

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE p53, p21 (NUCLEAR
E CITOPLASMÁTICO), p27 (NUCLEAR E
CITOPLASMÁTICO), BCLX, BCL2 E EGFR EM
GLIOBLASTOMA E SUA CORRELAÇÃO
COM DADOS CLÍNICOS E COM A SOBREVIDA**

ANDRÉ CAMPANA CORREIA LEITE

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do título de Mestre
em Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. João Victor Salvajoli

Co-orientadora: Dra. Maria Betânia Mahler Araújo

São Paulo

2006

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Leite, André Campana Correia

Avaliação da expressão de p53, p21 (nuclear e citoplasmático), p27 (nuclear e citoplasmático), BCLX, BCL2 e EGFR em glioblastoma e sua correlação com dados clínicos e com a sobrevida / André Campana Correia

Leite -- São Paulo, 2006.

48p.

Dissertação(mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: João Victor Salvajoli

Descritores: 1. GLIOBLASTOMA. 2. APOPTOSES. 3. GENES EGFR. 4. MARCADORES BIOLÓGICOS DE TUMOR. 5. RADIOTERAPIA

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. João Victor Salvajoli, pela orientação e confiança em mim depositadas.

À Dra. Maria Betânia Mahler Araújo, pela ajuda e paciência em me ensinar um pouco da patologia dos tumores do sistema nervoso central.

Ao Prof. Dr. Fernando Soares, diretor do departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A. C. Camargo.

A todos os profissionais do departamento de Radioterapia e de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A. C. Camargo.

À Sra. Cida, secretária do Dr. João Victor Salvajoli, por sua ajuda e paciência.

À bibliotecária Suely Francisco e sua equipe, pelo auxílio na obtenção dos artigos e na formatação desta tese.

À Prof^a Dra. Inês Innshimoto, pelo auxílio da elaboração dos testes estatísticos.

Ao Dr. João Luis Fernandes da Silva, diretor do departamento de radioterapia do Hospital Sírio Libanês e à Dra Cecília Kalil Haddad, chefe da física médica do Hospital Sírio Libanês, pela oportunidade de estágio naquele hospital.

Ao meu tio, Dr. Francisco Alberto Campana, pelo seu importante apoio nesse momento tão importante da minha vida profissional.

Aos meus pais, João Carlos e Maria Regina, por todo amor e carinho.

À minha noiva, Fernanda Palmeira, que soube compreender este momento tão importante para a minha carreira.

A todos os familiares e amigos, que torceram e rezaram pelo sucesso desse desafio profissional.

RESUMO

Leite ACC. **Avaliação da expressão de marcadores de apoptose e EGFR em glioblastoma e sua correlação com dados clínicos.** São Paulo; 2006. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antonio Prudente].

O Glioblastoma Multiforme (GBM) é o principal e o mais agressivo tumor do sistema central. O tratamento padrão consiste em cirurgia e radioterapia pós-operatória. A sobrevida média gira em torno de 12 meses após o diagnