (Lantos *et al.*, 2002).



**FIGURA 10 – Expressão de GFAP detectada por imuno-histoquímica (400X).** [a] Caso n°. 0.5 - Córtex Cerebral Não-Tumoral. [b] Caso n°. 40 – Astrocitoma Grau IV (OMS): percebe-se aumento da celularidade, com atipia nuclear e pleomorfismo significantes; a expressão de GFAP é visualizada somente em cerca da metade dos astrócitos neoplásicos. Para maiores detalhes sobre os casos, consultar Anexo IV.

### 1.5.3. Supressores Tumorais

O gene supressor tumoral **p53** está localizado no cromossomo 17p13.1, sendo constituído por onze exons. Seu produto protéico consiste numa nucleoproteína fosfatada de 53kDa, formada por três regiões distintas: a extremidade amino-terminal (exons 2, 3 e 4), reguladora da ativação transcricional; a porção central (exons 4, 5, 6, 7 e 8), responsável pela ligação ao DNA e a extremidade carboxi-terminal (exons 9, 10 e 11), importante na oligomerização tetramérica e na fixação nuclear da estrutura protéica (Lane, 1992).

A proteína p53 atua basicamente como um fator de transcrição, ativando moléculas reguladoras de diversos programas celulares incluindo o ciclo celular, a resposta ao dano ao DNA, a apoptose, a diferenciação celular e a angiogênese. Na resposta às lesões genéticas, por exemplo, a p53 pode induzir a expressão da proteína GADD-45 (de *growth arrest and DNA damage 45*), que (1) promove a parada do ciclo celular na fase G2, provavelmente pela associação com o complexo ciclina B/CDK1, (2) impede a replicação, através da formação de complexos inibitórios com o PCNA (de *proliferation cell nuclear antigen*) e (3) desestabiliza as interações DNA-histonas, permitindo assim o reparo ao DNA (Bertram, 2001).

A proteína p53 selvagem (*wild-type*, funcional) é discretamente expressa em todas as células normais, tendo curta meia-vida (20 a 30min). Entretanto, sua versão mutante (inativa) é altamente estável, provocando seu acúmulo celular e, dessa forma, tornando possível sua detecção. Por esta razão, o método imuno-histoquímico tem sido proposto como uma forma simples e rápida de investigação da mutação do gene p53 (Louis *et al.*, 1993).

O principal alvo transcricional da p53 é representado pelo gene WAF1 (também conhecido como CIP1, SDI1, mda-6 ou CDKN1A), localizado no cromossomo 6p21.1. Este, por sua vez, codifica uma proteína fosfatada de 21kDa, que também exhibe atividade supressora tumoral, denominada **p21<sup>WAF1/CIP1</sup>**. A proteína p21 atua como reguladora negativa

do ciclo celular, inibindo a atividade das CDKs ativadoras da transição G1-S (Figura 02) e controlando a síntese do DNA (fase S) através do bloqueio do PCNA (Ono *et al.*, 1997).

A regulação direta da expressão do WAF1 pelo p53 implica que, na presença da mutação do p53, os níveis de p21 estariam dramaticamente reduzidos ou totalmente ausentes. Deste modo, a expressão do p21 refletiria o *status* funcional do gene p53 de modo simples e adicional à constatação da existência da proteína p53 mutada.

Outra proteína supressora tumoral da família CIP/KIP corresponde à **p27<sup>KIP1</sup>**, codificada pelo gene situado no cromossomo 12p13. A proteína p27 apresenta 42% de homologia estrutural com a p21, o que justifica a similaridade na ação destas proteínas no bloqueio da progressão do ciclo celular através da inibição dos complexos ciclina D/CDK4, ciclina E/CDK2 e ciclina A/CDK2 (Lloyd *et al.*, 1999)

Fato curioso é a detecção da proteína p27, de atuação eminentemente nuclear, no compartimento citoplasmático de células neoplásicas. Recentes evidências sugerem que a expressão oncogênica de PKB (de *protein kinase B*) provocaria a fosforilação da proteína p27, resultando na sua redistribuição citoplasmática (Coqueret, 2003). A presença da p27 no citoplasma desencadearia seu processo de degradação através de ubiquitinação seguida de degradação por complexos proteossômicos. O seqüestro e a destruição da proteína p27 tornariam então possível a formação dos complexos ciclina/CDK, promovendo a ciclagem celular (Bloom & Pagano, 2003).

#### **1.5.4. Apoptose**

A apoptose apresenta-se como o término de uma cascata de eventos moleculares desencadeados por diversos estímulos, convergindo finalmente para a ativação de enzimas

proteolíticas (caspases) responsáveis pela morte celular. O processo de ativação das caspases, embora ainda não completamente elucidado, é regulado predominantemente pela família de proteínas bcl-2 (Cotran *et al.*, 2000).

Os membros da família bcl-2 podem ser divididos em moléculas pró-apotóticas (Bax, Bak, Bcl-x<sub>S</sub>, Bad, Bid, Bik, Hrk, Bim e Bok) e anti-apotóticas (Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-w, Bfl-1, Brag-1, Mcl-1, A1, E1B19K, LMW5-HL e EBV BHRF1). O balanço relativo entre as diferentes proteínas, refletindo a formação de homodímeros e heterodímeros (neutralização), define a via de atuação sobre o mecanismo de morte celular programada (Zörnig *et al.*, 2001).

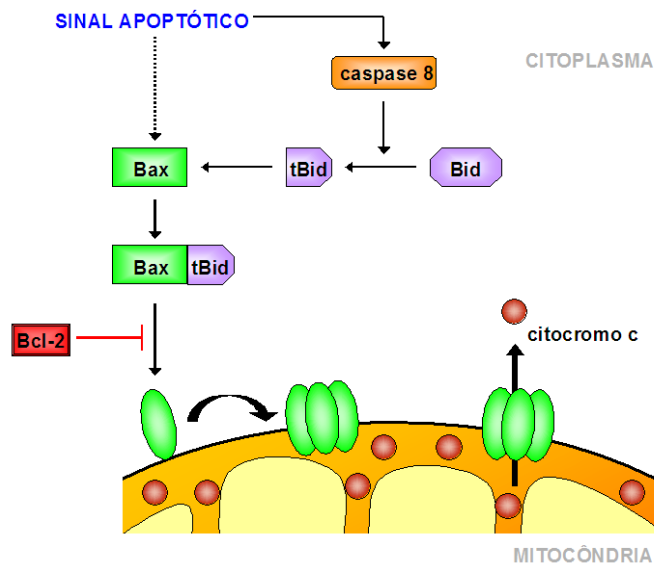
A proteína **Bax** (de *bcl-2 associated protein X*) representa o protótipo das proteínas pró-apotóticas. Na presença de um sinal apoptótico, a Bax é translocada do citoplasma para as proximidades das mitocôndrias, onde sofre ativação e modificação conformacional, aderindo à membrana mitocondrial externa. Pequenas unidades de proteínas Bax ativadas tendem ao agrupamento, formando oligômeros que acabam por penetrar a membrana mitocondrial externa. Essa integração possibilita a rápida liberação do citocromo **c**, um potente ativador de caspases (Figura 11) (Antonsson & Martinou, 2000).

Por outro lado, a proteína **Bcl-2** (de *B-cell lymphoma 2*), codificada pelo gene localizado no cromossomo 18q21, favorece a sobrevivência celular. Esta impede o escape do citocromo **c**, possivelmente pela formação de heterodímeros com moléculas pró-apotóticas como a proteína Bax (Amarante-Mendes & Green, 1999).

### 1.5.5. Receptores da Família ErbB

A resposta a diversos sinais extracelulares se inicia com a ativação de receptores específicos na membrana citoplasmática. Os receptores com domínios tirosino-quinase

destacam-se como os mais numerosos receptores celulares ligados a enzimas, compreendendo dezesseis famílias. Dentre estas, situa-se a família dos receptores ErbB (de *erythroblastic leukemia viral oncogene*) (Alberts *et al.*, 2002).

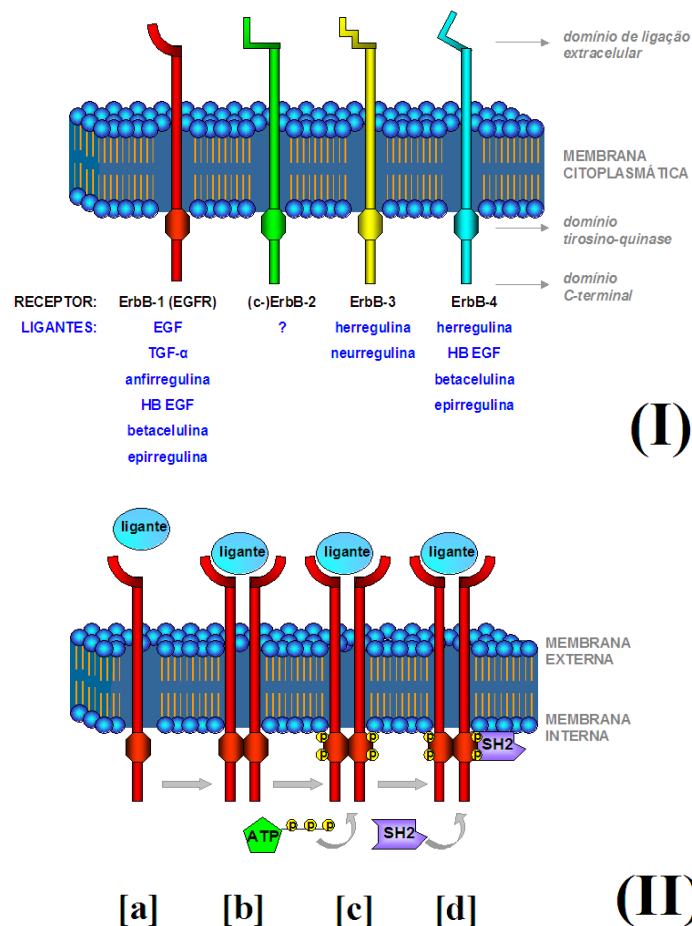


**FIGURA 11 – Representação simplificada da atuação das proteínas da família bcl-2 na regulação da cascata apoptótica mitocondrial.** O sinal apoptótico ativa a caspase 8 e mobiliza a proteína Bax do citoplasma para a mitocôndria. A caspase 8 cliva a proteína Bid, formando o tBid (fragmento C-terminal da Bid). O tBid ativa a Bax, induzindo sua alteração conformacional e adesão à membrana externa mitocondrial. As proteínas Bax ativadas oligomerizam-se e integralizam-se à membrana, possibilitando a liberação do citocromo c. A ativação da Bax pode ser prevenida pela heterodimerização com a proteína Bcl-2. Adaptado de Desagher & Martinou (2000).

Os receptores ErbB consistem em proteínas transmembranares com um domínio de ligação extracelular e outro citoplasmático, onde se encontra a porção tirosino-quinase. Estes podem ser formados a partir de quatro unidades monoméricas: ErbB-1, também conhecido como HER1 (de *homolog erythroblastic 1*) ou EGFR (de *epidermal growth factor receptor*), uma proteína de 170kDa codificada pelo gene localizado no cromossomo 7p12; ErbB-2 (HER2/neu), uma proteína com 185kDa codificada pelo gene situado no cromossomo 17q12-21.32; ErbB-3 (HER3) e ErbB-4 (HER4) (Figura 12-I) (Arteaga, 2003).



A funcionalidade dos receptores ErbB se dá através da formação de homo ou heterodímeros induzida pelo contato com fatores de crescimento específicos. Segue-se então da ativação do domínio tirosino-quinase, que promove a auto-fosforilação da cadeia de tirosina dos receptores. Uma vez fosforilados, os domínios citoplasmáticos dos receptores recrutam e ativam proteínas de sinalização intracelular que irão atuar em múltiplas cascatas regulatórias (Figura 12-II). As versões oncogênicas desses receptores resultam de sua superexpressão ou estão associadas à dimerização e à ativação persistentes, mesmo na ausência de ligantes, produzindo estado de estimulação contínua das vias mensageiras celulares (Meldensohn & Baselga, 2000).



**FIGURA 12 – Representação esquemática dos subtipos e do mecanismo de ativação dos receptores ErbB.** (I) Estrutura básica e ligantes específicos. (II) Mecanismo de ativação normal: [a] contato com o ligante, [b] alteração conformacional - dimerização, [c] auto-fosforilação e [d] ligação e ativação de proteínas sinalizadoras. Baseado em Arteaga (2003).

### 1.5.6. Sinalização Intracelular

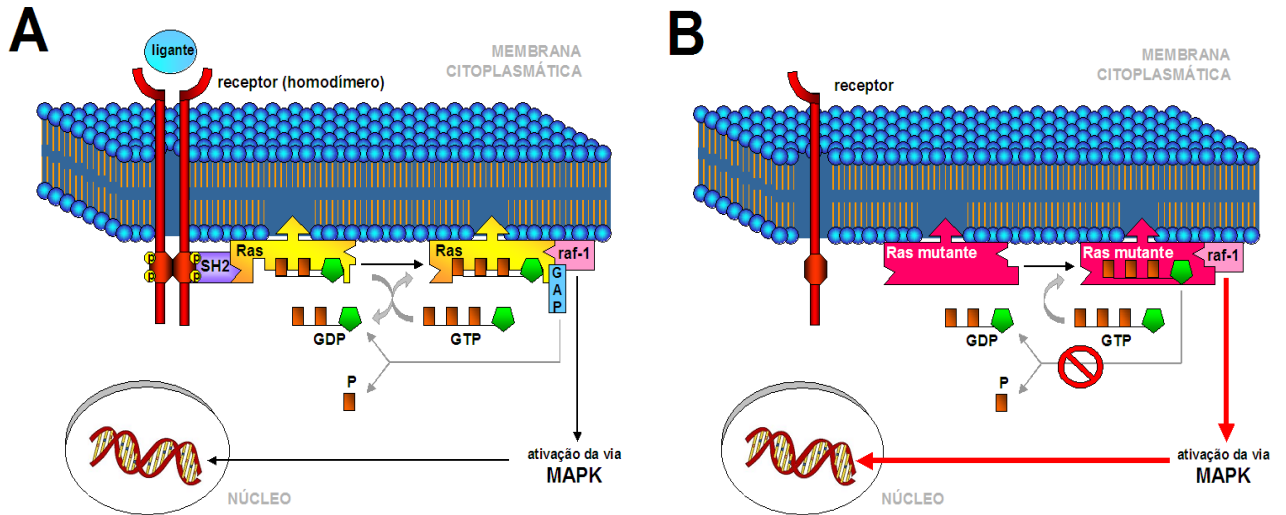
As proteínas **Ras** (de *rat sarcoma*) foram inicialmente descritas como produto de oncogenes virais, sendo identificados três subtipos: H-Ras (de Harvey), K-Ras (de Kirsten) e N-ras (de neuroblastoma). A descoberta dos genes homólogos humanos nos cromossomos 11, 12 e 1, respectivamente, revelou a mutação desse conjunto como a anormalidade genética mais freqüente em tumores humanos (Malumbres & Barbacid, 2003).

As proteínas Ras demonstram alto grau de homologia estrutural, apresentando 188 aminoácidos e peso molecular de 21kDa (daí **p21<sup>Ras</sup>**). Tais proteínas pertencem à grande família das proteínas monoméricas ligadas ao GTP (de *guanosine 5'-triphosphate*), sendo fundamentais na transdução intracitoplasmática de sinais (Shapiro, 2004).

Após contato com moléculas de ancoragem (como a SH2, de *Src homology region 2*) recém-sensibilizadas pela estimulação dos receptores da membrana citoplasmática, as proteínas Ras tornam-se ativas trocando o GDP (de *guanosine 5'-diphosphate*) pelo GTP. A Ras ativada pode excitar inúmeros mensageiros, incluindo o Raf-1 (de *Ras associated factor 1*). Este, por sua vez, sensibiliza a cascata de proliferação e diferenciação celular promovida pela importante via MAPK (de *mitogen-activated protein kinase*). Duas classes de enzimas regulam a atividade da Ras: (1) as GEFs (de *guanine nucleotide exchange factors*) possibilitam sua ligação ao GTP e (2) as GAPs (de *GTPase-activating protein*) promovem a hidrólise do GTP ligado à Ras, inativando-a (Figura 13-A) (Alberts *et al.*, 2002).

As formas mutantes das proteínas Ras exibem alterações moleculares que as tornam ativas, mesmo na ausência de estímulos extracelulares. Além disso, estas variantes também podem demonstrar refratariedade à ação das GAPs, mantendo o GTP aprisionado e, assim, prolongando seus períodos de ativação (Figura 13-B). A superexpressão das proteínas Ras,

por sua vez, ocasiona a maior sensibilização das vias transdutoras de sinal, tornando a detecção dessas proteínas num importante indicador de malignidade (Marshall, 1999).



**FIGURA 13 – Modelo esquemático da atuação das proteínas Ras “normal” (A) e mutante (B) na sinalização intracelular.** Adaptado de Cotran *et al.* (2000).

### 1.5.7. O Fator de Transcrição c-Myc

Em 1911, Peyton Rous evidenciou que um sarcoma típico de aves poderia ser transmitido através de extratos tumorais não-celulares, sugerindo que vírus poderiam ser os possíveis agentes etiológicos dessas neoplasias. Baseado nesse trabalho, Sheiness & Bishop (1979), estudando um subgrupo de retrovírus causadores da mielocitomatose em aves, identificaram o oncogene *v-myc* (de *v*iral *a*vian *m*ycelo*c*ytoma*t*osis). Subseqüentemente, o gene *c-myc* (de *c*ell) foi identificado como o homólogo celular deste oncogene retroviral, sendo sua superexpressão demonstrada em vários tumores humanos e animais (Dang, 1999).

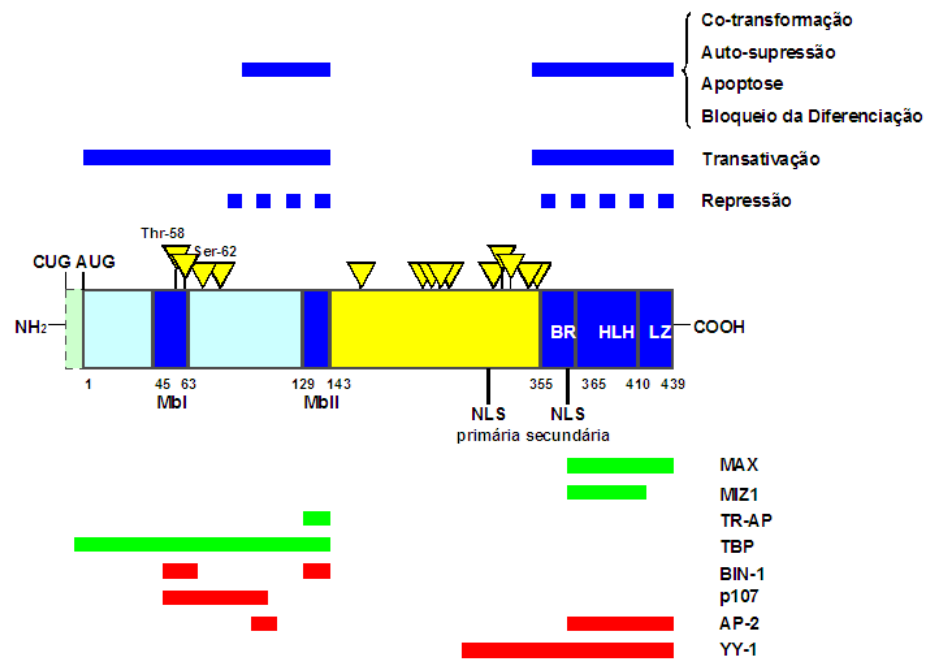
O gene *c-myc* está localizado no *locus* 8q24.1, compreendendo três exons. Seus produtos protéicos Myc-1 (67kDa) e Myc-2 (64kDa) consistem em fosfoproteínas nucleares

altamente conservadas, expressos em quantidades variáveis de acordo com o tecido avaliado. Uma terceira isoforma da proteína c-Myc, denominada de Myc-S (do inglês *short*) ou Myc-3, foi descrita recentemente (Spotts *et al.*, 1997).

Logo depois da descoberta do gene c-Myc, dois outros genes relacionados foram encontrados amplificados em cânceres humanos: o N-myc (nos neuroblastomas) e o L-myc (nos carcinomas do pulmão, do inglês *lung*). Adicionalmente, dois novos genes foram identificados, contudo somente em roedores: o B-myc e o S-myc. O conjunto desses genes é denominado genericamente como **família de oncogenes myc** (Melkounian *et al.*, 2002).

A proteína c-Myc contém duas seqüências de localização nuclear (NLS) e domínios estruturais que a caracterizam como um fator de transcrição. Os primeiros 143 aminoácidos da porção N-terminal compreendem o domínio de transativação (TAD), que contém as regiões chamadas Myc boxes (Mb) I e II. Estas últimas são intrinsecamente ligadas às atividades biológicas exercidas pela c-Myc e altamente conservadas entre os membros da família. A porção C-terminal contempla três importantes domínios: [1] a região básica (BR), implicada no reconhecimento específico da seqüência do DNA, [2] a helix-loop-helix (HLH) e [3] o zipper de leucina (LZ), estas últimas responsáveis pela formação de heterodímeros específicos entre a c-Myc e seus ligantes (Figura 14) (Pelengaris *et al.*, 2002).

Um dos ligantes reconhecido como essencial para a maioria das atividades biológicas exercidas pela c-Myc é a proteína **Max**. Esta, quando dimerizada com a proteína c-Myc, funciona como **ativadora** transcricional. Praticamente toda c-Myc celular está complexada com a proteína Max que, ao contrário da c-Myc, é expressa constitutivamente. A Max também interage com outras proteínas com domínios HLH-LZ, como as proteínas da família **Mad**. O complexo Max/Mad forma-se do mesmo modo como o Myc/Max, entretanto atua predominantemente como **repressor** transcricional (Baudino & Cleveland, 2001).



**FIGURA 14 – Estrutura, funções e ligantes da proteína c-Myc.** Os maiores domínios funcionais e os sítios de fosforilação estão representados na estrutura protéica central nas cores azul e amarela, respectivamente. As regiões responsáveis pelas atividades biológicas são indicadas acima da estrutura protéica e as envolvidas na ligação com outras proteínas são enumeradas logo abaixo. A faixa azul descontínua indica os domínios relacionados à repressão transcricional, ainda não completamente definidos. Exemplos de proteínas ligantes que promovem a função da proteína c-Myc são mostradas na cor verde e as inibidoras na cor vermelha. BR, região básica; HLH, *helix-loop-helix*; LZ, *zipper* de leucina; MBI, *Myc Box I*; MbII, *Myc Box II*; NLS, seqüência de localização nuclear. Adaptado de Facchini & Penn (1998).

Várias pesquisas têm sido realizadas na tentativa de compreender o mecanismo dual de transativação pelos complexos Myc/Max e Max/Mad. Recentes evidências sugerem que, pelo menos em parte, Myc e Mad regulam a transcrição através do recrutamento de, respectivamente, acetilases e desacetilases de histonas (Frank *et al.*, 2001).

A expressão do c-myc, bem como de outros membros da família myc, é indispensável durante o desenvolvimento embrionário normal. A atividade do c-myc em células normais é regulada por sinais externos, como fatores de crescimento e componentes da matriz extracelular, bem como por sinais internos, como a maquinaria de ativação do ciclo celular. Células diferenciadas normalmente expressam baixos níveis de c-Myc, embora possam potencialmente transcrever a proteína c-Myc quando estimuladas (Gardner *et al.*, 2002).

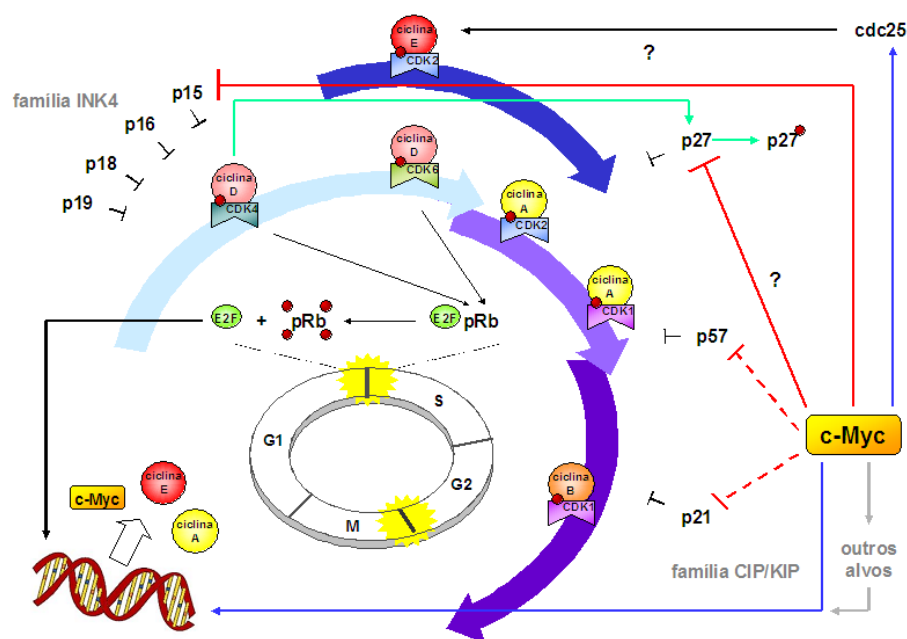
Embora a ligação entre c-myc e câncer esteja bem estabelecida, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, os mecanismos moleculares que promovem a transformação maligna mediada pelo c-myc não são completamente conhecidos. Muitos esforços têm se concentrado na identificação dos programas genéticos induzidos pelo c-myc, através da identificação dos seus potenciais alvos diretos e indiretos.

O impacto do c-myc no **ciclo celular** tem sido atribuído principalmente à promoção da transição G1-S através da ativação do complexo ciclina/CDK, do incentivo à transcrição E2F-dependente e do fomento ao crescimento celular (Beier *et al.*, 2000).

Quanto à ativação das CDKs, especialmente do complexo ciclinaE/CDK2, a proteína c-Myc atua em, pelo menos, três vias distintas: [1] inativação funcional do p27<sup>KIP1</sup>, através do estímulo à sua degradação ou através do seu seqüestro pelo complexo ciclinaD2/CDK4, [2] indução da cdc25A, uma fosfatase de CDKs e [3] ativação indireta da expressão de ciclina E. Nesses processos, as CDKs ficam livres para fosforilar as proteínas da família Rb, desencadeando a liberação dos fatores de transcrição E2F. Estes, por sua vez, ativam a transcrição de mais ciclinas e de outros genes promotores do ciclo celular, incentivando sobremaneira a progressão G1-S (Figura 15) (Amati *et al.*, 1998).

Especula-se que o c-myc também poderia atuar em outras vias, desde a inibição da transcrição de outros supressores tumorais até a cooperação com a oncoproteína transdutora de sinal Ras, atuando de modo complementar e sinérgico na ativação das CDKs por estímulos mitogênicos (Lutz *et al.*, 2002).

A superexpressão de c-myc, mesmo que transitoriamente, parece também induzir **instabilidade cromossômica**, caracterizada por ampliações, aneuploidias e poliploidias. Outros estudos sugerem que a c-Myc induz a produção de radicais livres pelas mitocôndrias, acarretando em danos ao DNA e, assim, irregularidades genômicas (Gardner *et al.*, 2002).

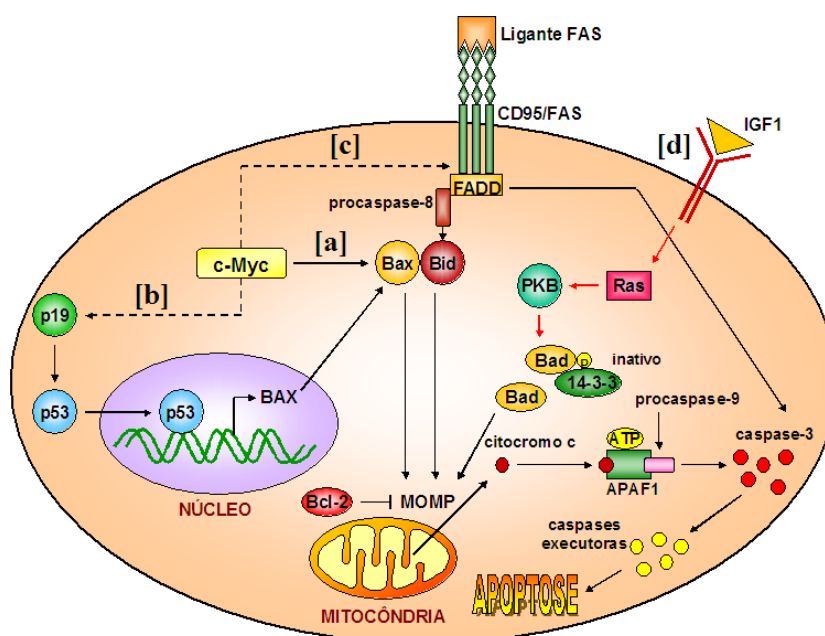


**FIGURA 15 – Representação parcial e simplificada da atuação do c-myc nas vias moleculares reguladoras do ciclo celular em organismos superiores.** A proteína c-Myc atua inativando os supressores tumorais (linhas vermelhas), embora algumas vias ainda não tenham sido totalmente elucidadas (linhas descontínuas). O sinal de interrogação (?) ilustra a participação de mediadores ainda não estabelecidos. A inibição do p15 promove a “liberação” do complexo ciclinaD/CDK4, que atua seqüestrando o p27. A ausência do p27 torna o complexo ciclinaE/CDK2 mais disponível, o que por sua vez promove a transição G1-S (linhas verdes). A disponibilidade dos complexos ciclina/CDK promove a fosforilação das proteínas da família Rb, desencadeando a liberação de E2F, que ativa a transcrição de mais ciclinas e de outros fatores transcricionais, dando impulso à ciclagem celular. O c-myc também atua diretamente como fator de transcrição de ativadores do ciclo celular (linhas azuis), como as ciclinas e a cdc25a, ou indiretamente, ativando outros elementos de transcrição (linhas cinzas). Adaptado de Amati *et al.* (1998), Cotran *et al.* (2000) e Lutz *et al.* (2002).

A proteína c-Myc também apresenta importante papel na **diferenciação celular**. Demonstrou-se que a baixa expressão de c-myc é acompanhada de diferenciação precoce e parada permanente da ciclagem celular. Por outro lado, a expressão ectópica de c-myc é suficiente para bloquear os mecanismos de diferenciação celular (Canelles *et al.*, 1997).

Historicamente, observa-se uma tendência em classificar o c-myc como um gene responsável pela **imortalização celular**. Tal vocação é reforçada quando se percebe o c-myc como o gene-chave na indução da atividade da telomerase, bem como na expressão de suas subunidades catalíticas TERT (de *telomerase reverse transcriptase*) (Wang *et al.*, 1998).

Paradoxalmente, evidenciou-se que, em certas circunstâncias, o c-myc poderia atuar induzindo a **apoptose**. Muitos genes envolvidos na morte celular programada, como o p53, p21 e Bax contém regiões responsivas a c-Myc em seus promotores. Entre as possíveis vias pró-apoptóticas mediadas pelo c-myc destaca-se a ativação do p19<sup>ARF</sup>. Esta proteína supressora tumoral atua reprimindo o MDM-2 (regulador negativo do p53), induzindo a disponibilização da p53 e, assim, desencadeando a promoção dos mecanismos apoptóticos (Figura 16) (Lutz *et al.*, 2002).



**FIGURA 16 – Vias apoptóticas mediadas pela proteína c-Myc.** [a] Ativação da proteína Bax. [b] Ativação indireta do supressor tumoral p53 via p19<sup>ARF</sup>. [c] Ligação ao receptor CD95/FAS. [d] Bloqueio da apoptose mediada pela proteína c-Myc. A sinalização via receptor IGF-1 e/ou a ativação da proteína Ras promovem a ativação da serina/treonina quinase PKB e, subseqüentemente, a fosforilação da proteína pró-apoptótica Bad. A Bad fosforilada é “seqüestrada” e inativada pelas proteínas 14-3-3. Adaptado de Pelengaris *et al.* (2002).

O aumento da proliferação celular requer insumos energéticos e disponibilidade de substratos específicos, resultando na necessidade do incremento no **metabolismo celular**. A regulação do volume celular é diretamente relacionada ao ciclo celular, embora a base molecular dessa modulação não seja completamente conhecida. Recentes pesquisas sugerem



que superexpressão de c-Myc resultaria no aumento da expressão de genes codificadores de proteínas ribossomais que, por sua vez, contribuiriam para o crescimento celular. Além disso, genes importantes para o metabolismo do DNA [como os que codificam a carboximetil-fosfato sintase (CAD), a ornitina descarboxilase (ODC), a dihidrofolato redutase (DHFR) e a timidina quinase (TK)] são igualmente apontados como alvos transcricionais da c-Myc (Dang, 1999).

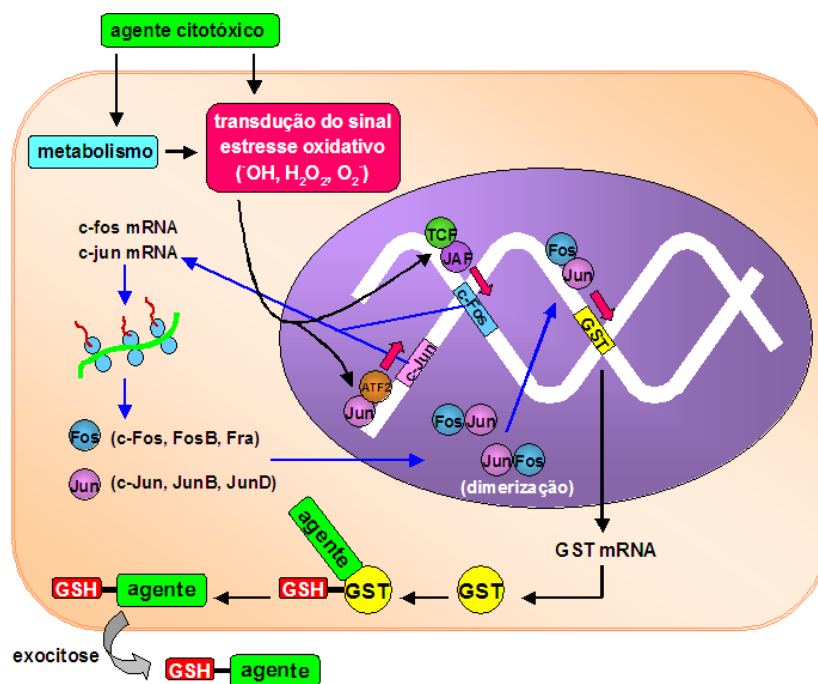
A proteína c-Myc também é descrita como capaz de ativar os promotores de enzimas glicolíticas frente aos sinais de hipóxia tecidual. Nos tumores, a vascularização escassa e o alto perfil proliferativo resultam num *status* hipóxico (conhecido como efeito Warburg) capaz de induzir a expressão do c-myc, que atua promovendo o reforço energético através da glicólise (Gardner *et al.*, 2002). Nessa perspectiva, cogita-se que a c-Myc possa atuar adicionalmente na supressão de fatores anti-angiogênicos, como a trombospondina, ativando a **angiogênese** na tentativa de contrapor a hipóxia e promover o suprimento metabólico exigido pela neoplasia (Knies-Bamforth *et al.*, 2004).

#### 1.5.8. Enzimas relacionadas à Quimiorresistência

Um dos cenários mais desafiadores da prática oncológica consiste no surgimento de resistência à quimioterapia antineoplásica. Diversos fatores, pré-existent ou secundários ao processo neoplásico, parecem contribuir para esse fenômeno. Condições fisiológicas (suprimento sanguíneo, pH e oxigenação tumoral) e biológicas (heterogeneidade celular e fenótipo metastático) são implicadas como indutoras de refratariedade à terapêutica antitumoral. Contudo, o termo **quimiorresistência** é tradicionalmente empregado em alusão a mecanismos bioquímicos, onde moléculas específicas são diretamente relacionadas à ineficácia de esquemas quimioterapêuticos (Ringborg & Platz, 1996).

Recentemente, algumas enzimas próprias do metabolismo celular normal foram identificadas como promotoras de resistência a drogas antineoplásicas. Superexpressas nos tecidos tumorais, ou mesmo em quantidades fisiológicas, essas enzimas parecem desencadear sistemas de detoxificação, de restabelecimento de vias metabólicas e de reparo ao DNA capazes de frustrar os mais variados regimes antineoplásicos (Nutt *et al.*, 2000).

A conjugação de moléculas citotóxicas com a glutatona (tripeptídeo formado por resíduos de glicina, glutamato e cisteína) representa um importante mecanismo de detoxificação celular (fase II). Os conjugados resultantes mostram-se menos tóxicos e mais hidrossolúveis, sendo geralmente excretados das células por transporte passivo. Pequenas moléculas reagem espontaneamente com a glutatona, todavia as maiores necessitam da interação com enzimas catalizadoras do tipo **Glutationa-S-Transferase (GST)** (Figura 17).

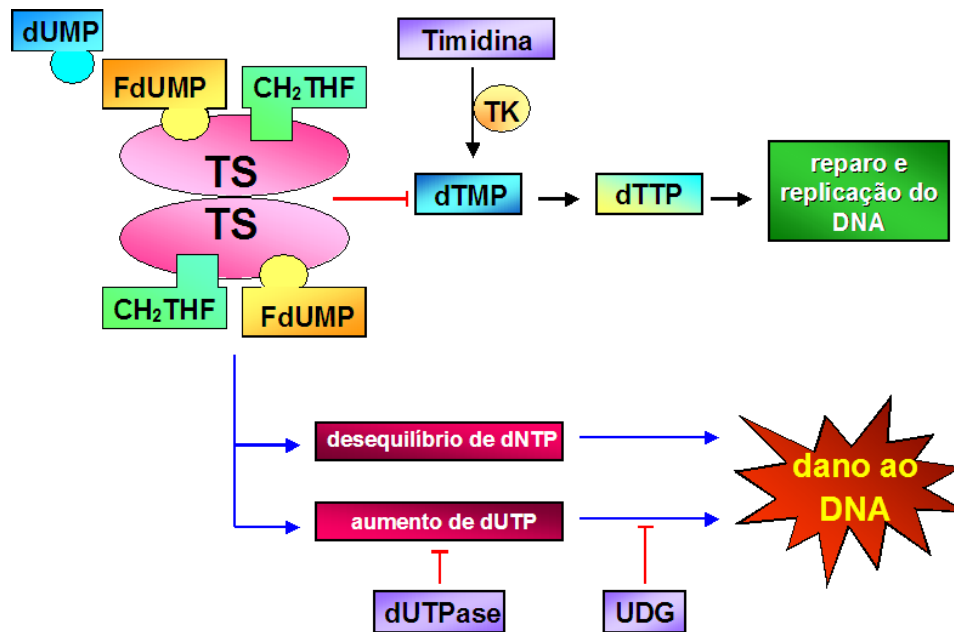


**FIGURA 17 – Modelo esquemático da regulação e do mecanismo de ação da Glutationa-S-Transferase (GST).** A ativação de mensageiros intracelulares e de radicais livres como resposta aos agentes citotóxicos e/ou seus metabólitos desencadeia a expressão de moléculas das famílias Fos e Jun. Estas formam heterodímeros que atuam como fatores de transcrição das proteínas GST ( $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\pi$  ou  $\tau$ ). As enzimas GST operam adicionando grupos GSH (glutatona) à estrutura dos agentes tóxicos e, assim, determinando sua exclusão da célula. Adaptado de Bergelson *et al.* (1994).

As GSTs abrangem um grupo de quatro isoenzimas [ $\alpha$  (alfa),  $\mu$  (mu),  $\pi$  (**pi**) e  $\tau$  (tau)] divididas de acordo com a especificidade para diferentes substratos. Diversos carcinógenos, agentes mutagênicos, quimioterápicos (ex.: alquilantes, antibióticos, podofilotoxinas), metabólitos tóxicos e produtos reativos do oxigênio têm suas taxas de detoxificação celular acentuadas pela ativação dessas enzimas (Wrensch *et al.*, 2004). Assim, sugere-se que a expressão diferencial das GSTs em células neoplásicas possa representar um importante mecanismo de quimiorresistência tumoral (Mattern & Volm, 1992).

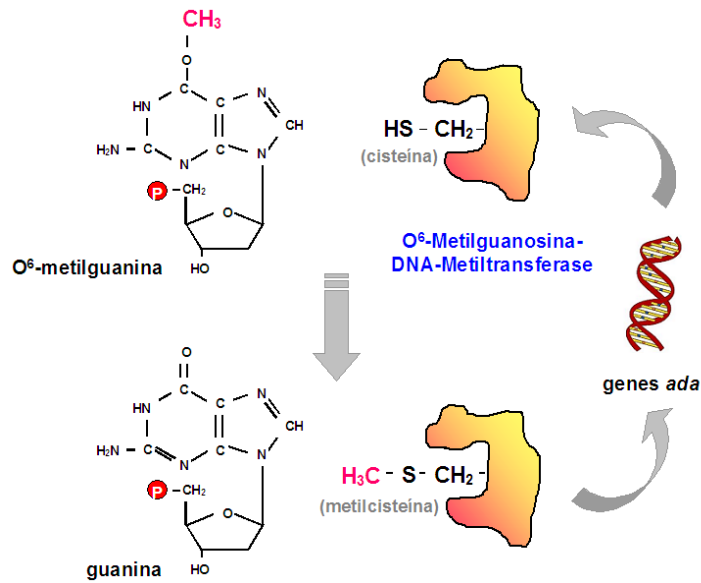
A enzima **Timidilato Sintase** (TS) exerce papel central na construção do DNA através do fomento à síntese de nucleotídeos Timidina. Drogas que inibem a atividade dessa enzima, como o 5-fluorouracil, provocam o bloqueio da replicação celular, demonstrando grande aplicabilidade na terapêutica antineoplásica (Figura 18). Estudos clínicos revelam correlação inversa entre a expressão de TS e a resposta aos seus agentes inibidores. Cogita-se que o aumento da TS possa suplantiar a ação dessas drogas, assegurando a síntese de nucleotídeos na célula tumoral e, dessa forma, possibilitando sua proliferação (Peters *et al.*, 2002).

A maioria das drogas antineoplásicas interage direta ou indiretamente com o DNA, podendo atuar em vários sítios dessa molécula. A metilação da posição O<sup>6</sup> da guanina, promovida por agentes alquilantes (ex.: nitrosuréias) e outros compostos genotóxicos, acarreta interrupções na fita do DNA que, dependendo da quantidade e extensão, ativam mecanismos apoptóticos. A enzima **O<sup>6</sup>-Metilguanossina-DNA-Metiltransferase** (MGMT) consiste numa proteína de 22kDa reparadora do DNA, atuando através da remoção de grupamentos metil da porção O<sup>6</sup> da guanina (Figura 19). A detecção de níveis elevados de MGMT indicaria tendência à restauração eficiente do DNA e, portanto, insucesso na aplicação dessas substâncias (Ueda *et al.*, 2004).

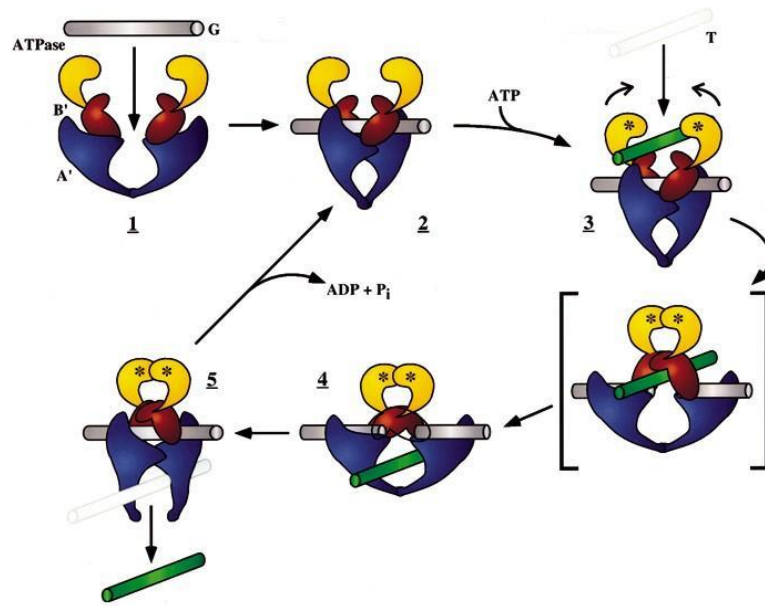


**FIGURA 18 – Mecanismo de inibição da Timidilato Sintase pelo 5-Fluorouracil.** A enzima TS (timidilato sintase) cataliza a conversão de dUMP (de *deoxyuridine monophosphate*) em timidilato (dTMP, de *deoxythymidine monophosphate*), tendo o CH<sub>2</sub>THF [metileno(CH<sub>2</sub>-)tetrahidrofolato] como doador do grupamento metil. O dTMP é metabolizado até o nucleotídeo timidina (dTTP, de *deoxythymidine triphosphate*), fundamental para a síntese e reparo do DNA. O FdUMP (de *fluorodeoxyuridine monophosphate*), metabólito ativo do 5FU (5-fluorouracil), acopla-se aos sítios ligantes do dUMP no homodímero TS-TS. A formação do complexo ternário TS- CH<sub>2</sub>THF-FdUMP inibe a síntese de dTMP e induz a produção de moléculas tóxicas a partir do FdUMP. O desequilíbrio na formação dos dNTPs (deoxinucleotídeos) e aumento de dUTP (de *deoxyuridine triphosphate*) acarreta em danos ao DNA. A extensão das lesões ao DNA causadas pelo dUTP depende também dos níveis da pirofosfatase dUTPase e da enzima UDG (de *uracil-DNA glycosylase*). O dTMP pode ser ainda conduzido à síntese de timidina por uma via acessória mediada pela enzima TK (de *thymidine kinase*). Adaptado de Longley *et al.* (2003).

A **DNA Topoisomerase II** (TopoII) consiste em alvo para muitos quimioterápicos, como os compostos antracíclicos e as podofilotoxinas. Estes agentes estabilizam o complexo de clivagem formado entre a TopoII e o DNA, resultando no aumento e/ou perpetuação das rupturas no material genético (Figura 20). Nesse contexto, o estímulo à destruição celular desencadeado pelas lesões estruturais no DNA mostra-se proporcional ao nível de TopoII, sugerindo que a redução na quantidade dessa enzima poderia constituir um importante mecanismo de quimiorresistência (Tanaka *et al.*, 2001).



**FIGURA 19** – Representação esquemática do mecanismo de ação da O<sup>6</sup>-Metilguanosa-DNA-Metiltransferase (MGMT). A MGMT atua removendo grupamentos metil “anormais”, transferindo-os para o radical sulfidríla da molécula de cisteína presente em seu sítio ativo. A enzima metilada perde a capacidade catalítica, todavia atua como potente indutor para expressão de MGMT e de outras enzimas reparadoras do DNA codificadas pelos genes *ada* (de *alkylation damage*). Adaptado de Komine *et al.* (2003).



**FIGURA 20** – Representação do mecanismo de descompactação das fitas de DNA catalisada pela enzima DNA Topoisomerase II (TopoII). (1) Estrutura dimérica da TopoII: A' – domínio estrutural, B' – domínio ATPase; (2) Ligação covalente reversível ao segmento G (DNA fita dupla); (3) Captação do segmento T após alteração conformacional dependente de ATP, seguida da quebra do segmento G; (4) Passagem do segmento T por entre a abertura do segmento G; (5) Reparo da ruptura do segmento G e liberação do segmento T. Adaptado de Alberts *et al.* (2002).

Esses mecanismos demonstram a necessidade não somente da busca por alvos terapêuticos mais precisos, como também da identificação do espectro de resistência nas diversas neoplasias humanas. Espera-se que a conjunção destes fatores permita a construção de um perfil biomolecular para cada espécime tumoral, proporcionando a predição e o desenvolvimento de tratamentos individualmente direcionados.

## 1.6. A BIOLOGIA MOLECULAR COMO FERRAMENTA FARMACOLÓGICA

A identificação das principais alterações moleculares envolvidas no processo neoplásico desvenda a possibilidade da elaboração de estratégias terapêuticas dirigidas especialmente para o bloqueio desses fenômenos. As **terapias alvo-direcionadas** prometem significantes avanços no tratamento do câncer através do desenvolvimento de agentes mais específicos, menos tóxicos, menos indutores de resistência e, portanto, mais efetivos.

Uma das novas abordagens consiste na inibição da expressão e/ou da atividade das CDKs nas células tumorais, impedindo a progressão do ciclo celular e, assim, ativando mecanismos apoptóticos. O Flavopididol, um inibidor sintético não-específico de CDKs, aparece como um promissor exemplo dessa classe, já figurando em estudos clínicos (Shapiro, 2004). Outra alternativa seria a restauração ou a reintrodução dos inibidores naturais das CDKs (genes supressores tumorais) quando estes estivessem mutados. A terapia genética com o gene p53, introduzido através de vetores virais ou lisossomos catiônicos, têm demonstrado sucesso no bloqueio da ciclagem celular e reativação da apoptose, melhorando a resposta de algumas neoplasias (inclusive os astrocitomas) à quimioterapia convencional (Chang *et al.*, 2000).

Outro potencial alvo molecular é representado pelo conjunto de receptores de superfície celular do tipo tirosino-quinase. Múltiplos agentes, compreendendo anticorpos monoclonais, moléculas inibitórias e imunotoxinas, têm sido desenvolvidos na tentativa de coibir os subtipos específicos desses receptores envolvidos na transformação e progressão neoplásicas (Mendelsohn & Baselga, 2000). O Imatinib foi a primeira droga produzida a partir desse conceito, atuando no bloqueio do domínio tirosino-quinase das proteínas *abl-bcr* na leucemia mielóide crônica (Thiesing *et al.*, 2000).

O impacto positivo do Trastuzumab (um anticorpo monoclonal recombinante bloqueador do receptor ErbB2) no tratamento do câncer de mama avançado abriu caminho para a geração dos agentes específicos contra os receptores da família ErbB (Cobleigh *et al.*, 1999). O Gefitinib, um inibidor seletivo do EGFR já em uso no carcinoma de pulmão metastático, vem apresentando bons resultados experimentais na sensibilização de gliomas malignos à radio e à quimioterapia (Stea *et al.*, 2003). Novas preparações como o Erlotinib (inibidor do domínio intracitoplasmático do EGFR), o Cetuximab (anticorpo monoclonal contra a porção extracelular do EGFR) e o Canertinib (inibidor irreversível pan-ErbB) encontram-se em adiantadas fases de diversos ensaios clínicos (Hamid, 2004).

Ainda com relação às vias de sinalização nas células tumorais, surge também a possibilidade do bloqueio das moléculas transdutoras intracelulares. A inibição da enzima farnesil-transferase tem se mostrado promissor artifício de inativação das proteínas Ras. A farnesilação (adição pós-traducional de resíduos de 15 a 20 carbonos no domínio C-terminal) promove a ativação e ancoragem à membrana citoplasmática desse grupo de proteínas, tornando-as responsivas aos estímulos por parte dos receptores de membrana (Crul *et al.*, 2001). Nesse sentido, drogas que suprimem a atividade catalítica das enzimas farnesil-transferases, como o Ionafarnib e o Tipifarnib, têm mostrado eficácia no tratamento de tumores sólidos com mutação da proteína Ras (Sebti, 2003). Ensaios com portadores de

tumores astrocíticos não detectaram respostas objetivas à terapia com esses agentes, embora alguns pacientes tenham demonstrado estabilização da doença (Delmas *et al.*, 2002).

A inibição dos fatores implicados na angiogênese tumoral representa mais uma nova tendência no tratamento do câncer. O reconhecimento de distúrbios moleculares e de mecanismos fisiológicos ativadores dos fenômenos angiogênicos delimitou alvos terapêuticos específicos, possibilitando a elaboração de diversas abordagens. Dentre as terapias anti-angiogênicas atualmente em avaliação clínica, destacam-se os inibidores de proteases (ex.: Velcade), os antagonistas dos fatores/receptores VEGF (de *vascular endothelial growth factor*) (exs.: Bevacizumab, Semaxanib), os inibidores das integrinas (exs.: Talidomida, Cilengitide), as toxinas endoteliais (ex.: Atrasentan), os inibidores das metaloproteinases (exs.: Marimastat, Prinomastat), os supressores naturais da angiogênese (ex.: Angiostatina) e os inibidores da ciclooxigenase-2 (ex.: Celecoxib) (Tremont-Lukats & Gilbert, 2003).

Outra vertente terapêutica aponta para o direcionamento do sistema imunológico no sentido do reconhecimento e eliminação de células tumorais. Esta tarefa apresenta-se como um grande desafio, visto os versáteis mecanismos de escape imunológico desenvolvido pelas neoplasias. Todavia, a expressão diferencial de antígenos nas células cancerosas como resultado de mutações ou alterações regulatórias nos proto-oncogenes tem possibilitado consideráveis progressos (Mariani, 2003). As propostas imunoterápicas abrangem a imunização passiva com anticorpos monoclonais (ex.: Rituximab), a imunização passiva com células T ou *natural killer* ativadas, o uso de citocinas imunomoduladoras (ex.: IL-2), a transfecção com os genes das citocinas (ex.: IL-12), a reversão da imunossupressão tumoral (ex.: bloqueio do TGF- $\beta$ 2), bem como o uso de vacinas anti-câncer desenvolvidas a partir de peptídeos tumorais ou com células dendríticas ativadas (Liu *et al.*, 2003).



Uma das mais recentes promessas na terapia molecular do câncer é representada pelas ferramentas de silenciamento genético pós-transcricional. Nestas, a inibição se dá através não mais da proteína oncogênica, mas sim do seu transcrito (RNA mensageiro, RNAm). O princípio da técnica consiste na introdução de moléculas de RNA complementar (RNA *antisense*) ou pequenos fragmentos de RNA (RNA *interference*) em células neoplásicas. Estes, por sua vez, reconhecem seqüências específicas de transcritos oncogênicos, formando RNAs dupla-fita híbridos que são em seguida degradados por ribozimas (Hannon, 2002). A constatação do livre acesso dos RNAs antisense e de interferência através da barreira hematoencefálica desperta ainda mais o interesse nessa estratégia como uma potencial abordagem contra tumores do SNC (Fan & Weiss, 2005).

Dessa forma, a conjunção entre o conhecimento dos distúrbios moleculares ativadores do processo tumorigênico, a detecção dos mecanismos de quimiorresistência, o uso racional da quimioterapia clássica e a aplicação das novas estratégias alvo-direcionadas sugere um novo tempo na prática oncológica, onde a abordagem individualizada e molecularmente guiada definirá a terapêutica antineoplásica.

## **2. OBJETIVOS**

### **GERAL**

Investigar a expressão de genes envolvidos no processo tumorigênico e nos mecanismos de resistência dos tumores astrocíticos.

### **ESPECÍFICOS**

- Descrever alguns indicadores clínico-epidemiológicos (incidência anual, distribuição por idade e sexo dos pacientes, localização tumoral) referentes aos astrocitomas diagnosticados no município de Fortaleza;
- Avaliar a influência dos achados histopatológicos na determinação do diagnóstico dos tumores astrocíticos, especialmente aqueles que consistem em critérios de graduação;
- Identificar alterações moleculares implicadas na tumorigênese dos astrocitomas;
- Examinar a expressão de enzimas relacionadas a mecanismos de quimiorresistência em tumores astrocíticos;
- Correlacionar as alterações moleculares observadas à graduação histológica e aos achados histopatológicos relativos aos tumores astrocíticos;
- Estabelecer as possíveis vias tumorigênicas dos astrocitomas através da análise combinada das alterações moleculares detectadas;
- Identificar potenciais alvos terapêuticos baseados na expressão diferencial de moléculas nos tumores astrocíticos;
- Determinar o melhor indicador de proliferação celular para os tumores astrocíticos dentre os marcadores estudados.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### REAGENTES E SOLUÇÕES

##### Anticorpos Primários:

- Anticorpo monoclonal anti-humano de camundongo para antígeno Ki-67 - clone MIB-1 – diluição utilizada: 1:80 (Immunotech<sup>®</sup>, França)
- Anticorpo monoclonal anti-humano de camundongo para BCL2 - clone 124 – diluição utilizada: 1:80 (DakoCytomation<sup>®</sup>, EUA)
- Anticorpo monoclonal anti-humano de camundongo para c-myc - clone 9E10.3 – diluição utilizada: 1:100 (Labvision<sup>®</sup>, EUA)
- Anticorpo monoclonal anti-humano de camundongo para EGFR - clone H11 – diluição utilizada: 1:100 (DakoCytomation<sup>®</sup>, EUA)
- Anticorpo monoclonal anti-humano de camundongo para GFAP (Proteína Ácida Glio-Fibrilar) - clone 6F2 – diluição utilizada: 1:100 (DakoCytomation<sup>®</sup>, EUA)
- Anticorpo monoclonal anti-humano de camundongo para GST $\pi$  (Glutathione-S-Transferase  $\pi$ ) - clone 353-10 – diluição utilizada: 1:50 (DakoCytomation<sup>®</sup>, EUA)
- Anticorpo monoclonal anti-humano de camundongo para MGMT (O<sup>6</sup>-Metilguanina-DNA-Metiltransferase) - clone MT3.1 – diluição utilizada: 1:50 (DakoCytomation<sup>®</sup>, EUA)
- Anticorpo monoclonal anti-humano de camundongo para p21<sup>ras</sup> - clone NCC-RAS-001 – diluição utilizada: 1:100 (DakoCytomation<sup>®</sup>, EUA)
- Anticorpo monoclonal anti-humano de camundongo para p21<sup>WAF1/Cip1</sup> - clone 4D10 – diluição utilizada: 1:50 (Novocastra<sup>®</sup>, Reino Unido)
- Anticorpo monoclonal anti-humano de camundongo para p27<sup>kip1</sup> - clone SX53G8 – diluição utilizada: 1:50 (DakoCytomation<sup>®</sup>, EUA)
- Anticorpo monoclonal anti-humano de camundongo para p53 - clone DO-7 – diluição utilizada: 1:80 (DakoCytomation<sup>®</sup>, EUA)
- Anticorpo monoclonal anti-humano de camundongo para Timidilato Sintase - clone TS106 – diluição utilizada: 1:80 (Chemicon<sup>®</sup>, EUA)
- Anticorpo monoclonal anti-humano de camundongo para Topoisomerase II $\alpha$  - clone Ki-S1 – diluição utilizada: 1:80 (DakoCytomation<sup>®</sup>, EUA)

- Anticorpo policlonal anti-humano de coelho para Bax – diluição utilizada: 1:400 (DakoCytomation<sup>®</sup>, EUA)
- Anticorpo policlonal anti-humano de coelho para oncoproteína erbB-2 – diluição utilizada: 1:100 (DakoCytomation<sup>®</sup>, EUA)

Ácido Clorídrico 2% (Synth<sup>®</sup>, Brasil)

Albumina Bovina 5% (Sigma<sup>®</sup>, EUA)

Bálsamo do Canadá (QEL<sup>®</sup>, Brasil)

Eosina (Nuclear<sup>®</sup>, Brasil)

Etanol 95% (Synth<sup>®</sup>, Brasil)

Hematoxilina de Harrys 40% (Nuclear<sup>®</sup>, Brasil)

*Kit* de detecção LSAB+ *System*-HRP (DakoCytomation<sup>®</sup>, EUA)

*Kit* de revelação DAB+ líquido (DakoCytomation<sup>®</sup>, EUA)

Peróxido de Hidrogênio 3% (Dinâmica<sup>®</sup>, Brasil)

Silano 4% (Sigma<sup>®</sup>, EUA)

Tampão Citrato 10mM pH=6,0 (Sigma<sup>®</sup>, EUA)

TBS pH=7,6 (50mM Tris-HCl; 150mM NaCl) (Sigma<sup>®</sup>, EUA)

Xileno (Synth<sup>®</sup>, Brasil)

## EQUIPAMENTOS

Balança de Precisão (Filizola<sup>®</sup> ID-1500, Brasil)

Banho-Maria (FANEM<sup>®</sup>, Brasil)

Câmara Úmida (Erviagas<sup>®</sup>, Brasil)

Câmara Fotográfica Digital 2200 (Nikon<sup>®</sup>, Japão)

Capela com Exaustor (Quimis<sup>®</sup>, Brasil)

Contador de Células Manual (Herka<sup>®</sup>, Alemanha)

Estufa 25-70°C (FANEM<sup>®</sup>, Brasil)

Forno de Microondas 700watts (Electrolux<sup>®</sup>, Brasil)

Geladeira (Electrolux<sup>®</sup>, Brasil)

Medidor de pH (Digimed<sup>®</sup>, Brasil)

Micropipetas 0,5-10µL; 20-200µL; 100-1000µL (Gilson<sup>®</sup>, EUA)

Microscópio Óptico 100-1000X (Nikon<sup>®</sup>, Japão)

Micrótomo (Quimis<sup>®</sup>, Brasil)

Pinça de Dissecção Anatômica 12cm (Webber Stainless<sup>®</sup>, Brasil)

Suporte de Lâminas para Histologia (Projecta<sup>®</sup>, Brasil)

## **VIDRARIA**

Béquer 500mL (Pyrex<sup>®</sup>, Brasil)

Cubas para Histologia (Durelex<sup>®</sup>, Brasil)

Erlenmeyer 500mL (Pyrex<sup>®</sup>, Brasil)

Proveta 1000mL (Pyrex<sup>®</sup>, Brasil)

## **PROGRAMAS COMPUTACIONAIS**

CART – *Classification and Regression Trees* 5.0 (Salford Systems<sup>®</sup>, EUA)

Microsoft Excel 2000 (Microsoft<sup>®</sup>, EUA)

Microsoft Word 2000 (Microsoft<sup>®</sup>, EUA)

SPSS – *Statistical Package for Social Science* 13.0 (SPSS<sup>®</sup> Inc., EUA)

## **OUTROS MATERIAIS**

Caixas para Lâminas (Projecta<sup>®</sup>, Brasil)

Caneta Hidrofóbica (DakoCytomation<sup>®</sup>, EUA)

Etiquetas (Pimaco<sup>®</sup>, Brasil)

Lâminas para Microscopia (26,0x76,0x1,0mm<sup>3</sup>) (Bioglass<sup>®</sup>, Brasil)

Lamínulas (24,0x32,0mm<sup>2</sup>) (Bioglass<sup>®</sup>, Brasil)

Luvas de Procedimento (Blowtex<sup>®</sup>, Brasil)

Papel de Filtro (Ripax<sup>®</sup>, Brasil)

Termômetro (BD<sup>®</sup>, Brasil)

## CASUÍSTICA

Realizou-se levantamento dos tumores astrocíticos humanos fixados em formalina e incluídos em parafina provenientes do arquivo do Laboratório BIOPSE<sup>®</sup> - Biomédica, Pesquisas e Serviços Ltda. (Fortaleza-Ceará-Brasil) referentes aos exames histopatológicos rotineiros realizados no período entre 1999 e 2003, totalizando 354 (trezentos e cinquenta e quatro) casos. Admitiram-se como critérios de inclusão a existência de mais de uma amostra (bloco) para cada caso, o bom estado de conservação dos blocos e a adequação da gradação histológica utilizada quando do diagnóstico em relação à padronizada pela OMS (Kleihues *et al.*, 2002). Dessa forma, 55 (cinquenta e cinco) astrocitomas foram selecionados: 13 (treze) grau I, 14 (catorze) grau II, 07 (sete) grau III e 21 (vinte e um) grau IV, configurando uma amostragem não-probabilística.

Como parâmetro de normalidade, 05 (cinco) amostras de tecido cerebral não-tumoral fixadas em formalina e incluídas em parafina foram obtidas do material de rotina do Setor de Necropsia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina – UFC. Foram selecionados casos em que a causa imediata da morte e a doença de base em nada remetessem a presença de neoplasia intra ou extracerebral.

A coleta das amostras foi autorizada pelos responsáveis de cada instituição, sendo o Projeto de Pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Complexo Hospitalar da Universidade Federal do Ceará sob protocolo 32/04 (Anexo I), dentro das normas que regulamentam a pesquisas em seres humanos segundo as Resoluções 196/96 e 251/97 do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde/Brasil.

## PREPARO DAS LÂMINAS E DOS CORTES HISTOLÓGICOS

As lâminas para microscopia foram limpas em acetona e tratadas com silano a 4%. Seguiu-se manufatura de cortes histológicos a 5µm. Uma lâmina de cada bloco foi destinada à coloração pela Hematoxilina/Eosina para reavaliação histopatológica e as restantes para o estudo proteômico *in situ* (imuno-histoquímica).

## IMUNO-HISTOQUÍMICA

No presente ensaio, foram estudadas as proteínas **GFAP**, **TS**, **MGMT**, **GSTπ**, **TopoIIα**, **Ki-67**, **c-Myc**, **p21<sup>ras</sup>**, **Bcl-2**, **Bax**, **p27<sup>KIP1</sup>**, **p21<sup>WAF1/CIP1</sup>**, **p53**, **EGFR** e **erbB-2**. Utilizou-se o método imuno-histoquímico da estreptoavidina-biotina-peroxidase, descrito por Hsu *et al.* (1981) com modificações, conforme o procedimento a seguir:

1. Passagem das lâminas em estufa pré-aquecida a 70°C por 120 minutos;
2. Desparafinização e hidratação em gradiente xileno-álcool-água;
3. Recuperação antigênica em forno de microondas utilizando tampão citrato 10mM pH=6,0 (± 99°C) por 15 minutos;
4. Incubação das lâminas com o anticorpo primário (diluição previamente padronizada) na geladeira (± 4°C) por 16 horas;
5. Detecção pelo sistema LSAB+ conforme orientações do fabricante;
6. Revelação pelo sistema DAB+ conforme orientações do fabricante;
7. Contra-coloração com hematoxilina de Harrys a 40%;
8. Desidratação em gradiente água-álcool-xileno;
9. Montagem com lamínula e bálsamo do Canadá.

## ANÁLISES HISTOPATOLÓGICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA

As avaliações histopatológica e imuno-histoquímica foram realizadas por três analistas experientes de forma independente. Os eventuais resultados conflitantes foram revisados pelos mesmos, agora em conjunto, para definição consensual da análise.

### **Análise Histopatológica**

Após a confirmação do diagnóstico histológico (variante e graduação, segundo critérios da OMS), procedeu-se reavaliação geral das lâminas coradas pela hematoxilina/eosina para análise de parâmetros histopatológico específicos (atipia nuclear, pleomorfismo celular, hiperplasia endotelial, presença necrose, índice mitótico, celularidade, presença de gemistócitos e existência de células gigantes). Foram atribuídos escores de acordo com os achados qualitativos, conforme descrito na Tabela 03.

### **Análise Imuno-Histoquímica**

Considerou-se marcação a coloração distinta em marrom (castanho), em contraposição ao azul/violeta da contra-coloração (hematoxilina), no(s) local(is) previsto(s) para a detecção do antígeno estudado (Tabela 04).

A expressão dos marcadores foi quantificada através da contagem manual por microscopia óptica de pelo menos 1.000 (mil) células astrocíticas, em diferentes campos representativos, utilizando magnificação de 400X. Procedeu-se então o cálculo do índice de marcação **LI** (de *labelling index*) (Landberg & Ross, 1993), segundo a fórmula:

$$LI (\%) = (\text{número de células imuno-positivas}) / (\text{número total de células contadas}) \times 100$$



**TABELA 03 – Significado dos escores utilizados na análise dos parâmetros histopatológicos**

<b>PARÂMETRO</b>	<b>ESCORE</b>	<b>SIGNIFICADO</b>
<b>Atipia Nuclear*</b>	<b>0</b>	ausente
<b>Pleomorfismo Celular*</b>	<b>1</b>	discreto(a)
<b>Hiperplasia Endotelial*</b>	<b>2</b>	moderado(a)
<b>Necrose*</b>	<b>3</b>	intenso(a)
<b>Índice Mitótico*</b>	<b>0</b>	ausência de figuras mitóticas
	<b>1</b>	≤ 2 mitoses / campo
	<b>2</b>	3 a 4 mitoses / campo
	<b>3</b>	≥ 5 mitoses / campo
<b>Celularidade</b>	<b>0</b>	normal
	<b>1</b>	baixa
	<b>2</b>	moderada
	<b>3</b>	alta
<b>Gemistócitos Células Gigantes</b>	<b>0</b>	ausentes
	<b>1</b>	poucos(as)
	<b>2</b>	numerosos(as)

(\*) critérios de graduação histopatológica dos astrocitomas segundo classificação da OMS.

**TABELA 04 – Sítio(s) de expressão celular das diferentes proteínas estudadas**

<b>PROTEÍNA</b>	<b>SÍTIO(S) DE EXPRESSÃO CELULAR</b>
GFAP	membrana citoplasmática e citoplasma
TS	citoplasma
MGMT	núcleo (citoplasma*)
GSTπ	núcleo (citoplasma*)
TopoIIα	núcleo
Ki-67	núcleo
c-Myc	núcleo e citoplasma
p21 <sup>ras</sup>	citoplasma
Bcl-2	citoplasma
Bax	citoplasma
p27 <sup>KIP1</sup>	núcleo e citoplasma
p21 <sup>WAF1/CIP1</sup>	núcleo
p53	núcleo
EGFR	membrana citoplasmática e citoplasma
ErbB-2	membrana citoplasmática e citoplasma

(\*) padrão de marcação pouco freqüente nos astrocitomas (Ali-Osman *et al.*, 1997; Yuan *et al.*, 2003).

Admitiu-se como critério de **positividade** a presença dos antígenos pesquisados em no mínimo 5% das células analisadas ( $LI \geq 5$ ), exceto no caso do marcador Ki-67, onde se considerou positiva a sua detecção para qualquer valor diferente de zero ( $LI > 0$ ).

Para os marcadores expressos na membrana citoplasmática e/ou citoplasma foi também realizada contagem semiquantitativa da mesma amostragem celular, levando-se em consideração a intensidade de marcação. Foram atribuídos os valores 0 (ausente), 1+ (fraca), 2+ (moderada) e 3+ (intensa) de acordo com a intensidade observada. Tais valores configuram índices aos quais foram multiplicados os valores percentuais (%) da fração células que representam a respectiva categoria de intensidade, sendo calculado o **H-Score** (McCarty *et al.*, 1985):

$$H = (\% 0) * 0 + (\% 1+) * 1 + (\% 2+) * 2 + (\% 3+) * 3$$

O mesmo procedimento não foi aplicado à marcação nuclear devido a grande variabilidade de intensidades de coloração promovida pela inconstância de volume e formas nucleares (pleomorfismo nuclear) observadas em uma mesma amostra tumoral.

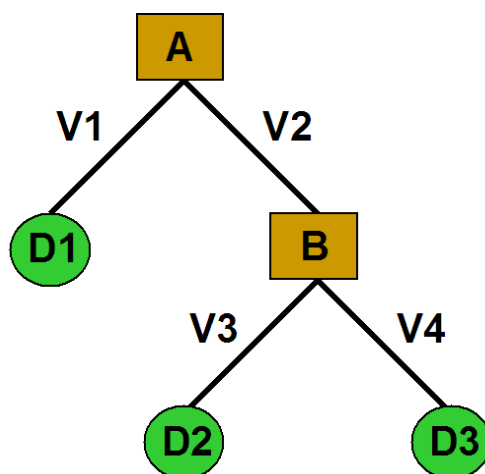
## **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os escores referentes às análises histopatológica e imuno-histoquímica, bem como os dados acerca da localização tumoral, da idade e do sexo dos pacientes, foram tabulados utilizando-se o programa Microsoft Excel<sup>®</sup> 2000 (Anexo IV).

Empregou-se o programa SPSS<sup>®</sup> 13.0 para comparação dos dados através de abordagens não-paramétricas (teste de Shapiro-Wilk, teste H de Kruskal-Wallis e teste U

de Mann-Whitney), sendo os resultados expressos como Média  $\pm$  2 E.P.M. (erro padrão da média). Foram considerados significantes valores de  $p < 0,05$ .

Aplicou-se também a metodologia CART (*Classification and Regression Trees*) de aprendizagem automática (inteligência artificial) para construção de **árvores de decisão** com complexidade limitada através do programa CART 5.0 (Breiman *et al.*, 1984). Árvores de decisão (Figura 21) são estruturas que se assemelham a árvores invertidas, nas quais as folhas representam as conclusões (diagnósticos), os nós expressam as variáveis (sinais, sintomas, achados) e os ramos distinguem os valores assumidos pelas variáveis. O primeiro nó é denominado raiz.



**FIGURA 21: Modelo esquemático de uma árvore de decisão.** A e B (retângulos): nós; V1, V2, V3 e V4 (traços): ramos; D1, D2 e D3 (círculos): folhas; Regras diagnósticas: A = V1 implica em D1, A = V2 e B = V3 implicam em D2 e A = V2 e B = V4 implicam em D3.

O CART inicia sua abordagem gerando uma árvore de tamanho máximo a partir dos dados descritos na casuística original. Assim, cada “caminho” que segue da raiz às folhas representaria um único caso. Posteriormente, procede-se a **poda** dos ramos, gerando árvores cada vez menores, até a escolha da melhor estratégia de decisão através de múltiplos processos estatísticos (Carvalho-Gomes & Gascuel, 1994).

Quando a quantidade de casos disponíveis para a construção da árvore é pequena, não possibilitando a divisão da amostra em um conjunto de aprendizagem e outro conjunto teste, o CART emprega a **validação cruzada**. Este procedimento utiliza sub-amostras disjuntas de mesmo tamanho para a formatação de sub-árvores, utilizando o mesmo processo de desbaste. Dessa forma, estima-se o erro real contido nas sentenças de decisão a partir da comparação entre as sub-árvores e a árvore principal, construída com a totalidade dos dados. A associação entre a poda e a validação cruzada fornece uma árvore de decisão de complexidade reduzida e com taxas de erro real satisfatórias.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. ANÁLISE CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA

O levantamento dos tumores astrocíticos registrados no Laboratório BIOPSE<sup>®</sup> (referência local para diagnóstico de neoplasias do SNC) no período de 1999 a 2003 permitiu a estimativa da incidência anual média dos astrocitomas na cidade de Fortaleza em **3,08**/100.000 habitantes, tendo como base de cálculo o conjunto populacional da capital cearense corrigido para o ano de 2004 (IBGE, 2005).

Dentre os casos selecionados para o estudo (Figura 22), a maioria (35%) era representada por Astrocitomas Grau IV (OMS), refletindo a maior incidência deste subtipo histológico sobre os demais. A distribuição dos casos de acordo com a faixa etária dos pacientes (Figura 23) demonstrou que 83,33% dos Astrocitomas Grau I acometeram pacientes jovens (4 a 19 anos), 71,43% dos Astrocitomas Grau II ocorreram em indivíduos adultos (23 a 48 anos), 42,86% dos Astrocitomas Grau III manifestaram-se no terceiro decênio (22 a 28 anos), ao passo que 45% dos Astrocitomas Grau IV surgiram na sexta década de vida. Apesar destas duas últimas gradações mostrarem predomínios específicos pelas faixas etárias descritas, observou-se que a ocorrência do grau III prolongava-se até pacientes adultos e idosos (40 a 71 anos) e o aparecimento do grau IV estendia-se desde crianças até idosos (5 a 81 anos).

A divisão por sexo dos pacientes portadores dos tumores astrocíticos avaliados (Figura 24) indicou relação masculino/feminino de 1,89, sendo esta relação de 1,28 quando contabilizados todos os pacientes detectados no levantamento geral (n=354). Quanto à localização tumoral (Figura 25), prevaleceram os sítios frontal, cerebelar e parietal. A maior parte (75%) dos tumores Grau I estava situada nos hemisférios cerebelares, enquanto cerca da metade (55%) dos tumores grau IV encontrava-se nos lobos cerebrais frontais.

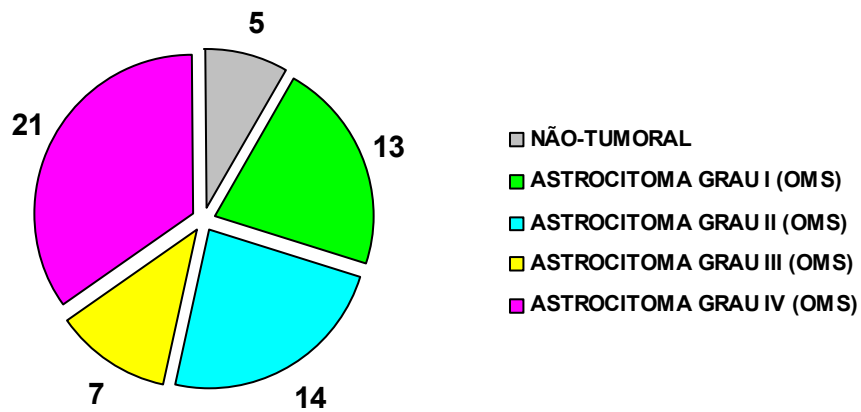


FIGURA 22 – Distribuição quantitativa dos casos (não-tumoral e astrocitomas) selecionados para o estudo segundo a classificação histológica (n=60).

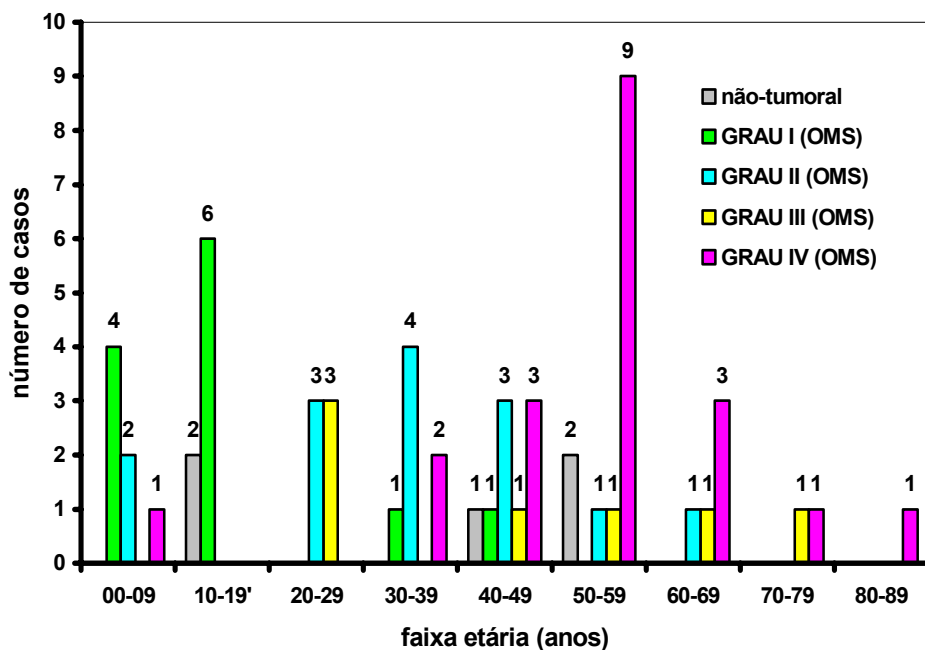


FIGURA 23 – Distribuição quantitativa dos casos (não-tumoral e astrocitomas) selecionados para o estudo segundo a faixa etária dos pacientes (n=60).

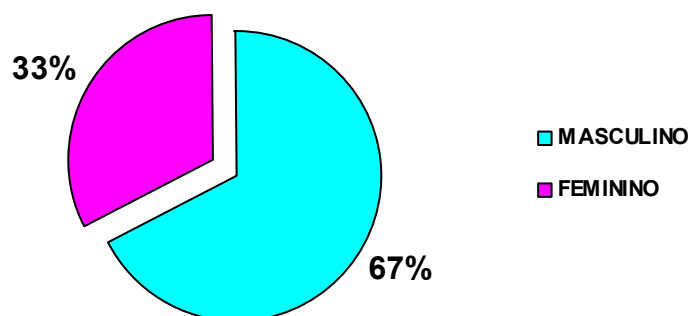
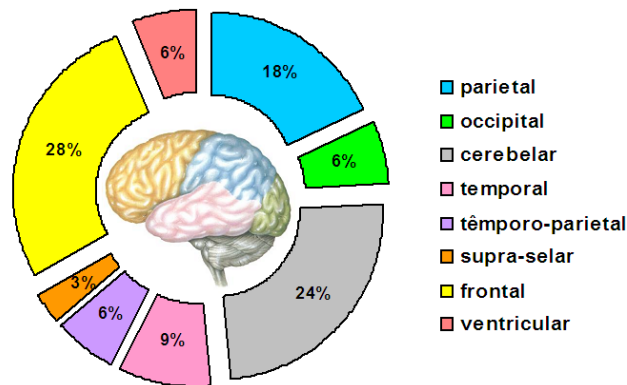


FIGURA 24 – Distribuição percentual dos astrocitomas avaliados segundo o sexo dos pacientes (n=55).



**FIGURA 25 – Distribuição percentual dos astrocitomas avaliados segundo a localização tumoral (n=33).**

## 4.2. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

A reavaliação dos parâmetros histopatológicos nos astrocitomas (Figuras 26 e 27), evidenciou significantes aumentos na celularidade, na atipia nuclear e na presença de necrose conforme a progressão tumoral. A atividade mitótica e a detecção de células gigantes acompanharam esta mesma tendência somente nos graus III e IV, enquanto a hiperplasia vascular manifestou-se de forma significativa unicamente nos Astrocitomas Grau IV. O pleomorfismo celular e a existência de gemistócitos demonstraram propensão ao acréscimo, embora não-significante, de acordo com a gradação tumoral. Nenhuma alteração quanto aos paradigmas avaliados foi constatada nas amostras não-tumorais. A soma dos escores referentes apenas aos critérios de gradação dos astrocitomas adotados pela OMS (Tabela 05) proporcionou clara distinção entre as categorias histológicas.

A análise conjunta de todos os parâmetros histopatológicos pela metodologia CART (Figura 28) indicou que a simples alteração na celularidade definiu a presença do tumor. O intenso pleomorfismo celular determinou o grau IV. A associação entre níveis moderados ou intensos de atipia nuclear e de atividade mitótica discriminou os tumores grau III. A conjunção entre atipia nuclear moderada ou intensa com figuras mitóticas discretas ou ausentes e com a inexistência de necrose diferenciou o grau II. Os tumores do grau I representaram a combinação entre a discreção ou a ausência dos índices referentes à atipia nuclear, ao pleomorfismo celular e à ocorrência de figuras mitóticas.

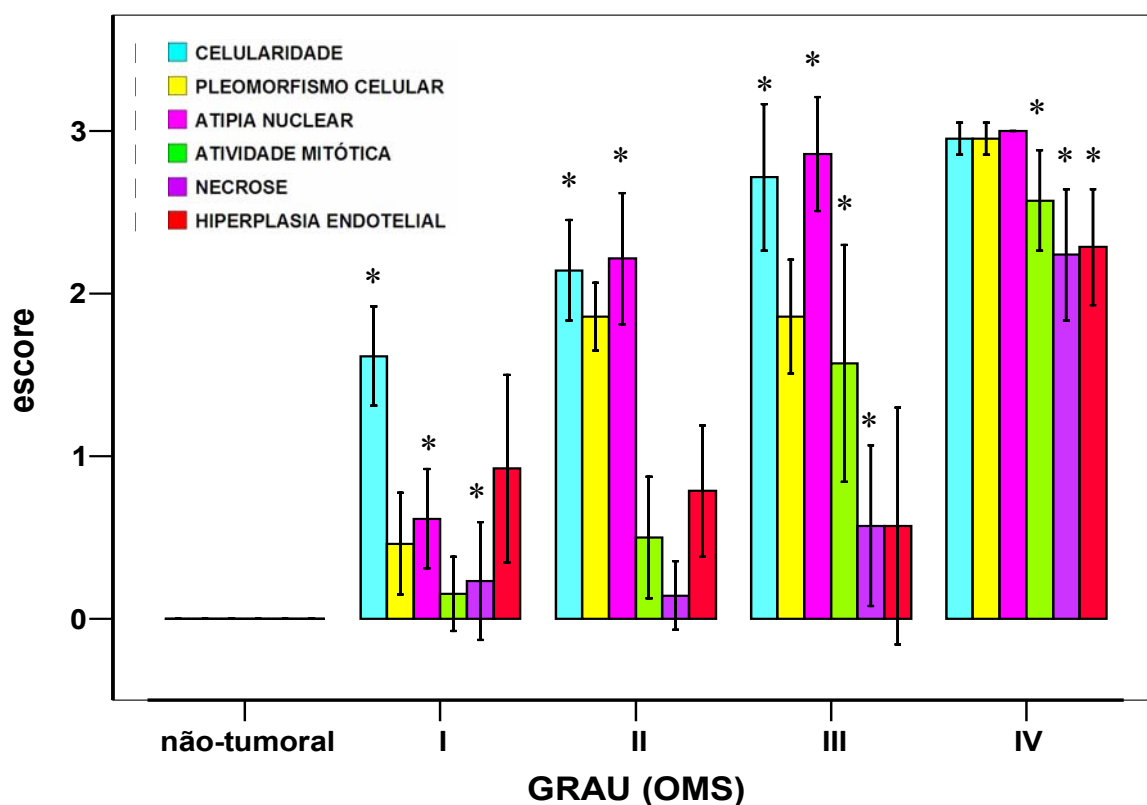


FIGURA 26 – Médias dos escores atribuídos aos parâmetros histopatológicos segundo a classificação histológica dos casos avaliados. (\*)  $p < 0,05$  em relação ao grupo anterior (teste U de Mann-Whitney).

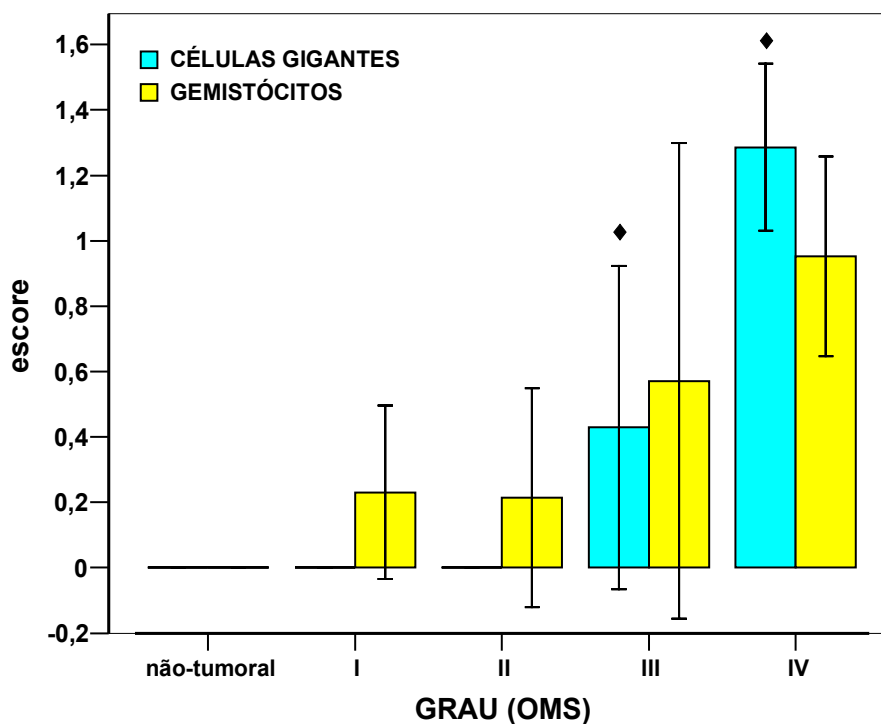


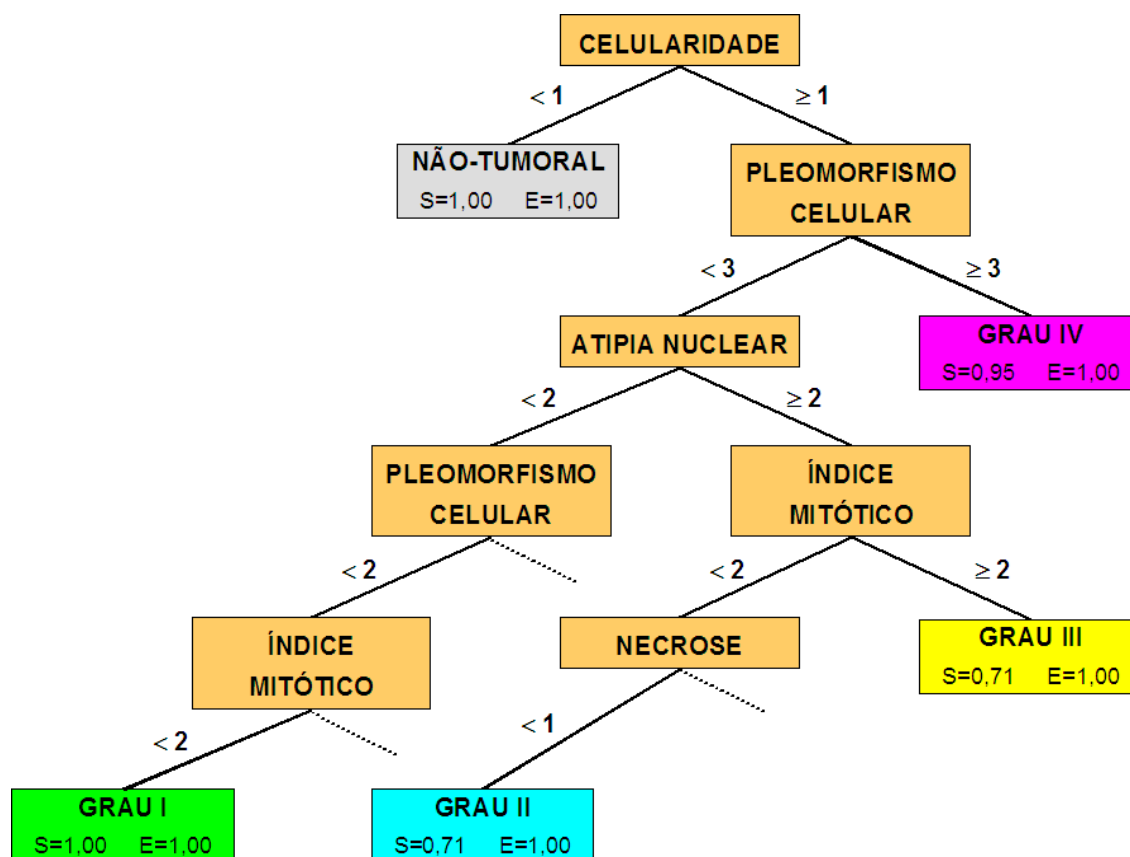
FIGURA 27 – Médias dos escores atribuídos à presença de células gigantes e de gemistócitos segundo a classificação histológica dos casos avaliados. (♦)  $p < 0,01$  em relação ao grupo anterior (teste U de Mann-Whitney).



**TABELA 05 – Valores referentes ao somatório dos escores atribuídos aos parâmetros histopatológicos adotados como critérios para graduação tumoral dos astrocitomas pela OMS (pleomorfismo celular, atipia nuclear, índice mitótico, hiperplasia vascular e necrose) segundo a classificação histológica dos casos avaliados**

<b>Classificação Histológica</b>	<b>Média do Total ± Desvio Padrão</b>
não-tumoral	0
GRAU I	2,38 ± 1,98 ♦
GRAU II	5,50 ± 1,50 ♦
GRAU III	7,43 ± 0,97 ♦
GRAU IV	13,05 ± 1,56 ♦

(♦)  $p < 0,01$  em relação ao grupo anterior (teste U de Mann-Whitney).



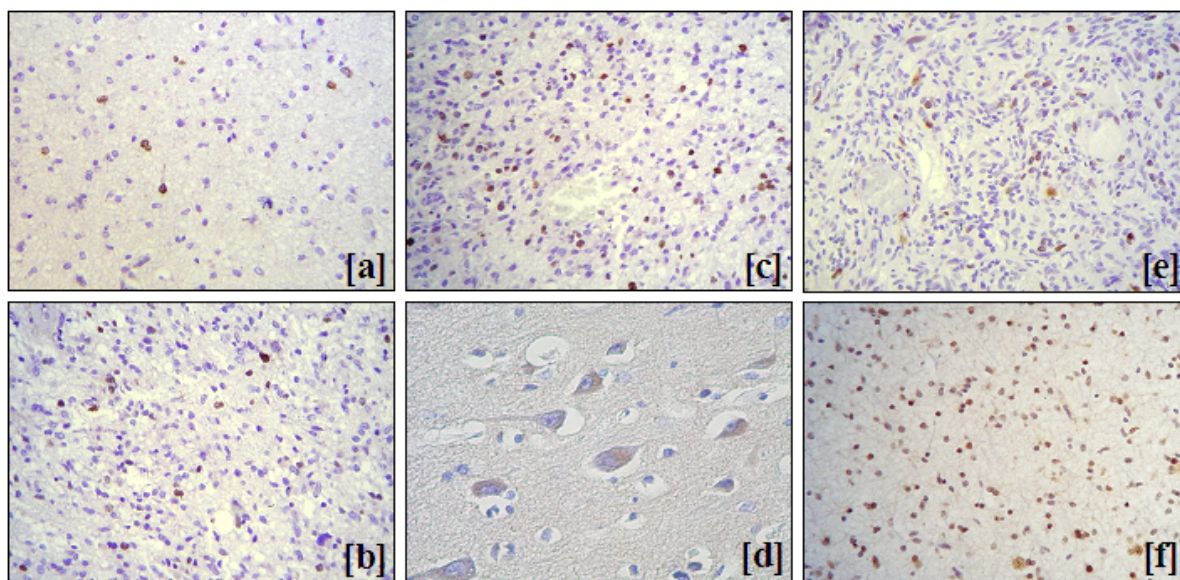
**FIGURA 28 –** Árvore de decisão fornecida pelo método CART referente à análise dos parâmetros histopatológicos de acordo com a classificação histológica dos casos avaliados. Custo relativo total: 0,192; S (sensibilidade); E (especificidade).

### 4.3. ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA

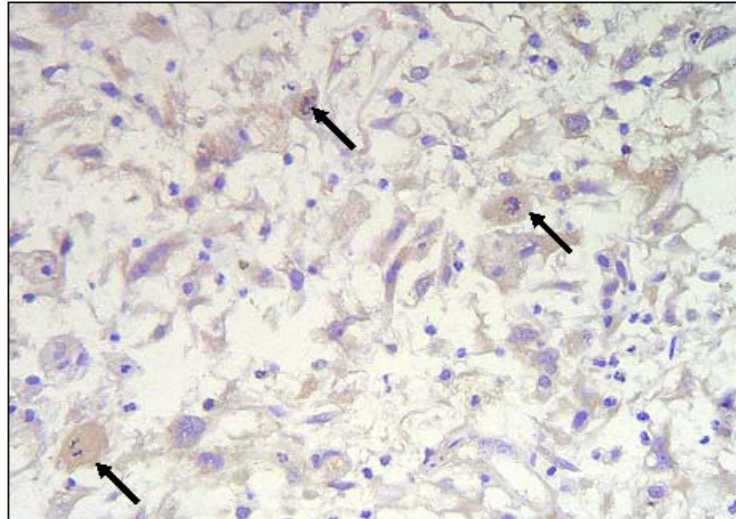
#### 4.3.1. Proliferação Celular

O padrão da marcação imuno-histoquímica para Ki-67 e Topoisomerase II $\alpha$ , marcadores clássicos de proliferação celular, está ilustrado na Figura 29. O potencial impacto do fator de transcrição c-Myc nos eventos proliferativos (Figura 30) acarretou a inclusão dos dados referentes à sua expressão nuclear (funcional) entre os indicadores de multiplicação celular, assim como os escores relacionados ao índice mitótico verificado pela histopatologia.

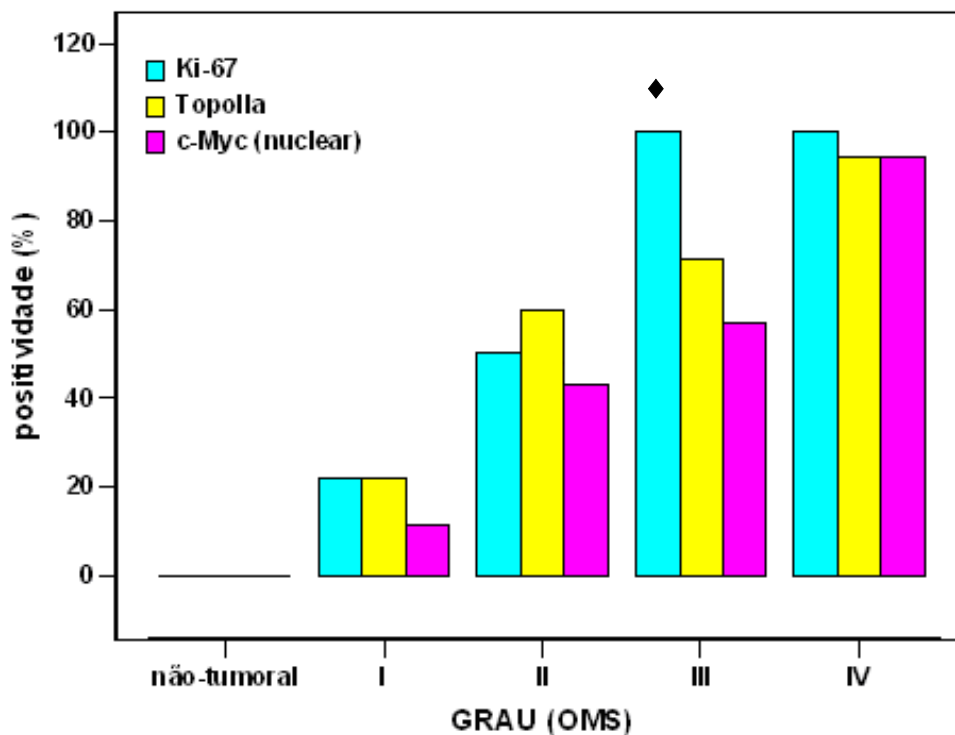
A positividade para Ki-67, TopoII $\alpha$  e c-Myc (Figura 31) demonstrou tendência de aumento com a progressão maligna, estando ausente nos tecidos não-tumorais e apresentando valores máximos nos astrocitomas de alto grau. A média dos escores atribuídos a esses indicadores (Figura 32) revelou a significativa marcação para c-Myc nos Astrocitomas Grau IV. Observou-se ainda aumento gradual da expressão do Ki-67 conforme o índice mitótico e a classificação histológica, não sendo o mesmo evidenciado quanto à detecção da TopoII $\alpha$ .



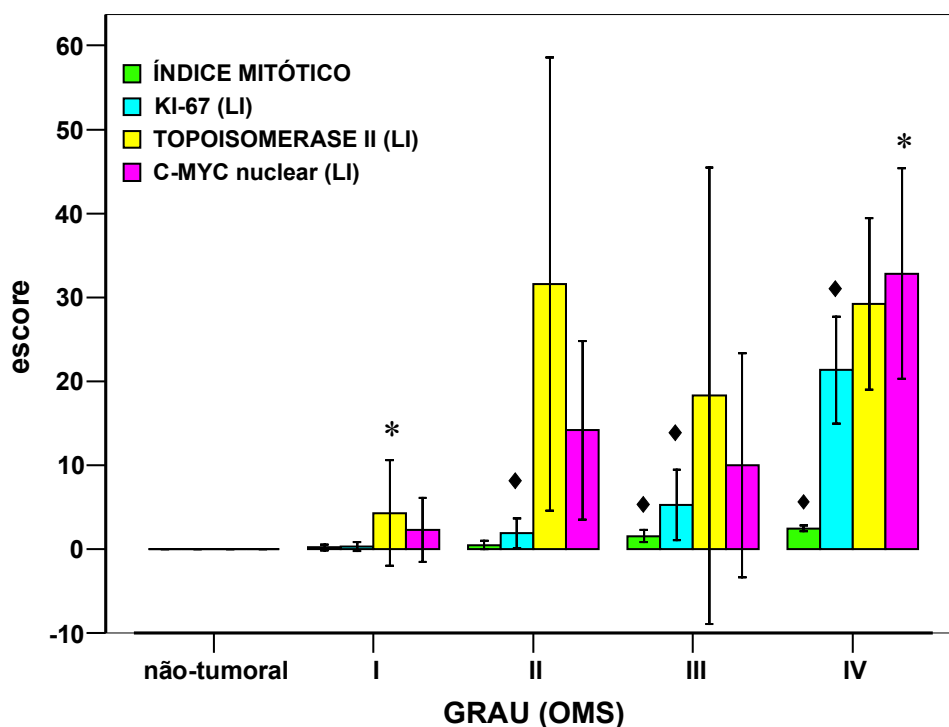
**FIGURA 29 – Expressão dos marcadores de proliferação celular Ki-67 [a, b, c, d] e Topoisomerase II $\alpha$  [e, f] detectada por imuno-histoquímica (400X).** [a] Caso n°. 03 – Astrocitoma Grau I (OMS): marcação discreta; [b] Caso n°. 17 – Astrocitoma Grau II (OMS): marcação moderada; [c] Caso n°. 35 – Astrocitoma Grau IV (OMS): marcação intensa; [d] Caso n°. 0.5 – Córtex Cerebral Não-Tumoral: ausência de marcação nuclear, todavia percebe-se *background* no citoplasma dos neurônios; [e] Caso n°. 31 – Astrocitoma Grau III (OMS): marcação moderada; [f] Caso n°. 32 – Astrocitoma Grau III (OMS): marcação intensa. Para maiores detalhes sobre os casos, consultar Anexo IV.



**FIGURA 30 – Expressão de c-Myc detectada por imuno-histoquímica (400X).** Caso n°. 36 – Astrocitoma Grau IV (OMS): dentre as células tumorais positivas, destacam-se aquelas que exibem figuras mitóticas (setas). Para maiores detalhes sobre o caso, consultar Anexo IV.



**FIGURA 31 – Percentuais de positividade imuno-histoquímica para os marcadores relacionados à proliferação celular Ki-67, TopoIIα e c-Myc (nuclear) segundo a classificação histológica dos casos avaliados. (♦)  $p < 0,01$  em relação ao grupo anterior (teste U de Mann-Whitney).**



**FIGURA 32** – Médias dos escores atribuídos aos parâmetros relacionados à proliferação celular [índice mitótico, Ki-67 (LI), TopoII $\alpha$  (LI), c-Myc nuclear (LI)] segundo a classificação histológica dos casos avaliados. LI (de *Labeling Index*); (♦)  $p < 0,01$  e (\*)  $p < 0,05$  em relação ao grupo anterior (teste U de Mann-Whitney).

Os valores médios referentes à expressão do antígeno Ki-67 nas classes histológicas examinadas encontram-se na Tabela 06. A Figura 33 demonstra que os índices acima de 8,0% distinguiram os tumores grau IV, ao passo que os escores entre 1,5 e 8,0% designaram os tumores do grau III. Contagens abaixo de 1,5% compreenderam indiscriminadamente as demais categorias histológicas analisadas.

#### 4.3.2. Diferenciação Astrocítica ♦

O aspecto da marcação imuno-histoquímica para GFAP pôde ser visto na Figura 09. Em média, 76,9% das células tumorais nos Astrocitomas Grau IV avaliados manifestaram positividade para GFAP com intensidade moderada (2+), contrastando com os índices máximos (LI=100 e H=300) verificados nos astrócitos das amostras não-tumorais (Figura 34).

♦ A expressão de GFAP foi avaliada somente nas amostras não-tumorais (controle) e nos Astrocitomas Grau IV, notadamente os mais anaplásicos, objetivando confirmar a origem astrocítica e identificar o nível de diferenciação desses tumores.

TABELA 06 – Valores referentes aos escores atribuídos à expressão do antígeno Ki-67 (LI) detectada por imuno-histoquímica segundo a classificação histológica dos casos avaliados

Classificação Histológica	Média ± Desvio Padrão
não-tumoral	0
GRAU I	0,23 ± 0,60 ♦
GRAU II	1,43 ± 2,20 ♦
GRAU III	5,28 ± 4,50 ♦
GRAU IV	19,8 ± 12,72 ♦

LI (de *Labelling Index*); (♦)  $p < 0,01$  em relação ao grupo anterior (teste U de Mann-Whitney).

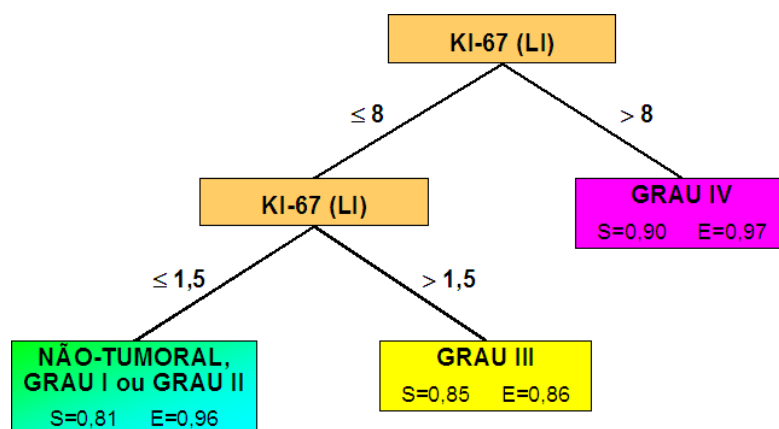


FIGURA 33 – Árvore de decisão fornecida pelo método CART referente à análise da expressão do antígeno Ki-67 detectada por imuno-histoquímica de acordo com as diferentes gradações dos astrocitomas avaliados. Custo relativo total: 0,595; S (sensibilidade); E (especificidade); LI (de *Labelling Index*).

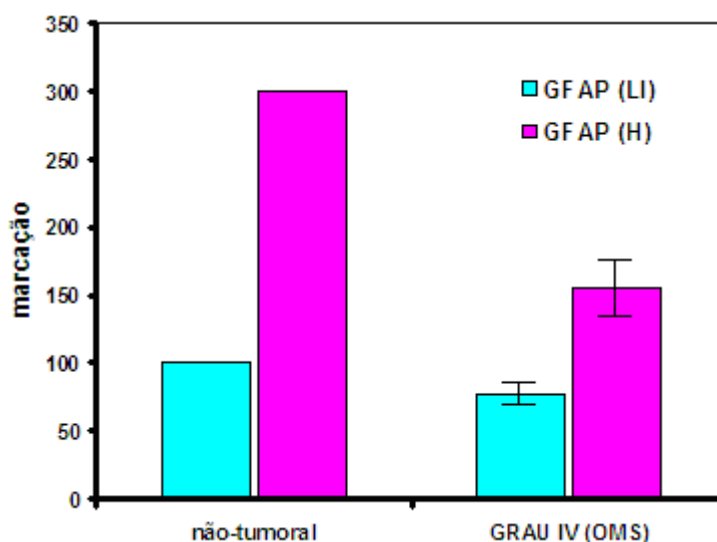


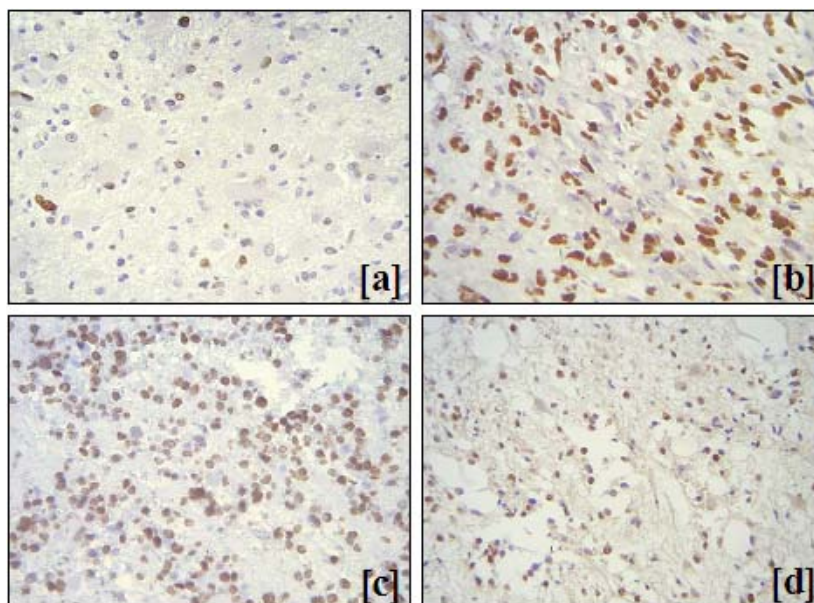
FIGURA 34 – Médias dos escores atribuídos à expressão de GFAP detectada por imuno-histoquímica segundo a classificação histológica dos casos avaliados. LI (de *Labelling Index*); H (de *H-Score*).

### 4.3.3. Supressores Tumorais

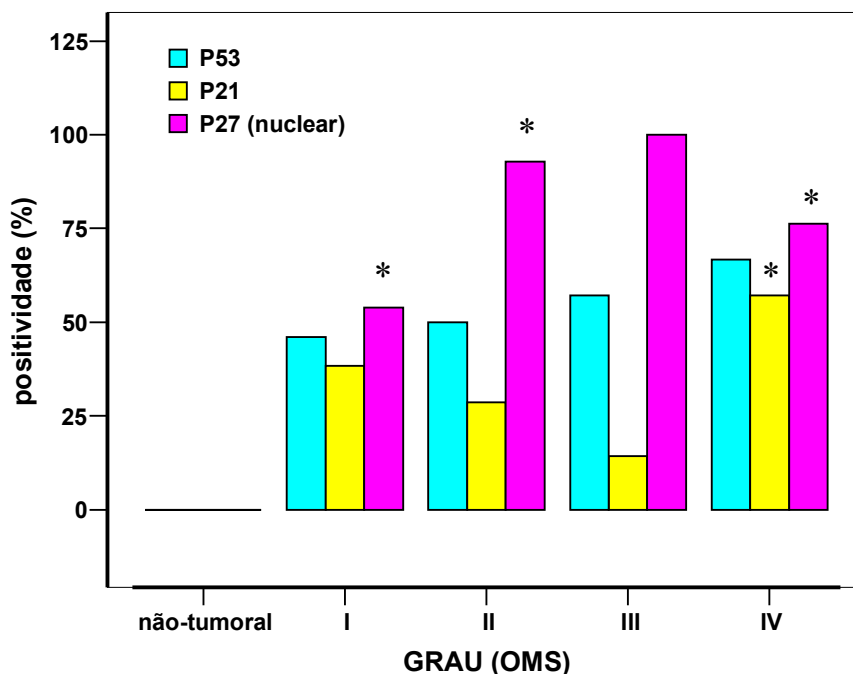
A detecção imuno-histoquímica das proteínas p53, p21 e p27 é retratada na Figura 35. Não foi evidenciada a expressão destas moléculas em astrócitos não-tumorais. A positividade (Figura 36) e a média dos escores (Figura 37) para p53 demonstraram discreta propensão ao aumento com a evolução dos tumores astrocíticos. A porcentagem de casos positivos para p27 nuclear (funcional) apresentou significativa ascensão conforme a progressão maligna, embora com importante redução nos Astrocitomas Grau IV. Já os valores referentes à sua expressão mantiveram a orientação de crescimento de acordo com a seqüência tumoral, com notável marcação nos tumores grau IV: cerca de 40% dos casos exibiram positividade em mais de 70% das células tumorais (LI > 70). As marcações para p53 e p27 (nuclear) correlacionaram-se de forma significativa com a classificação histológica ( $p < 0,01$ ; teste H de Kruskal-Wallis).

Por outro lado, os índices para p21 manifestaram tendência de redução com a sucessão tumoral até a gradação III, contrastando com os significantes aumentos em positividade e em expressão nos tumores do grau IV. A relação entre a expressão imuno-histoquímica dos supressores tumorais p53 e p21 (alvo transcricional do p53) é apresentada na Figura 38, onde se percebe pequena fração (16,36%) funcionalmente discordante [representada por p53(+)/p21(+)], principalmente nos Astrocitomas Grau IV. A positividade para p53, p21 e p27 (nuclear) no conjunto dos tumores astrocíticos estudados foi de 54,98%, 34,61% e 80,72%, respectivamente.

A marcação citoplasmática de p27 foi observada em 32,96% dos astrocitomas avaliados, apresentando-se mais freqüentemente nos tumores de alto grau (III e IV) do que nos de baixo grau (I e II) (Figura 39). A concomitância (+/+) entre a detecção nuclear e citoplasmática de p27 demonstrou inclinação semelhante, sendo de 42,86% nos tumores de alto grau e 22,22% nos de baixo grau. Verificou-se sutil disposição ao acréscimo da expressão citoplasmática para p27 conforme a progressão tumoral (Figura 40).



**FIGURA 35 – Expressão dos supressores tumorais p53 [a, b], p21 [c] e p27 [d] detectada por imunohistoquímica (400X).** [a] Caso n°. 15 – Astrocitoma Grau II (OMS): marcação discreta; [b] Caso n°. 29 – Astrocitoma Grau III (OMS): marcação intensa; [c] Caso n°. 52 – Astrocitoma Grau IV (OMS): marcação intensa; [d] Caso n°. 17 – Astrocitoma Grau II (OMS): marcações nuclear e citoplasmática moderadas. Para maiores detalhes sobre os casos, consultar Anexo IV.



**FIGURA 36 – Percentuais de positividade imunohistoquímica para os supressores tumorais p53, p21 e p27 (nuclear) segundo a classificação histológica dos casos avaliados. (\*)  $p < 0,05$  em relação ao grupo anterior (teste U de Mann-Whitney).**

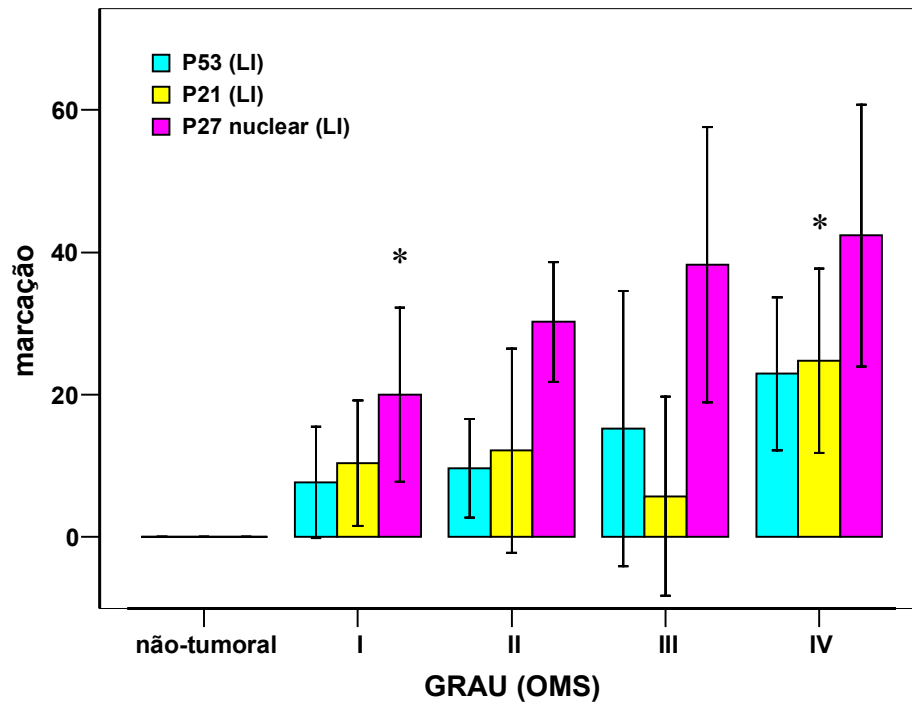


FIGURA 37 – Médias dos escores atribuídos à expressão dos supressores tumorais [p53 (LI), p21 (LI) e p27 nuclear (LI)] detectada por imuno-histoquímica segundo a classificação histológica dos casos avaliados. LI (de *Labelling Index*); (\*)  $p < 0,05$  em relação ao grupo anterior (teste U de Mann-Whitney).

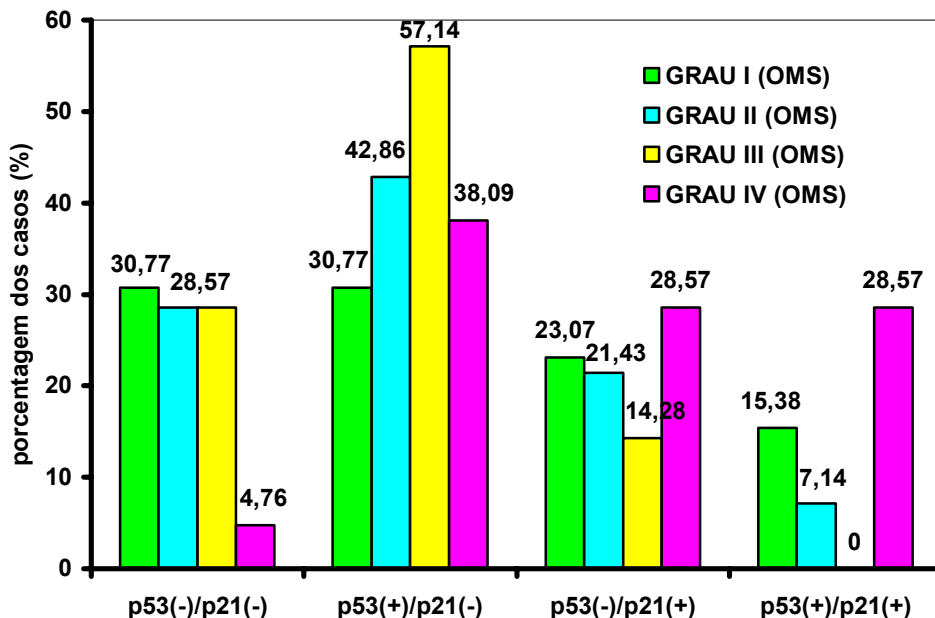


FIGURA 38 – Distribuição percentual das diferentes gradações dos astrocitomas segundo a relação entre a expressão imuno-histoquímica das proteínas p53 e p21. (+) presença da expressão; (-) ausência da expressão.



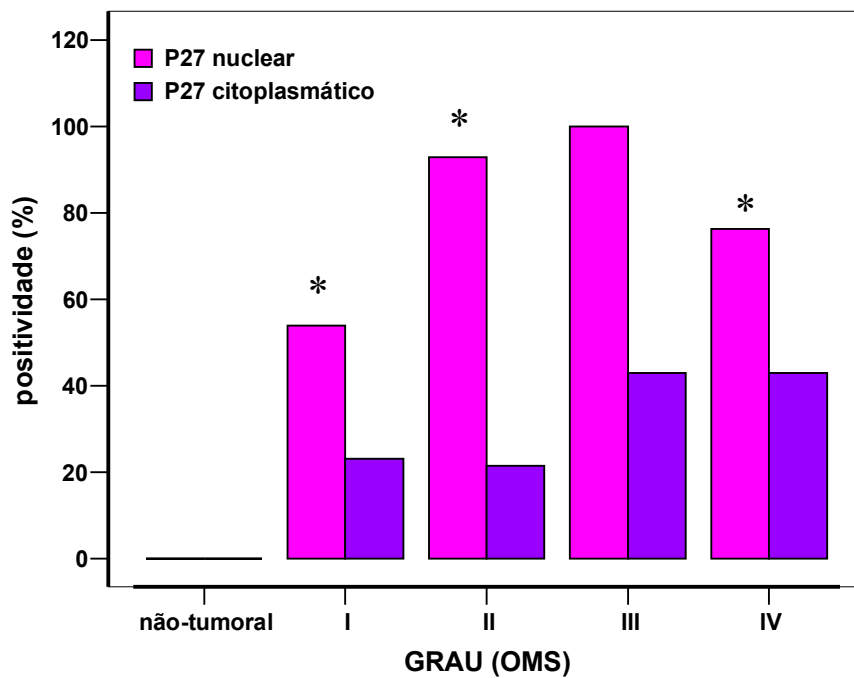


FIGURA 39 – Percentuais de positividade imuno-histoquímica para o supressor tumoral p27 (nuclear e citoplasmático) segundo a classificação histológica dos casos avaliados. (\*)  $p < 0,05$  em relação ao grupo anterior (teste U de Mann-Whitney).

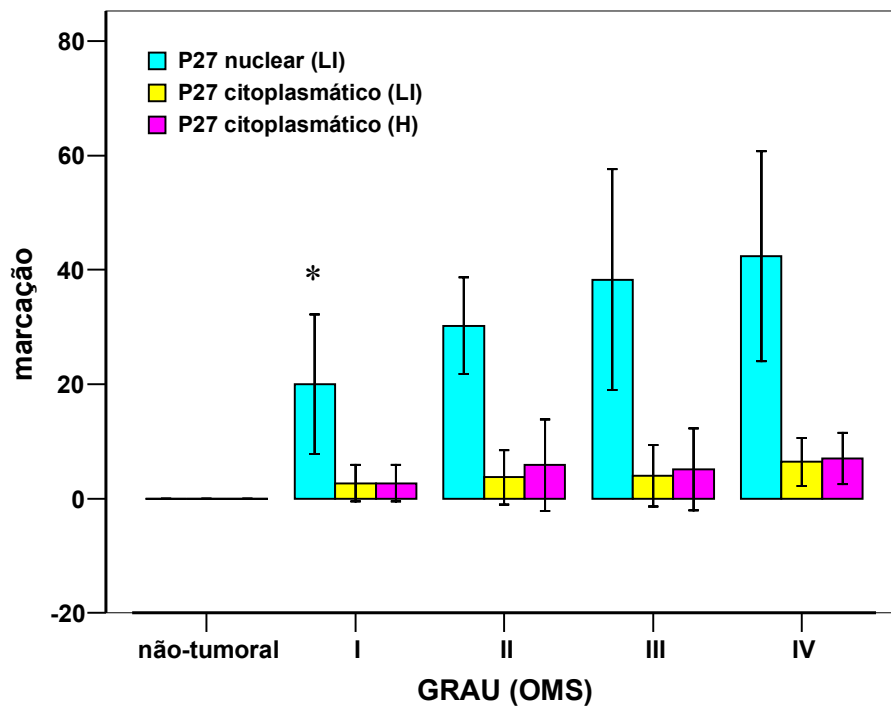
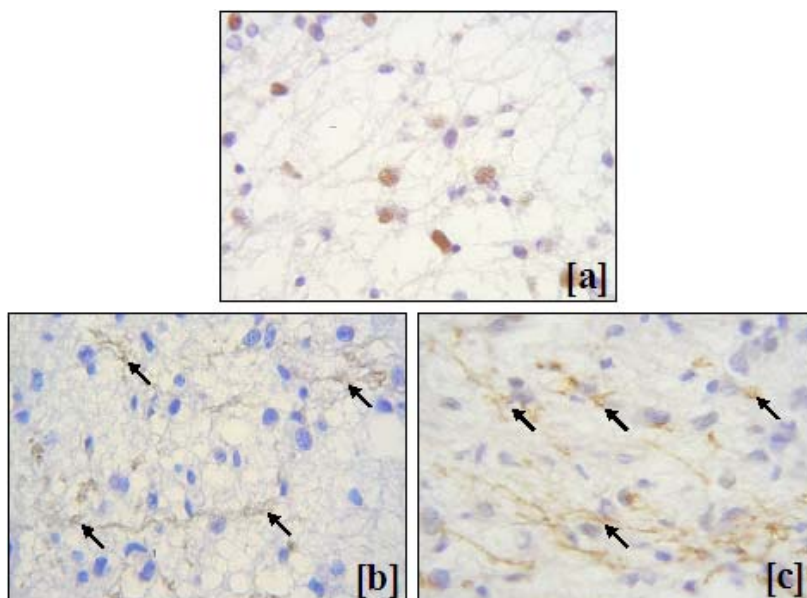


FIGURA 40 – Médias dos escores atribuídos à expressão de p27 nuclear (LI) e citoplasmático (LI e H) detectada por imuno-histoquímica segundo a classificação histológica dos casos avaliados. LI (de *Labelling Index*); H (de *H-Score*); (\*)  $p < 0,05$  em relação ao grupo anterior (teste U de Mann-Whitney).

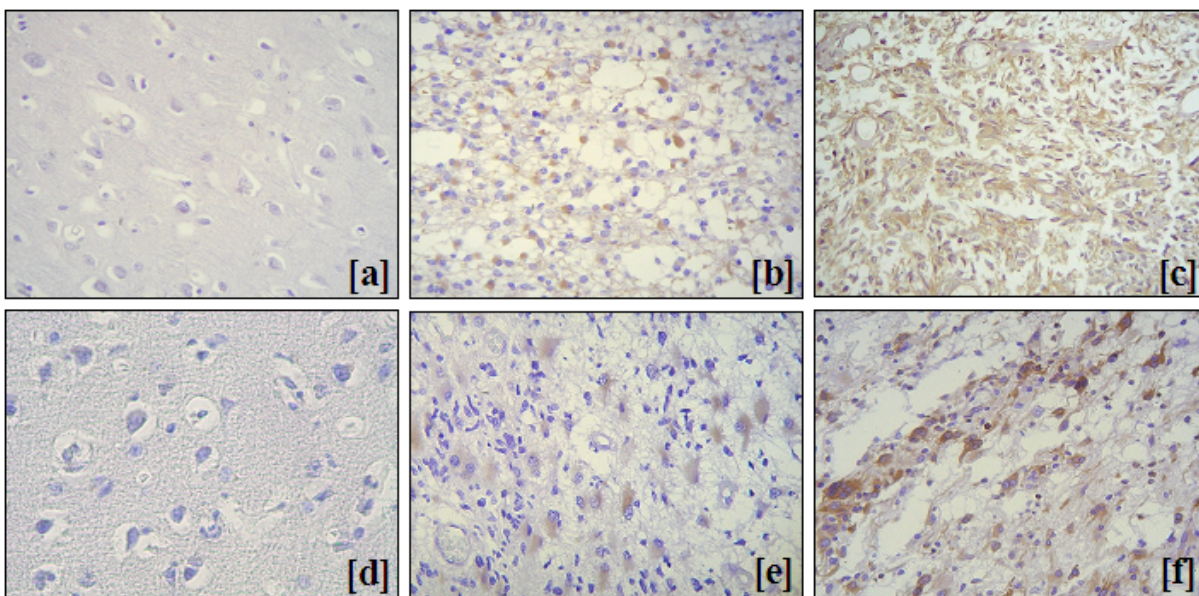
Curiosamente, pôde se observar ainda a expressão de p21 e p27 na micróglia contígua às células tumorais em aproximadamente 70% dos casos positivos para p53, notadamente nos astrocitomas de alto grau (Figura 41).



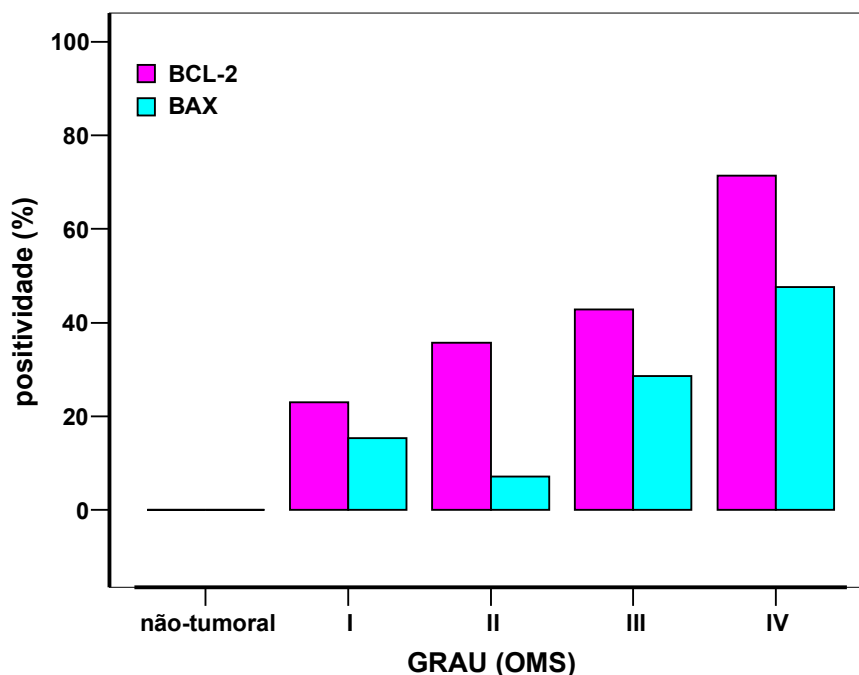
**FIGURA 41 – Expressão dos supressores tumorais p53 [a], p21 [b] e p27 [c] detectada por imunohistoquímica (400X). Caso n<sup>o</sup>. 01 – Astrocitoma Grau I (OMS): a marcação para p53 nos astrócitos tumorais é acompanhada pela positividade para p21 e p27 nas células microgliais adjacentes (setas). Para maiores detalhes sobre o caso, consultar Anexo IV.**

#### **4.3.4. Apoptose**

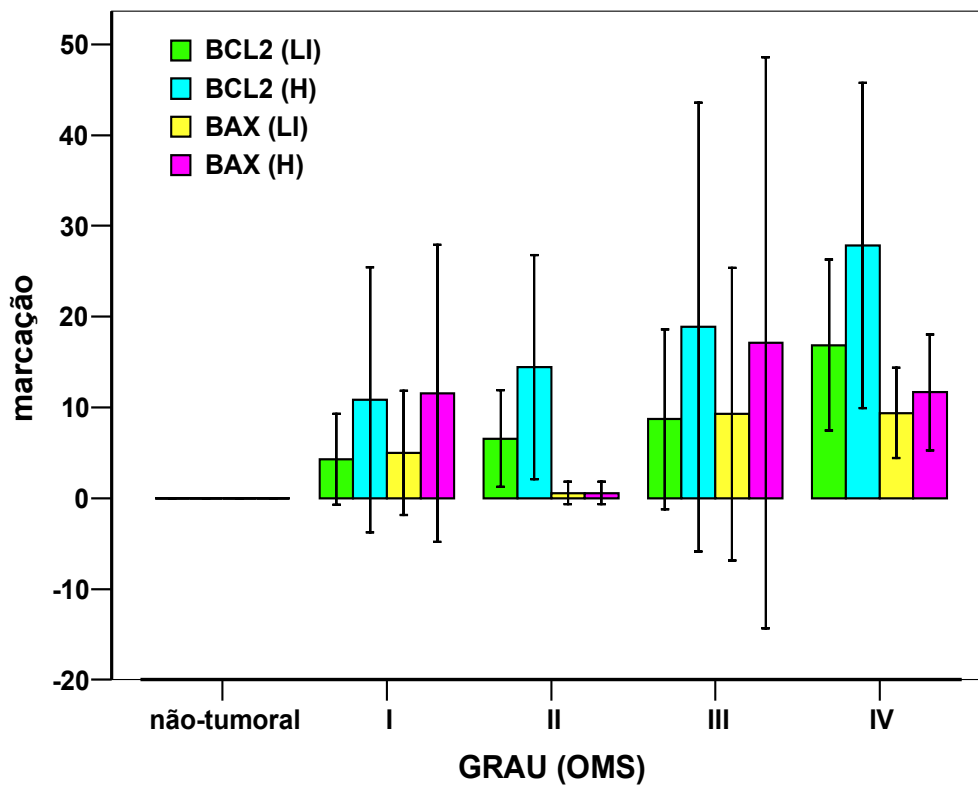
Exemplos de reações imuno-histoquímicas para Bcl-2 e Bax estão ilustrados na Figura 42. O percentual de positividade (Figura 43) e a média dos escores (Figura 44) referentes à marcação para a proteína Bcl-2 mostraram tendência ao acréscimo com a evolução tumoral. Em relação à proteína Bax, evidenciou-se propensão ao aumento da positividade e à constância nos níveis de sua expressão de acordo com a progressão maligna, exceto pela redução desses índices observada nos Astrocitomas Grau II. A positividade para Bcl-2 e Bax na totalidade dos tumores astrocíticos investigados foi de 43,26% e 24,67%, respectivamente. Tais proteínas não foram evidenciadas entre as amostras não-tumorais pesquisadas.



**FIGURA 42 – Expressão dos marcadores relacionados à apoptose Bax [a, b, c] e Bcl-2 [d, e, f] detectada por imuno-histoquímica (400X).** [a] Caso n°. 0.1 – Córtex Cerebral Não-Tumoral: ausência de marcação; [b] Caso n°. 11 – Astrocitoma Grau I (OMS): marcação moderada; [c] Caso n°. 52 – Astrocitoma Grau IV (OMS): marcação intensa; [d] Caso n°. 0.3 – Córtex Cerebral Não-Tumoral: ausência de marcação; [e] Caso n°. 29 – Astrocitoma Grau III (OMS): marcação moderada; [f] Caso n°. 02 – Astrocitoma Grau I (OMS): marcação intensa. Para maiores detalhes sobre os casos, consultar Anexo IV.

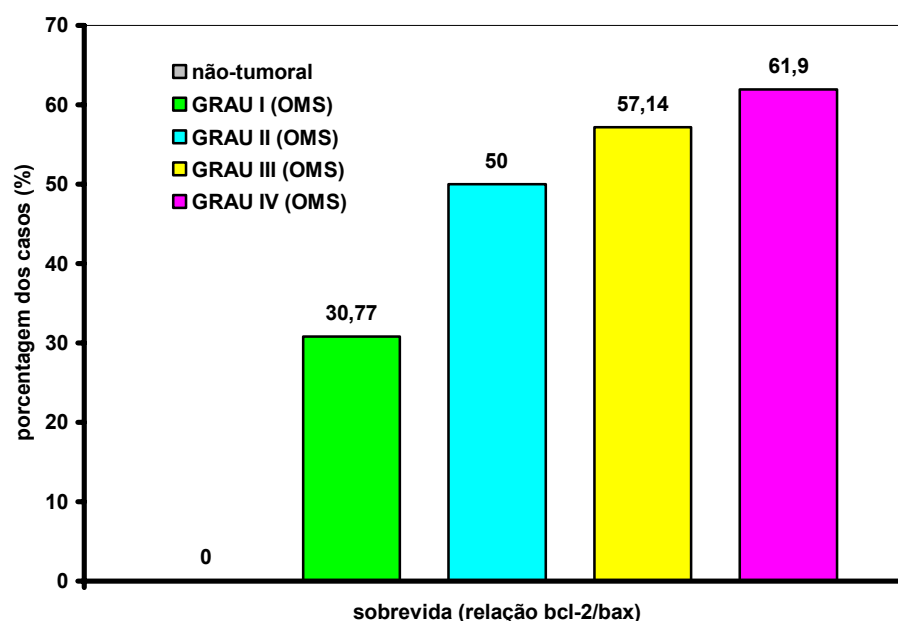


**FIGURA 43 – Percentuais de positividade imuno-histoquímica para Bcl-2 e Bax segundo a classificação histológica dos casos avaliados.**



**FIGURA 44** – Médias dos escores atribuídos à expressão de Bcl-2 e Bax (LI e H) detectada por imunohistoquímica segundo a classificação histológica dos casos avaliados. LI (de *Labelling Index*); H (de *H-Score*).

As marcações para Bcl-2 (LI) e Bax (LI) manifestaram significativa correlação com a graduação dos astrocitomas ( $p < 0,05$ ; teste H de Kruskal-Wallis), sendo mais freqüente a detecção destas moléculas nos tumores do grau IV do que nos tumores do grau I e II ( $p < 0,05$ ; teste U de Mann-Whitney). A avaliação da tendência à sobrevida celular nos tumores astrocíticos, calculada através do balanço entre Bcl-2 (estímulo anti-apoptótico) e Bax (estímulo pró-apoptótico), revelou sua ampliação conforme a progressão tumoral (Figura 45).

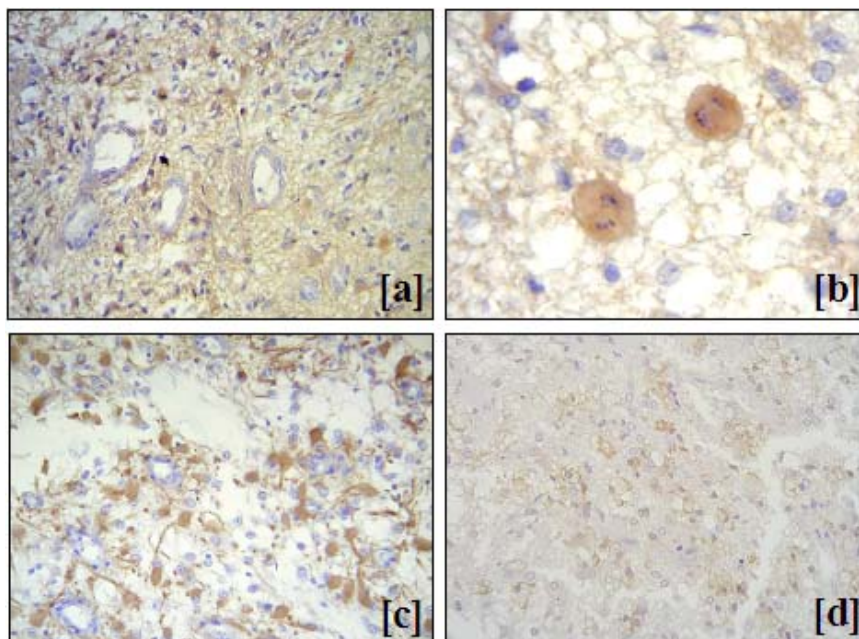


**FIGURA 45 – Distribuição percentual das diferentes classificações histológicas segundo a tendência à sobrevida estimada pelo balanço entre a expressão de Bcl-2 e Bax detectada por imuno-histoquímica.**

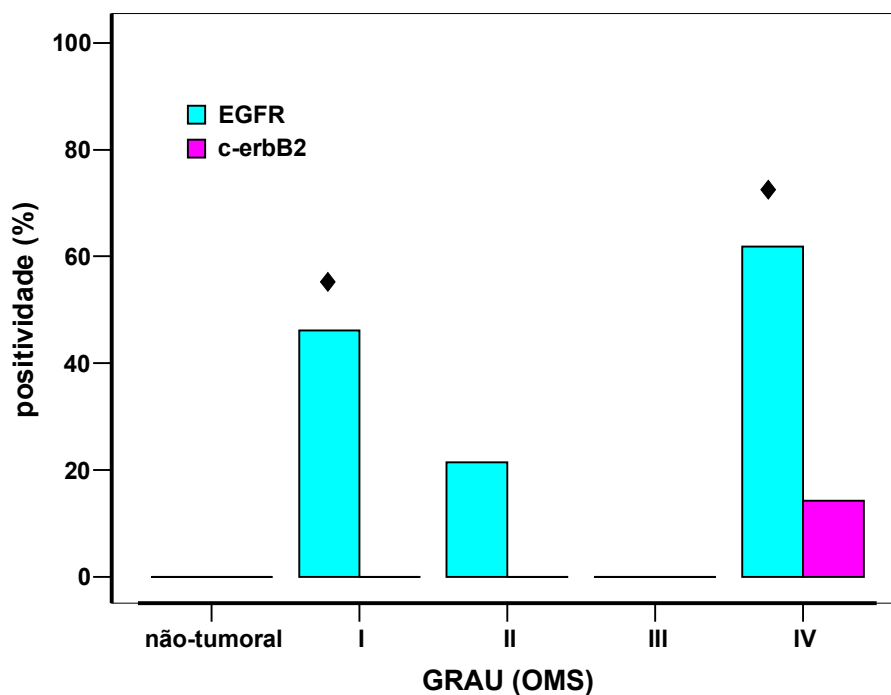
#### **4.3.5. Receptores da Família ErbB**

Aspectos da marcação imuno-histoquímica para EGFR e ErbB2 nos astrocitomas podem ser vistos na Figura 46. Não houve expressão destes receptores nos astrócitos não-tumorais. A positividade para EGFR e ErbB2 no conjunto dos tumores estudados foi de 32,37% e 3,57%, respectivamente.

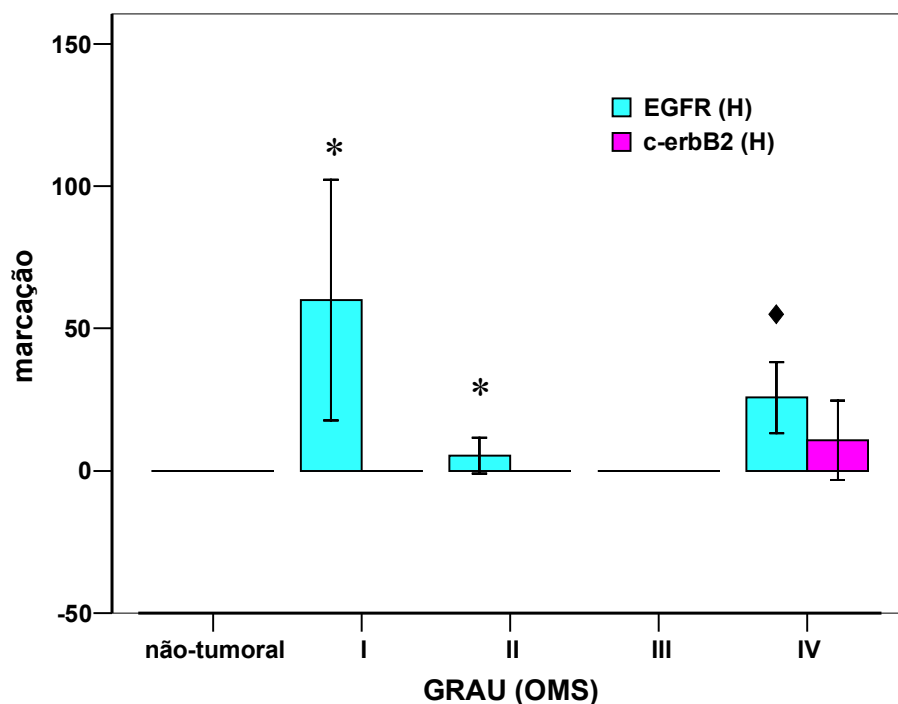
Os percentuais de positividade (Figura 47) e os valores médios do escore H (Figura 48) relativos ao EGFR foram significantes nos tumores astrocíticos dos graus I e IV. Apesar dos Astrocitomas Grau IV terem demonstrado o maior índice de casos positivos para EGFR, a média de expressão mostrou-se inferior à constatada nos tumores do grau I devido à menor intensidade da marcação verificada. A proteína ErbB2 foi detectada somente em 14,28% dos tumores do grau IV, apresentando média de 41,66% de células marcadas (LI médio  $\cong$  42) com intensidade moderada (H médio  $\cong$  75).



**FIGURA 46 – Expressão dos receptores de membrana EGFR [a, b, c] e ErbB2 [d] detectada por imuno-histoquímica.** [a e b] Caso n°. 43 – Astrocitoma Grau IV (OMS): (a) marcação intensa (400X), (b) detalhe evidencia algumas células positivas exibindo figuras mitóticas (1.000X); [c] Caso n°. 13 – Astrocitoma Grau I (OMS): marcação intensa, predominante em gemistócitos; [d] Caso n°. 49 – Astrocitoma Grau IV (OMS): marcação moderada. Para maiores informações sobre os casos, consultar Anexo IV.

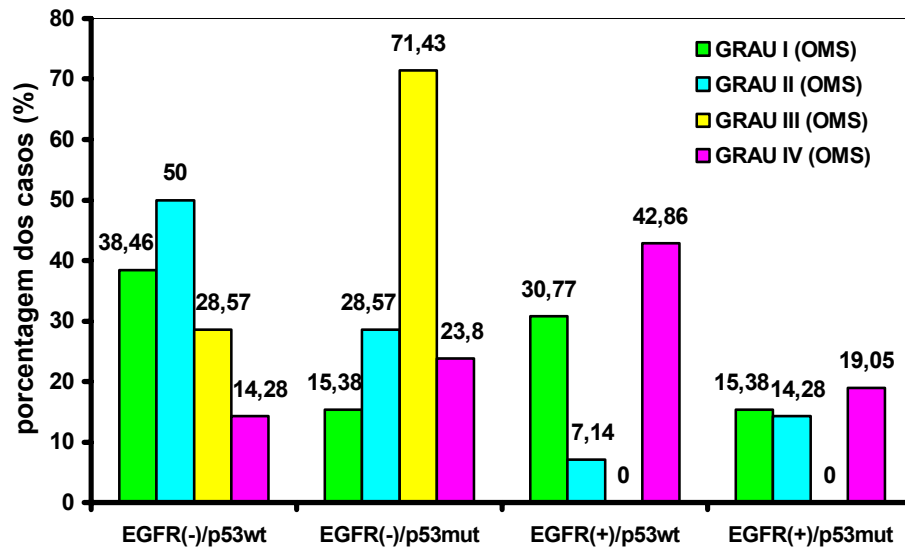


**FIGURA 47 – Percentuais de positividade imuno-histoquímica para EGFR e ErbB2 segundo a classificação histológica dos casos avaliados.** (♦)  $p < 0,01$  em relação ao grupo anterior (teste U de Mann-Whitney).



**FIGURA 48 – Médias dos escores atribuídos à expressão de EGFR (H) e ErbB2 (H) detectada por imunohistoquímica segundo a classificação histológica dos casos avaliados. H (de *H-Score*); (♦)  $p < 0,01$  e (\*)  $p < 0,05$  em relação ao grupo anterior (teste U de Mann-Whitney).**

Apoiando-se na expressão imuno-histoquímica das proteínas EGFR e p53/p21, projetou-se o perfil funcional dos seus respectivos genes nos tumores astrocíticos pesquisados (Figura 49). Nos Astrocitomas Graus I e II, a maior parte dos casos (38,46% e 50%, respectivamente) não demonstrou indícios de alterações simultâneas nos genes EGFR e p53. Todavia, considerável fração de tumores astrocíticos do grau I (30,77%) apresentou aumento na expressão do gene EGFR associadas à normalidade no gene p53, ao passo que importante porção dos tumores do grau II (28,57%) exibiu modificações no gene p53 na ausência de desordens no gene EGFR. Este último panorama ilustrou a principal tendência verificada nos tumores do grau III (71,43%). Quanto aos tumores do grau IV, observou-se maior frequência (42,86%) da superexpressão do gene EGFR em conjunção à inexistência da mutação do gene p53. Cerca de 14,54% dos astrocitomas avaliados manifestaram a presença de alterações em ambos os genes EGFR e p53.

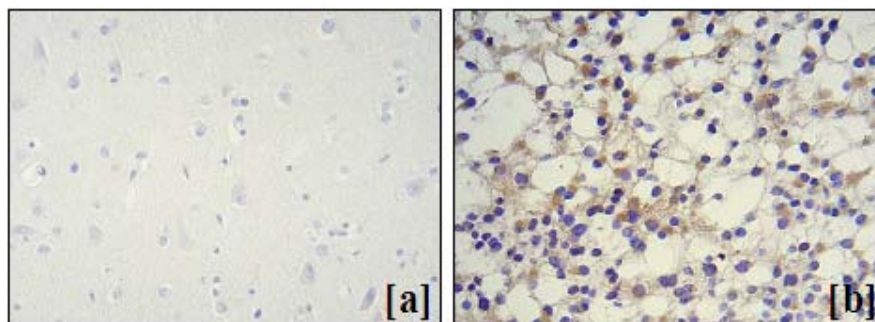


**FIGURA 49 – Distribuição percentual das diferentes graduações dos astrocitomas segundo a situação funcional dos genes p53 e EGFR estimada pela detecção imuno-histoquímica de suas respectivas proteínas.** wt\* (selvagem, de *wild-type*); mut (mutado); + (presença da expressão); – (ausência da expressão).

\* considerou-se o gene selvagem quando se constatava a ausência de expressão para p53 [p53(-)] ou a presença da expressão para p53 associada à significativa positividade para p21 [p53(+)/p21(+)].

#### 4.3.6. Sinalização Intracelular

A detecção imuno-histoquímica da proteína Ras é ilustrada na Figura 50. Percebeu-se significativa positividade para p21<sup>Ras</sup> nos Astrocitomas Grau II em relação às demais classes histológicas (Figura 51), conquanto a média dos escores referente à expressão dessa proteína (Figura 52) tenha se destacado nos tumores do grau I ( $p < 0,01$ ; teste H de Kruskal-Wallis). A porcentagem de casos positivos para a proteína Ras entre os tumores astrocíticos investigados foi de 10,90%, não sendo observada marcação entre as amostras não-tumorais.



**FIGURA 50 – Expressão de Ras detectada por imuno-histoquímica (400X).** [a] Caso n°. 0.2 – Córtex Cerebral Não-Tumoral: ausência de marcação; [b] Caso n°. 11 – Astrocitoma Grau I (OMS): marcação moderada. Para maiores detalhes sobre os casos, consultar Anexo IV.



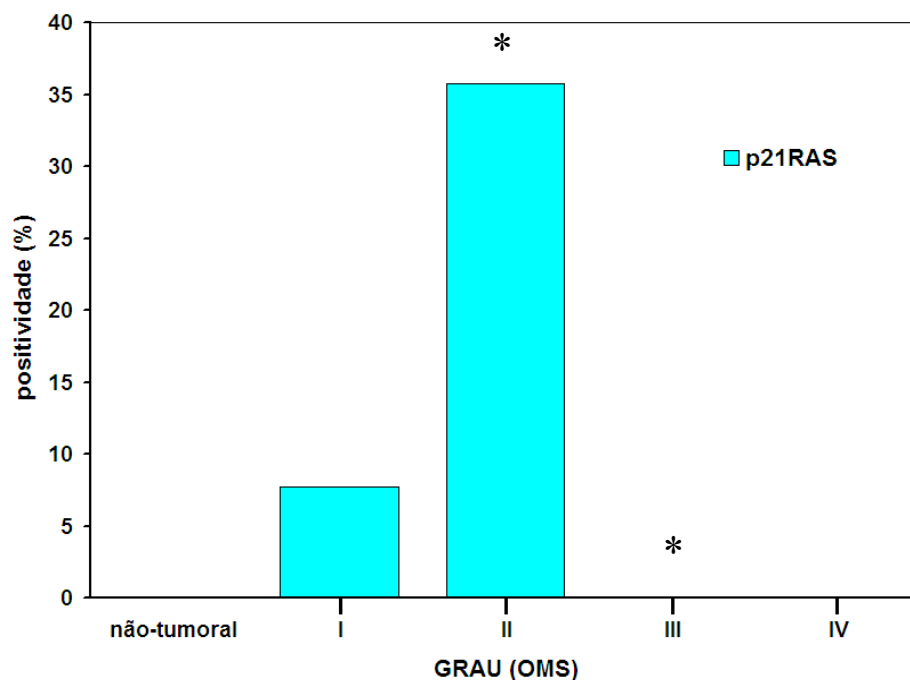


FIGURA 51 – Percentual de positividade imuno-histoquímica para p21<sup>Ras</sup> segundo a classificação histológica dos casos avaliados. (\*)  $p < 0,05$  em relação ao grupo anterior (teste U de Mann-Whitney).

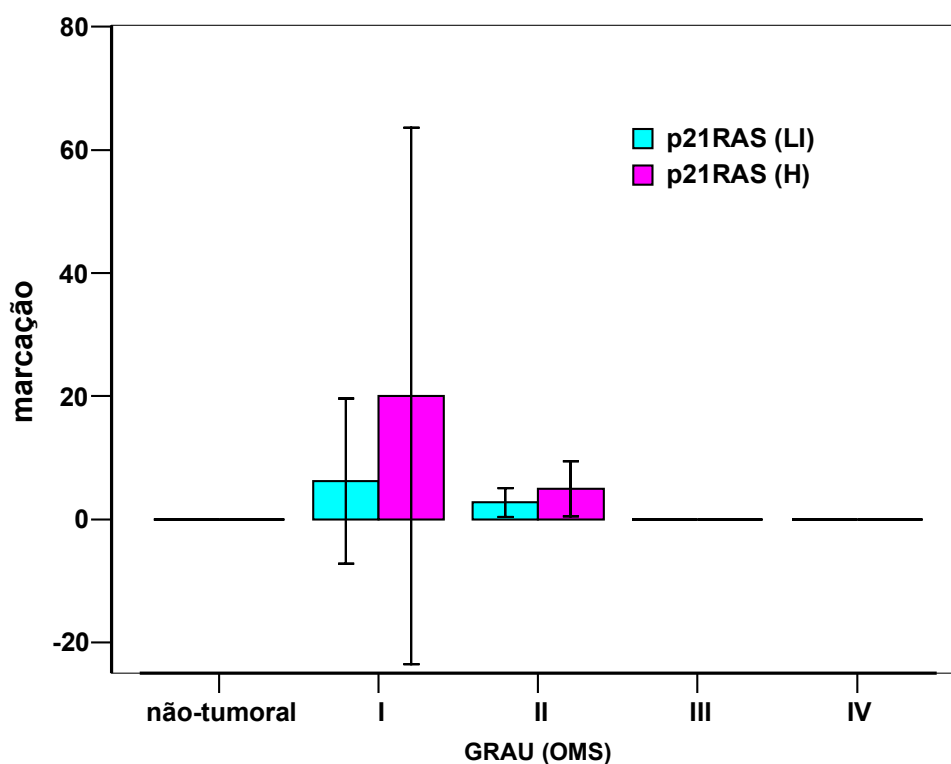
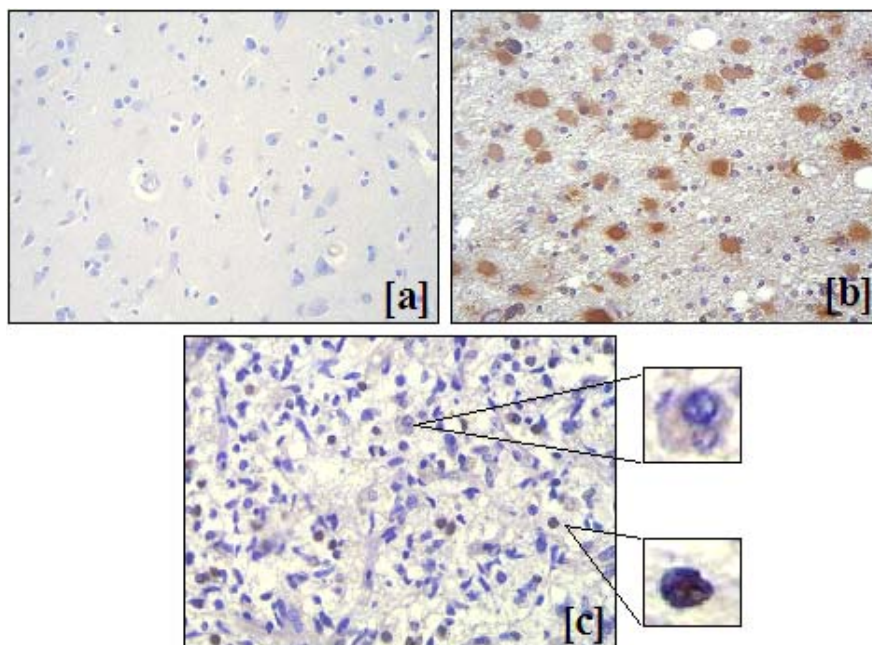


FIGURA 52 – Médias dos escores atribuídos à expressão de Ras (LI e H) detectada por imuno-histoquímica segundo a classificação histológica dos casos avaliados. H (de H-Score); LI (de Labelling Index).

#### 4.3.7. O Fator de Transcrição c-Myc

A Figura 53 retrata diferentes padrões de marcação imuno-histoquímica para a proteína c-Myc. O percentual de positividade (Figura 54) e o valor médio dos escores (Figura 55) referentes à expressão nuclear de c-Myc apresentaram tendência ao aumento com a sucessão tumoral dos astrocitomas.

Quanto à detecção citoplasmática de c-Myc, observou-se maior número de casos positivos entre os tumores astrocíticos de alto grau (III e IV) do que entre os de baixo grau (I e II). Semelhante diferenciação foi constatada de modo significativo através dos valores relativos às médias do escore H, com maiores índices para os tumores de alto grau em relação aos de baixo grau. Já em relação à porcentagem de células positivas (escore LI), evidenciou-se significativa marcação a partir dos tumores do grau I, mantendo-se constante até a discreta ampliação registrada nos tumores do grau IV.



**FIGURA 53 – Expressão de c-Myc detectada por imuno-histoquímica (400X).** [a] Caso n°. 0.2 – Córtex Cerebral Não-Tumoral: ausência de marcação; [b] Caso n°. 14 – Astrocitoma Grau II (OMS): marcação citoplasmática moderada, predominante em gemistócitos; [c] Caso n°. 28 – Astrocitoma Grau III (OMS): marcações citoplasmática (detalhe superior) e nuclear (detalhe inferior) moderadas. Para maiores informações sobre os casos, consultar Anexo IV.

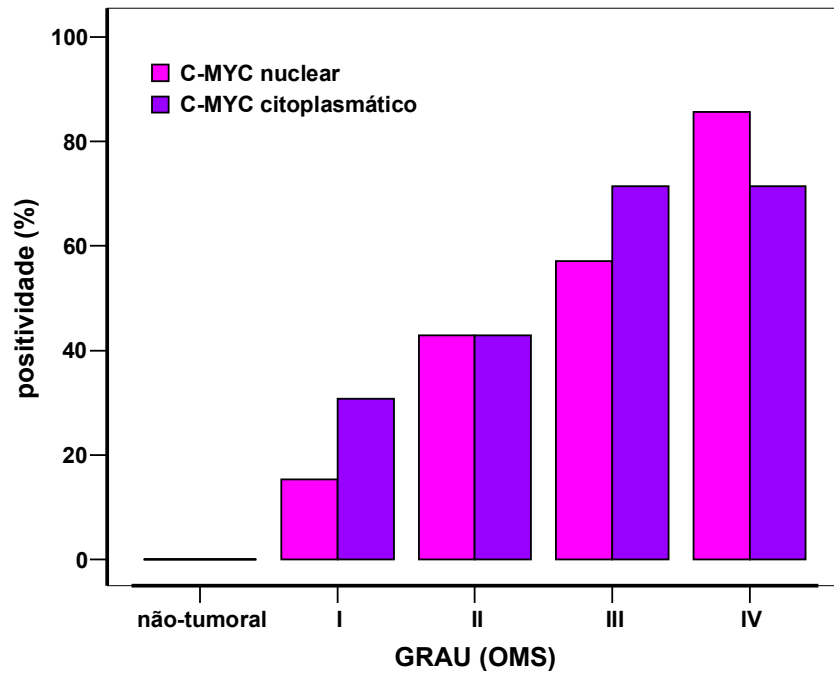


FIGURA 54 – Percentuais de positividade imuno-histoquímica para o fator de transcrição c-Myc (nuclear e citoplasmático) segundo a classificação histológica dos casos avaliados.

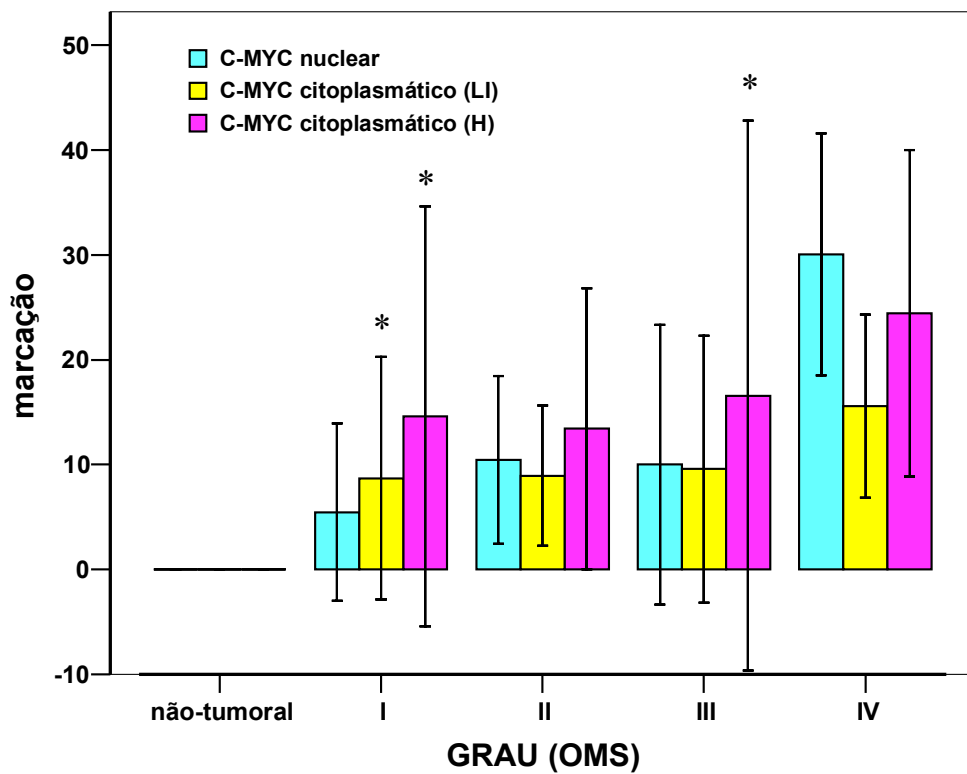
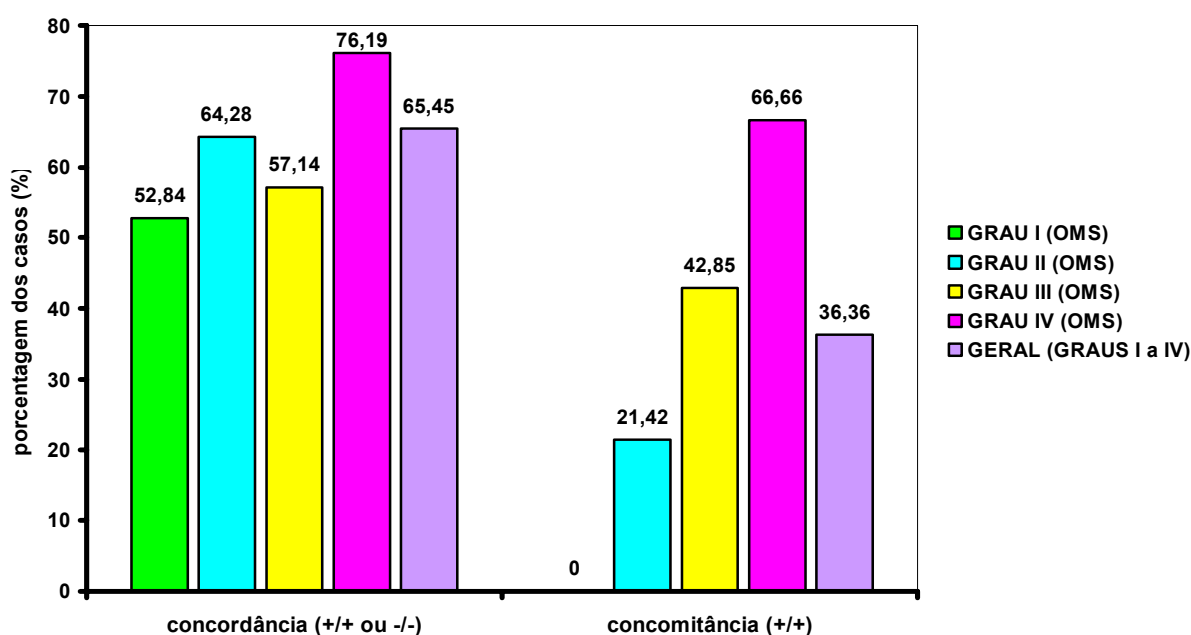


FIGURA 55 – Médias dos escores atribuídos à expressão de c-Myc detectada por imuno-histoquímica segundo a classificação histológica dos casos avaliados. LI (de *Labelling Index*); H (de *H-Score*); (\*)  $p < 0,05$  em relação ao grupo anterior (teste U de Mann-Whitney).

A concordância entre as expressões nuclear e citoplasmática para c-Myc mostrou-se similar nas diferentes gradações dos tumores astrocíticos (em média 65,45%), enquanto a concomitância demonstrou considerável acréscimo conforme a progressão maligna (Figura 56). A positividade geral para c-Myc dentre os astrocitomas avaliados foi de 50,27% e 54,12% para os sítios nuclear e citoplasmático, respectivamente. Não ocorreu positividade entre os exemplares não-tumorais averiguados.



**FIGURA 56 – Percentuais de concordância (+/+ ou +/-) e concomitância (+/+) entre as marcações nuclear e citoplasmática para c-Myc detectadas por imuno-histoquímica segundo a classificação histológica dos astrocitomas avaliados.**

#### 4.3.8. Vias Tumorigênicas

A constatação da maior frequência de alterações na expressão dos genes p53, EGFR e c-myc nos tumores astrocíticos, bem como as evidências do impacto dessas variações na graduação tumoral, suscitou a subdivisão simplificada dos astrocitomas avaliados considerando-se agora a alteração molecular preponderante (quantitativa e qualitativamente) em cada caso. O resultado destas inferências encontra-se representado na Figura 57.

Nos Astrocitomas Grau I constataram-se semelhantes índices entre os tumores que exibiram a mutação do p53 e a superexpressão do EGFR como principal desordem molecular. Nos Astrocitomas Graus II e III observou-se predomínio da mutação do p53, especialmente nesta última gradação, logo seguida pela expressão do c-myc. Nos Astrocitomas Grau IV, prevaleceu a superexpressão do EGFR, sucedida pela mutação do p53 e pela expressão do c-myc, respectivamente.

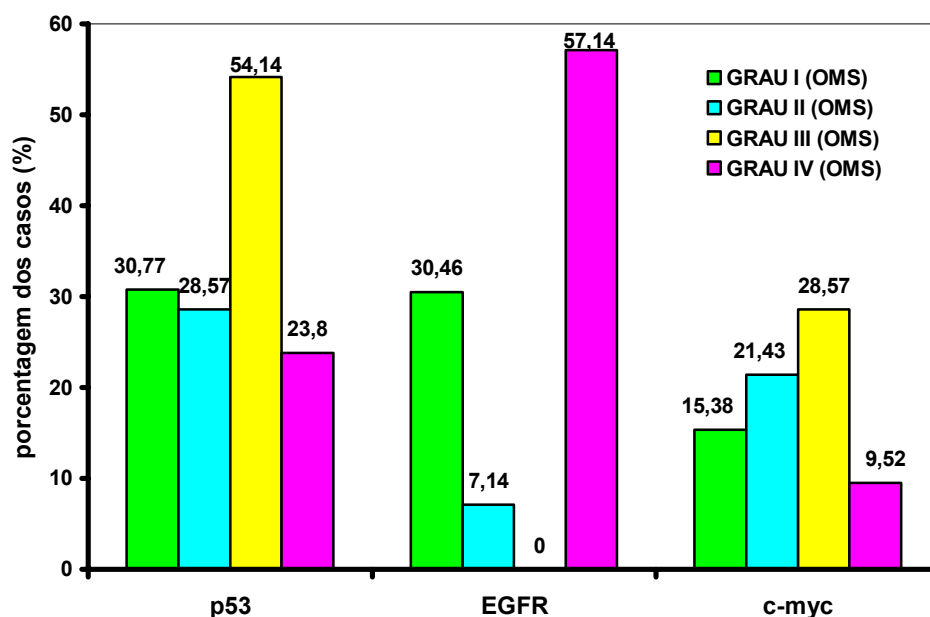


FIGURA 57 – Distribuição percentual das diferentes gradações dos astrocitomas segundo o principal evento tumorigênico (mutação do p53, superexpressão do EGFR, expressão de c-Myc) estimado pela detecção imuno-histoquímica das proteínas correlatas.

#### 4.3.9. Enzimas relacionadas à Quimiorresistência

Exemplos da detecção imuno-histoquímica para TopoII $\alpha$ , MGMT, GST $\pi$  e TS podem ser vistos nas Figuras 29 [e, f] e 58. Os percentuais de positividade e os escores médios de expressão dessas enzimas nas diferentes classificações histológicas são mostrados nas Figuras 59 e 60, respectivamente.

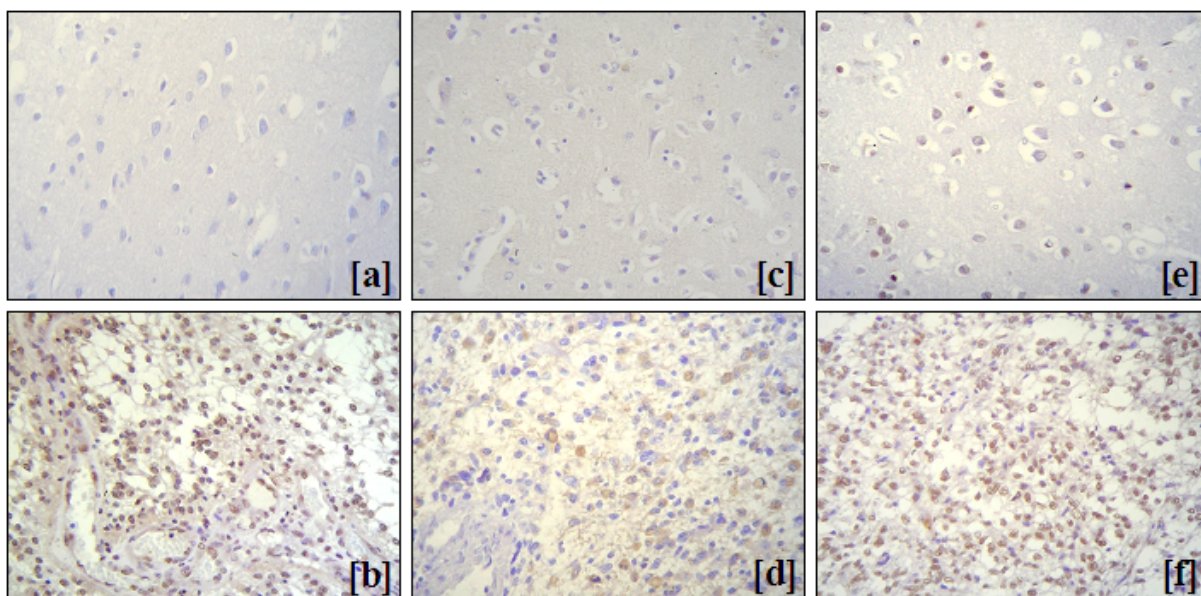
A presença da MGMT foi evidenciada em todos os espécimes avaliados (tumoriais e não-tumoriais), ocorrendo predominantemente no núcleo das células astrocíticas. Os índices

médios de marcação para essa enzima foram elevados (LI médio = 69,43), demonstrando aparente nivelamento entre as distintas categorias histológicas pesquisadas.

A GST $\pi$  foi detectada basicamente entre os astrocitomas, com elevada positividade (média de 92,44%) nas diferentes gradações tumorais, ao passo que os escores de expressão (LI) para essa enzima apresentaram tendência à redução conforme a progressão maligna.

Quanto à TopoII $\alpha$ , constatou-se tendência à ampliação das porcentagens de amostras positivas de acordo com a evolução tumoral dos astrocitomas (média de 62,02%), enquanto os índices de marcação revelaram-se similares nas diversas gradações (LI médio = 22,93).

Já a TS manifestou-se preponderantemente nos tumores astrocíticos, com semelhantes valores de positividade (média de 79,16%) e escores de expressão (LI médio = 23,95; H médio = 38,20) nas diferentes gradações. Os Astrocitomas Grau IV configuraram exceção, visto que exibiram significativo aumento do índice médio de marcação (LI médio = 63,33), mesmo diante da redução no percentual de casos positivos para essa enzima.



**FIGURA 58 – Expressão das enzimas relacionados à quimiorresistência GST $\pi$  [a, b], TS [c, d] e MGMT [e, f] detectada por imuno-histoquímica (400X).** [a, c, e] Caso n<sup>o</sup>. 04 – Córtex Cerebral Não-Tumoral: ausência de marcação para GST $\pi$  e TS, porém intensa marcação das células astrocíticas para MGMT; [b] Caso n<sup>o</sup>. 06 – Astrocitoma Grau I (OMS): marcação intensa; [d] Caso n<sup>o</sup>. 30 – Astrocitoma Grau III (OMS): marcação moderada; [f] Caso n<sup>o</sup>. 33 – Astrocitoma Grau III (OMS): marcação intensa. Para maiores detalhes sobre os casos, consultar Anexo IV.

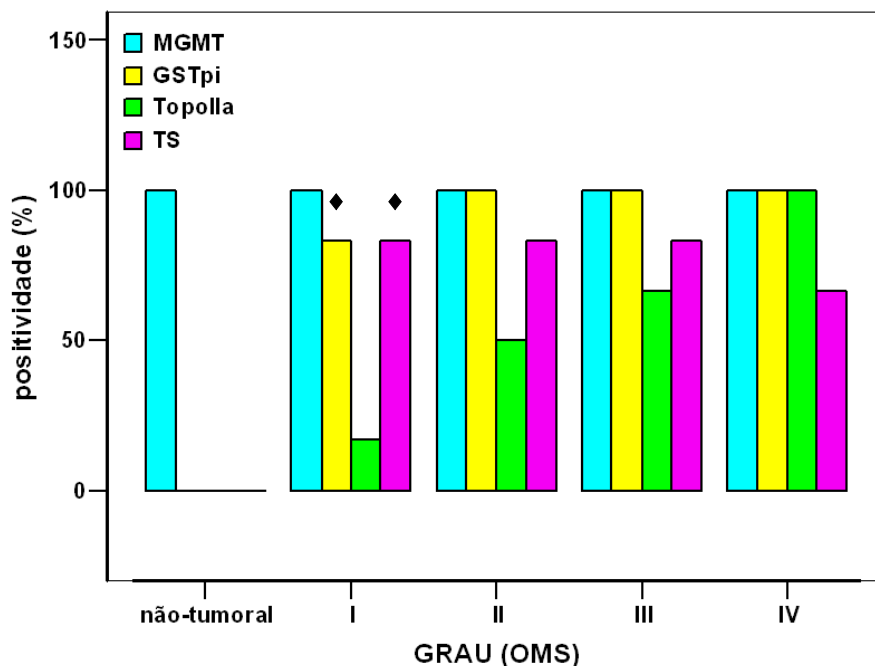


FIGURA 59 – Percentuais de positividade imuno-histoquímica para as enzimas MGMT, GST $\pi$ , TopoII $\alpha$  e TS segundo a classificação histológica dos casos avaliados. (♦)  $p < 0,01$  em relação ao grupo anterior (teste U de Mann-Whitney).

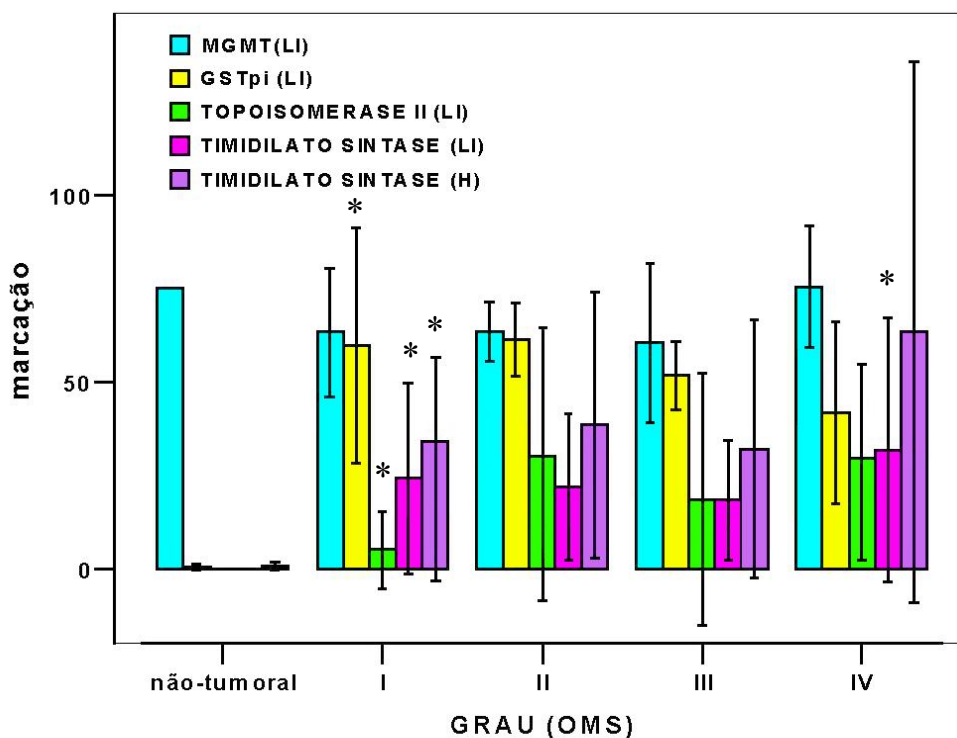


FIGURA 60 – Médias dos escores atribuídos à expressão das enzimas relacionadas à quimiorresistência [MGMT (LI), GST $\pi$  (LI), TopoII $\alpha$  (LI) e TS (LI e H)] detectada por imuno-histoquímica segundo a classificação histológica dos casos avaliados. LI (de *Labelling Index*) H (de *H-Score*); (\*)  $p < 0,05$  em relação ao grupo anterior (teste U de Mann-Whitney).

## 5. DISCUSSÃO

O presente estudo analisou o perfil clínico-epidemiológico, histopatológico e imuno-histoquímico de 55 (cinquenta e cinco) tumores astrocíticos e de 05 (cinco) exemplares de tecido cerebral não-tumoral (grupo controle), todos procedentes de material de arquivo fixado em formalina e incluído em parafina. A proposta de avaliação proteômica *in situ* de 15 (quinze) marcadores relacionados a diferentes funções celulares em uma mesma amostragem de astrocitomas apresenta-se, até este momento, sem paralelo na literatura mundial.

### 5.1. ANÁLISE CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA

A incidência anual dos astrocitomas evidenciada na cidade de Fortaleza (3,08/100.000 habitantes) mostrou-se semelhante às observadas em regiões subdesenvolvidas (2,86/100.000) (Kleihues & Cavenee, 2000) e inferior às verificadas em áreas mais desenvolvidas, como o município de São Paulo (4,15/100.000) (Mirra *et al.*, 2001) e os EUA (4,81/100.000) (CBTRUS, 2002). Conforme indicado, essa diferença parece remeter somente a razões sócio-econômicas, visto que não se detectam fatores etiológicos específicos para o surgimento de tumores astrocíticos entre os diferentes povos/territórios mundiais (Lantos *et al.*, 2002). Acredita-se que as dificuldades enfrentadas pelos pacientes no acesso aos serviços de saúde pública (profissionais especializados, recursos de imagem, oportunidade cirúrgica) contribuam para o atraso no diagnóstico e/ou na conduta terapêutica, resultando na ausência de perspectiva cirúrgica ou mesmo no óbito dos portadores dessas e de outras neoplasias primárias do SNC.



Embora seja pouco provável, não se pode descartar a possibilidade de sub-notificação dos casos de astrocitomas em Fortaleza, já que a referência do material histológico para o Laboratório BIOPSE® não ocorre de forma invariável. Além disso, a carência de abordagens terapêuticas pós-cirúrgicas por vezes desestimula os pacientes a se certificarem do diagnóstico histopatológico (fonte dos dados). Esse panorama reforça a necessidade da implementação de um serviço oficial confiável para o registro dos tumores primários do SNC diagnosticados no Brasil, objetivando o reconhecimento endêmico e o planejamento de estratégias eficientes para o seguimento clínico-cirúrgico dessas neoplasias.

A distribuição etária dos pacientes da amostra avaliada (n=55) refletiu de modo fidedigno as peculiaridades descritas nos estudos epidemiológicos multicêntricos, com o predomínio dos astrocitomas de baixo grau (I e II) entre os indivíduos mais jovens e dos astrocitomas de alto grau (III e IV) entre os mais idosos (Louis, 1997). A classificação por sexo entre os casos da amostragem revelou a preponderância do gênero masculino, todavia a relação masculino/feminino observada no levantamento geral (1,28) retratou melhor a propensão mundial (1,02) (Kleihues & Cavenee, 2000).

A localização dos tumores astrocíticos estudados também reproduziu os achados internacionais, com predominância dos tumores grau I na região infratentorial e dos tumores grau II, III e IV em sítios supratentoriais (Ironsides *et al.*, 2002). Apesar dos Astrocitomas Grau IV serem descritos mais freqüentemente (31%) nos lobos temporais (Kleihues & Cavenee, 2000), cerca da metade dos tumores dessa gradação pertencentes à amostra encontrava-se nos lobos frontais. Apesar do reduzido tamanho amostral, parece razoável supor que a maior porção do tecido cerebral corresponda ao principal local para o surgimento de tumores tipicamente supratentoriais (Burger *et al.*, 2002). Outra explicação advém da possível extensão de grandes massas tumorais sobre os lobos frontais, caracterizando-as no momento cirúrgico como presentes nestas projeções encefálicas.

## 5.2. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

A reavaliação dos parâmetros histopatológicos nos astrocitomas pesquisados indicou que a alteração da celularidade define a presença de neoplasia; a atipia nuclear caracteriza os tumores do grau II, enquanto sua associação à atividade mitótica distingue os tumores do grau III; a presença de hiperplasia endotelial e/ou necrose diferencia os tumores do grau IV em relação ao grau III; discretas alterações histológicas discriminam os tumores do grau I. Esses achados coincidem integralmente com os critérios estabelecidos pela OMS para graduação dos tumores astrocíticos (Kleihues *et al.*, 2002), confirmando o diagnóstico original e reiterando a aplicabilidade e a reprodutibilidade dos mesmos.

Ressalta-se, no entanto, que tais resultados foram obtidos através não da usual análise qualitativa de achados histológicos, mas da atribuição de escores semiquantitativos propostos pelo presente estudo (Tabela 03) de acordo com os paradigmas preconizados pela OMS para a classificação dos astrocitomas. Tanto as variações individuais como o somatório das pontuações demonstraram valor preditivo em relação à gradação tumoral. Dessa forma, percebe-se a adequação desta estratégia como auxiliar na determinação do grau dos tumores astrocíticos, tendo os valores médios da soma dos escores analisados (Tabela 05) como principal referência para a classificação dessas neoplasias.

Outro importante instrumento para distinção da graduação dos astrocitomas revelado pela corrente investigação surgiu com a aplicação da metodologia CART (Figura 28). Além da combinação dos parâmetros já descritos, a árvore de decisão referente à análise histopatológica dos tumores astrocíticos apontou o pleomorfismo celular intenso como “marca registrada” do grau IV. De fato, poucos neoplasmas humanos demonstram tamanha heterogeneidade em sua composição celular como os Astrocitomas Grau IV (Ellison *et al.*, 2004). Nestes tumores, transições entre áreas com diferenciação astrocítica discernível e

regiões altamente anaplásicas mostram-se freqüentes e, por vezes, ocorrem de forma abrupta. Essas variações súbitas parecem indicar o aparecimento de novos fenótipos tumorais desencadeados pela aquisição de alterações genéticas diversas (Louis, 1997).

A necessidade da precisão na classificação dos astrocitomas provém da imprescindível padronização do diagnóstico desses tumores, uma vez que este persiste como o único indicador de condutas terapêuticas específicas e agrega valor prognóstico quanto à sobrevivência dos pacientes (Jaros *et al.*, 1992). Dessa forma, acredita-se que o uso dos escores/médias e da árvore de decisão para gradação dos tumores astrocíticos apresentados neste estudo configurem artifícios aplicáveis na prática diagnóstica como auxiliares na determinação do grau histológico dos astrocitomas, especialmente os de difícil categorização.

Embora não figurem entre os critérios de gradação tumoral da OMS, a presença de células gigantes multinucleadas e a detecção de gemistócitos entre os tipos celulares dos tumores astrocíticos são apontadas como indicadores de malignidade (Gray *et al.*, 2004). Nos astrocitomas investigados, células gigantes foram evidenciadas somente nos tumores de alto grau (III e IV), manifestando-se em associação à elevada celularidade e ao expressivo pleomorfismo celular. Diversos autores consideram esses elementos celulares como conseqüentes a alterações regressivas (indiferenciação) e sugerem sua correlação com pior prognóstico clínico (Louis & Cavenee, 1997). Já os gemistócitos foram encontrados desde os astrocitomas de baixo grau (I e II), todavia com maior representação entre os tumores de alto grau, assim como relatado na literatura. Esses componentes celulares, por sua vez, são descritos como resultantes possivelmente da degeneração de astrócitos neoplásicos, conquanto sua origem permaneça incerta (Taillibert *et al.*, 2004). Tumores astrocíticos de baixo grau onde são demonstrados gemistócitos exibem tendência à rápida progressão para subtipos mais malignos (Vinters *et al.*, 1998). Apesar disso, não se constata correlação direta entre a proporção de gemistócitos e o prognóstico dos pacientes (Yang *et al.*, 2003).

### **5.3. ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA**

#### **5.3.1. Proliferação Celular**

A proliferação celular descontrolada é a principal característica do processo neoplásico. O conceito do aumento de malignidade conforme o incremento do índice proliferativo tumoral é intuitivamente admitido como regra (Grzybicki & Moore, 1999). Nos últimos anos, a medida do perfil proliferativo dos astrocitomas, assim como seu possível impacto diagnóstico/prognóstico nos tumores, tem sido alvo de intensas pesquisas, utilizando variadas metodologias (Stemmer-Rachamimov & Louis, 1997).

O mais simples e antigo método de averiguação de células proliferantes consiste na observação de figuras mitóticas nos tecidos avaliados. As transformações estruturais desencadeadas pela mitose, como a condensação da cromatina recém-duplicada (final da prófase), a centralização celular das cromátides (metáfase), a separação dos cromossomos pelo fuso mitótico (anáfase) e o início da distinção entre as duas novas células (telófase), são eventos facilmente visualizados por microscopia óptica simples (Cotran *et al.*, 2000). Contudo, o fenômeno mitótico representa apenas o último passo (fase M) do complexo mecanismo proliferativo representado pelo ciclo celular (G1-S-G2-M).

A necessidade da detecção das células proliferativas, independentemente da presença de indícios morfológicos, levou à busca por elementos expressos exclusivamente no período de ciclagem celular. Nesse sentido, surge o antígeno Ki-67, uma proteína nuclear presente em todas as fases do ciclo celular (Gerdes *et al.*, 1991). A elaboração do anticorpo monoclonal MIB-1 para a análise imuno-histoquímica do Ki-67 transformou-o no mais utilizado marcador de proliferação celular na rotina histopatológica devido à sua aplicabilidade em tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina (Cattoretti *et al.*, 1992).

O presente estudo demonstrou o aumento gradual da expressão do antígeno Ki-67 de acordo com a progressão maligna e o índice mitótico dos tumores astrocíticos avaliados (Figura 32). Além disso, os escores médios do índice da marcação (LI) para Ki-67 revelaram significativa distinção entre as diferentes gradações dos astrocitomas (Tabela 06). Essas tendências mostram-se em concordância com a maioria dos estudos anteriores (Tabela 07), apesar da oscilação observada entre os valores estabelecidos para cada grupo histopatológico.

**TABELA 07 – Índices de marcação imuno-histoquímica (LI) para o antígeno Ki-67 nas diferentes gradações dos tumores astrocíticos (incluídos em parafina) segundo diversas referências, incluindo o presente estudo**

Referência	AC	Grau I (OMS)		Grau II (OMS)		Grau III (OMS)		Grau IV (OMS)	
		n	MD ± DP	n	MD ± DP	n	MD ± DP	n	MD ± DP
Raghavan <i>et al.</i> (1990) *	MIB-1 1:50	-	-	26	0,50 ± 0,54	26	4,10 ± 2,80	38	6,40 ± 3,34
Jaros <i>et al.</i> (1992) *♦	MIB-1 1:50	-	-	06	1,10	13	8,30	20	13,40
Karamitopoulou <i>et al.</i> (1994)	MIB-1 1:50	-	-	24	2,03 ± 2,03	26	12,80 ± 6,29	09	14,57 ± 6,57
Onda <i>et al.</i> (1994)	MIB-1 1:50	-	-	23	4,20 ± 4,10	22	7,30 ± 7,20	30	13,90 ± 13,50
Wakimoto <i>et al.</i> (1996) *♦	MIB-1 1:50	-	-	19	3,80 ± 2,70	25	18,40 ± 9,70	28	31,60 ± 12,90
Kordek <i>et al.</i> (1996) *	poAb 1:50	08	0,80	09	1,90	09	6,30	30	9,80
Khalid <i>et al.</i> (1997) *	MIB-1 1:100	09	1,20 ± 1,60	24	1,80 ± 3,20	20	13,50 ± 11,20	33	15,70 ± 15,40
Eneström <i>et al.</i> (1998) *♦	MIB-1 1:50	-	-	06	7,60 ± 2,30	09	13,30 ± 3,90	07	24,30 ± 6,60
Giannini <i>et al.</i> (1999) *♦	MIB-1 1:100	131	1,10	45	2,30	50	6,00	45	9,1
Ralte <i>et al.</i> (2001) *♦	MIB-1 1:50	08	0,44 ± 0,76	30	3,73 ± 3,70	11	9,65 ± 7,22	15	10,33 ± 7,98
Neder <i>et al.</i> (2004) *♦	MoAb 1:200	-	-	11	2,35 ± 3,00	05	6,44 ± 2,70	31	12,28 ± 8,20
<b>Faria (2005) *</b>	<b>MIB-1 1:80</b>	<b>13</b>	<b>0,23 ± 0,60</b>	<b>14</b>	<b>1,43 ± 2,20</b>	<b>07</b>	<b>5,28 ± 4,50</b>	<b>21</b>	<b>19,80 ± 12,70</b>

LI (de *Labelling Index*); AC (anticorpo e diluição); n (número de casos); MD (média); DP (desvio padrão);

\* (associação estatística com a gradação histológica); ♦ (associação estatística com a sobrevida).

Mesmo com relativa limitação no número de casos estudados, percebe-se que os índices de marcação para Ki-67 obtidos pela atual investigação exibiram valores similares aos de grandes séries, como a reportada por Giannini *et al.* (1999).

As evidentes variações quantitativas para semelhantes gradações tumorais, observadas entre os diferentes estudos, podem ser justificadas por uma simples e desconcertante razão: a determinação imuno-histoquímica de antígenos em tumores astrocíticos fixados em formalina e incluídos em parafina, especialmente aqueles relacionados à atividade proliferativa, não é fácil! Os desafios começam no processamento rotineiro do material, onde a inadequação dos métodos de fixação e diafanização tecidual pode ocasionar deterioração protéica, destituindo o tecido do antígeno a ser pesquisado (Shi *et al.*, 2001). Durante a reação imuno-histoquímica, fatores como a adequação dos cortes histológicos, as condições de recuperação antigênica, a titulação do anticorpo primário, o tempo de detecção, a técnica de revelação, a intensidade da contra-coloração, entre outros são determinantes para a qualidade final da imuno-marcação (Taylor *et al.*, 1994). Já na etapa de visualização microscópica, a escolha dos campos tumorais para a avaliação (geralmente os astrocitomas apresentam áreas heterogêneas, com importantes distinções entre as populações celulares), o número de células avaliadas e a experiência do examinador podem influenciar a quantificação das células imuno-reativas (Coons & Johnson, 1993).\*

Considerando as limitações da metodologia imuno-histoquímica “manual”, sistemas automáticos de coloração e métodos computacionais para contagem de células positivas têm sido propostos como solução para a padronização universal desta importante ferramenta de estudo. Entretanto, o custo desses equipamentos e a necessidade de pessoal especialmente treinado para aplicação dos mesmos têm dificultado, até o presente momento, a utilização dessas estratégias na rotina diagnóstica em patologia e na prática laboratorial (Sallinen, 1999).

---

\* As fontes de variação do método imuno-histoquímico enumeradas são extensíveis a todos os marcadores.

Por outro lado, as melhorias qualitativas dos reagentes (anticorpos monoclonais, sistemas de detecção mais sensíveis) e a formatação de diretrizes técnicas internacionais (ex.: Herceptest<sup>®</sup>) representam avanços simples e práticos em direção à aquisição de uniformidade entre os estudos imuno-histoquímicos multicêntricos. O impacto desses fatores já pode ser notado através da maior regularidade observada entre os resultados obtidos pelas pesquisas publicadas mais recentemente.

A despeito da variabilidade dos dados, grande parte dos investigadores aponta nítida correlação entre o nível de marcação para Ki-67 e o grau histológico dos tumores astrocíticos (Tabela 07), confirmando a importância da proliferação celular na determinação do fenótipo maligno tumoral. Nessa direção, o presente trabalho reporta ainda o estabelecimento de “valores de corte” da marcação (LI) para o antígeno Ki-67 nos tumores astrocíticos de acordo com a graduação tumoral, através da metodologia CART (Figura 33). Escores acima de 8% distinguiram os Astrocitomas Grau IV (sensibilidade: 0,90; especificidade: 0,97), índices entre 1,5% e 8% diferenciaram os Astrocitomas Grau III (sensibilidade: 0,85; especificidade: 0,86) e valores abaixo de 1,5% discriminaram os astrocitomas de baixo grau (I e II) (sensibilidade: 0,81; especificidade: 0,96).

A estipulação de tais valores não possui correspondente entre as referências atuais. Apesar disso, comparando-se esses resultados aos percentuais médios de marcação para Ki-67 em tumores astrocíticos, conforme já descritos (Tabela 07) e resumidos por Lantos *et al.* (2002) [ $\cong$  0% no grau I; < 4% no grau II; 5-10% no grau III; 15-20% no grau IV], percebe-se que os “pontos de corte” descrevem valores inferiores aos reportados pelas médias. Considera-se que este fato se deva a propensão do método do CART em privilegiar a especificidade sobre a sensibilidade, ou seja, em não atribuir diagnóstico àquele que realmente não o representa. Essa tendência termina por promover o “descarte” daqueles tumores com índice proliferativo excessivamente divergente da maioria dos casos de sua

gradação histológica. Nesse sentido, deduz-se que astrocitomas genotipicamente mais malignos (elevados índices proliferativos), possivelmente inclinados à progressão neoplásica, são os responsáveis pela superioridade dos escores médios de marcação para o antígeno Ki-67 quando considerados os valores esperados para os tumores da mesma gradação histopatológica, porém demonstrando a “típica” malignidade deste grau.

Dessa forma, admite-se que os escores médios (Tabela 06) e a árvore de decisão (Figura 33) estabelecidos a partir da marcação para Ki-67 nos astrocitomas pesquisados configurem ferramentas adicionais no apoio à determinação da gradação histopatológica dessas neoplasias, especialmente para os tumores de alto grau.

Muitos relatos sugerem o antígeno Ki-67 como indicador de prognóstico nos tumores astrocíticos (Shiffer *et al.*, 1988; Montine *et al.*, 1994; Wakimoto *et al.*, 1996; Hoshi *et al.*, 1997; McKeever *et al.*, 1998; Eneström *et al.*, 1998; Giannini *et al.*, 1999; Pollack *et al.*, 2002). Jaros *et al.* (1992) descreve escores acima de 5% (LI > 5) como preditivos de menor sobrevida. Ralte *et al.* (2001) encontrou correlação inversa entre os valores da expressão do Ki-67 e o tempo de recorrência tumoral. Não obstante, diversos estudos contradizem esses achados (Ito *et al.*, 1994; Ellison *et al.*, 1995a; Karkavelas *et al.*, 1995; Kaluza *et al.*, 1997; Hilton *et al.*, 1998). De fato, ainda não existem evidências conclusivas sobre o impacto da detecção do Ki-67 como fator prognóstico independente nos astrocitomas.

Acontecimento intrigante ocorreu com a visualização de pigmentação castanha, compatível com a coloração do cromógeno imuno-histoquímico diaminobenzidina (DAB), no citoplasma de alguns neurônios dos tecidos cerebrais não-tumorais pesquisados quanto à presença do antígeno Ki-67 (Figura 29 [d]). Apesar de não se conhecer a real função da proteína Ki-67, sabe-se que esta atua no processo proliferativo através de mecanismos exclusivamente nucleares (Fonatsch *et al.*, 1991). Além disso, os neurônios corticais cerebrais não possuem atividade proliferativa, visto se tratarem de células altamente especializadas e,



portanto, maximamente diferenciadas (Fuchs *et al.*, 2004). A constatação de semelhante coloração nas lâminas coradas com HE, nas mesmas áreas descritas, conduziu à conclusão de que tal achado tratava-se de *background*, ou seja, de uma “marcação” artefactual. Atribui-se tal fenômeno a substâncias pré-existentes nessas células, possivelmente a lipofuscina (pigmento amarelado resultante da degeneração de organelas celulares neuronais) ou até mesmo a melanina (pigmento escuro presente no citoplasma de neurônios da substância negra mesencéflica) (Gray & Woulfe, 2005).

A detecção da enzima DNA Topoisomerase II $\alpha$ , descrita como expressa diferencialmente durante o intervalo S-G2-M do ciclo celular, tem sido apontada como uma alternativa para a determinação da atividade proliferativa nos tumores astrocíticos (Bredel *et al.*, 2002c). A presente investigação constatou crescente positividade para TopoII $\alpha$  de acordo com a progressão dos astrocitomas (22,22% no grau I; 60,00% no grau II; 71,43% no grau III; 94,44% no grau IV) (Figura 31). Todavia, as médias dos índices de marcação (LI) para TopoII $\alpha$  não exibiram o mesmo comportamento (4,33; 31,60; 18,28; 29,22) (Figura 32), bem como não demonstraram correlação com a expressão do antígeno Ki-67.

Estes resultados contrastam com os obtidos por Holden & Townsend (1999), que observaram índices de marcação (LI) para TopoII $\alpha$  crescentes de acordo com a gradação dos tumores astrocíticos (2,1; 4,0; 17,3; 39,5). Já Taniguchi *et al.* (1999) evidenciaram diferenças nos escores de marcação (LI) para TopoII $\alpha$  somente entre astrocitomas de baixo e alto grau (4,07 nos graus I e II; 11,97 no grau III; 13,84 no grau IV). Ambas as pesquisas relatam ainda significativa correlação entre as marcações para Ki-67 e TopoII $\alpha$ , apesar dos maiores índices verificados para este último marcador.

Entretanto, como explicar a maior expressão da TopoII $\alpha$  em relação ao Ki-67 se esta enzima encontrar-se-ia expressa em um período menor do ciclo celular? Através da análise

por citometria de fluxo, Taniguchi *et al.* (1999) perceberam que a detecção de TopoII $\alpha$  nos astrocitomas ocorria também em células nas fases G0 e G1. O referido trabalho atribui tal achado à possível persistência desta enzima após sua atuação no processo replicativo e a prováveis alterações qualitativas em sua expressão, decorrentes da transformação maligna. Sendo assim, julga-se estar descaracterizada a expressão desta enzima como exclusiva durante o processo de multiplicação celular, descartando sua aplicação como marcador específico do *status* proliferativo. Além disso, recentes evidências apontam a participação das DNA Topoisomerases II, incluindo o subtipo alfa, nos mecanismos reparadores do DNA de células em repouso (G0) (Adachi *et al.*, 2004; Walker *et al.*, 2004).

Transpondo esses conhecimentos para o conjunto de dados apresentados pelo presente estudo, admite-se que a crescente positividade para TopoII $\alpha$  observada conforme a progressão tumoral dos astrocitomas avaliados represente o impacto do grau de malignidade sobre a proliferação celular e o dano ao DNA. A superioridade nos índices de marcação para TopoII $\alpha$  em relação ao Ki-67 em todas as gradações reforça a convicção sobre a atuação desta enzima em outros mecanismos além da multiplicação celular. Contudo, a progressiva redução da diferença entre os valores médios da marcação para TopoII $\alpha$  e Ki-67 nos tumores astrocíticos (a partir do grau II) sugere a falência do processo de reparo com a evolução neoplásica.

Apesar do potencial envolvimento do fator de transcrição c-Myc no mecanismo proliferativo (Figuras 14 e 30), poucas referências versam sobre esta correlação nos tumores astrocíticos. Nesse sentido, a atual investigação analisou a marcação nuclear (funcional) para c-Myc nos astrocitomas da amostra, tendo observado propensão ao aumento do número de casos positivos (15,38%; 42,86%; 57,14%; 85,71%) e dos índices de marcação (LI) (5,46; 10,42; 10,00; 30,04) conforme a progressão tumoral (Figuras 31 e 32).

Tais resultados confirmam a tendência de aumento da expressão de c-Myc de acordo com o grau de malignidade dos astrocitomas, notadamente nos tumores do grau IV (Engelhard

*et al.*, 1989). Semelhante inclinação foi demonstrada por Orian *et al.* (1992) (positividade de 5% no grau II; 33% no grau III; 76% no grau IV), embora os percentuais mostrem-se inferiores aos aqui reportados, possivelmente pela maior sensibilidade do método imuno-histoquímico na atualidade.

Dessa forma, parece razoável indicar a contribuição da proteína c-Myc para o processo de multiplicação celular nos tumores astrocíticos. Entretanto, a persistente superioridade nos índices de expressão nuclear de c-Myc em relação aos valores encontrados para o antígeno Ki-67, bem como a grande variabilidade individual de sua marcação, remetem ao provável envolvimento dessa proteína em outros eventos neoplásicos ativos nos astrocitomas.

Resumidamente, os dados apresentados pelo presente estudo corroboram com o conceito da participação da enzima DNA Topoisomerase II $\alpha$  e da proteína c-Myc nos mecanismos de proliferação celular dos astrocitomas. Todavia, o potencial comprometimento dessas proteínas em outras demandas celulares inviabiliza o uso de suas expressões como indicadores específicos da multiplicação celular nesses tumores. Por outro lado, a expressão do antígeno Ki-67 demonstrou significativo aumento conforme a progressão dos tumores astrocíticos e confirmou-se como preditiva da gradação tumoral.

### **5.3.2. Diferenciação Astrocítica**

Na presente investigação, a predominante expressão da Proteína Ácida Glio-Fibrilar observada em todos os Glioblastomas Multiformes avaliados reiterou a origem astrocítica dos mesmos, excluindo a possibilidade da evolução desses tumores a partir de precursores oligodendrogliais (Louis *et al.*, 2002). A marcação média para GFAP nos Astrocitomas Grau IV ocorreu em, aproximadamente, 77% dos astrócitos tumorais (LI =  $76,90 \pm 11,88$ ) de forma moderada (H =  $155,57 \pm 35,68$ ) (Figura 34). Tendo como referência a detecção da GFAP nos astrócitos dos tecidos não-tumorais (LI = 100 e H = 300), reitera-se a concepção de que a quantidade e a intensidade da marcação para GFAP são inversamente proporcionais à extensão da

anaplasia (Lantos *et al.*, 2002). Apesar da evidente correlação com a malignidade tumoral, Wilhelmsson *et al.* (2003) destaca que a baixa expressão de GFAP não contribui para o desenvolvimento neoplásico, estando implicada unicamente na representação do estado de diferenciação das células tumorais.

### Supressores Tumorais

O presente estudo constatou discreta tendência ao acréscimo do número de casos positivos quanto à expressão da proteína p53 conforme a progressão dos tumores astrocíticos, demonstrando semelhantes valores aos reportados pelos trabalhos anteriores, compilados na Tabela 08. O índice médio de marcação (LI) também apresentou propensão ao aumento de acordo com a gradação dos astrocitomas (7,69; 9,64; 15,28; 22,95) (Figura 37), a despeito da regularidade dos escores médios recentemente publicados por Nayak *et al.* (2001) entre os tumores dos graus II, III e IV (0; 9,89; 8,15; 8,13).

**TABELA 08 – Percentuais de positividade imuno-histoquímica para p53 nas diferentes gradações dos tumores astrocíticos segundo diversas referências, incluindo o presente estudo**

Referência	Grau I (OMS)		Grau II (OMS)		Grau III (OMS)		Grau IV (OMS)		GERAL	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Jaros <i>et al.</i> (1992) * <sup>†</sup>	04	0	06	17,00	13	38,00	20	65,00	43	44,00
Louis <i>et al.</i> (1993)	-	-	08	37,50	12	58,33	14	50,00	24	50,00
Lang <i>et al.</i> (1994)	07	71,00	08	63,00	16	64,51	-	-	31	64,51
Kordek <i>et al.</i> (1996)	08	0	09	44,40	09	33,30	30	53,30	56	41,00
Ono <i>et al.</i> (1997) *	-	-	15	40,00	20	40,00	13	38,00	48	39,58
Khalid <i>et al.</i> (1998)	-	-	-	-	-	-	57	52,63	57	52,63
Kirla <i>et al.</i> (2000)	-	-	-	-	25	44,00	52	46,00	77	45,45
Xu <i>et al.</i> (2001)	-	-	-	-	-	-	-	-	41	68,30
Pardo <i>et al.</i> (2004) <sup>†</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	74	48,00
Nayak <i>et al.</i> (2004)	15	0	38	52,63	29	48,27	70	50	152	45,39
<b>Faria (2005) *</b>	<b>13</b>	<b>46,15</b>	<b>14</b>	<b>50,00</b>	<b>07</b>	<b>57,14</b>	<b>21</b>	<b>66,66</b>	<b>55</b>	<b>54,98</b>

n (número de casos); % (porcentagem); \* (associação estatística com a gradação histológica);

<sup>†</sup> (associação estatística com a sobrevida).

Os altos valores e a semelhança entre as frequências de marcação para p53 observadas nas diferentes gradações dos tumores astrocíticos confirmam a mutação do gene p53 como um evento inicial e relevante na formação dessas neoplasias (Louis *et al.*, 1993). Acredita-se que a proliferação clonal das células mutadas para p53 conforme a progressão tumoral ampliaria a porcentagem de células imuno-positivas (Dietrich & Tribolet, 1997), tornando os aumentos dos índices de marcação (LI) aqui apresentados mais prováveis do que a constância descrita por Nayak *et al.* (2001).

Dentre as investigações expostas (Tabela 08), destacam-se os conflitantes resultados acerca da expressão da proteína p53 nos Astrocitomas Grau I. Os dados da atual pesquisa corroboram com os achados de Lang *et al.* (1994), que descreveram a detecção imuno-histoquímica da p53 nos tumores do grau I, embora em maior porcentagem de casos. Essa mesma tendência é ratificada por grande parte dos estudos que utilizaram métodos moleculares (mais sensíveis e específicos) para detecção de alterações no gene p53, comprovando a participação da mutação deste gene na tumorigênese dos Astrocitomas Pilocíticos (Tabela 09). Considera-se que o êxito na demonstração *in situ* da proteína p53 nos tumores astrocíticos do grau I reportado por Lang *et al.* (1994) e pelo corrente trabalho tenha sido ocasionado pela alta performance técnica obtida através da otimização máxima do método imuno-histoquímico utilizado. Todavia, futuros estudos deverão esclarecer de modo definitivo o impacto do gene p53 nos Astrocitomas Grau I através de grandes séries tumorais examinadas a partir de abordagens moleculares específicas.

Inúmeras pesquisas relatam ainda a detecção da proteína p53 em tumores astrocíticos como fator prognóstico. Jaros *et al.* (1992) e Pardo *et al.* (2004) referem-se à proteína p53 com indicadora de maior progressão maligna, menor período livre de doença após a cirurgia e menor sobrevida. Por outro lado, Birner *et al.* (2002) associaram a detecção da proteína p53 à maior sensibilidade dos tumores do grau IV à radioterapia e à quimioterapia adjuvantes.

Poucas referências na literatura exploram o papel do gene supressor tumoral WAF1 (codificador da proteína p21<sup>WAF1/CIP1</sup>) no processo neoplásico dos astrocitomas, visto sua mutação ser descrita como um evento raro entre esses tumores (Ono *et al.*, 1997). Contudo, o fato do WAF1 ser o principal alvo transcricional do gene p53 abre a perspectiva do melhor entendimento funcional dessa via inibidora do ciclo celular a partir do estudo da expressão dos produtos protéicos desses genes (Coqueret, 2003).

A análise da expressão da proteína p21 nos tumores astrocíticos pesquisados revelou propensão ao decréscimo do percentual de casos positivos (38,46%; 28,57%; 14,28%; 57,14%) e dos valores médios de marcação (LI) (10,38; 12,14; 5,71; 24,79) segundo a evolução tumoral, a despeito dos notáveis aumentos desses índices nos Astrocitomas Grau IV (Figuras 36 e 37). Khalid *et al.* (1998) e Kirla *et al.* (2000), estudando a expressão do p21 nos Glioblastomas, descreveram percentuais de positividade de 57% e 48%, respectivamente. Ono *et al.* (1997) verificou semelhante inclinação nos índices médios (LI) conforme a graduação tumoral, apesar dessa redução ter sido extensível aos tumores do grau IV (22,2 no grau II, 14,0 no grau III; 10,2 no grau IV).

A avaliação preliminar desses achados conduz à idéia da menor expressão do p21 de acordo com a progressão maligna dos tumores astrocíticos, apesar do intrigante acréscimo de sua expressão nos Astrocitomas Grau IV. Todavia, convém examinar tais resultados em associação aos dados encontrados quanto à detecção da proteína p53 (Figura 38).

Considerando a incapacidade da proteína p53 mutada em ativar a expressão da proteína p21 e a detecção desta última como evidência da funcionalidade da p53, observou-se que, entre as diferentes gradações tumorais, semelhantes porcentagens não demonstraram alteração da via supressora tumoral p53/p21 {grupos A [p53(-)/p21(-)] e C [p53(-)/p21(+)]}, exceto pelos tumores do grau III no grupo C e os do grau IV principalmente no grupo A. Por outro lado, crescentes porcentagens dos astrocitomas apresentaram alteração da via p53/p21

conforme a progressão tumoral {grupo B [p53(+)/p21(-)]}, apesar do menor índice verificado nos tumores do grau IV. Diferentes parcelas dos astrocitomas exibiram ativação funcionalmente conflitante da via p53/p21 {grupo D [p53(+)/p21(+)]}, destacadamente os tumores do grau IV.

O grupo B representa os casos onde certamente ocorreu alteração do gene p53. A crescente marcação corrobora com os achados prévios de acréscimo da mutação do p53 conforme a gradação tumoral, sugeridos pelo aumento da expressão da proteína p53. A menor fração de tumores do grau III no grupo C reforça o grande impacto da mutação do p53 nessa categoria tumoral. Ainda no grupo B, percebeu-se menor porcentagem de tumores do grau IV, apesar da tendência de aumento frente à notória expressão da p53 nesta gradação (Figura 37). Acredita-se que este conflito seja explicado pela detecção, na realidade, da proteína p53 selvagem em uma parcela dos Astrocitomas Grau IV. Esta expressão ocorreria pela ativação desse supressor tumoral provocada por outra(s) alteração(ões) genética(s) presente(s) nos tumores grau IV, levando ao acúmulo de notável quantidade da proteína p53 funcional, capaz de persistir em quantidades detectáveis nos tecidos (Xu *et al.*, 2001). Tal parcela seria representada provavelmente pelos tumores do grau IV encontrados no grupo D, onde a evidência da detecção da p53 selvagem é reforçada pela positividade para p21. Ono *et al.* (1997) relatam que os astrocitomas que acumulam a proteína p53 na ausência de mutação do gene p53 tendem a expressar p21 de modo mais intenso em relação aos que acumulam p53 mutada ou não acumulam p53. Assim, propõe-se que o expressivo acréscimo médio na expressão da proteína p21 constatado nos Glioblastomas seja reflexo, pelo menos em parte, da superexpressão de p53 selvagem em uma porção desses tumores.

Outra possibilidade para a redução dos percentuais referentes aos Astrocitomas Grau IV no grupo B concomitante ao acréscimo no grupo D seria a superexpressão da proteína MDM2 (inativadora a proteína p53 selvagem), resultando em pouca ou nenhuma expressão de

p21 apesar do acúmulo de p53. Todavia, estudos anteriores tornam essa alternativa mais remota visto que, além da detecção da amplificação do gene *MDM2* ter sido verificada em apenas 10% dos glioblastomas estudados, nenhum desses casos positivo teria sido detectado entre os tumores com imuno-expressão para a proteína p53 associada à mutação do gene p53 (Rubio *et al.*, 1993).

Admite-se que os casos descritos no grupo D, incluindo os astrocitomas dos graus I e II, poderiam ainda indicar a expressão de p21 por vias independentes da induzida pelo p53. Essa possibilidade fundamenta-se na observação da expressão de p21 em células nocauteadas para o gene p53, desencadeada por agentes citotóxicos, mitógenos, indutores de diferenciação entre outros (Jiang *et al.*, 1994; Johnson *et al.*, 1994; Michieli *et al.*, 1994; Steinman *et al.*, 1994). Nos astrocitomas, esse fenômeno já foi evidenciado tanto em linhagens celulares *in vitro* (Jung *et al.*, 1995) como em material procedente de biópsias (Ono *et al.*, 1997). A(s) outra(s) alteração(ões) genética(s) proposta(s) para os tumores do grau IV parece(m) remeter a mecanismos completamente distintos da via p53/p21, visto a ausência de justificativa (até este momento) para os mínimos índices atingidos por esta gradação no grupo A.

A inferência do *status* funcional do gene p53 a partir da expressão imuno-histoquímica das proteínas p53 e p21 demonstra correlação com a detecção da mutação do p53 por técnicas moleculares específicas, embora não as prescindam (Ono *et al.*, 1997). O uso dessa estratégia pelo presente estudo permitiu a dedução de índices para mutação do gene p53 que acompanharam a tendência da maior parte das referências (acréscimo conforme a progressão dos astrocitomas, exceto pelo decréscimo nos tumores do grau IV), apesar da grande variabilidade entre os valores apontados pelas diferentes investigações (Tabela 09).

Com grande homologia estrutural e funcional ao p21, destaca-se ainda o supressor tumoral p27. Alterações quantitativas da proteína p27<sup>KIP1</sup> são freqüentemente descritas em tumores humanos, apesar de mutações e deleções do gene p27 serem raramente observadas



(Lloyd *et al.*, 1999). Recentes evidências indicam que tais alterações seriam reguladas por mecanismos exclusivamente pós-transcricionais, como a degradação protéica mediada por ubiquitinas, e influenciariam diretamente o comportamento biológico tumoral (Bloom & Pagano, 2003).

**TABELA 09 – Percentuais de mutação do gene p53 nas diferentes gradações dos tumores astrocíticos segundo diversas referências, incluindo o presente estudo**

Referência	Método	Graus I e II (OMS)		Grau III (OMS)		Grau IV (OMS)	
		n	%	n	%	n	%
Mashiyama <i>et al.</i> (1991)	SSCP	06	0	03	66,66	10	10,00
Fults <i>et al.</i> (1992)	SSCP	06	0	14	37,71	25	28,00
Louis <i>et al.</i> (1993)	SSCP+Seq	08	37,50	12	33,33	14	28,57
Wu <i>et al.</i> (1993)	SSCP	09	0	06	16,60	38	12,15
Chozick <i>et al.</i> (1994)	SSCP	15	0	07	14,28	19	31,57
Lang <i>et al.</i> (1994)	SSCP+Seq	07 e 08	14,00 e 25,00	16	18,75	-	-
Rasheed <i>et al.</i> (1994)	SSCP	36	8,30	11	54,54	51	17,3
Patt <i>et al.</i> (1996)	SSCP	07 e 18	14,30 e 5,06	04	25,00	13	0
Ono <i>et al.</i> (1997)	p53/p21	15	26,66	20	25,00	13	30,76
	SSCP+Seq		26,66		25,00		23,07
Hwang <i>et al.</i> (1999)	SSCP+Seq	05	0	13	23,07	05	20
Hayes <i>et al.</i> (1999)	SSCP	20	53,00	-	-	-	-
Kato <i>et al.</i> (2000)	Seq	-	-	14	64,30	27	25,90
<b>Faria (2005)</b>	<b>p53/p21</b>	<b>13 e 14</b>	<b>30,77 e 42,86</b>	<b>07</b>	<b>57,14</b>	<b>21</b>	<b>38,09</b>

n (número de casos); % (porcentagem); SSCP (de *single-strand conformation polymorphism*); Seq (sequenciamento); p53/p21 (estimativa segundo a relação entre a expressão de p53 e de p21).

Poucos estudos referem-se à expressão do p27 nos astrocitomas. Piva *et al.* (1997) e Mizumatsu *et al.* (1999) relatam correlação inversa entre a graduação dos tumores astrocíticos e os índices médios da marcação nuclear (LI) para p27 [(44,40 no grau II; 5,86 no grau III; 2,10 no grau IV) e (64,0; 54,9; 48,00; 40,20), respectivamente]. Por outro lado, Alleyne *et al.* (1999) e Zagzag *et al.* (2003) não evidenciaram qualquer relação entre a o grau de malignidade dos astrocitomas e a imuno-expressão de p27.

No entanto, a presente investigação revelou crescente positividade para p27 (nuclear) nos astrocitomas conforme a evolução tumoral, exceto pela relativa redução nos tumores do grau IV (53,84%; 92,86%; 100,00%; 76,19%) (Figura 39). Quanto aos escores médios da marcação nuclear (LI) para p27, demonstrou-se discreta propensão ao acréscimo de acordo com a graduação dos tumores astrocíticos (20,00; 30,21; 38,28; 42,38) (Figura 40). A maior média verificada nos Astrocitomas Grau IV, apesar da menor positividade, remete à expressiva marcação (LI > 70) constatada em cerca de 40% dos tumores desta graduação.

A despeito das notáveis divergências entre os estudos, os dados aqui reportados indicam que a expressão nuclear de p27 nos astrocitomas ocorre proporcionalmente ao grau tumoral, refletindo a ativação funcional do gene p27 como supressor do processo neoplásico. Dentre os Astrocitomas Grau IV, entretanto, significativa porcentagem dos casos não expressou p27, demonstrando mais uma vez a heterogeneidade deste grupo. Sugere-se que nesses tumores estejam ativadas vias de degradação da proteína p27, já que não foram evidenciados níveis elevados de p27 citoplasmático (dados discutidos a seguir) e a mutação do gene p27 é comprovadamente incomum entre os tumores humanos. Dessa forma, percebe-se que as alterações na expressão nuclear da proteína p27 apenas refletem a malignidade tumoral, não demonstrando impacto na tumorigênese dos astrocitomas.

A maioria dos trabalhos que avaliam a expressão de p27 nas neoplasias humanas desconsidera a detecção dessa proteína no citoplasma celular, referindo-se a esta como desprovida de significado funcional (Zagzag *et al.*, 2003). Todavia, novos estudos revelam que a proteína p27 recém-transcrita pode ser impedida de entrar no núcleo através da fosforilação mediada pela proteíno-quinase B (PKB ou Akt), ativada oncogenicamente. Assim, o acúmulo citoplasmático de p27 representaria o bloqueio da sua função como supressora tumoral (nuclear), fomentando a progressão neoplásica (Blain & Massagué, 2002).

O presente estudo configura a primeira análise da expressão citoplasmática da proteína p27 em tumores astrocíticos. Os resultados indicaram maior positividade citoplasmática para p27 entre os astrocitomas de alto grau (42,86%) em relação aos de baixo grau (23,07%) (Figura 39), sendo a concomitância entre as marcações nuclear e citoplasmática para p27 mais evidente nos tumores de alto grau (42,86%). O aumento paralelo entre as marcações nuclear e citoplasmática para p27 conforme a progressão dos tumores astrocíticos, associado à maior concomitância de positividade nos tumores de alto grau, sugere que a expressão citoplasmática de p27 nos astrocitomas reflete a superexpressão nuclear dessa proteína, pelo menos parcialmente.

Contudo, os valores médios para os índices de marcação citoplasmática de p27 nos tumores astrocíticos foram modestos, embora com discreta propensão ao acréscimo de acordo com a gradação tumoral [H (2,69; 5,85; 5,14; 7,00) e LI (2,69; 3,71; 4,00; 6,42)] (Figura 40). Esses baixos escores de marcação citoplasmática para p27 indicam que (1) ou o bloqueio citoplasmático da proteína p27 ocorre em pequena quantidade ou (2) verifica-se eficiente degradação protéica da p27 após seu bloqueio no citoplasma celular. De qualquer forma, a apresentação citoplasmática da proteína p27 não parece ser relevante para o processo tumorigênico dos astrocitomas.

Apesar das evidências aqui reportadas serem contrárias à participação do p27 na promoção dos tumores astrocíticos, Mizumatsu *et al.* (1999) e Kirla *et al.* (2003) descrevem a baixa expressão de p27 como indicadora de pior prognóstico. Chen *et al.* (1996) expõem a transfecção do gene p27 funcional em gliomas como promissor método de inibição da proliferação celular, enquanto Park *et al.* (2004) apontam melhores resultados com o uso do gene p27 mutado. Outras análises, por sua vez, retratam o p27 como indutor de resistência tumoral (Hochhauser, 1997). Lloyd *et al.* (1999) relatam ainda o potencial envolvimento do p27 em diversos mecanismos como a diferenciação celular, a apoptose, a interação/adesão

celular e a inflamação. Dessa forma, novas pesquisas serão necessárias para o estabelecimento do verdadeiro papel deste supressor tumoral na progressão dos astrocitomas.

Ainda quanto aos supressores tumorais, percebeu-se freqüente marcação para p21 e p27 entre as células microgliais presentes no tecido astrocítico tumoral quando este mostrava positividade para p53 (Figura 41), especialmente em tumores de alto grau. A expressão de supressores tumorais em células da micróglia já havia sido descrita após episódios de injúria traumática (Saito *et al.*, 2000) e mesmo nas regiões peritumorais dos astrocitomas (Korshunov *et al.*, 2002). Todavia, pela primeira vez se estabelece a correlação entre essas marcações e a presença de uma alteração molecular específica no tecido tumoral. Apesar da autonomia intercelular quanto ao controle direto dos mecanismos proliferativos, sugere-se que de alguma forma a micróglia possa reagir a presença de desordens moleculares nas células tumorais. Futuros estudos deverão esclarecer esse fenômeno, bem como avaliar seu possível impacto no comportamento biológico dos tumores astrocíticos.

### **Apoptose**

Na presente investigação, tanto a porcentagem de casos positivos (23,07%; 35,71%; 42,86%; 71,43%) como os índices médios de marcação [LI (4,30; 6,57; 8,71; 16,85) e H (10,84; 14,42; 18,85; 27,85)] para a proteína anti-apoptótica Bcl-2 demonstraram tendência de aumento segundo a graduação dos astrocitomas (Figuras 43 e 44). Fels *et al.* (2000) detectaram propensão similar quanto à positividade para Bcl-2 nos tumores astrocíticos de alto grau (48% no grau III; 51% no grau IV), ao passo que Ellison *et al.* (1995b) descreveram inclinação oposta (44% no grau II; 42% no grau III; 28% no grau IV). Entretanto, Strik *et al.* (1999) e Kraus *et al.* (2001) confirmaram recentemente a tendência de maior positividade entre os Astrocitomas Grau IV (94,60% e 60,25%, respectivamente). Não foram encontrados estudos que apresentassem escores de marcação comparáveis aos aqui relatados.

Com relação à expressão da proteína pró-apoptótica Bax, mostrou-se inclinação ao acréscimo na positividade (15,38%; 7,14%; 28,57%; 47,62%) e relativa constância entre as médias de marcação [LI (5,00; 0,57; 9,28; 9,38) e H (11,53; 0,57; 17,14; 11,66)] conforme evolução dos tumores astrocíticos, excetuando-se a redução verificada em todos os valores referentes aos Astrocitomas Grau II (Figuras 43 e 44). Os escassos estudos acerca da expressão imuno-histoquímica de Bax nos tumores astrocíticos relatam apenas a alta frequência da detecção de Bax nos Glioblastomas [98% (Krajewski *et al.*, 1997), 78% (Strik *et al.*, 1999), 94% (Cartron *et al.*, 2003)].

A despeito da ausência de significância estatística verificada entre os índices de marcação (LI e H) para Bcl-2 e Bax na análise seqüencial (teste U) das diferentes gradações dos astrocitomas, o exame do conjunto dos valores (teste H) relativos à fração de células positivas (LI) para essas proteínas demonstrou significativa correlação com o grau histopatológico. Tal distinção foi reforçada pela significativa superioridade dos escores para Bcl-2 e Bax nos tumores do grau IV em relação aos tumores do grau I e II (teste U).

Frente ao exposto, evidencia-se o aumento paralelo na detecção das proteínas Bax e Bcl-2 conforme a gradação dos astrocitomas (notadamente entre os de baixo e alto grau), sugerindo a co-regulação entre a expressão dessas proteínas durante a progressão tumoral (Martin *et al.*, 2001). Quanto a intrigante redução da marcação para Bax nos tumores do grau II, admite-se que particularidades referentes à histogênese dessa classe tumoral possam provocar variações na expressão de moléculas relacionadas à apoptose (Hara *et al.*, 1997). Todavia, essas variações podem ser mais bem compreendidas quando avaliadas frente ao balanço entre as tendências pró- e anti-apoptótica (Zörnig *et al.*, 2001).

Assim, através da comparação quantitativa entre os índices de marcação (LI) das proteínas Bcl-2 (anti-apoptótica) e Bax (pró-apoptótica), foi demonstrada crescente

orientação à sobrevivência celular conforme a progressão dos tumores astrocíticos (Figura 45). Acredita-se que essa diminuição gradual do estímulo apoptótico, associada ao aumento progressivo do incentivo proliferativo antes relatado, resulta na promoção cada vez maior das células mais anaplásicas (mais alteradas geneticamente), contribuindo para a evolução do fenótipo maligno dos astrocitomas (Yu *et al.*, 2000). Apesar disso, nenhuma correlação prognóstica categórica foi detectada a partir da expressão das proteínas Bcl-2 e Bax nos tumores astrocíticos até este momento (Hara *et al.*, 1997; Rieger *et al.*, 1998; Strik *et al.*, 1999; Fels *et al.*, 2000).

### **5.3.5. Receptores da Família ErbB**

A expressão aberrante da glicoproteína EGFR tem sido associada à tumorigênese e à progressão maligna nos astrocitomas (Libermann *et al.*, 1985; Ekstrand *et al.*, 1991). A amplificação do gene EGFR é apontada como a principal desordem responsável pela sua superexpressão nesses tumores, notadamente nos glioblastomas (Huncharek & Kupelnick, 2000). Outra possível alteração consiste no rearranjo do gene EGFR, provocando sua ativação constitucional. O rearranjo mais observado resulta na variante denominada EGFRvIII (também designada por  $\Delta$ EGFR ou de2-7EGFR), caracterizada pela deleção dos exons 2-7 no RNAm, correspondentes aos nucleotídeos 275-1075 (codificadores dos aminoácidos 6-273) (Shinojima *et al.*, 2003). Waha *et al.* (1996) descreve ainda o aumento da expressão do EGFR na ausência de alterações gênicas como um achado freqüente entre os tumores astrocíticos.

A significativa expressão de EGFR verificada nos Astrocitomas Grau IV pesquisados (LI médio =  $19,28 \pm 17,97$ ; H médio =  $25,71 \pm 27,44$ ) reforça as evidências da participação desse receptor nos mecanismos tumorigênicos atuantes nesta gradação, conforme documentado pela maioria dos trabalhos anteriores (Tabela 10). Recentes estudos indicam que a superexpressão de EGFR ocorre mais freqüentemente entre os Glioblastomas Primários, ou

seja, aqueles que se originam diretamente de células precursoras astrocíticas e acometem predominantemente pacientes idosos (Louis, 1997). Contudo, nenhuma correlação entre a idade dos pacientes e a marcação para EGFR foi verificada nos casos aqui reportados.

**TABELA 10 – Percentuais de positividade imuno-histoquímica para EGFR nas diferentes gradações dos tumores astrocíticos segundo diversas referências, incluindo o presente estudo**

Referência	Grau I (OMS)		Grau II (OMS)		Grau III (OMS)		Grau IV (OMS)		GERAL	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Jaros <i>et al.</i> (1992) <sup>♦</sup>	04	0	06	33,00	13	85,00	20	95,00	43	74,42
Orian <i>et al.</i> (1992)	-	-	20	95,00	21	48,00	21	86,00	62	77,42
Agosti <i>et al.</i> (1992) *	10	0	15	0	15	0	63	67,00	103	40,77
Kordek <i>et al.</i> (1995)	08	0	09	11,10	09	22,20	30	33,30	56	23,21
Hwang <i>et al.</i> (1997)	-	-	12	67,00	13	92,30	08	100,00	33	85,00
Simmons <i>et al.</i> (2001) <sup>♦</sup>	-	-	-	-	-	-	110	35,45	110	35,45
Shinojima <i>et al.</i> (2003) <sup>♦</sup>	-	-	-	-	-	-	87	46,00	87	46,00
<b>Faria (2005) *</b>	<b>13</b>	<b>46,15</b>	<b>14</b>	<b>21,43</b>	<b>07</b>	<b>0</b>	<b>21</b>	<b>61,09</b>	<b>55</b>	<b>32,37</b>

n (número de casos); % (porcentagem); \* (associação estatística com a gradação histológica);

<sup>♦</sup> (associação estatística com a sobrevida);

A ausência da expressão de EGFR entre os Astrocitomas Grau III avaliados contrastou com os elevados índices de positividade relatados pela maior parte das pesquisas (Tabela 10). Embora não se possa excluir a possibilidade da sub-representação dessa categoria pela atual investigação, visto a pequena amostragem analisada (n = 07), esse resultado pode ser justificado pela pequena ocorrência de alterações moleculares no gene EGFR descritas nos tumores do grau III (Bredel *et al.*, 1999). Já a discreta detecção de EGFR observada nos Astrocitomas Grau II examinados (LI médio = 3,92 ± 7,88; H médio = 5,35 ± 10,82) corrobora com a maioria das referências, sendo apontada como decorrente do simples acréscimo da expressão de EGFR, sem a influência de desordens moleculares específicas (Jaros *et al.*, 1992) (Figura 47, Figura 48 e Tabela 10).

Apesar das evidentes discrepâncias entre os dados obtidos pelas várias investigações quanto à positividade para EGFR nas diferentes gradações dos tumores astrocíticos, os poucos trabalhos que avaliaram a presença desse receptor nos Astrocitomas Grau I são unânimes em reportar a ausência da expressão de EGFR nesta gradação (Tabela 10). Análises moleculares permitiram também a confirmação da inexistência de amplificação e/ou rearranjo do gene EGFR nesses tumores (Huncharek & Kupelnick, 2000). No entanto, o presente estudo revelou significativa marcação para EGFR entre os tumores astrocíticos do grau I (LI médio =  $27,30 \pm 32,63$ ; H médio =  $60,00 \pm 69,88$ ).

Poder-se-ia alegar a ocorrência de marcação artefactual (*background*). Todavia, (1) outros estudos apontam o método imuno-histoquímico como uma técnica sensível para a documentação da presença da proteína EGFR (Schober *et al.*, 1995); (2) inúmeras referências demonstram a aplicabilidade e a especificidade do clone H11 (anticorpo monoclonal anti-EGFR utilizado) na detecção da proteína EGFR em tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina (Agosti *et al.*, 1992); (3) outros tumores do grau I, bem como de outras gradações, mostraram-se negativos para a expressão de EGFR; (4) os índices de marcação não foram discretos ou duvidosos, muitas vezes superando os vistos nos tumores do grau IV.

Dessa forma, admite-se que a marcação evidenciada nos Astrocitomas Grau I corresponda, de fato, à superexpressão da proteína EGFR, ainda que esse aumento de expressão ocorra na ausência de desordens moleculares específicas (Jaros *et al.*, 1992; Waha *et al.*, 1996). Assim, propõe-se a superexpressão de EGFR como mais um potencial evento tumorigênico presente nessa gradação, estimulando novas pesquisas quanto ao seu mecanismo de ativação e possível impacto prognóstico.

Várias investigações apontam a superexpressão/amplificação do EGFR nos tumores astrocíticos como relacionada ao pior prognóstico clínico, embora a maioria tenha falhado em demonstrar o EGFR como um fator preditivo independentemente da gradação histológica



desses tumores (Jaros *et al.*, 1992; Schober *et al.*, 1995; Waha *et al.*, 1996; Shinojima *et al.*, 2003). Uma exceção consiste no trabalho de Hiesiger *et al.* (1993), que reporta a superexpressão de EGFR nos Astrocitomas Grau IV como indicadora *per si* de comportamento clínico agressivo e resistência terapêutica.

A superexpressão da glicoproteína (c-)erbB2, por sua vez, é freqüentemente observada nos cânceres de mama, bem como numa grande variedade de tumores gastrintestinais e geniturinários (Ross *et al.*, 1999). Nestas neoplasias, o aumento quantitativo dessa unidade receptora de sinais extracelulares favorece a formação de homodímeros (erbB2-erbB2) e/ou de heterodímeros (ex.: EGFR-erbB2), resultando na maior sensibilidade e responsividade aos estímulos mitogênicos (Espinosa *et al.*, 2003).

Mesmo diante da rara ocorrência de ampliações no gene HER2/neu nos tumores astrocíticos (Haapasalo *et al.*, 1996), alguns trabalhos descrevem o simples acréscimo de erbB2 como um potencial evento tumorigênico dos astrocitomas (Schwechheimer *et al.*, 1994; Hwang *et al.*, 1997). Além disso, outras referências sugerem a provável associação entre a expressão de EGFR e de erbB2 no processo neoplásico desses tumores (Menard *et al.*, 2004).

A atual investigação constatou a expressão de erbB2 somente nos Astrocitomas Grau IV pesquisados (positividade de 14,28%; LI médio =  $5,95 \pm 16,85$ ; H médio =  $10,71 \pm 30,83$ ), correspondendo a 3,57% de positividade entre todos os tumores astrocíticos avaliados. Haapasalo *et al.* (1996) também observaram discreta marcação para erbB2 nos astrocitomas (3,90%), em parte devido à ausência da sua expressão nos tumores de baixo grau (I e II). Koka *et al.* (2003) perceberam a expressão diferencial de erbB2 entre os Glioblastomas (15,40%), sendo esta mesma disposição comprovada posteriormente por Potti *et al.* (2004). Dessa forma, confirma-se a discreta participação do receptor erbB2 na tumorigênese dos astrocitomas, notadamente nos tumores do grau IV.

Dos 03 (três) Astrocitomas Grau IV positivos para erbB2, 02 (dois) também apresentavam marcação para EGFR (Anexo IV), ratificando a tendência de co-expressão entre esses receptores (Hwang *et al.*, 1997). A superexpressão de erbB2 exclusivamente entre os tumores do grau IV denota ainda a contribuição dessa alteração molecular para o estabelecimento de fenótipos mais malignos, possivelmente através do sinergismo com a freqüente expressão de EGFR nesta gradação (Menard *et al.*, 2004). Esse fato corrobora com a atribuição de pior prognóstico aos tumores astrocíticos que expressam erbB2, conforme apontado por Koka *et al.* (2003) e Potti *et al.* (2004).

As consideráveis evidências acerca do envolvimento do EGFR e do supressor tumoral p53 no estabelecimento e progressão dos astrocitomas suscitaram a análise conjunta desses genes nos tumores avaliados. Através da imuno-expressão de EGFR e de p53/p21, foi deduzida a situação funcional dos genes EGFR e p53 nas diferentes gradações dos tumores astrocíticos (Figura 49). O percentual de casos que não apresentaram alterações em ambos os genes [EGFR(-)/p53wt] diminuiu de acordo com a progressão tumoral, confirmando a crescente aquisição dessas desordens genotípicas conforme a evolução maligna dos astrocitomas (Louis *et al.*, 2002). O número de casos que exibiram somente mutação do p53 [EGFR(-)/p53mut] aumentou consoante a graduação histológica, exceto pela relativa redução observada nos Astrocitomas Grau IV. Essa mesma propensão já havia sido apontada na apreciação individual do p53 (Figura 38 – grupo B), sendo atribuída à propagação da mutação do p53 segundo a sucessão tumoral e à provável participação de outras alterações genéticas nos tumores do grau IV. Entre essas ‘outras’ alterações, julga-se figurar a superexpressão do EGFR, visto a significativa porcentagem de casos do grau IV (42,86%) que demonstraram exclusivamente essa desordem [EGFR(+)/p53wt]. Parte dos Astrocitomas Grau I manifestaram semelhante panorama (30,77%), reiterando o grande impacto da expressão de EGFR nesta graduação. Excetuando-se os tumores do grau III, a simultaneidade entre as

alterações moleculares [EGFR(+)/p53mut] ocorreu em proporções similares nas diferentes gradações dos tumores astrocíticos (média de 14,54%), reafirmando os achados de Kordek *et al.* (1995). O pequeno percentual de concomitância entre a superexpressão de EGFR e a mutação de p53 caracterizou ainda a tendência de mútua exclusividade entre esses eventos moleculares, assim como reportado por Watanabe *et al.* (1996) e Yoon *et al.* (2001).

Tal distinção entre as alterações moleculares nos genes EGFR e p53 fomenta ainda a diferenciação dos Astrocitomas Grau IV nos subtipos Primário (ou *de novo*) e Secundário (ou progressivo). Kleihues & Ohgaki (1999) referem-se aos Glioblastomas Primários como derivados diretamente de células precursoras astrocíticas, com breve evolução clínica, sendo mais comuns em pacientes idosos e apresentando unicamente a superexpressão do EGFR [EGFR(+)/p53wt]. Já os Glioblastomas Secundários são descritos como provenientes de astrocitomas dos graus II ou III, com lenta progressão clínica, surgindo em pacientes jovens e demonstrando somente a mutação do p53 [EGFR(-)/p53mut] (Figura 08).

A despeito da ausência dos parâmetros clínicos dos portadores dos tumores astrocíticos aqui analisados, bem como de qualquer relação entre a expressão de EGFR ou p53/p21 e a faixa etária dos mesmos, sugere-se que os 42,86% dos tumores do grau IV que revelaram apenas a superexpressão do EGFR correspondam a Glioblastomas Primários, enquanto os 23,80% que manifestaram unicamente a mutação do p53 representem Glioblastomas Secundários. Essa inferência ganha suporte frente às semelhantes distribuições registradas pelos trabalhos anteriores, em sua maioria correlacionadas também ao seguimento clínico dos pacientes (Tabela 11).

Apesar da coerente distinção entre os fenótipos Primário e Secundário a partir do genótipo EGFR *versus* p53, recentes evidências destacam a similaridade entre essas variantes quanto ao comportamento biológico tumoral (Simmons *et al.*, 2001; Sarkar *et al.*, 2004). Por

consequente, outras alterações moleculares devem ser investigadas na tentativa de melhor contextualizar a marcante heterogeneidade clínica característica dos Astrocitomas Grau IV.

**TABELA 11 – Distribuição percentual dos Astrocitomas Grau IV (OMS) de acordo com a situação funcional dos genes p53 e EGFR estimada por imuno-histoquímica e/ou técnicas moleculares segundo diversas referências, incluindo o presente estudo**

Referência	n	Astrocitoma Grau IV (OMS)			
		EGFR(-)/p53wt	EGFR(+)/p53wt (primário*)	EGFR(-)/p53mut (secundário*)	EGFR(+)/p53mut
Hayashi <i>et al.</i> (1997)	70	30,00 %	40,00 %	30,00 %	0 %
Watanabe <i>et al.</i> (1997)	19	16,00 %	47,00 %	21,00 %	16,00 %
Newcomb <i>et al.</i> (1998)	80	29,00 %	18,00 %	36,00 %	18,00 %
Simmons <i>et al.</i> (2001)	46	48,00 %	22,00 %	26,00 %	4,00 %
Sarkar <i>et al.</i> (2004)	58	14,00 %	38,00 %	34,00 %	14,00 %
<b>Faria (2005)</b>	<b>21</b>	<b>14,28 %</b>	<b>42,86 %</b>	<b>23,80 %</b>	<b>19,05 %</b>

n (número de casos); – (ausência da expressão); + (presença da expressão); wt (selvagem); mut (mutado).

\* classificação baseada somente no perfil genotípico (Kleihues & Ohgaki, 1999)

### 5.3.6. Sinalização Intracelular

As proteínas H-, K- e N-Ras, denominadas conjuntamente por p21<sup>Ras</sup>, desempenham papel central nos mecanismos de sinalização que regulam o crescimento, a diferenciação, a proliferação e a sobrevivência celulares (Sebti, 2003). Os eventos tumorigênicos podem ativar diretamente as vias reguladas pela p21<sup>Ras</sup> através de mutações nos genes *ras* ou de sua superexpressão proteica. Somente neste último caso se consegue revelar a presença da p21<sup>Ras</sup> pelo método imuno-histoquímico, visto que as versões normal (níveis fisiológicos) e mutada dessas proteínas geralmente são expressas em quantidades não-detectáveis (Marshall, 1999).

A atual investigação demonstrou a expressão da proteína p21<sup>Ras</sup> predominantemente entre os Astrocitomas Grau II (positividade de 37,71%; LI médio = 2,71 ± 4,02; H médio = 4,92 ± 7,79). A expressiva marcação de um único caso do grau I (positividade de 7,69%)

resultou em escores médios relativamente mais elevados nesta gradação (LI =  $6,15 \pm 22,18$ ; H =  $20 \pm 72,11$ ). Nenhum tumor astrocítico de alto grau (III e IV) da amostra avaliada apresentou marcação para p21<sup>Ras</sup> (Figuras 51 e 52).

Em análises anteriores, Arvanitis *et al.* (1991) observaram positividade para p21<sup>Ras</sup> em 35,71% dos Astrocitomas Grau II e em 75% dos tumores astrocíticos de alto grau. Orian *et al.* (1992) confirmaram a tendência de maior detecção da proteína p21<sup>Ras</sup> entre os astrocitomas de alto grau (57%), embora não tenham evidenciado casos positivos entre os tumores do grau II. Dentre os estudos prévios, não há referência à expressão de p21<sup>Ras</sup> em Astrocitomas Grau I nem descrição de índices de marcação metodologicamente comparáveis aos aqui apresentados.

A despeito das discrepâncias entre os resultados, grande parte das pesquisas confirma a ausência da imuno-expressão de p21<sup>Ras</sup> nos astrocitomas de alto grau e associam este fato à freqüente superexpressão dos receptores do tipo tirosino-quinase (ex.: EGFR, PDGFR) nesses tumores (Bos, 1989; Tuzi *et al.*, 1991; Guha *et al.*, 1997). Acredita-se que a hiperativação desses receptores, mesmo repercutindo sobre quantidades fisiológicas de p21<sup>Ras</sup>, seria suficiente para a maior promoção das cascatas intracelulares, tornando a expressão oncogênica de p21<sup>Ras</sup> “dispensável” (Guha *et al.*, 1997).

Essa hipótese também pode ser estendida aos Astrocitomas Grau I avaliados, já que os casos dessa graduação foram predominantemente negativos para p21<sup>Ras</sup> e demonstraram significativa positividade para EGFR. Contudo, não se pode excluir a possibilidade da ausência da superexpressão de p21<sup>Ras</sup> como uma característica independente nos tumores do grau I, desde que o único caso positivo para p21<sup>Ras</sup> nessa gradação também apresentava considerável expressão de EGFR (Anexo IV).

A detecção de p21<sup>Ras</sup> concomitante à inexistência da expressão de EGFR nos Astrocitomas Grau II avaliados reforça ainda mais a tendência antes reportada. A marcação

para p21<sup>Ras</sup> quase que exclusivamente entre os tumores do grau II também demonstra que a superexpressão de p21<sup>Ras</sup> ocorre de modo diferencial nesta gradação. Além disso, a ausência da expressão de p21<sup>Ras</sup> entre os astrocitomas de alto grau sugere que os Astrocitomas do Grau II portadores de alterações na expressão de p21<sup>Ras</sup> não progridem para fenótipos mais malignos, tornando a marcação para p21<sup>Ras</sup> num virtual indicador de melhor prognóstico.

Não obstante, Bian *et al.* (2000) relataram não ter observado qualquer relação entre a expressão de p21<sup>Ras</sup> com a gradação ou o prognóstico dos tumores astrocíticos, propondo que tais associações seriam facultadas às mutações dos genes *ras*. Todavia, Gomori *et al.* (1999) e Woods *et al.* (2002) ressaltam que os tumores astrocíticos, contrariamente a maioria das neoplasias humanas, raramente apresentam mutações nos genes *ras*.

### **5.3.7. O Fator de Transcrição c-Myc**

A contribuição da proteína c-Myc nuclear (funcional) para o processo de proliferação celular nos astrocitomas foi discutida anteriormente. Conforme relatado, a superioridade dos índices de marcação nuclear para c-Myc em relação aos valores obtidos para o antígeno Ki-67 (admitido como marcador padrão de proliferação celular), assim como a notável variabilidade destes escores, indicou a provável participação da proteína c-Myc em outros fenômenos neoplásicos atuantes nesses tumores.

Apesar das intensas pesquisas, os mecanismos pelos quais a desregulação da expressão do gene *c-myc* promove a tumorigênese não estão completamente elucidados. Dentre os possíveis eventos coordenados pela expressão oncogênica do *c-myc*, destacam-se o incremento do metabolismo celular (Dang, 1999), a indução de instabilidade cromossômica (Gardner *et al.*, 2002), o bloqueio da diferenciação celular (Canelles *et al.*, 1997), a regulação da apoptose (Lutz *et al.*, 2002) e a promoção da imortalidade celular (Wang *et al.*, 1998). Os altos índices de c-Myc nuclear entre os tumores astrocíticos do grau IV sugerem ainda o

envolvimento dessa proteína na ativação da angiogênese (Knies-Bamforth *et al.*, 2004), fenômeno responsável pela marcante proliferação endotelial observada nessa gradação (Kleihues & Cavenee, 2000). Futuros estudos especialmente orientados para a investigação das diferentes funções da proteína c-Myc deverão identificar os programas celulares ativados por esta proteína e o real impacto dessas alterações nos tumores astrocíticos.

A maioria dos trabalhos que avaliaram a expressão de c-Myc nas neoplasias humanas desprezou a detecção dessa proteína no citoplasma celular, referindo-se a esta como desprovida de significado funcional (Orian *et al.*, 1992) ou até mesmo como marcação inespecífica, resultante de fixação histológica inadequada (Williams *et al.*, 1990). No entanto, alguns estudos observaram o acréscimo da expressão citoplasmática de c-Myc conforme a progressão maligna nos carcinomas gástrico (Yamamoto *et al.*, 1987), do cólon (Royds *et al.*, 1992) e do ovário (Sasano *et al.*, 1992). Já Satoh *et al.* (1992) e Bai *et al.* (1994) reportaram inclinação oposta quanto aos carcinomas oral e endometrial, respectivamente. Royds *et al.* (1992) comprovaram ainda que a proteína c-Myc citoplasmática encontrava-se associada a grupamentos ribossômicos, sugerindo que o acúmulo dessa proteína no citoplasma resultaria de possíveis alterações pós-transcricionais.

Recentes evidências apontam a distribuição protéica celular como resultado de complexos e refinados mecanismos de transporte núcleo-citoplasmático, consistindo em: (1) reconhecimento da proteína por receptores de “importação” ou “exportação”; (2) ancoragem do complexo receptor-proteína aos poros da membrana nuclear; (3) deslocamento do complexo através da membrana nuclear; (4) liberação do receptor e (5) reciclagem dos fatores de transporte (Alberts *et al.*, 2002). Dessa forma, percebe-se que a desregulação dessas etapas pode ocasionar a localização anômala e, conseqüentemente, a alteração funcional de grande variedade de proteínas. Fabbro & Henderson (2003) confirmam o processo neoplásico como

potencial indutor de modificações nesses mecanismos, provocando a acumulação/disfunção de proteínas responsáveis por importantes fenômenos celulares.

Frente a esta realidade, o presente estudo procedeu a primeira avaliação da marcação citoplasmática do c-Myc em tumores astrocíticos, tendo evidenciado maior positividade entre os tumores de alto grau (71,43%) em relação aos tumores do grau I (30,77%) e II (42,86%) (Figura 54). Por outro lado, os escores médios de marcação foram semelhantes, exceto pela disposição de aumento verificada nos astrocitomas do grau IV [LI (8,69; 8,92; 9,57; 15,57) e H (14,61; 13,42; 16,57; 24,42)] (Figura 55). Esses dados indicam o acúmulo citoplasmático da proteína c-Myc como um evento inicial e relevante na tumorigênese dos astrocitomas, notadamente nos tumores do grau IV.

A expressiva e constante concordância entre as marcações nuclear e citoplasmática para c-Myc nos tumores astrocíticos (em média 65,45%) sugerem ainda que a presença desta proteína no citoplasma reflete diretamente seus níveis nucleares de expressão. Já o crescimento da concomitância entre essas marcações caracteriza o surgimento de c-Myc no citoplasma como diretamente proporcional à evolução maligna dos astrocitomas. Não obstante, a relativa diminuição da concomitância nos Glioblastomas demonstra eventuais divergências entre a localização citoplasmática e nuclear da proteína c-Myc nesses tumores, reforçando ainda mais a heterogeneidade dessa gradação (Figura 56).

Diante desses achados e dos conhecimentos atuais, propõe-se a **hipótese do aprisionamento citoplasmático de c-Myc nos tumores astrocíticos** como uma tentativa de bloqueio das funções oncogênicas dessa proteína. Admite-se que, objetivando reduzir o impacto da expressão aberrante do gene c-myc, mecanismos de transporte núcleo-citoplasmático reduziram progressivamente a captação da proteína c-Myc recém-transcrita ou até mesmo promoveriam sua expulsão após a entrada no núcleo. A potencialização deste fenômeno com a progressão tumoral ocasionaria, por vezes, a retenção total de c-Myc no



citoplasma, justificando as consideráveis discordâncias entre as marcações nuclear e citoplasmática observadas nos tumores Astrocitomas Grau IV.

A necessidade de comprovação desta hipótese suscitará novas investigações, promovendo a identificação dos elementos regulatórios envolvidos no mecanismo de transporte núcleo-citoplasmático e colaborando para o entendimento das múltiplas vias moduladas pela proteína c-Myc da tumorigênese dos astrocitomas. Para tanto, julga-se também fundamental o estudo dos ligantes específicos do fator de transcrição c-Myc (ex.: Max), bem como dos estímulos responsáveis pela expressão dessa enigmática proteína.

#### **5.3.8. Vias Tumorigênicas**

O fenômeno tumorigênico consiste num complexo processo no qual células tornam-se imortais, proliferantes, invasoras e moduladoras dos seus ambientes (Louis, 1997). Uma única alteração molecular dificilmente é responsável pela totalidade do evento neoplásico, sendo este habitualmente resultante de uma série de distúrbios genéticos em diversos níveis da regulação celular (Cavenee & White, 1995).

Todavia, a alteração de alguns genes com papel central em múltiplos canais regulatórios revela o potencial impacto de uma simples desordem molecular para o desenvolvimento do câncer. Nesse contexto, admite-se que as principais alterações genéticas desencadeadoras da transformação maligna são aquelas que conferem as maiores “vantagens” à célula-matriz, estimulando sua proliferação e sobrevivência. Percebe-se ainda que tais desordens acabam sendo amplamente perpetuadas para as células subseqüentes (expansão clonal), assegurando sua presença na maioria das células formadoras do tumor primário (Nowell, 1976; Breivik, 2005).

Dessa forma, através da simples comparação quantitativa e qualitativa entre os escores referentes aos marcadores que mais se destacaram nos tumores astrocíticos (p53/p21, EGFR e

c-Myc), pôde-se inferir a principal alteração molecular em cada caso investigado, determinando as principais vias tumorigênicas ativadas nas diferentes gradações dos astrocitomas (Figura 57).

A mutação do gene supressor tumoral p53 destacou-se em todas as gradações dos tumores astrocíticos (especialmente nos Astrocitomas Grau III), figurando como a principal alteração tumorigênica dentre os astrocitomas estudados. A manifestação dessa desordem genética desde os tumores do grau I, associada à sua manifestação em consideráveis índices nas gradações subseqüentes, confirma a mutação do p53 como um evento inicial, relevante e potencial indicador da progressão tumoral nos astrocitomas.

Já a superexpressão do EGFR notabilizou-se apenas entre os tumores astrocíticos dos graus I e IV, caracterizando esta alteração molecular como distintiva dessas gradações e não relacionada à sucessão tumoral nos astrocitomas. O amplo predomínio da via EGFR nos Astrocitomas Grau IV reafirma a importante contribuição das desordens deste gene para o estabelecimento dos Glioblastomas. Por outro lado, a constatação da expressão de EGFR nos Astrocitomas Grau I desvenda um inédito subconjunto genético nessa gradação, acrescentando um novo elemento para a melhor compreensão da tumorigênese e da eventual evolução maligna desses tumores.

Outra novidade consistiu na demonstração da expressão do gene c-myc (nuclear e/ou citoplasmática) como capaz de explicar o processo tumorigênico dos astrocitomas quando da ausência ou discreta participação das alterações nos genes p53 ou EGFR. O impacto do c-myc na transformação maligna dos astrocitomas mostrou-se crescente conforme a gradação tumoral, exceto pela modesta influência verificada nos Astrocitomas Grau IV.

Huang *et al.* (2000) já haviam constatado o aumento da expressão do c-myc (RNAm) nos Astrocitomas Grau II, sugerindo o envolvimento deste gene na patogênese dos tumores astrocíticos de baixo grau. Jensen *et al.* (2003), por sua vez, demonstraram que a

superexpressão do gene c-myc em precursores astrogliais de camundongos era suficiente para deflagrar o fenômeno neoplásico, originando tumores astrocíticos de fenótipo maligno (alto grau). Deste modo, fortalece-se o conceito do gene c-myc como responsável por uma importante e distinta via molecular na tumorigênese dos astrocitomas, atuando de modo alternativo àquelas encabeçadas pelos genes p53 e EGFR.

### **5.3.8. Enzimas relacionadas à Quimiorresistência**

Apesar dos recentes avanços na quimioterapia dos gliomas, a expectativa de sobrevida para a maioria dos pacientes permanece inalterada. Grande parte do insucesso na terapia adjuvante desses tumores é atribuída às variações na sensibilidade tumoral desencadeadas por desordens genéticas inerentes à formação e/ou à progressão dessas neoplasias, caracterizando o fenômeno denominado quimiorresistência primária (Kitange *et al.*, 2001).

Vários estudos moleculares têm demonstrado a participação de enzimas reguladoras do metabolismo celular nos mecanismos de quimiorresistência dos astrocitomas, assim como o sucesso de estratégias terapêuticas delineadas segundo o perfil bioquímico de cada tumor (Nagane *et al.*, 1999; Nutt *et al.*, 2000; Tanaka *et al.*, 2000). Não obstante, a detecção imunohistoquímica dessas enzimas desponta como uma alternativa prática para o *screening* dos mecanismos de resistência tumoral, constituindo promissora ferramenta para a escolha de agentes antineoplásicos efetivos e, principalmente, para a exclusão das drogas virtualmente ineficientes (Mattern & Volm, 1992).

Neste sentido, a corrente investigação apresenta a imuno-expressão de algumas enzimas associadas à quimiorresistência (MGMT, GST $\pi$ , TopoII $\alpha$  e TS) nos tumores astrocíticos, configurando um dos primeiros relatos semiquantitativos acerca da detecção *in situ* dessas proteínas em astrocitomas de diferentes graduações histológicas (Figuras 59 e 60).

A enzima O<sup>6</sup>-Metilguanossina-DNA-Metiltransferase (MGMT) atua na reparação de eventuais lesões no DNA através da remoção de grupamentos alquil nocivamente transferidos para a posição O<sup>6</sup> da guanossina (Margison *et al.*, 2003). Inúmeras pesquisas têm comprovado a associação entre o acréscimo na expressão da MGMT em células neoplásicas e a resistência tumoral aos agentes alquilantes, com destaque para as nitrosuréias, a procarbazona e a temozolomida - importantes drogas utilizadas na terapia dos astrocitomas (Gerson, 2002).

No presente ensaio, constatou-se a expressão da MGMT em astrócitos de todos os casos examinados, com elevados e semelhantes escores médios de marcação (LI) entre os espécimes tumorais (68,07; 72,50; 63,14; 73,10) e não-tumorais (75,00).

A detecção da MGMT na totalidade das amostras avaliadas revela a ativação dessa enzima como um fenômeno assíduo na linhagem astrocítica. Anteriormente, Citron *et al.* (1995) havia reportado a detecção dessa enzima em 100% dos tecidos cerebrais saudáveis, enquanto Yuan *et al.* (2003) relataram semelhante tendência em relação aos astrocitomas (94,28%). Em contraste, Ohe *et al.* (2003) e Sun *et al.* (2004) descreveram menor positividade para MGMT entre os tumores astrocíticos: 73,50% e 50,84%, respectivamente.

Já os consideráveis índices médios de marcação (LI) para MGMT demonstram a eminente presença dessa enzima nos casos pesquisados, ao passo que a semelhança entre os escores nas diferentes classes histológicas denota a não-associação da expressão dessa enzima com a sucessão de eventos neoplásicos nos astrocitomas. Esses achados contrapõem-se aos de Yuan *et al.* (2003), que observaram o decréscimo dos valores médios de marcação para MGMT conforme a progressão dos tumores astrocíticos (69,28 no grau II; 44,44 no grau III e 19,36 no grau IV), bem como aos de Silber *et al.* (1993), que evidenciaram o aumento da quantidade e da distribuição dessa enzima na maioria dos tumores cerebrais quando comparadas aos tecidos não-tumorais adjacentes.

As notórias discrepâncias entre os dados supracitados refletem sobretudo a relativa escassez de estudos imuno-histoquímicos para a enzima MGMT nos astrocitomas, visto que a maior parte dos trabalhos nesse campo remete a investigações moleculares. Dentre estas, sobressaem-se pesquisas acerca da hipermetilação da região promotora do gene *MGMT*, fenômeno responsável pelo impedimento da sua expressão (silenciamento epigenético).

A compilação dos trabalhos acerca da metilação do gene *MGMT* mostra que, em média, 43,16% (297/688) dos tumores astrocíticos exibem essa alteração (Esteller *et al.*, 2001; Nakamura *et al.*, 2001; Komine *et al.*, 2003; Balaña *et al.*, 2003; Blan *et al.*, 2004; Hegi *et al.*, 2005; Watanabe *et al.*, 2005). Todavia, cerca de 97% desses tumores também manifestam o *status* não-metilado (Blan *et al.*, 2004). Estas evidências demonstram que a transformação neoplásica configura importante estímulo para a metilação desse gene, induzindo o bloqueio da expressão da MGMT nos astrocitomas. Tal desordem, contudo, ocorre de forma heterogênea entre as células neoplásicas, o que acaba assegurando a presença da referida enzima na maioria dos tumores astrocíticos. Essa tendência pôde ser comprovada através da marcante positividade para MGMT verificada entre os espécimes tumorais do corrente estudo. Além disso, o relato de semelhantes índices de metilação nos astrocitomas dos graus II e IV (48%) (Nakamura *et al.*, 2001) reforça a similaridade entre a expressão da MGMT nas diferentes graduações desses tumores, disposição também registrada pela atual investigação.

Nakamura *et al.* (2001) descreveram ainda intrigante correlação entre a ocorrência da metilação no gene *MGMT* e a maior frequência de mutações no gene p53 em tumores astrocíticos [especialmente transições guanina:citosina → adenina:timina localizadas nos sítios CpG (de *cytosine-phosphate-guanine*)]. Apesar do desconhecimento acerca de seu significado funcional, esta tendência pode justificar a discreta redução no escore médio de marcação para MGMT observada nos Astrocitomas Grau III da presente análise, uma vez que essa categoria histológica apresenta o maior índice de mutação do gene p53 (Figura 57).

Conforme esperado, o fenômeno da metilação do *MGMT* nos tumores astrocíticos é reconhecido como indicador de melhor resposta aos agentes alquilantes por grande parte dos trabalhos, sendo ainda apontado como preditor independente de maior sobrevida (Balaña *et al.*, 2003; Kamiryo *et al.*, 2004; Hegi *et al.*, 2005). Blan *et al.* (2004), por sua vez, não identificaram qualquer relação entre o silenciamento epigenético do *MGMT* e a resposta terapêutica/sobrevida geral dos portadores de Glioblastomas. Já Komine *et al.* (2003) e Watanabe *et al.* (2005) reportam a metilação desse gene como indicativa de pior prognóstico clínico e de menor resposta às nitrosurêias tanto em astrocitomas de baixo quanto de alto grau. Dessa forma, percebe-se que o impacto prognóstico do bloqueio epigenético do *MGMT* permanece incerto, sendo necessário maiores investigações.

Mesmo diante de tantas divergências, admite-se que a significativa expressão da enzima *MGMT* verificada nos tumores astrocíticos possa conferir notável resistência aos quimioterápicos indutores de danos ao DNA, o que em parte suportaria o freqüente insucesso dos agentes alquilantes no tratamento dessas neoplasias. Esta refratariedade à quimioterapia manifestar-se-ia como uma condição inerente às células astrocitárias, estando aparentemente dissociada das alterações tumorigênicas sucedidas nos astrocitomas.

Outro importante mecanismo de quimiorresistência é representado pela família de enzimas Glutationa-S-Transferases (GSTs), que atua favorecendo a detoxificação celular mediada pela glutatona reduzida (GSH). Recentes estudos apontam o aumento da expressão das GSTs nos gliomas, especialmente da variante pi (GST $\pi$ ), como potencial responsável pela resistência desses tumores à cisplatina (Nagane *et al.*, 1995), à nimustina (ACNU), à tenoposida (VM26) (von Bossanyi *et al.*, 1997) e à carmustina (BCNU) (Nutt *et al.*, 2000).

O presente trabalho evidenciou discreta expressão da GST $\pi$  em células astrocíticas dos espécimes não-tumorais examinados (LI médio  $\cong$  0,40), com nítido predomínio da marcação nuclear, à semelhança do reportado por Hara *et al.* (1990) e Grant & Ironside (1995).

Já as amostras tumorais manifestaram elevada positividade nuclear para GST $\pi$  desde os Astrocitomas Grau I, apresentando tendência à ampliação do percentual de casos positivos de acordo com a evolução histológica (76,92%; 92,86%; 100,00%; 100,00%). Por outro lado, constatou-se propensão ao declínio dos índices médios de marcação (LI) para essa enzima conforme a progressão dos tumores astrocíticos avaliados (59,80; 61,46; 55,00; 46,71). Esses achados reproduzem os de von Bossanyi *et al.* (1997), que observaram considerável expressão da GST $\pi$  nos astrocitomas, notadamente entre os tumores do grau II. Grant & Ironside (1990) mencionaram ainda correlação inversa entre a imuno-deteção dessa enzima e o grau de anaplasia tumoral, o que poderia fundamentar a redução nos escores médios de expressão (LI) da GST $\pi$  verificada nos astrocitomas de alto grau (III e IV).

Em conjunto, tais dados sugerem a ativação da expressão da enzima GST $\pi$  como um fenômeno peculiar, inicial, vigoroso e freqüente na tumorigênese dos astrocitomas, ainda que passível de interrupções frente à aquisição de fenótipos mais anaplásicos. Nesse contexto, infere-se que a expressão diferencial dessa enzima nos tumores astrocíticos resulte em grande incentivo à detoxificação celular promovida pela glutatona, justificando (pelo menos parcialmente) a habitual resistência dos astrocitomas às drogas antineoplásicas sabidamente depuradas pela GSH, como os agentes alquilantes, os antibióticos e as podofilotoxinas.

A maioria dos ensaios reportam ainda o acréscimo na expressão da GST $\pi$  nos tumores astrocíticos como indicador de agressividade clínica e forte preditor de menor sobrevida (Ali-Osman *et al.*, 1997; Yoshii *et al.*, 2001), embora algumas pesquisas não tenham encontrado qualquer valor prognóstico atribuível à marcação para essa enzima (Anda *et al.*, 2003).

Outra enzima potencialmente implicada na quimiorresistência tumoral consiste na Timidilato Sintase (TS), que catalisa a única via intracelular responsável pela síntese do Timidilato - uma das etapas limitantes na síntese do DNA. Inúmeros estudos sugerem que aumentos significativos na expressão dessa enzima em células neoplásicas poderiam superar

os efeitos de seus agentes inibidores, configurando o mecanismo básico da refratariedade terapêutica (Peters *et al.*, 2002). Dentre os quimioterápicos que bloqueiam a TS, destacam-se os consagrados antagonistas dos sítios da pirimidina [5-fluorouracil (5FU); capecitabina] e as novas drogas inibidoras dos sítios do folato [ZD1694 (Raltitrexed); LY231514 (Pemetrexed); AG337 (Nolatrexed); ZD9331 e AG331] (van Triest *et al.*, 2000).

A atual pesquisa constatou tênue expressão de TS em astrócitos das amostras não-tumorais avaliadas (H médio  $\cong$  0,60), ao passo que nos astrocitomas investigados (n = 24)\* foi evidenciada considerável positividade para essa enzima, com semelhantes percentuais entre as diferentes gradações (83,33%; 83,33%; 83,33%; 66,66%). Os escores médios de marcação para TS demonstraram a mesma orientação, exceto pelos maiores índices verificados nos tumores do grau IV [LI (24,16; 21,66; 18,33; 31,66) e H (35,00; 38,33; 32,00; 63,33)]. Esses dados corroboram com os relatados por Boon *et al.* (2004), que verificaram a ativação diferencial do gene da TS nos tumores astrocíticos, bem como ratificam a maior imunodeteção dessa enzima nos astrocitomas de alto grau (particularmente nos Glioblastomas), conforme apontado por Bardot *et al.* (1994).

Assim, percebe-se a superexpressão da TS como um evento distintivo e comum no processo tumorigênico dos astrocitomas, ocorrendo com grande intensidade desde os tumores de baixo grau e atingindo proeminentes valores entre os Astrocitomas Grau IV. Nesta perspectiva, denota-se intrínseca capacidade de resistência dos tumores astrocíticos aos agentes antineoplásicos inibidores da TS, o que em parte explicaria a baixa eficiência de drogas como o 5FU no tratamento dessas neoplasias (Cvitkovic *et al.*, 1993; Stewart *et al.*, 1995; Cascino *et al.*, 1996; Shapiro *et al.*, 1999). Até o momento, não existem relatos quanto ao valor prognóstico da imunodeteção dessa enzima nos astrocitomas.

---

\* A detecção imuno-histoquímica da enzima TS foi realizada somente em vinte e quatro amostras tumorais (seis de cada graduação tumoral) devido à limitada quantidade disponível do anticorpo monoclonal TS106.



Ao contrário das demais enzimas analisadas, a presença da DNA Topoisomerase II (TopoII) constitui situação favorável para a ação de diversos agentes antineoplásicos, de modo que a redução da sua expressão em células tumorais é que determina o fenômeno de quimiorresistência. Essa enzima atua rompendo e religando a dupla fita do DNA - manobras essenciais para a funcionalidade do material genético, conquanto potencialmente letais se desprovidas de minuciosa regulação (Wilstermann & Osheroff, 2003). Drogas que favorecem a formação dos complexos de clivagem DNA-TopoII transformam essa enzima numa virtual toxina celular, capaz de fragmentar de forma irreparável o genoma e, assim, desencadear mecanismos de morte celular. Algumas dessas substâncias são conhecidas como “venenos” da TopoII, sendo representadas pelos(as) compostos antracíclicos, epipodofilotoxinas, acridinas, antracenedionas, antibióticos e elipticinas (Kufe *et al.*, 2003).

Os resultados obtidos pela presente investigação acerca da detecção da enzima DNA Topoisomerase II subtipo alfa (TopoII $\alpha$ ) foram comentados anteriormente na seção 5.3.1 (Proliferação Celular; pág. 99). De acordo com o exposto, percebeu-se crescente positividade para TopoII $\alpha$  conforme a progressão dos tumores astrocíticos, com elevados e semelhantes índices médios de marcação (LI) para os tumores dos grau II, III e IV. Estes achados demonstram a expressão diferencial dessa enzima nos astrocitomas, especialmente a partir do grau II, indicando a potencial susceptibilidade dessas neoplasias aos quimioterápicos que promovem a ativação das enzimas TopoII.

A despeito dessas evidências, o impacto prognóstico da expressão da TopoII $\alpha$  nos tumores astrocíticos continua indefinido. Grande parte dos estudos aponta a elevada marcação para essa enzima como indicativa de menor sobrevida (Tanigushi *et al.*, 1999; Korkolopoulou *et al.*, 2001; Bredel *et al.*, 2002a; Ho *et al.*, 2003), vocação provavelmente conseqüente à participação da TopoII $\alpha$  no mecanismo de proliferação celular e, por conseguinte, no estabelecimento de fenótipos mais malignos. Entretanto, Bredel *et al.* (2002b) constataram

maior sobrevida entre os portadores de Glioblastomas que apresentavam altos índices de detecção para essa enzima, enquanto nos gliomas ópticos da infância (astrocitomas de baixo grau) nenhuma associação entre a presença da TopoII $\alpha$  e o comportamento clínico desses tumores foi observada (Bredel *et al.* 2002c).

### 5.3.9. Potenciais Alvos Moleculares

O reconhecimento de determinadas alterações moleculares como essenciais para o estabelecimento e/ou progressão do câncer constitui o ponto de partida para a caracterização dessas desordens como possíveis alvos terapêuticos. Idealmente, um alvo molecular deve configurar aspecto distintivo e estratégico para o processo neoplásico, sendo ainda regulado de modo diferente entre células tumorais e tecidos sadios (Huang & Oliff, 2001).

Nessa perspectiva, os dados apresentados pela atual análise fundamentam a indicação dos genes/proteínas **p53**, **Bcl-2**, **EGFR**, **c-Myc**, **MGMT**, **GST $\pi$**  e **TopoII $\alpha$**  como potenciais alvos moleculares nos tumores astrocíticos.

A confirmação da mutação do gene p53 como a principal desordem molecular nos astrocitomas incentiva a pesquisa por artifícios capazes de restaurar a função desse gene nos referidos tumores. Utilizando técnicas de reposição do gene supressor tumoral p53 através de vetores virais (terapia genética), Tsuchiya (2000) observou maior radiosensibilidade entre as linhagens de Astrocitomas Grau IV tratadas, enquanto Georger *et al.* (2004) demonstraram indução da apoptose e redução do crescimento tumoral respectivamente em culturas primárias e modelos de transplantes heterólogos de Glioblastomas transfectados com o gene p53.

Já a constatação do aumento na expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 conforme a progressão dos tumores astrocíticos, resultando em crescente tendência à sobrevida celular, abre espaço para abordagens que promovam o bloqueio transcricional dessa proteína e, assim, estimulem o mecanismo apoptótico. Zhu *et al.* (2003) reportaram considerável inibição do

crescimento tumoral, completa perda do potencial tumorigênico e significativo incremento da sensibilidade à cisplatina em culturas de astrocitomas malignos humanos tratadas com oligonucleotídeos *antisense* para Bcl-2. Jiang *et al.* (2003) obtiveram semelhantes resultados com o uso de oligonucleotídeos *antisense* para Bcl-2/Bcl-x<sub>L</sub> (bi-específicos) nas linhagens de Glioblastomas U87 e NS008.

A consolidação da superexpressão do EGFR como a alteração molecular predominante nos Astrocitomas Grau IV (especialmente dos Primários), bem como as novas evidências acerca da sua participação na tumorigênese dos Astrocitomas Grau I, desvenda a perspectiva do emprego das modernas táticas anti-EGFR no tratamento dessas neoplasias. Dentre estas, Kuan *et al.* (2001) ressaltam os inibidores protéicos, os anticorpos monoclonais “desarmados” ou complexados (ligados a agentes citotóxicos, imunotoxinas ou radioisótopos) e os imunizantes ativos (peptídeos imunogênicos, células dendríticas) como possíveis estratégias para o tratamento dos tumores astrocíticos. Comprovando essa disposição, Stea *et al.* (2003) verificaram significativo efeito radiosensibilizador e indutor da apoptose em células de Glioblastoma (linhagem U251) com o uso do Gefitinib, um bloqueador do domínio tirosinoquinase do EGFR. Zhang *et al.* (2004) e Fan & Weiss (2005) documentaram ainda o potencial terapêutico da tecnologia RNA *interference* no impedimento da expressão, respectivamente, do EGFR e da variante EGFRvIII em astrocitomas malignos.

O estabelecimento da ativação do gene c-myc como uma via tumorigênica alternativa àquelas deflagradas pela mutação do p53 e pela superexpressão do EGFR nos tumores astrocíticos fomenta o interesse por terapêuticas capazes de bloquear a expressão desse gene. Baker *et al.* (2002) reportaram um caso de Astrocitoma Grau III recorrente que obteve remissão parcial com a aplicação do Fenilbutirato, uma droga da categoria dos modificadores da resposta biológica que atua inibindo as cascatas mediadas pela c-Myc. Hosoi *et al.* (1998) relataram o agente citostático Rapamicina como um eficiente bloqueador da transcrição do

gene c-myc em células tumorais humanas, incluindo as provenientes de gliomas. No âmbito das terapias moleculares, Broaddus *et al.* (1997) descreveram excelentes resultados com a utilização de oligonucleotídeos *antisense* para c-myc no tratamento de gliomas malignos, ao passo que Chen *et al.* (1995) apontaram a transfecção de tumores cerebrais humanos com adenovírus contendo o gene MAD (antagonista do c-myc) como uma estratégia promissora.

A evidência de elevada expressão da enzima MGMT entre os astrocitomas manifesta a eminente refratariedade desses tumores aos quimioterápicos alquilantes. Todavia, a ação da MGMT pode ser bloqueada através da utilização de fármacos como a O<sup>6</sup>-benzilguanina (BG), resultando em potencial reversão da resistência aos agentes alquiladores (Gerson, 2002). Kanzawa *et al.* (2003) documentaram a quimiossensibilização da linhagem de Glioblastoma T98G à temozolomida após o tratamento com a BG. Bobola *et al.* (2005), estudando 11 (onze) linhagens de gliomas pediátricos, observaram que a administração de BG reduz a dose letal (LD10) da carmustina (BCNU) e da temozolomida em, respectivamente, 2,6 e 26 vezes, bem como diminui a dose tóxica desses agentes em 3,3 e 138 vezes, respectivamente. A utilização clínica da BG vem sendo encorajada por recentes estudos de fase I/II, que mostram a inexistência de toxicidade aparente dessa droga quando utilizada em protocolos adjuvantes para gliomas malignos humanos (Friedman *et al.*, 1998).

O grande incentivo à detoxificação celular nos astrocitomas, depreendido a partir da marcante presença da enzima GST $\pi$ , configura outro virtual mecanismo de quimiorresistência atuante nesses tumores. Não obstante, diferentes estratégias terapêuticas têm sido propostas com o objetivo de revogar essa condição. Allalunis-Turner *et al.* (1991) evidenciaram a sensibilização à carmustina e à mostarda nitrogenada em culturas primárias de gliomas malignos após a incubação com a Butionina Sulfoximina, um aminoácido sintético que restringe a atividade das enzimas GST pela inibição da síntese da glutatona (molécula efetora da detoxificação). Brandt & Ali-Osman (1997) identificaram a Cisplatina como um agente

supressor reversível da expressão de GST $\pi$  na linhagem de Glioblastoma MGR3, operando de maneira dose-dependente. Já Geroni *et al.* (2002) relataram o potencial uso da Brostalicina (PNU-166196), um novo agente alquilante da classe dos ligantes do sulco menor do DNA (ou MGBs, de *minor groove binders*) que exibe intrigante acréscimo da sua atividade citotóxica conforme a ampliação dos níveis celulares das GSTs e da glutathiona reduzida (GSH).

Em contraste, a demonstração do aumento na expressão da enzima TopoII $\alpha$  nos astrocitomas estimula a utilização dos fármacos que interferem na atuação dessa enzima em esquemas terapêuticos para os referidos tumores. Os “venenos” da TopoII atuam promovendo a formação dos complexos de clivagem covalentes DNA-TopoII, sendo representados por agentes intercaladores [Epipodofilotoxinas (exs.: etoposida, tenoposida)] e não-intercaladores [Antraciclina (exs.: doxorubicina, daunorubicina); Acridinas (ex.: amsacrina); Antibióticos (ex.: actinomicina); Antracenedionas (ex.: mitoxantrona) e Elipticinas (ex.: hidroxielipticina)] (Kufe *et al.*, 2003). A Topo II também é alvo para uma segunda categoria de drogas conhecidas como “inibidores catalíticos”, que impedem a enzima de realizar suas funções fisiológicas através da intromissão na sua ligação com o DNA (exs.: aclarrubicina, suramina), da estabilização dos complexos de clivagem não-covalentes DNA-TopoII (exs.: merbarona, ICRF-187) ou da inibição do sítio ATPásico enzimático (ex.: novobiocina) (Larsen *et al.*, 2003). Beauchesne *et al.* (1999) obtiveram resultados satisfatórios utilizando a radioterapia associada à quimioterapia com a Etoposida no tratamento de gliomas malignos primários, referindo índices de resposta e sobrevida semelhantes aos alcançados com a terapia clássica (radioterapia + nitrosuréis). Enquanto isso, Ali-Osman *et al.* (1993) e Vassal *et al.* (2003) constataram a eficácia dos inibidores da TopoII no tratamento dos Glioblastomas em linhagens celulares e modelos de transplante heterólogos, respectivamente.

Diante do exposto, percebe-se que a identificação de alvos moleculares em células tumorais configura importante ferramenta para o desenvolvimento de novas drogas anticâncer e estratégias terapêuticas, além de elucidar os eventos tumorigênicos e de possibilitar o uso mais racional dos agentes antineoplásicos atualmente disponíveis. Nesse contexto, destaca-se ainda a potencialidade da combinação de múltiplas abordagens farmacológicas e genéticas na tentativa de modular os variados componentes envolvidos nas diversas cascatas de sinalização celular ativadas nas neoplasias humanas (Bunz *et al.*, 2001).

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A incidência anual dos tumores astrocíticos na cidade de Fortaleza mostrou-se semelhante às observadas em regiões subdesenvolvidas;
- A distribuição por idade, por sexo e pela localização tumoral dos portadores de astrocitomas em Fortaleza reproduziu, de um modo geral, as tendências mundiais;
- A utilização dos escores semiquantitativos e da árvore de decisão CART referentes aos parâmetros histopatológicos dos tumores astrocíticos configurou estratégia prática e auxiliar para a graduação tumoral segundo os critérios estabelecidos pela OMS;
- A presença de células gigantes multinucleadas e/ou de gemistócitos nos astrocitomas confirmou-se como indicadora de fenótipos tumorais mais malignos;
- A marcação para o antígeno Ki-67 em mais de 8,0% das células tumorais distinguiu os Astrocitomas Grau IV, índices entre 1,5 e 8,0% diferenciaram os Astrocitomas Grau III e valores abaixo de 1,5% discriminaram os tumores de baixo grau (I e II);
- As proteínas TopoII $\alpha$  e c-Myc (nuclear) demonstraram associação com proliferação celular nos tumores astrocíticos, todavia de maneira não exclusiva;
- A marcação da proteína p53 foi evidenciada em todas as graduações tumorais, especialmente no grau III;
- A expressão do supressor tumoral WAF1 (p21) demonstrou correlação inversa com a graduação dos tumores astrocíticos (exceto no grau IV), configurando ainda importante recurso para a inferência da situação funcional do gene p53;
- A marcante presença da proteína p21<sup>WAF1/CIP1</sup> entre os Glioblastomas indicou a superexpressão da proteína p53 selvagem e a participação de outras desordens moleculares distintas da via p53/p21 em parte dos tumores dessa gradação;

- A expressão nuclear do p27<sup>KIP1</sup> manifestou-se proporcionalmente à malignidade tumoral, revelando a ativação funcional desse supressor como insuficiente para a contenção do processo tumorigênico dos astrocitomas;
- A expressão citoplasmática do p27<sup>KIP1</sup> foi modesta entre os tumores astrocíticos, ocorrendo como reflexo de sua expressão nuclear e, portanto, não demonstrando impacto na tumorigênese dessas neoplasias;
- O predomínio da proteína anti-apoptótica Bcl-2 sobre a proteína pró-apoptótica Bax consolidou-se com a progressão dos astrocitomas;
- A expressão da proteína erbB2 ocorreu somente em alguns tumores do grau IV;
- A superexpressão da proteína EGFR figurou entre as principais alterações moleculares dos tumores astrocíticos dos graus I e IV;
- A superexpressão do EGFR e a mutação do p53 configuraram eventos mutuamente exclusivos no processo tumorigênico dos astrocitomas;
- A expressão da proteína p21<sup>Ras</sup> foi evidenciada principalmente entre os Astrocitomas Grau II, não ocorrendo nos tumores astrocíticos de alto grau;
- A superexpressão da proteína p21<sup>Ras</sup> e dos receptores da família erbB demonstraram tendência à exclusividade recíproca entre os tumores astrocíticos;
- O acúmulo citoplasmático da proteína c-Myc apresentou-se como um fenômeno inicial e significativo na tumorigênese dos astrocitomas, sendo reflexo direto da expressão nuclear do gene c-Myc e da malignidade tumoral;
- As discordâncias entre as marcações nuclear e citoplasmática para c-Myc, principalmente entre os Astrocitomas Grau IV, suscitaram a elaboração da hipótese do aprisionamento citoplasmático da c-Myc, a qual admite o bloqueio da captação nuclear da proteína c-Myc recém-transcrita no citoplasma como uma tentativa de redução da sua funcionalidade como fator de transcrição;



- A análise conjunta dos marcadores moleculares investigados confirmou a mutação do gene p53 como a principal via tumorigênica dos astrocitomas, ainda que a superexpressão do EGFR tenha sido a alteração predominante nos tumores do grau IV e a expressão do gene c-myc tenha configurado uma via molecular distinta em relação às demais nas diferentes graduações tumorais.
- A elevada expressão da enzima MGMT manifestou-se como condição inerente às células astrocíticas (tumorais e não-tumorais), fundamentando a habitual quimiorresistência dos astrocitomas aos compostos alquilantes;
- A ativação da enzima GST $\pi$  representou fenômeno peculiar, inicial, intenso e freqüente na tumorigênese dos astrocitomas, indicando o potencial incremento à detoxificação celular de agentes antineoplásicos nesses tumores;
- A superexpressão da enzima TS constituiu evento distintivo, primário, comum e relevante entre os tumores astrocíticos, notadamente nos Glioblastomas, sugerindo a intrínseca capacidade de resistência desses tumores aos inibidores dessa enzima;
- A considerável expressão da enzima TopoII $\alpha$  entre os astrocitomas demonstrou a potencial susceptibilidade dessas neoplasias às drogas ativadoras dessa enzima;
- Os genes/produtos protéicos p53, Bcl-2, EGFR, c-Myc, MGMT, GST $\pi$  e TopoII $\alpha$  foram identificados como potenciais alvos moleculares nos tumores astrocíticos.

## 7. CONCLUSÕES

- O antígeno Ki-67 notabilizou-se como o melhor marcador de proliferação celular nos tumores astrocíticos, sendo sua expressão preditora da graduação histopatológica dessas neoplasias;
- A mutação do gene supressor tumoral p53 configurou evento inicial, relevante e indicador de progressão nos tumores astrocíticos;
- Os astrocitomas não demonstraram alterações na via de ativação do gene supressor tumoral p27<sup>KIP1</sup>;
- Houve crescente orientação à sobrevida celular (perfil anti-apoptótico) conforme a evolução maligna dos tumores astrocíticos;
- A superexpressão da proteína erbB2 representou fenômeno incomum na tumorigênese dos astrocitomas;
- A superexpressão da proteína p21<sup>Ras</sup> configurou evento molecular típico dos Astrocitomas Grau II, sendo ainda indicadora de não-progressão tumoral;
- A ativação do gene c-myc representou uma via tumorigênica distinta e alternativa àquelas encabeçadas pela mutação do p53 e pela superexpressão do EGFR nos tumores astrocíticos;
- As enzimas indutoras de quimiorresistência MGMT, GST $\pi$  e TS mostraram-se altamente expressas nos tumores astrocíticos;
- A enzima TopoII $\alpha$  apresentou-se como promissor alvo terapêutico nos astrocitomas.

## 8. LIMITAÇÕES & COMENTÁRIOS

- A quantidade de amostras tumorais investigadas pelo presente estudo foi relativamente pequena, especialmente no grupo dos Astrocitomas Grau III (n = 07), devido ao limitado número de casos que se enquadraram nos critérios de inclusão estabelecidos (existência de múltiplos blocos, bom estado de conservação e diagnóstico histológico segundo os parâmetros da OMS) e à restrita quantidade de reagentes para as reações imuno-histoquímicas;
- As informações clínicas referentes aos portadores dos tumores astrocíticos examinados pela corrente investigação não foram apresentadas em detalhes visto as dificuldades enfrentadas para a obtenção dos prontuários (pacientes de diversos hospitais), a freqüente ocorrência de registros médicos incompletos e o baixo índice de seguimento clínico pós-cirúrgico;
- A análise de possíveis correlações prognósticas e a confirmação dos mecanismos de quimiorresistência tumoral, sugeridas pelos marcadores moleculares avaliados no presente ensaio, foram impossibilitadas devido à ausência dos parâmetros clínicos (sobrevida, tempo livre de doença, recidivas, exposição/resposta à quimioterapia e/ou à radioterapia) antes comentada;
- A melhor definição de alguns eventos moleculares mencionados pela atual pesquisa foi dificultada pela limitação do método imuno-histoquímico em identificar alterações genéticas específicas, demonstrando a necessidade da complementação deste estudo através de abordagens moleculares.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADACHI, N.; IIZUMI, S.; SO, S.; KOYAMA, H. Genetic evidence for involvement of two distinct nonhomologous end-joining pathways in repair of topoisomerase II-mediated DNA damage. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 318, n. 4, p. 856-861, 2004.
- ADAMS, R.D.; VICTOR, M.; ROOPER, A.H. **Adam's & Victor's principles of neurology**. 6<sup>th</sup>. ed., Washington: Hardcover; 1998.
- AGOSTI, R.M.; LEUTHOLD, M.; GULLICK, W.J.; YASARGIL, M.G.; WIESTLER, O.D. Expression of the epidermal growth factor receptor in astrocytic tumours is specifically associated with glioblastoma multiforme. **Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.**, v. 420, n. 4, p. 321-325, 1992.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; PETER, W. **Molecular biology of the cell**. 4<sup>th</sup>. ed. New York: Garland Science, 2002.
- ALI-OSMAN, F.; BERGER, M.S.; RAJAGOPAL, S.; SPENCE, A.; LIVINGSTON, R.B. Topoisomerase II inhibition and altered kinetics of formation and repair of nitrosourea and cisplatin-induced DNA interstrand cross-links and cytotoxicity in human glioblastoma cells. **Cancer Res.**, v. 53, n. 23, p. 5663-5668, 1993.
- ALI-OSMAN, F.; BRUNNER, J.M.; KUTLUK, T.M.; HESS, K. Prognostic significance of glutathione S-transferase pi expression and subcellular localization in human gliomas. **Clin. Cancer Res.**, v. 3, n. 12, pt. 1, p. 2253-2261, 1997.
- ALLALUNIS-TURNER, M.J.; DAY 3<sup>rd</sup>., R.S.; MCKEAN, J.D.; PETRUK, K.C.; ALLEN, P.B.; ARONYK, K.E.; WEIR, B.K.; HUYSER-WIERENGA, D.; FULTON, D.S.; URTASUN, R.C. Glutathione levels and chemosensitizing effects of buthionine sulfoximine in human malignant glioma cells. **J. Neurooncol.**, v. 11, n. 2, p. 157-164, 1991.
- ALLEYNE, C.H. Jr.; HE, J.; YANG, J.; HUNTER, S.B.; COTSONIS, G.; JAMES, C.D.; OLSON, J.J. Analysis of cyclin dependent kinase inhibitors in malignant astrocytomas. **Int. J. Oncol.**, v. 14, n. 6, p. 1111-1116, 1999.
- AMARANTE-MENDES, G.P.; GREEN, D.R. The regulation of apoptotic cell death. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 32, p. 1053-1061, 1999.
- AMATI, B.; ALEVIZOPOULOS, K.; VLACH, J. Myc and the cell cycle. **Front. Biosci.**, v. 3, p. 250-268, 1998.
- ANDA, T.; SHABANI, H.K.; TSUNODA, K.; TOKUNAGA, Y.; KAMINOGO, M.; SHIBATA, S.; HAYASHI, T.; ISEKI, M. Relationship between expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase, glutathione-S-transferase pi in glioblastoma and the survival of the patients treated with nimustine hydrochloride: an immunohistochemical analysis. **Neurol. Res.**, v. 25, n. 3, p. 241-248, 2003.
- ANTONSSON, B.; MARTINO, J-C. The Bcl-2 protein family. **Exp. Cell Res.**, v. 256, p. 50-57, 2000.

- ARTEAGA, C. Targeting HER1/EGFR: a molecular approach to cancer therapy. **Semin. Oncol.**, v. 30, n. 3, p. 3-14, 2003.
- ARVANITIS, D.; MALLIRI, A.; ANTONIOU, D.; LINARDOPOULOS, S.; FIELD, J.K.; SPANDIDOS, D.A. Ras p21 expression in brain tumors: elevated expression in malignant astrocytomas and glioblastomas multiforme. **In Vivo**, v. 5, n. 4, p. 317-321, 1991.
- BAI, M.K.; COSTOPOULOS, J.S.; CHRISTOFORIDOU, B.P.; PAPADIMITRIOU, C.S. Immunohistochemical detection of the c-myc oncogene product in normal, hyperplastic and carcinomatous endometrium. **Oncology**, v.51, n. 4, p. 314-319, 1994.
- BAILEY, P.; CUSHING, H. **A classification of tumors of the gliomas group on a histogenetic basis with a correlated study of prognosis**. Philadelphia: Lippincott, 1926.
- BAKER, M.J.; BREM, S.; DANIELS, S.; SHERMAN, B.; PHUPHANICH, S. Complete response of a recurrent, multicentric malignant glioma in a patient treated with phenylbutyrate. **J. Neurooncol.**, v. 59, n. 3, p. 239-242, 2002.
- BAKSHI, R.P.; GALANDE, S.; MUNIYAPPA, K. Functional and regulatory characteristics of eukaryotic type II DNA topoisomerase. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.**, v. 36, n. 1, p. 1-37, 2001.
- BALANÑA, C.; RAMIREZ, J.L.; TARON, M.; ROUSSOS, Y.; ARIZA, A.; BALLESTER, R.; SARRIES, C.; MENDEZ, P.; SANCHEZ, J.J.; ROSELL, R. O6-methyl-guanine-DNA methyltransferase methylation in serum and tumor DNA predicts response to 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea but not to temozolamide plus cisplatin in glioblastoma multiforme. **Clin. Cancer Res.**, v. 9, n. 4, p. 1461-1468, 2003.
- BARDOT, V.; DUTRILLAUX, A.M.; DELATTRE, J.Y.; VEGA, F.; POISSON, M.; DUTRILLAUX, B.; LUCCIONI, C. Purine and pyrimidine metabolism in human gliomas: relation to chromosomal aberrations. **Br. J. Cancer**, v. 70, n. 2, p. 212-218, 1994.
- BAUDINO, T.A.; CLEVELAND, J.L. The Max network gone mad. **Mol. Cell. Biol.**, v. 21, n. 3, p. 691-702, 2001.
- BEAUCHESNE, P.; SOLER, C.; RUSCH, P.; FOTSO, M.J.; DUTHEL, R.; SCHMITT, T.; BRUNON, J. Phase II study of a radiotherapy/etoposide combination for patients with newly malignant gliomas. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 44, n. 3, p. 210-216, 1999.
- BEIER, R.; BURGIN, A.; KIERMAIER, A.; FERRO, M.; KARSUNKY, H.; SAFFRICH, R.; MOROY, T.; ANSORGE, W.; ROBERTS, J.; EILERS, M. Induction of cyclin E-cdk2 kinase activity, E2F-dependent transcription and cell growth by Myc are genetically separable events. **EMBO J.**, v. 19, n. 21, p. 5813-5823, 2000.
- BERGELSON, S.; PINKUS, R.; DANIEL, V. Intracellular glutathione levels regulate Fos/Jun induction and activation of glutathione S-transferase gene expression. **Cancer Res.**, v. 54, n. 1, p. 36-40, 1994.
- BERTRAM, J.S. The molecular biology of cancer. **Mol. Aspects Med.**, v. 21, p. 167-223, 2001.
- BIAN, X.W.; SHI, J.Q.; LIU, F.X. Pathologic significance of proliferative activity and oncoprotein expression in astrocytic tumors. **Anal. Quant. Cytol. Histol.**, v. 22, n. 6, p. 429-437, 2000.

- BIRNER, P.; PIRIBAUER, M.; FISCHER, I.; GATTERBAUER, B.; MAROSI, C.; UNGERSBOCK, K.; ROSSLER, K.; BUDKA, H.; HAINFELLNER, J.A. Prognostic relevance of p53 protein expression in glioblastoma. **Oncol. Rep.**, v. 9, n. 4, p. 703-707, 2002.
- BLAIN, S.W.; MASSAGUÉ, J. Breast cancer banishes p27 from nucleus. **Nat. Med.**, v. 8, n. 10, p. 1076-1078, 2002.
- BLAN, J.L.; WAGER, M.; GUILHOT, J.; KUSY, S.; BATAILLE, B.; CHANTEREAU, T.; LAPIERRE, F.; LARSEN, C.J.; KARAYAN-TAPON, L. Correlation of clinical features and methylation status of MGMT gene promoter in glioblastomas. **J. Neurooncol.**, v. 68, n. 3, p. 275-283, 2004.
- BLOOM, J.; PAGANO, M. Deregulated degradation of the cdk inhibitor p27 and malignant transformation. **Semin. Cancer Biol.**, v. 13, n. 1, p. 41-47, 2003.
- BOBOLA, M.S.; SILBER, J.R.; ELLENBOGEN, R.G.; GEYER, J.R.; BLANK, A.; GOFF, R.D. O6-methylguanine-DNA methyltransferase, O6-benzylguanine, and resistance to clinical alkylators in pediatric primary brain tumor cell lines. **Clin. Cancer Res.**, v. 11, n. 7, p. 2747-2755, 2005.
- BOON, K.; EDWARDS, J.B.; EBERHART, C.G.; RIGGINS, G.J. Identification of astrocytoma associated genes including cell surface markers. **BMC Cancer**, v. 4, n. 1, p. 39, 2004.
- BOS, J.L. ras oncogenes in human cancer: a review. **Cancer Res.**, v. 49, n. 17, p. 4682-4689, 1989.
- BRANDT, T.Y.; ALI-OSMAN, F. Detection of DNA damage in transcriptionally active genes by RT-PCR and assessment of repair of cisplatin-induced damage in the glutathione S-transferase-pi gene in human glioblastoma cells. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 143, n. 1, p. 22-29, 1997.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer - INCA. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2005: incidência de câncer no Brasil**, Rio de Janeiro: INCA, 2004.
- BRASIL. Ministério da Saúde. DATASUS. **Dados sobre morbidade e mortalidade**, Disponível em: <<http://www.datasus.gov.br>>. Acesso em: 10 maio de 2005, 20:00.
- BREASTED, J.H. **The Edwin Smith surgical papyrus**. v. 1, Chicago: University of Chicago Press, 1980.
- BREDEL, M.; POLLACK, I.F.; HAMILTON, R.L.; JAMES, C.D. Epidermal growth factor receptor expression and gene amplification in high-grade non-brainstem gliomas of childhood. **Clin. Cancer Res.**, v. 5, n. 7, p. 1786-1792, 1999.
- BREDEL, M.; POLLACK, I.F.; HAMILTON, R.L.; BIRNER, P.; HAINFELLNER, J.A.; ZENTNER, J. DNA topoisomerase IIalpha predicts progression-free and overall survival in pediatric malignant non-brainstem gliomas. **Int. J. Cancer**, v. 99, n. 6, p. 817-820, 2002a.
- BREDEL, M.; PIRIBAUER, M.; MAROSI, C.; BIRNER, P.; GATTERBAUER, B.; FISCHER, I.; STROBEL, T.; ROSSLER, K.; BUDKA, H.; HAINFELLNER, J.A. High expression of DNA topoisomerase IIalpha and Ki-67 antigen is associated with prolonged survival in glioblastoma patients. **Eur. J. Cancer**, v. 38, n. 10, p. 1343-1347, 2002b.
- BREDEL, M.; SLAVC, I.; BIRNER, P.; CZECH, T.; HABERLER, C.; STROBEL, T.; WOLFSBERGER, S.; BUDKA, H.; HAINFELLNER, J.A. DNA topoisomerase IIalpha expression in optic pathway gliomas of childhood. **Eur. J. Cancer**, v. 38, n. 3, p. 393-400, 2002c.

- BREIMAN, L.; FRIEDMAN J.H.; OLSHEN R.A.; STONE C.J. **Classification and regression trees**. Pacific Grove: Wadsworth, 1984.
- BREIVIK, J. The evolutionary origin of genetic instability in cancer development. **Semin. Cancer Biol.**, v. 15, n. 1, p. 51-60, 2005.
- BROADDUS, W.C.; CHEN, Z.J.; PRABHU, S.S.; LOUDON, W.G.; GILLIES, G.T.; PHILLIPS, L.L.; FILLMORE, H. Antiproliferative effect of c-myc antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides in malignant glioma cells. **Neurosurgery**, v. 41, n. 4, p. 908-915, 1997.
- BROWN, D.C.; GATTER, K.C. Ki-67 protein: the immaculate deception? **Histopathology**, v. 40, p. 2-11, 2002.
- BURGER, P.C.; SCHEITHAUER, B.; VOGEL, F.S. **Surgical pathology of nervous system and its coverings**. 4<sup>th</sup> ed., Glasgow: Arnold Publishers, 2002.
- BUNZ, F. Cell death and cancer therapy. **Curr. Opin. Pharmacol.**, v. 1, n. 4, p. 337-341, 2001.
- CANELLES, M.; DELGADO, M.D.; HYLAND, K.M.; LERGA, A.; RICHARD, C.; DANG, C.V.; LEON, J. Max and inhibitory c-Myc mutants induce erythroid differentiation and resistance to apoptosis in human myeloid leukemia cells. **Oncogene**, v. 14, n. 11, p. 1315-1327, 1997.
- CARTRON, P.F.; JUIN, P.; OLIVER, L.; MARTIN, S.; MEFLAH, K.; VALLETTE, F.M. Nonredundant role of Bax and Bak in Bid-mediated apoptosis. **Mol. Cell Biol.**, v. 23, n. 13, p. 4701-4712, 2003.
- CARVALHO-GOMES, F.; GASCUEL, O. SDL, a stochastic algorithm for learning decision lists with limited complexity. **Ann. Mathemat. Artif. Intellig.**, v. 10, p. 281-302, 1994.
- CASCINO, T.L.; VEEDER, M.H.; BUCKNER, J.C.; O'FALLON, J.R.; WIESENFELD, M.; LEVITT, R.; GOLDBERG, R.M.; KUROSS, S.A.; MORTON, R.F.; SCHEITHAUER, B.W. Phase II study of 5-fluorouracil and leucovorin in recurrent primary brain tumor. **J. Neurooncol.**, v. 30, n. 3, p. 243-246, 1996.
- CASTELO, M.A.; SCHIAVETTI, A.; VARRASSO, G.; CLERICO, A.; CAPPELLI, C. Chemotherapy in low-grade astrocytoma management. **Childs Nerv. Syst.**, v. 14, p. 6-9, 1998.
- CATTORETTI, G.; BECKER, M.H.G.; KEY, G.; DUCHROW, M.; SCHLÜTER, C.; GALLE, J.; GERDES J. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB-1 and MIB-3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. **J. Pathol.**, v. 168, p. 357-363, 1992.
- CAVENEY, W.K.; WHITE, R.L. The genetic basis of cancer. **SCIAM**, 224<sup>a</sup> ed, p. 50-57, 1995.
- CBTRUS. **Statistical report: primary brain tumours in the United States (1995-1999)**. Chicago: Central Brain Tumor Registry of the United States, 2002.
- CHANG, E.H.; PIROLLO, K.F.; BOUKER, K.B. Tp53 gene therapy: a key to modulating resistance to anticancer therapies? **Mol. Med. Today**, v. 6, 358-364, 2000.
- CHEN, J.; WILLINGHAM, T.; MARGRAF, L.R.; SCHREIBER-AGUS, N.; DEPINHO, R.A.; NISEN, P.D. Effects of the MYC oncogene antagonist, MAD, on proliferation, cell cycling and the malignant phenotype of human brain tumour cells. **Nat. Med.**, v. 1, n. 7, p. 638-643, 1995.

- CHEN, J.; WILLINGHAM, T.; SHUFORD, M.; NISEN, P.D. Tumor suppression and inhibition of aneuploid cell accumulation in human brain tumor cells by ectopic overexpression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1. **J. Clin. Invest.**, v. 97, n. 8, p. 1983-1988, 1996.
- CHOSDOL, K.; CHATTOPADHYAY, P.; SINHA, S. Molecular pathways of glial tumorigenesis. **Curr. Sci.**, v. 82, n. 6, p. 648-654, 2002.
- CHOZICK, B.S.; PEZZULLO, J.C.; EPSTEIN, M.H.; FINCH, P.W. Prognostic implications of p53 overexpression in supratentorial astrocytic tumors. **Neurosurgery**, v. 35, n. 5, p. 831-837, 1994.
- CITRON, M.; WHITE, A.; DECKER, R.; WASSERMAN, P.; LI, B.; RANDALL, T.; GUERRA, D.; BELANICH, M.; YAROSH, D. O6-methylguanine-DNA methyltransferase in human brain tumors detected by activity assay and monoclonal antibodies. **Oncol. Res.**, v. 7, n. 1, p. 49-55, 1995.
- COBLEIGH, M.A.; VOGEL, C.L.; TRIPATHY, D.; ROBERT, N.J.; SCHOLL, S.; FEHRENBACHER, L.; WOLTER, J.M.; PATON, V.; SHAK, S.; LIEBERMAN, G.; SLAMON, D.J. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. **J. Clin. Oncol.**, v. 17, n. 9, p. 2639-2648, 1999.
- COONS, S.W.; JOHNSON, P.C. Regional heterogeneity in the proliferative activity of human gliomas as measured by the Ki-67 labeling index. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, v. 52, n. 6, p. 609-618, 1993.
- COQUERET, O. New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? **Trends Cell Biol.**, v. 13, n. 2, p. 65-70, 2003.
- COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, S.L. (Eds.) **Robbins-Patologia estrutural e funcional**. 6ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
- CRUL, M.; DE KLERK, G.J.; BEIJNEN, J.H.; SCHELLENS, J.H. Ras biochemistry and farnesyl transferase inhibitors: a literature survey. **Anticancer Drugs**, v. 12, n. 3, p. 163-184, 2001.
- CVITKOVIC, F.B.; HAIE-MEDER, C.; PAPANIMITRAKOPOULOU, V.; ARMAND, J.P.; CIOLOCA, C.; MAUGIS, N.; CONSTANS, J.P. Pilot study of 6 weeks of chemoradiotherapy with 5 FU and hydroxyurea in malignant gliomas. **J. Neurooncol.**, v. 15, n. 1, p. 9-17, 1993.
- DANG, C.V. c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. **Mol. Cell. Biol.**, v. 19, n. 1, p. 1-11, 1999.
- DELMAS, C.; HELIEZ, C.; COHEN-JONATHAN, E.; END, D.; BONNET, J.; FAVRE, G.; TOULAS, C. Farnesyltransferase inhibitor, R115777, reverses the resistance of human glioma cell lines to ionizing radiation. **Int. J. Cancer**, v. 100, n. 1, p. 43-48, 2002.
- DESAGHER, S.; MARTINOU, J-C. Mitochondria as the central control point of apoptosis. **Trends Cell Biol.**, v. 10, p. 369-377, 2000.
- DIETRICH, P.Y.; TRIBOLET, N. Brain tumors: the time has come to amplify research. **Neurosurg. Focus**, v. 3, n. 5, introduction, 1997.
- EKSTRAND, A.J.; JAMES, C.D.; CAVENEE, W.K.; SELIGER, B.; PETTERSSON, R.F.; COLLINS, V.P. Genes for epidermal growth factor receptor, transforming growth factor alpha,



- and epidermal growth factor and their expression in human gliomas in vivo. **Cancer Res.**, v. 51, n. 8, p. 2164-2172, 1991.
- ELLISON, D.W.; STEART, P.V.; BATEMAN, A.C.; PICKERING, R.M.; PALMER, J.D.; WELLER, R.O. Prognostic indicators in a range of astrocytic tumours: an immunohistochemical study with Ki-67 and p53 antibodies. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry**, v. 59, n. 4, p. 413-419, 1995a.
- ELLISON, D.W.; STEART, P.V.; GATTER, K.C.; WELLER, R.O. Apoptosis in cerebral astrocytic tumours and its relationship to expression of the bcl-2 and p53 proteins. **Neuropathol. Appl. Neurobiol.**, v. 21, n. 4, p. 352-361, 1995b.
- ELLISON, D.; LOVE, S.; CHIMELLI, L.; HARDING, B.N.; LOWE, J.; VINTERS, H.V. **Neuropathology: a reference text of CNS pathology**. 2<sup>nd</sup> ed., Los Angeles: Mosby, 2004.
- ENESTRÖM, S.; VAVRUCH, L.; FRANLUND, B.; NORDENSKJÖLD, B. Ki-67 antigen expression as a prognostic factor in primary and recurrent astrocytomas. **Neurochirurgie**, v. 44, n. 1, p. 25-30, 1998.
- ENG, L.F.; GHIRNIKAR, R.S.; LEE, Y.L. Glial fibrillary acidic protein: GFAP - thirty-one years (1969-2000). **Neurochem. Res.**, v. 25, p. 1439-1451, 2000.
- ENGELHARD, H.H. 3<sup>rd</sup>; BUTLER, A.B. 4<sup>th</sup>; BAUER, K.D. Quantification of the c-myc oncoprotein in human glioblastoma cells and tumor tissue. **J. Neurosurg.**, v. 71, n. 2, p. 224-232, 1989.
- ESPINOSA, A.B.; TABERNERO, M.D.; GARCIA-MACIAS, M.C.; PRIMO, D.; BERNAL, A.G.; CRUZ, J.J.; RAMOS, M.; FONT DE MORA, J.; GOMEZ ALONSO, A.; ORFAO, A. Her-2/neu gene amplification in familial vs. sporadic breast cancer: impact on the behavior of the disease. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 120, n. 6, p. 917-927, 2003.
- ESTELLER, M.; CORN, P.G.; BAYLIN, S.B.; HERMAN, J.G. A gene hypermethylation profile of human cancer. **Cancer Res.**, v. 61, n. 8, p. 3225-3229, 2001.
- FABBRO, M.; HENDERSON, B.R. Regulation of tumor suppressors by nuclear-cytoplasmic shuttling. **Exp. Cell. Res.**, v. 282, n. 2, p. 59-69, 2003.
- FACCHINI, L.M.; PENN, L.Z. The molecular role of Myc in growth and transformation: recent discoveries lead to new insights. **FASEB J.**, n. 12, p. 633-651, 1998.
- FAN, Q.W.; WEISS, W.A. RNA interference against a glioma-derived allele of EGFR induces blockade at G(2)M. **Oncogene**, v. 24, n. 5, p. 829-837, 2005.
- FELS, C.; SCHAFFER, C.; HUPPE, B.; BAHN, H.; HEIDECKE, V.; KRAMM, C.M.; LAUTENSCHLAGER, C.; RAINOV, N.G. Bcl-2 expression in higher-grade human glioma: a clinical and experimental study. **J. Neuro-Oncol.**, v. 48, n. 3, p. 207-216, 2000.
- FIELDS, R.D.; STEVENS-GRAHAN, B. New insights into neuron-glia communication. **Science**, v. 298, p. 556-562, 2002.
- FIELDS, R.D. A outra metade do cérebro. **SCIAM, Brasil**. 24<sup>a</sup> ed, p. 47-53, 2004.
- FONATSCH, C.; DUCHROW, M.; RIEDER, H.; SCHLÜTER, C.; GERDES, J. Assignment of the human Ki-67 gene (MKI67) to 10q25ter. **Genomics**, v. 11, p. 476-477, 1991.

- FRANK, S.R.; SCHROEDER, M.; FERNANDEZ, P.; TAUBERT, S.; AMATI, B. Binding of c-Myc to chromatin mediates mitogen-induced acetylation of histone H4 and gene activation. **Genes Dev.**, v. 15, n. 16, p. 2069-2082, 2001.
- FRIEDMAN, H.S.; MCLENDON, R.E.; KERBY, T.; DUGAN, M.; BIGNER, S.H.; HENRY, A.J.; ASHLEY, D.M.; KRISCHER, J.; LOVELL, S.; RASHEED, K.; MARCHEV, F.; SEMAN, A.J.; COKGOR, I.; RICH, J.; STEWART, E.; COLVIN, O.M.; PROVENZALE, J.M.; BIGNER, D.D.; HAGLUND, M.M.; FRIEDMAN, A.H.; MODRICH, P.L. DNA mismatch repair and O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase analysis and response to Temodal in newly diagnosed malignant glioma. **J. Clin. Oncol.**, v. 16, n. 12, p. 3851-3857, 1998.
- FUCHS, E.; CZECH, B.; KOLE, M.H.; MICHAELIS, T.; LUCASSEN, P.J. Alterations of neuroplasticity in depression: the hippocampus and beyond. **Eur. Neuropsychopharmacol.**, suppl. 5, p. S481-S490, 1994.
- FULTS, D.; BROCKMEYER, D.; TULLOUS, M.W.; PEDONE, C.A.; CAWTHON, R.M. p53 mutation and loss of heterozygosity on chromosomes 17 and 10 during human astrocytoma progression. **Cancer Res.**, v. 52, n. 3, p. 674-679, 1992.
- GARDNER, L.; LEE, L.; DANG, C. myc oncogene. In: BERTINO, J. R. (Org.). **Encyclopedia of Cancer**. 2<sup>nd</sup>. ed., vol. II. Orlando: Academic Press, 2002.
- GEOERGER, B.; VASSAL, G.; OPOLON, P.; DIRVEN, C.M.; MORIZET, J.; LAUDANI, L.; GRILL, J.; GIACCONE, G.; VANDERTOP, W.P.; GERRITSEN, W.R.; VAN BEUSECHEM, V.W. Oncolytic activity of p53-expressing conditionally replicative adenovirus AdDelta24-p53 against human malignant glioma. **Cancer Res.**, v. 64, n. 16, p. 5753-5759, 2004.
- GERDES, J.; LI, L.; SCHLÜTER, C.; DUCHROW, M.; WOHLBERG, C.; GERLACH, C.; STAHLER, I.; KLOTH, S.; BRANDT, E.; FLAD, H-D. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. **Am. J. Pathol.**, v. 138, p. 867-873, 1991.
- GERONI, C.; MARCHINI, S.; COZZI, P.; GALLIERA, E.; RAGG, E.; COLOMBO, T.; BATTAGLIA, R.; HOWARD, M.; D'INCALCI, M.; BROGGINI, M. Brostallicin, a novel anticancer agent whose activity is enhanced upon binding to glutathione. **Cancer Res.**, v. 62, n. 8, p. 2332-2336, 2002.
- GERSON, S.L. Clinical relevance of MGMT in the treatment of cancer. **J. Clin. Oncol.**, v. 20, n. 9, p. 2388-2399, 2002.
- GIANNINI, C.; SCHEITHAUER, B.W.; BURGER, P.C.; CHRISTENSEN, M.R.; WOLLAN, P.C.; SEBO, T.J.; FORSYTH, P.A.; HAYOSTEK, C.J. Cellular proliferation in pilocytic and diffuse astrocytomas. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, v. 58, n. 1, p. 46-53, 1999.
- GOMORI, E.; DOCZI, T.; PAJOR, L.; MATOLCSY, A. Sporadic p53 mutations and absence of ras mutations in glioblastomas. **Acta Neurochir. (Wien)**, v. 141, n. 6, p. 593-599, 1999.
- GRANT, R.; IRONSIDE, J.W. Glutathione S-transferases and cytochrome P450 detoxifying enzyme distribution in human cerebral glioma. **J. Neurooncol.**, v. 25, n. 1, p. 1-7, 1995.
- GRAY, F.; DE GIROLAMI, U.; POIRIER, J. **Escourolle and Poirier manual of basic neuropathology**. 4<sup>th</sup>. ed., Boston: Butterworth Heinemann Health, 2004.

- GRAY, D.A.; WOULFE, J. Lipofuscin and aging: a matter of toxic waste. **Sci. Aging Knowledge Environ.**, n. 5, rel., 2005.
- GREEMBERG, D.A.; AMINOFF, M.J.; SIMON, R.P. **Neurologia clínica**, 2ª ed., Porto Alegre: Artes Médicas; 1996.
- GRZYBICKI, D.M.; MOORE, S.A. Implications of prognostic markers in brain tumors. **Clin. Lab. Med.**, v. 19, n. 4, p. 833-847, 1999.
- GUHA, A.; FELDKAMP, M.M.; LAU, N.; BOSS, G.; PAWSON, A. Proliferation of human malignant astrocytoma is dependent on Ras activation. **Oncogene**, v. 15, n. 23, p. 2755-2765, 1997.
- HAAPASALO, H.; HYYTINEN, E.; SALLINEN, P.; HELIN, H.; KALLIONIEMI, O.P.; ISOLA, J. c-erbB-2 in astrocytomas: infrequent overexpression by immunohistochemistry and absence of gene amplification by fluorescence *in situ* hybridization. **Br. J. Cancer**, v. 73, n. 5, p. 620-623, 1996.
- HAMID, O. Emerging treatments in oncology: focus on tyrosine kinase (erbB) receptor inhibitors. **J. Am. Pharm. Assoc.**, v. 44, n. 1, p. 52-58, 2004.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, p. 57-70, 2000.
- HANNON, G.J. RNA interference. **Nature**, v. 418, p. 244-251, 2002.
- HARA, A.; YAMADA, H.; SAKAI, N.; HIRAYAMA, H.; TANAKA, T.; MORI, H. Immunohistochemical demonstration of the placental form of glutathione S-transferase, a detoxifying enzyme in human gliomas. **Cancer**, v. 66, n. 12, p. 2563-2568, 1990.
- HARA, A.; HIROSE, Y.; YOSHIMI, N.; TANAKA, T.; MORI, H. Expression of Bax and bcl-2 proteins, regulators of programmed cell death, in human brain tumors. **Neurol. Res.**, v. 19, n. 6, p. 623-628, 1997.
- HAYASHI, Y.; UEKI, K.; WAHA, A.; WIESTLER, O.D.; LOUIS, D.N.; VON DEIMLING, A. Association of EGFR gene amplification and CDKN2 (p16/MTS1) gene deletion in glioblastoma multiforme. **Brain Pathol.**, v. 7, n. 3, p. 871-875, 1997.
- HAYES, V.M.; DIRVEN, C.M.; DAM, A.; VERLIND, E.; MOLENAAR, W.M.; MOOIJ, J.J.; HOFSTRA, R.M.; BUYS, C.H. High frequency of TP53 mutations in juvenile pilocytic astrocytomas indicates role of TP53 in the development of these tumors. **Brain Pathol.**, v. 9, n. 3, p. 462-467, 1999.
- HEGI, M.E.; DISERENS, A.C.; GORLIA, T.; HAMOU, M.F.; DE TRIBOLET, N.; WELLER, M.; KROS, J.M.; HAINFELLNER, J.A.; MASON, W.; MARIANI, L.; BROMBERG, J.E.; HAU, P.; MIRIMANOFF, R.O.; CAIRNCROSS, J.G.; JANZER, R.C.; STUPP, R. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. **N. Engl. J. Med.**, v. 352, n. 10, p. 997-1003, 2005.
- HIESIGER, E.M.; HAYES, R.L.; PIERZ, D.M.; BUDZILOVICH, G.N. Prognostic relevance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) and c-neu/erbB2 expression in glioblastomas (GBMs). **J. Neurooncol.**, v. 16, n. 2, p. 93-104, 1993.

- HILTON, D.A.; LOVE, S.; BARBER, R.; ELLISON, D.; SANDEMAN, D.R. Accumulation of p53 and Ki-67 expression do not predict survival in patients with fibrillary astrocytomas or the response of these tumors to radiotherapy. **Neurosurgery**, v. 42, n. 4, p. 724-729, 1998.
- HILTON, D.A.; MELLING, C. Genetic markers in the assessment of intrinsic brain tumors. **Curr. Diagn. Pathol.**, v. 10, p. 83-92, 2004.
- HO, D.M.; HSU, C.Y.; TING, L.T.; CHIANG, H. MIB-1 and DNA topoisomerase II alpha could be helpful for predicting long-term survival of patients with glioblastoma. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 119, n. 5, p. 715-722, 2003.
- HOCHHAUSER, D. Modulation of chemosensitivity through altered expression of cell cycle regulatory genes in cancer. **Anticancer Drugs**, v. 8, p. 903-910, 1997.
- HOLDEN, J.A.; TOWNSEND, J.J. DNA topoisomerase II-alpha as a proliferation marker in astrocytic neoplasms of the central nervous system: correlation with MIB1 expression and patient survival. **Mod. Pathol.**, v. 12, n. 12, p. 1094-1100, 1999.
- HOSHI, M.; YOSHIDA, K.; SHIMAZAKI, K.; SASAKI, H.; OTANI, M.; KAWASE, T. Correlation between MIB-1 staining indices and recurrence in low-grade astrocytomas. **Brain Tumor Pathol.**, v. 14, n. 1, p. 47-51, 1997.
- HOSOI, H.; DILLING, M.B.; LIU, L.N.; DANKS, M.K.; SHIKATA, T.; SEKULIC, A.; ABRAHAM, R.T.; LAWRENCE JR., J.C.; HOUGHTON, P.J. Studies on the mechanism of resistance to rapamycin in human cancer cells. **Mol. Pharmacol.**, v. 54, n. 5, p. 815-824, 1998.
- HSU, S.M.; RAINE, L.; FANGER, H. Use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 29, p. 577-580, 1981.
- HUANG, H.; COLELLA, S.; KURRER, M.; YONEKAWA, Y.; KLEIHUES, P.; OHGAKI, H. Gene expression profiling of low-grade diffuse astrocytomas by cDNA arrays. **Cancer Res.**, v. 60, n. 24, p. 6868-6874, 2000.
- HUANG, P.S.; OLIFF, A. Drug-targeting strategies in cancer therapy. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v. 11, n. 1, p. 104-110, 2001.
- HUNCHAREK M.; KUPELNICK, B. Epidermal growth factor receptor gene amplification as a prognostic marker in glioblastoma multiforme: results of a meta-analysis. **Oncol. Res.**, v. 12, n. 2, p. 107-112, 2000.
- HWANG, S.L.; CHAI, C.Y.; LIN, H.J.; HOWNG, S.L. Expression of epidermal growth factor receptors and c-erbB-2 proteins in human astrocytic tumors. **Kaohsiung J. Med. Sci.**, v. 13, n. 7, p. 417-424, 1997.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Estimativas Populacionais para os municípios brasileiros em 01/07/2004**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 10 fev. 2005, 10:00.
- IRONSIDE, J.W.; MOSS, T.; LOWE, J.; WELLER, R.; LOUIS, D.N. **Diagnostic pathology of nervous system tumours**. London: Churchill Livingstone, 2002.

- ITO, S.; CHANDLER, K.L.; PRADOS, M.D.; LAMBORN, K.; WYNNE, J.; MALEC, M.K.; WILSON, C.B.; DAVIS, R.L.; HOSHINO, T. Proliferative potential and prognostic evaluation of low-grade astrocytomas. **J. Neurooncol.**, v. 19, n. 1, p. 1-9, 1994.
- JAROS, E.; PERRY, R.H.; ADAM, L.; KELLY, P.J.; CRAWFORD, P.J.; KALBAG, R.M.; MENDELOW, A.D.; SENGUPTA, R.P.; PEARSON, A.D. Prognostic implications of p53 protein, epidermal growth factor receptor, and Ki-67 labelling in brain tumours. **Br. J. Cancer**, v. 66, n. 2, p. 373-385, 1992.
- JENSEN, N.A.; PEDERSEN, K.M.; LIHME, F.; RASK, L.; NIELSEN, J.V.; RASMUSSEN, T.E.; MITCHELMORE, C. Astroglial c-Myc overexpression predisposes mice to primary malignant gliomas. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 10, p. 8300-8388, 2003.
- JIANG, H.; LIN, J.; SU, Z.Z.; COLLART, F.R.; HUBERMAN, E.; FISHER, P.B. Induction of differentiation in human promyelocytic HL-60 leukemia cells activates p21, WAF1/CIP1, expression in the absence of p53. **Oncogene**, v. 9, n. 11, p. 3397-3406, 1994.
- JIANG, Z.; ZHENG, X.; RICH, K.M. Down-regulation of Bcl-2 and Bcl-xL expression with bispecific antisense treatment in glioblastoma cell lines induce cell death. **J. Neurochem.**, v. 84, n. 2, p. 273-281, 2003.
- JONSON, M.; DIMITROV, D.; VOJTA, P.J.; BARRETT, J.C.; NODA, A.; PEREIRA-SMITH, O.M.; SMITH, J.R. Evidence for a p53-independent pathway for upregulation of SDI1/CIP1/WAF1/p21 RNA in human cells. **Mol. Carcinog.**, v. 11, n. 2, p. 59-64, 1994.
- JUNG, J.M.; LI, H.; KOBAYASHI, T.; KYRITSIS, A.P.; LANGFORD, L.A.; BRUNER, J.M.; LEVIN, V.A.; ZHANG, W. Inhibition of human glioblastoma cell growth by WAF1/Cip1 can be attenuated by mutant p53. **Cell Growth Differ.**, v. 6, n. 8, p. 903-913, 1995.
- KALUZA, J.; ADAMEK, D.; PYRICH, M. Ki-67 as a marker of proliferation activity in tumor progression of recurrent gliomas of supratentorial localization: immunocytochemical quantitative studies. **Pol. J. Pathol.**, v. 48, n. 1, p. 31-36, 1997.
- KAMB, A. Cell-cycle regulators and cancer. **TIG**, v. 11, n. 4, p. 136-140, 1995.
- KAMIRYO, T.; TADA, K.; SHIRAISHI, S.; SHINOJIMA, N.; KOCHI, M.; USHIO, Y. Correlation between promoter hypermethylation of the O6-methylguanine-deoxyribonucleic acid methyltransferase gene and prognosis in patients with high-grade astrocytic tumors treated with surgery, radiotherapy, and 1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea-based chemotherapy. **Neurosurgery**, v. 54, n. 2, p. 349-357, 2004.
- KANZAWA, T. BEDWELL, J.; KONDO, Y.; KONDO, S.; GERMANO, I.M. Inhibition of DNA repair for sensitizing resistant glioma cells to temozolomide. **J. Neurosurg.**, v. 99, n. 6, p. 1047-1052, 2003.
- KARAMITOPOULOU, E.; PERENTES, E.; DIAMANTIS, I.; MARAZIOTIS, T. Ki-67 immunoreactivity in human central nervous system tumors: a study with MIB 1 monoclonal antibody on archival material. **Acta Neuropathol. (Berl.)**, v. 87, n. 1, p. 47-54, 1994.
- KARKAVELAS, G.; MAVROPOULOU, S.; FOUNTZILAS, G.; CHRISTOFORIDOU, V.; KARAVELIS, A.; FOROGLU, G.; PAPADIMITRIOU, C. Correlation of proliferating cell nuclear antigen assessment, histologic parameters and age with survival in patients with glioblastoma multiforme. **Anticancer Res.**, v. 15, n. 2, p. 531-536, 1995.

- KATO, H.; KATO, S.; KUMABE, T.; SONODA, Y.; YOSHIMOTO, T.; KATO, S.; HAN, S.Y.; SUZUKI, T.; SHIBATA, H.; KANAMARU, R.; ISHIOKA, C. Functional evaluation of p53 and PTEN gene mutations in gliomas. **Clin. Cancer Res.**, v. 6, n. 10, p. 3937-43, 2000.
- KHALID, H.; SHIBATA, S.; KISHIKAWA, M.; YASUNAGA, A.; ISEKI, M.; HIURA, T. Immunohistochemical analysis of progesterone receptor and Ki-67 labeling index in astrocytic tumors. **Cancer**, v. 80, n. 11, p. 2133-2140, 1997.
- KHALID, M.H.; YAGI, N.; HIURA, T.; SHIBATA, S. Immunohistochemical analysis of p53 and p21 in human primary glioblastomas in relation to proliferative potential and apoptosis. **Brain Tumor Pathol.**, v. 15, n. 2, p. 89-94, 1998.
- KIRLA, R.; SALMINEN, E.; HUHTALA, S.; NUUTINEN, J.; TALVE, L.; HAAPASALO, H.; KALIM, H. Prognostic value of the expression of tumor suppressor genes p53, p21, p16 and pRb, and Ki-67 labelling in high grade astrocytomas treated with radiotherapy. **J. Neurooncol.**, v. 46, n. 1, p. 71-80, 2000.
- KIRLA, R.M.; HAAPASALO, H.K.; KALIMO, H.; SALMINEN, E.K. Low expression of p27 indicates a poor prognosis in patients with high-grade astrocytomas. **Cancer**, v. 97, n. 3, p. 644-648, 2003.
- KITANGE, G.J.; SMITH, J.S.; JENKINS, R.B. Genetic alterations and chemotherapeutic response in human diffuse gliomas. **Expert Rev. Anticancer Ther.**, v. 1, n. 4, p. 595-605, 2001.
- KLEIHUES, P.; OHGAKI, H. Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. **Neuro-oncol.**, v. 1, n. 1, p. 44-51, 1999.
- KLEIHUES, P.; CAVENEE, W.K. (Eds.) **World Health Organization classification of tumours: pathology and genetics of tumours of the central nervous system.** Lyon: IARC Press, 2000.
- KLEIHUES, P.; LOUIS, D.N.; SCHEITHAUER, B.W.; RORKE, L.B.; REIFENBERGER, G.; BURGER, P.C.; CAVENEE, W.K. The WHO classification of tumours of the nervous system. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, v. 61, n. 3, p. 215-225, 2002.
- KNIES-BAMFORTH, U.E.; FOX, S.B.; POULSOM, R.; EVAN, G.I.; HARRIS, A.L. c-Myc interacts with hypoxia to induce angiogenesis in vivo by a vascular endothelial growth factor-dependent mechanism. **Cancer Res.**, v. 64, n.18, p. 6563-6570, 2004.
- KOKA, V.; POTTI, A.; FORSEEN, S.E.; PERVEZ, H.; FRAIMAN, G.N.; KOCH, M.; LEVITT, R. Role of Her-2/neu overexpression and clinical determinants of early mortality in glioblastoma multiforme. **Am. J. Clin. Oncol.**, v. 26, n. 4, p. 332-335, 2003.
- KOMINE, C.; WATANABE, T.; KATAYAMA, Y.; YOSHINO, A.; YOKOYAMA, T.; FUKUSHIMA, T. Promoter hypermethylation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase is an independent predictor of shortened progression free survival in patients with low-grade diffuse astrocytomas. **Brain Pathol.**, v. 13, n. 2, p. 176-184, 2003.
- KORDEK, R.; BIERNAT, W.; ALWASIAK, J.; MACULEWICZ, R.; YNAGIHARA, R.; LIBERSKI, P.P. p53 protein and epidermal growth factor receptor expression in human astrocytomas. **J. Neurooncol.**, v. 26, n. 1, p. 11-16, 1995.

- KORDEK, R.; BIERNAT, W.; DEBIEC-RYCHTER, M.; ALWASIAK, J.; LIBERSKI, P.P. Comparative evaluation of p53-protein expression and the PCNA and Ki-67 proliferating cell indices in human astrocytomas. **Pathol. Res. Pract.**, v. 192, n. 3, p. 205-209, 1996.
- KORKOLOPOULOU, P.; PATSOURIS, E.; KONSTANTINIDOU, A.E.; CHRISTODOULOU, P.; THOMAS-TSAGLI, E.; KOUZELIS, K.; ANGELIDAKIS, D.; ROLOGIS, D.; DAVARIS, P. Mitosin and DNA topoisomerase IIalpha: two novel proliferation markers in the prognostication of diffuse astrocytoma patient survival. **Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.**, v. 9, n. 3, p. 207-214, 2001.
- KORSHUNOV, A.; GOLANOV, A.; SYCHEVA, R. Immunohistochemical markers for prognosis of anaplastic astrocytomas. **J. Neuro-Oncol.**, v. 58, p. 203-215, 2002.
- KRAJEWSKI, S.; KRAJEWSKA, M.; EHRMANN, J.; SIKORSKA, M.; LACH, B.; CHATTEN, J.; REED, J.C. Immunohistochemical analysis of Bcl-2, Bcl-X, Mcl-1, and Bax in tumors of central and peripheral nervous system origin. **Am. J. Pathol.**, v. 150, n. 3, p. 805-814, 1997.
- KRAUS, J.A.; WENGHOEFER, M.; GLESMANN, N.; MOHR, S.; BECK, M.; SCHMIDT, M.C.; SCHRODER, R.; BERWEILER, U.; ROGGENDORF, W.; DIETE, S.; DIETZMANN, K.; HEUSER, K.; MULLER, B.; FIMMERS, R.; VON DEIMLING, A.; SCHLEGEL, U. TP53 gene mutations, nuclear p53 accumulation, expression of Waf/p21, Bcl-2, and CD95 (APO-1/Fas) proteins are not prognostic factors in de novo glioblastoma multiforme. **J. Neurooncol.**, v. 52, n. 3, p. 263-272, 2001.
- KUAN, C.T.; WIKSTRAND, C.J.; BIGNER, D.D. EGFRvIII as a promising target for antibody-based brain tumor therapy. **Brain Tumor Pathol.**, v. 17, n. 2, p. 71-78, 2000.
- KUFE, D.W.; POLLOCK, R.E.; WEICHSELBAUM, R.R.; BAST JR., R.C.; GANSLER, T.S.; HOLLAND, J.F.; FREI III, E. (Eds.) **Holland & Frei Cancer Medicine**. 6<sup>th</sup> ed., Ontario: Hamilton, 2003.
- LANDBERG, G.; ROSS, G. Proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 antigen expression in human haematopoietic cells during growth stimulation and differentiation. **Cell Prolif.**, v. 26, p. 427-437, 1993.
- LANE, D.P. p53 guardian of the genome. **Nature**, v. 358, p. 15-16, 1992.
- LANG, F.F.; MILLER, D.C.; KOSLOW, M.; NEWCOMB, E.W. Pathways leading to glioblastoma multiforme: a molecular analysis of genetic alterations in 65 astrocytic tumors. **J. Neurosurg.**, v. 81, n. 3, p. 427-436, 1994.
- LANTOS, P.L.; ROSENBLUM, M.K.; KLEIHUES, P. Tumours of the nervous system. In: **Greenfield's Neuropathology**. vol. 2, 7<sup>th</sup> ed., Glasgow: Arnold Publishers, 2002.
- LARSEN, A.K.; ESCARGUEIL, A.E.; SKLADANOWSKI, A. Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy. **Pharmacol. Ther.**, v. 99, n. 2, p. 167-181, 2003.
- LIBERMANN, T.A.; NUSBAUM, H.R.; RAZON, N.; KRIS, R.; LAX, I.; SOREQ, H.; WHITTLE, N.; WATERFIELD, M.D.; ULLRICH, A.; SCHLESSINGER, J. Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumours of glial origin. **Nature**, v. 313, n. 5998, p. 144-147, 1985.
- LIU, Y.; NG, K.; LILLEHEI, K.O. Cell-mediated immunotherapy: a new approach to the treatment of malignant gliomas. **Cancer Control**, v. 10, n. 2, p. 138-147, 2003.

- LLOYD, R.V.; ERICKSON, L.A.; JIN, L.; KULIG, E.; QIAN, X.; CHEVILLE, J.C.; SCHEITHAUER, B.W. p27kip1: a multifunctional cyclin-dependent kinase inhibitor with prognostic significance in human cancers. **Am. J. Pathol.**, v. 154, n. 2, p. 313-323, 1999.
- LONGLEY, D.B.; HARKIN, D.P.; JOHNSTON, P.G. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. **Nat. Rev. Cancer**, v. 3, n. 5, p. 330-338, 2003.
- LOUIS, D.N.; VON DEIMLING, A.; CHUNG, R.Y.; RUBIO, M.P.; WHALEY, J.M.; EIBL, R.H.; OHGAKI, H.; WIESTLER, O.D.; THOR, A.D.; SEIZINGER, B.R. Comparative study of p53 gene and protein alterations in human astrocytic tumors. **J Neuropathol. Exp. Neurol.**, v. 52, n. 1, p. 31-38, 1993.
- LOUIS, D.N.; GUSELLA, J.F. A tiger behind many doors: multiple genetic pathways to malignant gliomas. **Trends Genet.**, v. 11, n. 10, p. 412-415, 1995.
- LOUIS, D.N. A molecular genetic model of astrocytoma histopathology. **Brain Pathol.**, v. 7, p. 755-764, 1997.
- LOUIS, D.N.; CAVENEE, W.K. Neoplasms of the central nervous system. In: **Cancer: principles and practice of oncology**. 5<sup>th</sup>. ed., Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1997.
- LOUIS, D.N.; POMEROY, S.L.; CAIRNCROSS, J.G. Focus on central nervous system neoplasia. **Cancer Cell**, v. 1, p.125-128, 2002.
- LOURO, I.D.; LLERENA-JUNIOR, J.C.; VIEIRA DE MELO, M.S.; ASTHON-PROLLA, P.; CONFORTI-FRÓES, N. (Eds.) **Genética molecular do câncer**. 2<sup>a</sup>. ed., São Paulo: MSG Produção Editorial, 2002.
- LUTZ, W.; LEON, J.; EILERS, M. Contributions of Myc to tumorigenesis. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1602, n. 1, p. 61-71, 2002.
- MacLEOD, K. Tumor suppressor genes. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v. 10, p. 81-93, 2000.
- MALUMBRES, M.; BARBACID, M. RAS oncogenes: the first 30 years. **Nat. Rev., Cancer**, v. 3, p. 7-13, 2003.
- MALUMBRES, M.; BARBACID, M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. **Nat. Rev., Cancer**, v. 1, p. 222-231, 2001.
- MARGISON, G.P.; POVEY, A.C.; KAINA, B.; SANTIBÁÑEZ KOREF, M.F. Variability and regulation of O6-alkylguanine-DNA-alkyltransferase. **Carcinogenesis**, v. 24, n. 4, p. 625-635, 2003.
- MARIANI, S.M. Cancer and the immune response: improving the odds. Highlights from the 90<sup>th</sup> Meeting of the American Association of Immunologists; May 6-10, 2003; Denver, Colorado. **MedGenMed.**, v. 5, n. 2, article 457158, 2003.
- MARSHALL, C. How do small GTPase signal transduction pathway regulate cell cycle entry? **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 11, p. 732-736, 1999.
- MARTIN, S.; TOQUET, C.; OLIVER, L.; CARTRON, P.F.; PERRIN, P.; MEFLAH, K.; CUIILLERE, P.; VALLETTE, F.M. Expression of bcl-2, bax and bcl-xl in human gliomas: a re-appraisal. **J. Neurooncol.**, v. 52, n. 2, p. 129-139, 2001.



- MASHIYAMA, S.; MURAKAMI, Y.; YOSHIMOTO, T.; SEKIYA, T.; HAYASHI, K. Detection of p53 gene mutations in human brain tumors by single-strand conformation polymorphism analysis of polymerase chain reaction products. **Oncogene**, v. 6, n. 8, p. 1313-1318, 1991.
- MATTERN, J.; VOLM, M. Prediction of drug resistance in human tumors using immunohistochemical techniques. **Anticancer Res.**, v. 12, n. 2, p. 413-418, 1992.
- McCARTY, K.S. Jr.; MILLER, L.S.; COX, E.B.; KONRATH, J.; McCARTY, K.S. Sr. Estrogen receptor analyses. Correlation of biochemical and immunohistochemical methods using monoclonal antireceptor antibodies. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v. 109, n. 8, p. 716-721, 1985.
- McKEEVER, P.E.; STRAWDERMAN, M.S.; YAMINI, B.; MIKHAIL, A.A.; BLAIVAS, M. MIB-1 proliferation index predicts survival among patients with grade II astrocytoma. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, v. 57, n. 10, p. 931-936, 1998.
- MELKOUMIAN, Z.K.; MARTIROSYAN, A.R.; STROBL, J.S. Myc protein is differentially sensitive to quinidine in tumor versus immortalized breast epithelial cell lines. **Int. J. Cancer**, n. 102, v. 1, p. 60-69, 2002.
- MENARD, S.; CASALINI, P.; CAMPIGLIO, M.; PUPA, S.M.; TAGLIABUE, E. Role of HER2/neu in tumor progression and therapy. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 61, n. 23, p. 2965-2978, 2004.
- MENDELSON, J.; BASELGA, J. The EGF receptor family as targets for cancer therapy. **Oncogene**, v. 19, p. 6550-6565, 2000.
- MICHIELI, P.; CHEDID, M.; LIN, D.; PIERCE, J.H.; MERCER, W.E.; GIVOL, D. Induction of WAF1/CIP1 by a p53-independent pathway. **Cancer Res.**, v. 54, n. 13, p. 3391-3395, 1994.
- MIRRA, A.P.; LATORRE, M.R.D.O.; VENEZIANO, D.B. (Eds.) **Incidência de câncer no município de São Paulo, Brasil 1997-1998. Mortalidade de câncer no município de São Paulo, Brasil. Tendência no período de 1969-1998.** Brasília: Ministério da Saúde/Brasil, 2001.
- MIZUMATSU, S.; TAMIYA, T.; ONO, Y.; ABE, T.; MATSUMOTO, K.; FURUTA, T.; OHMOTO, T. Expression of cell cycle regulator p27Kip1 is correlated with survival of patients with astrocytoma. **Clin Cancer Res.**, v. 5, n. 3, p. 551-557, 1999.
- MONTINE, T.J.; VANDERSTEENHOVEN, J.J.; AGUZZI, A.; BOYKO, O.B.; DODGE, R.K.; KERNS, B.J.; BURGER, P.C. Prognostic significance of Ki-67 proliferation index in supratentorial fibrillary astrocytic neoplasms. **Neurosurgery**, v. 34, n. 4, p. 674-679, 1994.
- NAGANE, M.; SHIBUI, S.; OYAMA, H.; ASAI, A.; KUCHINO, Y.; NOMURA, K. Investigation of chemoresistance-related genes mRNA expression for selecting anticancer agents in successful adjuvant chemotherapy for a case of recurrent glioblastoma. **Surg. Neurol.**, v. 44, n. 5, p. 462-468, 1995.
- NAGANE, M.; ASAI, A.; SHIBUI, S.; OYAMA, H.; NOMURA, K.; KUCHINO, Y. Expression pattern of chemoresistance-related genes in human malignant brain tumors: a working knowledge for proper selection of anticancer drugs. **Jpn. J. Clin. Oncol.**, v. 29, n. 11, p. 527-534, 1999.
- NAKAMURA, M.; WATANABE, T.; YONEKAWA, Y.; KLEIHUES, P.; OHGAKI, H. Promoter methylation of the DNA repair gene MGMT in astrocytomas is frequently associated with G:C --> A:T mutations of the TP53 tumor suppressor gene. **Carcinogenesis**, v. 22, n. 10, p. 1715-1719, 2001.

- NAYAK, A.; RALTE, A.M.; SHARMA, M.C.; SINGH, V.P.; MAHAPATRA, A.K.; MEHTA, V.S.; SARKAR, C. p53 protein alterations in adult astrocytic tumors and oligodendrogliomas. **Neurol. India**, v. 52, n. 2, p. 228-232, 2004.
- NEDER, L.; COLLI, B.O.; MACHADO, H.R.; CARLOTTI Jr., C.G.; SANTOS, A.C.; CHIMELLI, L. MIB-1 labeling index in astrocytic tumors--a clinicopathologic study. **Clin. Neuropathol.**, v. 23, n. 6, p. 262-270, 2004.
- NEWCOMB, E.W.; COHEN, H.; LEE, S.R.; BHALLA, S.K.; BLOOM, J.; HAYES, R.L.; MILLER, D.C. Survival of patients with glioblastoma multiforme is not influenced by altered expression of p16, p53, EGFR, MDM2 or Bcl-2 genes. **Brain Pathol.**, v. 8, n. 4, p. 655-667, 1998.
- NOWELL, P.C. The clonal evolution of tumor cell populations. **Science**, v. 194, n. 4260, p. 23-28, 1976.
- NUTT, C.L.; NOBLE, M.; CHAMBERS, A.F.; CAIRNCROSS, J.G. Differential expression of drug resistance genes and chemosensitivity in glial cell lineages correlate with differential response of oligodendrogliomas and astrocytomas to chemotherapy. **Cancer Res.**, v. 60, n. 17, p. 4812-4818, 2000.
- NWOKEDI, E.C.; DIBIASE, S.J.; JABBOUR, S.; HERMAN, J.; AMIN, P.; CHIN, L.S. Gamma knife stereotactic radiosurgery for patients with glioblastoma multiforme. **Neurosurgery**, v. 50, n. 1, p. 41-46; discussion 46-7, 2002.
- OHE, N.; SAIO, M.; KIJIMA, M.; TAMAKAWA, N.; SUWA, T.; KOJIMA, Y.; YANO, H.; KAKU, Y.; IWAMA, T.; SHINODA, J.; SAKAI, N.; TAKAMI, T. In situ detection of O6-methylguanine-DNA methyltransferase messenger RNA in paraffin-embedded human astrocytic tumor tissues by nested in situ RT-PCR is useful in predicting chemotherapy-resistance of tumors. **Int. J. Oncol.**, v. 22, n. 3, p. 543-549, 2003.
- ONDA, K.; DAVIS, R.L.; SHIBUYA, M.; WILSON, C.B.; HOSHINO, T. Correlation between the bromodeoxyuridine labeling index and the MIB-1 and Ki-67 proliferating cell indices in cerebral gliomas. **Cancer**, v. 74, n. 7, p. 1921-1926, 1994.
- ONO, Y.; TAMIYA, T.; ICHIKAWA, T.; MATSUMOTO, K.; FURUTA, T.; OHMOTO, T.; AKIYAMA, K.; SEKI, S.; UEKI, K.; LOUIS, D.N. Accumulation of wild-type p53 in astrocytomas is associated with increased p21 expression. **Acta Neuropathol. (Berl.)**, v. 94, n. 1, p. 21-27, 1997.
- ORIAN, J.M.; VASILOPOULOS, K.; YOSHIDA, S.; KAYE, A.H.; CHOW, C.W.; GONZALES, M.F. Overexpression of multiple oncogenes related to histological grade of astrocytic glioma. **Br. J. Cancer**, v. 66, n. 1, p. 106-112, 1992.
- PARDO, F.S.; HSU, D.W.; ZEHEB, R.; EFIRD, J.T.; OKUNIEFF, P.G.; MALKIN, D.M. Mutant, wild type, or overall p53 expression: freedom from clinical progression in tumours of astrocytic lineage. **Br. J. Cancer**, v. 91, n. 9, p. 1678-86, 2004.
- PARK, K.H.; LEE, J.; YOO, C.G.; KIM, Y.W.; HAN, S.K.; SHIM, Y.S.; KIM, S.K.; WANG, K.C.; CHO, B.K.; LEE, C.T. Application of p27 gene therapy for human malignant glioma potentiated by using mutant p27. **J. Neurosurg.**, v. 101, n. 3, p. 505-510, 2004.
- PATT, S.; GRIES, I.I.; GIRALDO, M.; CERVOS-NAVARRO, J.; MARTIN, H.; JANISCH, W.; BROCKMOLLER, J. p53 gene mutations in human astrocytic brain tumors including pilocytic astrocytomas. **Hum. Pathol.**, v. 27, n. 6, p. 586-589, 1996.

- PEKMEZOVIC, T.; JAREBINSKI, M.; PAVLOVIC, M. Epidemiology of central nervous system tumours. **Arch. Oncol.**, v. 10, n. 3, p. 177-178, 2002.
- PELENGARIS, S.; KHAN, M.; EVAN, G. c-Myc: more than just a matter of life and death. **Nat. Rev. Cancer**, v. 2, n. 10, p. 764-776, 2002.
- PETERS, G.J.; BACKUS, H.H.; FREEMANTLE, S.; VAN TRIEST, B.; CODACCI-PISANELLI, G.; VAN DER WILT, C.L.; SMID, K.; LUNEC, J.; CALVERT, A.H.; MARSH, S.; MCLEOD, H.L.; BLOEMENA, E.; MEIJER, S.; JANSEN, G.; VAN GROENINGEN, C.J.; PINEDO, H.M. Induction of thymidylate synthase as a 5-fluorouracil resistance mechanism. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1587, n. 2-3, p. 194-205, 2002.
- PIVA, R.; CAVALLA, P.; BORTOLOTTI, S.; CORDERA, S.; RICHIARDI, P.; SCHIFFER, D. p27/kip1 expression in human astrocytic gliomas. **Neurosci. Lett.**, v. 234, n. 2-3, p. 127-130, 1997.
- POLLACK, I.F.; HAMILTON, R.L.; BURNHAM, J.; HOLMES, E.J.; FINKELSTEIN, S.D.; SPOSTO, R.; YATES, A.J.; BOYETT, J.M.; FINLAY, J.L. Impact of proliferation index on outcome in childhood malignant gliomas: results in a multi-institutional cohort. **Neurosurgery**, v. 50, n. 6, p. 1238-1244, 2002.
- POTTI, A.; FORSEEN, S.E.; KOKA, V.K.; PERVEZ, H.; KOCH, M.; FRAIMAN, G.; MEHDI, S.A.; LEVITT, R. Determination of HER-2/neu overexpression and clinical predictors of survival in a cohort of 347 patients with primary malignant brain tumors. **Cancer Invest.**, v. 22, n. 4, p. 537-544, 2004.
- RABENHORST S.H.B.; BURINI, R.C.; SCHIMITT, F.C.L. Ciclo celular: mecanismos reguladores e marcadores bioquímicos. **Rev. Bras. Cancerol.**, v. 40, n. 3, p. 141-147, 1994.
- RAGHAVAN, R.; STEART, P.V.; WELLER, R.O. Cell proliferation patterns in the diagnosis of astrocytomas, anaplastic astrocytomas and glioblastoma multiforme: a Ki-67 study. **Neuropathol. Appl. Neurobiol.**, v. 16, n. 2, p. 123-133, 1990.
- RALTE, A.M.; SHARMA, M.C.; KARAK, A.K.; MEHTA, V.S.; SARKAR, C. Clinicopathological features, MIB-1 labeling index and apoptotic index in recurrent astrocytic tumors. **Pathol. Oncol. Res.**, v. 7, n. 4, p. 267-278, 2001.
- RASHEED, B.K.; MCLENDON, R.E.; HERNDON, J.E.; FRIEDMAN, H.S.; FRIEDMAN, A.H.; BIGNER, D.D.; BIGNER, S.H. Alterations of the TP53 gene in human gliomas. **Cancer Res.**, v. 54, n. 5, p. 1324-1330, 1994.
- RIEGER, L.; WELLER, M.; BORNEMANN, A.; SCHABET, M.; DICHGANS, J.; MEYERMANN, R. BCL-2 family protein expression in human malignant glioma: a clinical-pathological correlative study. **J. Neurol. Sci.**, v. 155, n. 1, p. 69-75, 1998.
- RINGBORG, U.; PLATZ, A. Chemotherapy resistance mechanisms. **Acta Oncol.**, v. 35, suppl. 5, p. 76-80, 1996.
- ROSS, J.S.; YANG, F.; KALLAKURY, B.V.; SHEEHAN, C.E.; AMBROS, R.A.; MURACA, P.J. HER-2/neu oncogene amplification by fluorescence *in situ* hybridization in epithelial tumors of the ovary. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 111, n. 3, p. 311-316, 1999.
- ROUS, P. Transmission of a malignant new growth by means of a cell-free filtrate. **JAMA**, v. 56, p.198, 1911.

- ROYDS, J.A.; SHARRARD, R.M.; WAGNER, B.; POLACARZ, S.V. Cellular localization of c-myc product in human colorectal epithelial neoplasia. **J. Pathol.**, v. 166, n. 3, p. 225-233, 1992.
- RUBIO, M.P.; VON DEIMLING, A.; YANDELL, D.W.; WIESTLER, O.D.; GUSELLA, J.F.; LOUIS, D.N. Accumulation of wild type p53 protein in human astrocytomas. **Cancer Res.**, v. 53, n. 15, p. 3465-3467, 1993.
- RUTKA, J.T.; MURAKAMI, M.; DIRKS, P.B.; HUBBARD, S.L.; BECKER, L.E.; FUKUYAMA, K.; JUNG, S.; TSUGU, A.; MATSUZAWA, K. Role of glial filaments in cells and tumors of glial origin: a review. **J Neurosurg.**, v. 67, p. 420-430, 1997.
- SALLINEN, P. **Quantitative pathology in astrocytic tumors: special reference to image analysis and proliferation capacity of cancer cells.** 1999. 70 f. Academic Dissertation, University of Tampere, Finland, 1999.
- SANDHU, C.; SLINGERLAND, J. Deregulation of the cell cycle in cancer. **Cancer Detec. Prev.**, v. 2, n. 2, p. 107-118, 2000.
- SARKAR, C.; SINHA, S.; SHARMA, M.C.; KUMAR, R.; MEHTA, V.S. Supratentorial glioblastoma in adults: identification of subsets and their clinical correlation. **Brain Tumor Pathol.**, v. 24, n. 1, p. 7-12, 2004.
- SASANO, H.; NAGURA, H.; SILVERBERG, S.G. Immunolocalization of c-myc oncoprotein in mucinous and serous adenocarcinomas of the ovary. **Hum. Pathol.**, v. 25, n. 5, p. 491-495, 1992.
- SATOH, M.; SASHIMA, M.; HATAKEYAMA, S.; YOSHIMURA, N.; OTSU, T.; SUZUKI, A. Immunohistochemical localization of c-myc oncogene product in oral papilloma. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 21, n. 3, p. 97-99, 1992.
- SCHIFFER, D.; CHIO, A.; GIORDANA, M.T.; LEONE, M.; SOFFIETTI, R. Prognostic value of histologic factors in adult cerebral astrocytoma. **Cancer**, v. 61, n. 7, p. 1386-1393, 1988.
- SCHOBER, R.; BLZER, T.; WAHA, A.; REIFENBERGER, G.; WECHSLER, W.; VON DEIMLING, A.; WIESTLER, O.D.; WESTPHAL, M.; KEMSHEAD, J.T.; VEGA, F. The epidermal growth factor receptor in glioblastoma: genomic amplification, protein expression, and patient survival data in a therapeutic trial. **Clin. Neuropathol.**, v. 14, n. 3, p. 169-174, 1995.
- SCHOTTENFELD, D.; BEEBE-DIMMER, J.L. Advances in cancer epidemiology: understanding causal mechanisms and the evidence for implementing interventions. **Annu. Rev. Public Health**, n.26, p. 37-60, 2005.
- SCHWECHHEIMER, K.; LAUFLE, R.M.; SCHMAHL, W.; KNODLSEDER, M.; FISCHER, H.; HOFLE, H. Expression of neu/c-erbB-2 in human brain tumors. **Hum. Pathol.**, v. 25, n. 8, p. 772-780, 1994.
- SEBTI, S.M. Blocked pathways: FTIs shut down oncogene signals. **The Oncologist**, v. 8, suppl. 3, p. 30-38, 2003.
- SHAPIRO, W.R.; GREEN, S.B.; BURGER, P.C.; SELKER, R.G.; VANGILDER, J.C.; ROBERTSON, J.T.; MEALEY Jr., J.; RANSOHOFF, J.; MAHALEY Jr., M.S. A randomized comparison of intra-arterial versus intravenous BCNU, with or without intravenous 5-fluorouracil, for newly diagnosed patients with malignant glioma. **J. Neurosurg.**, v. 76, n. 5, p. 772-781, 1992.

- SHAPIRO, G.I. Preclinical and clinical development of the cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol. **Clin. Cancer. Res.**, v. 10, n. 12/2, p. 4270s-4275s, 2004.
- SHEINESS, D.; BISHOP, J.M. DNA and RNA from uninfected vertebrate cells contain nucleotide sequences related to the putative transforming gene of avian myelocytomatosis virus. **J. Virol.**, v. 31, p. 514-521, 1979.
- SHI, S-R.; COTE, R.J.; TAYLOR, C.R. Antigen retrieval techniques: current perspectives. **J. Histochem. Citochem.**, v. 48, n. 8, p. 931-937, 2001.
- SHINOJIMA, N.; TADA, K.; SHIRAISHI, S.; KAMIRYO, T.; KOCHI, M.; NAKAMURA, H.; MAKINO, K.; SAYA, H.; HIRANO, H.; KURATSU, J.; OKA, K.; ISHIMARU, Y.; USHIO, Y. Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme. **Cancer. Res.**, v. 63, n. 20, p. 6962-6970, 2003.
- SILBER, J.R.; MUELLER, B.A.; EWERS, T.G.; BERGER, M.S. Comparison of O6-methylguanine-DNA methyltransferase activity in brain tumors and adjacent normal brain. **Cancer Res.**, v. 53, n. 14, p. 3416-3420, 1993.
- SIMMONS, M.L.; LAMBORN, K.R.; TAKAHASHI, M.; CHEN, P.; ISRAEL, M.A.; BERGER, M.S.; GODFREY, T.; NIGRO, J.; PRADOS, M.; CHANG, S.; BARKER, F.G. 2<sup>nd</sup>; ALDAPE, K. Analysis of complex relationships between age, p53, epidermal growth factor receptor, and survival in glioblastoma patients. **Cancer Res.**, v. 61, p. 1122-1128, 2001.
- SPOTTS, G.D.; PATEL, S.V.; XIAO, Q.; HANN, S.R. Identification of downstream-initiated c-myc proteins which are dominant-negative inhibitors of transactivation by full length c-Myc proteins. **Mol. Cell. Biol.**, v.17, p. 1459-1468, 1997.
- STEA, B.; FALSEY, R.; KISLIN, K.; PATEL, J.; GLANZBERG, H.; CAREY, S.; AMBRAD, A.A.; MEUILLET, E.J.; MARTINEZ, J.D. Time and dose-dependent radiosensitization of the glioblastoma multiforme U251 cells by the EGF receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1839 ('Iressa'). **Cancer Lett.**, v. 202, n. 1, p. 43-51, 2003.
- STEINMAN, R.A.; HOFFMAN, B.; IRO, A.; GUILLOUF, C.; LIEBERMANN, D.A.; EL-HOUSEINI, M.E. Induction of p21 (WAF-1/CIP1) during differentiation. **Oncogene**, v. 9, n. 11, p. 3389-3396, 1994.
- STEMMER-RACHAMIMOV, A.O.; LOUIS, D.N. Histopathologic and immunohistochemical prognostic factors in malignant gliomas. **Curr. Opin. Oncol.**, v. 9, p. 230-234, 1997.
- STEWART, D.J.; DAHROUGE, S.; SOLTYS, K. A phase II study of 5-fluorouracil plus folinic acid in malignant gliomas in adults. **J. Neurooncol.**, v. 23, n. 3, p. 249-252, 1995.
- STRIK, H.; DEININGER, M.; STREFFER, J.; GROTE, E.; WICKBOLDT, J.; DICHGANS, J.; WELLER, M.; MEYERMANN, R. BCL-2 family protein expression in initial and recurrent glioblastomas: modulation by radiochemotherapy. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry**, v. 67, n. 6, p.763-768, 1999.
- STUPP, R.; REGG, C. New drugs and combinations for malignant glioma. **Forum (Genova)**, v. 13, n. 1, p. 61-75, 2003.
- SUN, Y.H.; ZHANG, Y.Z.; WANG, Z.C.; SUN, M.Z.; ZHAO, D.H. Relationship between the expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in glioma and the survival time of patients. **Ai Zheng**, v. 23, n. 9, p. 1052-1055, 2004.

- TAILLIBERT, S.; PEDRETTI, M.; SANSON, M. Current classification of gliomas. **Presse Med.**, v. 33, n. 18, p. 1274-1277, 2004.
- TANAKA, S.; KAMITANI, H.; AMIN, M.R.; WATANABE, T.; OKA, H.; FUJII, K.; NAGASHIMA, T.; HORI, T. Preliminary individual adjuvant therapy for gliomas based on the results of molecular biological analyses for drug-resistance genes. **J. Neurooncol.**, v. 46, n. 2, p. 157-171, 2000.
- TANAKA, S.; KOBAYASHI, I.; OKA, H.; FUJII, K.; WATANABE, T.; NAGASHIMA, T.; HORI, T. Drug-resistance gene expression and progression of astrocytic tumors. **Brain Tumor Pathol.**, v. 18, n. 2, p. 131-137, 2001.
- TANIGUCHI, K.; WAKABAYASHI, T.; YOSHIDA, T.; MIZUNO, M.; YOSHIKAWA, K.; KIKUCHI, A.; NAKASHIMA, N.; YOSHIDA, J. Immunohistochemical staining of DNA topoisomerase II $\alpha$  in human gliomas. **J. Neurosurg.**, v. 91, p. 477-482, 1999.
- TAYLOR, C.R.; SHI, S-R.; CHAIWUN, B.; YOUNG, L.; IMAM, S.A.; COTE, R.J. Strategies for improving the Immunohistochemical staining of various intranuclear prognostic markers in formalin-paraffin sections: androgen receptor, estrogen receptor, progesterone receptor, p53 protein, proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 antigen revealed by antigen retrieval techniques. **Hum. Pathol.**, v. 25, n. 3, p. 263-270, 1994.
- THIESING, J.T.; OHNO-JONES, S.; KOLIBABA, K.S.; DRUKER, B.J. Efficacy of STI571, an abl tyrosine kinase inhibitor, in conjunction with other antileukemic agents against bcr-abl-positive cells. **Blood**, v. 96, n. 9, p. 3195-3199, 2000.
- TORSTEN, P. WIESTLER, O.D. Molecular neuropathology of astrocytic brain tumor. **J. Neuro-Oncol.**, v. 35, p. 211-222, 1997.
- TREMONT-LUKATS, I.W.; GILBERT, M.R. Advances in molecular therapies in patients with brain tumors. **Cancer Control**, v. 10, n. 2, p. 125-137, 2003.
- TSUCHIYA, K. Functional restoration of tumor suppressor p53 alters susceptibility of glioblastoma cells to irradiation--analysis using a cell line containing a temperature-sensitive mutant. **Hokkaido Igaku Zasshi**, v. 75, n. 4, p. 265-274, 2000.
- TUZI, N.L.; VENTER, D.J.; KUMAR, S.; STADDON, S.L.; LEMOINE, N.R.; GULLICK, W.J. Expression of growth factor receptor in human brain tumours. **Br. J. Cancer**, v. 63, n. 2, p. 227-233, 1991.
- UEDA, S.; MINETA, T.; NAKAHARA, Y.; OKAMOTO, H.; SHIRAISHI, T.; TABUCHI, K. Induction of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by dexamethasone in glioblastomas. **J. Neurosurg.**, v. 101, n. 4, p. 659-663, 2004.
- VAN TRIEST, B.; PINEDO, H.M.; GIACCONE, G.; PETERS, G.J. Downstream molecular determinants of response to 5-fluorouracil and antifolate thymidylate synthase inhibitors. **Ann. Oncol.**, v. 11, n. 4, p. 385-391, 2000.
- VASSAL, G.; MERLIN, J.L.; TERRIER-LACOMBE, M.J.; GRILL, J.; PARKER, F.; SAINTE-ROSE, C.; AUBERT, G.; MORIZET, J.; SEVENET, N.; POUILLAIN, M.G.; LUCAS, C.; KALIFA, C. In vivo antitumor activity of S16020, a topoisomerase II inhibitor, and doxorubicin against human brain tumor xenografts. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 51, n. 5, p. 385-394, 2003.

- VINTERS, H.V.; FARREL, M.A.; MISCHEL, P.S.; ANDERS, K.H. **Diagnostic neuropathology**. Boston: Marcel Decker, 1998.
- VIRCHOW, R. **Die krankhaften geschwülste**. Berlin: Hirshwald, 1863.
- VON BOSSANYI, P.; DIETE, S.; DIETZMANN, K.; WARICH-KIRCHES, M.; KIRCHES, E. Immunohistochemical expression of P-glycoprotein and glutathione S-transferases in cerebral gliomas and response to chemotherapy. **Acta Neuropathol. (Berl.)**, v. 94, n. 6, p. 605-611, 1997.
- WAHA, A.; BAUMANN, A.; WOLF, H.K.; FIMMERS, R.; NEUMANN, J.; KINDERMANN, D.; ASTRAHANTSEFF, K.; BLUMCKE, I.; VON DEIMLING, A.; SCHLEGEL, U. Lack of prognostic relevance of alterations in the epidermal growth factor receptor-transforming growth factor-alpha pathway in human astrocytic gliomas. **J. Neurosurg.**, v. 84, n. 4, p. 634-641, 1996.
- WAKIMOTO, H.; AOYAGE, M.; NAKAYAMA, T.; NAGASHIMA G.; YMAMOTO, S.; TAMAKI, M.; HIRAKAWA, K. Prognostic labeled significance of Ki-67 labeling indices obtained using MIB-1 monoclonal antibody in patients with supratentorial astrocytomas. **Cancer**, v. 77, n. 2, p. 373 –380, 1996.
- WALKER, J.V.; NITISS, K.C.; JENSEN, L.H.; MAYNE, C.; HU, T.; JENSEN, P.B.; SEHESTED, M.; HSIEH, T.; NITISS, J.L. A mutation in human topoisomerase II alpha whose expression is lethal in DNA repair-deficient yeast cells. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 25, p. 25947-25954, 2004.
- WANG, J.; XIE, L.Y.; ALLAN, S.; BEACH, D.; HANNON, G.J. Myc activates telomerase. **Genes Dev.**, v. 12, n. 12, p. 1769-1774, 1998.
- WATANABE, K.; TACHIBANA, O.; SATA, K.; YONEKAWA, Y.; KLEIHUES, P.; OHGAKI, H. Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. **Brain Pathol.**, v. 6, n. 3, p. 217-223, 1996.
- WATANABE, T.; KATAYAMA, Y.; KOMINE, C.; YOSHINO, A.; OGINO, A.; OHTA, T.; FUKUSHIMA, T. O6-methylguanine-DNA methyltransferase methylation and TP53 mutation in malignant astrocytomas and their relationships with clinical course. **Int. J. Cancer**, v. 113, n. 4, p. 581-587, 2005.
- WIKSTRAND, C.J.; HALE, L.P.; BATRA, S.K.; HILL, M.L.; HUMPHREY, P.A.; KURPAD, S.N.; McLENDON, R.E.; MOSCATELLO, D.; PEGRAM, C.N.; REIST, C.J. Monoclonal antibodies against EGFRvIII are tumor specific and react with breast and lung carcinomas and malignant gliomas. **Cancer Res.**, v. 55, n. 14, p. 3140-3148, 1995.
- WILHELMSSON, U.; ELIASSON, C.; BJERKVIG, R.; PEKNY, M. Loss of GFAP expression in high-grade astrocytomas does not contribute to tumor development or progression. **Oncogene**, v.22, n. 22, p. 3407-3411, 2003.
- WILLIAMS, A.R.; PIRIS, J.; WYLLIE, A.H. Immunohistochemical demonstration of altered intracellular localization of the C-Myc oncogene product in human colorectal neoplasms. **J. Pathol.**, v. 160, n. 4, p. 287-293, 1990.
- WILSTERMANN, A.M.; OSHEROFF, N. Stabilization of eukaryotic topoisomerase II-DNA cleavage complexes. **Curr. Top. Med. Chem.**, v. 3, n. 3, p. 321-338, 2003.
- WOODS, S.A.; MARMOR, E.; FELDKAMP, M.; LAU, N.; APICELLI, A.J.; BOSS, G.; GUTMANN, D.H.; GUHA, A. Aberrant G protein signaling in nervous system tumors. **J. Neurosurg.**, v. 97, n. 3, p. 627-642, 2002.

- WU, J.K.; YE, Z.; DARRAS, B.T. Frequency of p53 tumor suppressor gene mutations in human primary brain tumors. **Neurosurgery**, v. 33, n. 5, p. 824-830, 1993.
- XU, Q.Z.; LIU, F.; LU, D.H.; YU, S.Z.; YANG, H. Expression of P21 WAF1/CIP1 in human astrocytomas in correlating with P53, MDM2, and cellular proliferation index. **Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao**, v. 23, n. 4, p. 341-345, 2001.
- YAMAMOTO, T.; YASUI, W.; OCHIAI, A.; ITO, H.; ABE, K.; YANAIHARA, N.; TAHARA, E. Immunohistochemical detection of c-myc oncogene product in human gastric carcinomas: expression in tumor cells and stromal cells. **Jpn. J. Cancer Res.**, v. 78, n. 11, p. 1169-1174, 1987.
- YANG, H.J.; KIM, J.E.; PAEK, S.H.; CHI, J.G.; JUNG, H.W.; KIM, D.G. The significance of gemistocytes in astrocytoma. **Acta Neurochir. (Wien)**, v. 145, n. 12, p. 1097-1103, 2003.
- YOON, K.S.; LEE, M.C.; KANG, S.S.; KIM, J.H.; JUNG, S.; KIM, Y.J.; LEE, J.H.; AHN, K.Y.; LEE, J.S.; CHEON, J.Y. p53 mutation and epidermal growth factor receptor overexpression in glioblastoma. **J. Korean Med. Sci.**, v. 16, n. 4, p. 481-488, 2001.
- YOSHII, Y.; SAITO, A.; HYODO, A.; TSURUSHIMA, H.; SUN, L. Expression of enzymes and oncogene induced after radiotherapy and/or chemotherapy in patients with brain tumors. **Hum. Cell**, v. 14, n. 1, p. 95-103, 2001.
- YU, S.; PU, P.; JIANG, D.; AN, T.; GUAN, X.; YANG, L. Relationship of bcl-2 gene expression with cell proliferation and apoptosis in human gliomas. **Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi**, v. 29, n. 1, p. 12-15, 2000.
- YUAN, Q.; MATSUMOTO, K.; NAKABEPPU, Y.; IWAKI, T. A comparative immunohistochemistry of O6-methylguanine-DNA methyltransferase and p53 in diffusely infiltrating astrocytomas. **Neuropathology**, v. 23, n. 3, p. 203-209, 2003.
- ZAGZAG, D.; BLANCO, C.; FRIEDLANDER, D.R.; MILLER, D.C.; NEWCOMB, E.W. Expression of p27KIP1 in human gliomas: relationship between tumor grade, proliferation index, and patient survival. **Hum. Pathol.**, v. 34, n. 1, p. 48-53, 2003.
- ZALUTSKY, M.R. Targeted radiotherapy of brain tumours. **Br. J. Cancer**, v. 90, n. 8, p. 1469-1473, 2004.
- ZHANG, Y.; ZHANG, Y.F.; BRYANT, J.; CHARLES, A.; BOADO, R.J.; PARDRIDGE, W.M. Intravenous RNA interference gene therapy targeting the human epidermal growth factor receptor prolongs survival in intracranial brain cancer. **Clin. Cancer. Res.**, v. 10, n. 11, p. 3667-3677, 2004.
- ZHU, C.J.; LI, Y.B.; WONG, M.C. Expression of antisense bcl-2 cDNA abolishes tumorigenicity and enhances chemosensitivity of human malignant glioma cells. **J. Neurosci. Res.**, v. 74, n. 1, p. 60-66, 2003.
- ZÖRNIG, M.; HUEBER, A-O.; BAUM, W.; EVAN, G. Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1551, p. F1-F37, 2001.
- ZÜLCH, K.J. (Ed.) **Histologic typing of tumour of the central nervous system**. Geneva: World Health Organization, 1979.



## **10. ANEXOS**

## ANEXO I

### APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Universidade Federal do Ceará  
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. Nº 121/04

Fortaleza, 29 de março de 2004

Protocolo nº 32/04

**Pesquisador responsável:** Mário Henrique Girão Faria

**Deptº./Serviço:** Departamento de Fisiologia e Farmacologia/UFC

**Título do Projeto:** "Investigação das alterações moleculares nos astrocitomas: vias tumorigênicas, alvos terapêuticos e indicadores de resistência"

Levamos ao conhecimento de V.Sª. que o Comitê de Ética em Pesquisa e do Complexo Hospitalar da Universidade Federal do Ceará – COMEPE, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução nº196 de 10 de outubro de 1996 e Resolução nº 251 de 07 de agosto de 1997, publicadas no Diário Oficial, em 16 de outubro de 1996 e 23 de setembro de 1997, respectivamente, aprovou o projeto supracitado na reunião do dia 25 de março de 2004.

Atenciosamente,

*Mirian Parente Monteiro*

Dra. Mirian Parente Monteiro  
Coordenadora Adjunta do Comitê  
de Ética em Pesquisa  
COMEPE/HUWC/UFC

## ANEXO II

### ORÇAMENTO GERAL

MATERIAL DE CONSUMO	ORIGEM	QUANTIDADE	VALOR (US\$)
Anticorpo monoclonal anti-humano de camundongo para antígeno Ki-67 - clone MIB-1	Immunotech®	1,0mL	468.00
Anticorpo policlonal anti-humano de coelho para oncoproteína c-erbB-2	DakoCytomation®	0,2mL	344.00
Anticorpo monoclonal anti-humano de camundongo para c-myc - clone 9E10.3	Labvision®	1,0mL	500.00
Anticorpo monoclonal anti-humano de camundongo para EGFR - clone H11	DakoCytomation®	1,0mL	756.00
Anticorpo monoclonal anti-humano de camundongo para BCL2 - clone 124	DakoCytomation®	1,0mL	418.00
Anticorpo policlonal anti-humano de coelho para Bax	DakoCytomation®	1,0mL	396.00
Anticorpo monoclonal anti-humano de camundongo para p53 - clone DO-7	DakoCytomation®	1,0mL	364.00
Anticorpo monoclonal anti-humano de camundongo para p27kip1 - clone SX53G8	DakoCytomation®	1,0mL	496.00
Anticorpo monoclonal anti-humano de camundongo para p21WAF1/Cip1 - clone 4D10	Novocastra®	1,0mL	364.00
Anticorpo monoclonal anti-humano de camundongo para p21ras - clone NCC-RAS-001	DakoCytomation®	1,0mL	404.00
Anticorpo monoclonal anti-humano de camundongo para Timidilato Sintase - clone TS106	Chemicon®	0,2mL	680.00
Anticorpo monoclonal anti-humano de camundongo para MGMT - clone MT3.1	DakoCytomation®	1,0mL	426.00
Anticorpo monoclonal anti-humano de camundongo para Topoisomerase IIa - clone Ki-S1	DakoCytomation®	1,0mL	488.00
Anticorpo monoclonal anti-humano de camundongo para GSTpi - clone 353-10	DakoCytomation®	1,0mL	436.00
Anticorpo monoclonal anti-humano de camundongo para GFAP - clone 6F2	DakoCytomation®	1,0mL	340.00
Kit Dako LSAB+, peroxidase-universal	DakoCytomation®	2	904.00
Kit DAB+ líquido	DakoCytomation®	1	122.00
Caneta para Imuno-Histoquímica	DakoCytomation®	2	160.00
Ácido Cítrico	Sigma®	1,0Kg	8.00
Tris	Sigma®	1,0Kg	216.00
Cloreto de Sódio	Synth®	2,0Kg	6.00
Álcool Etílico 95%	Synth®	50,0L	140.00
Xileno	Dinâmica®	50,0L	204.00
Ácido Clorídrico	Synth®	1,0L	6.00
Acetona	Dinâmica®	5,0L	39.00
Silano	Sigma®	200,0mL	413.80
Peróxido de Hidrogênio 30vol	Dinâmica®	5,0L	33.00
Albumina Bovina (BSA)	Sigma®	100,0g	871.00
Hematoxilina	Nuclear®	30,0g	174.00
Lâminas	Bioglass®	1500	58.50
Lamínulas 24X32mm	Perfecta®	1500	46.80
Bálsamo do Canadá	QEL®	300,0mL	28.80
Gastos Gerais			400.00
<b>TOTAL</b>			<b>10,710.90</b>

## ANEXO III

### FONTES DE FINANCIAMENTO

<b>FUNTE DE FINANCIAMENTO</b>	<b>VALOR (US\$)</b>
Laboratório de Genética Molecular – LABGEM / UFC	3,870.80
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Processo no. 470424/01-0)	3,188.00
DakoCytomation®, Inc. / BIOGEN®	1,714.00
Recursos Pessoais	1,233.00
Departamento de Patologia e Medicina Legal / UFC	705.10
<b>TOTAL</b>	<b>10,710.90</b>

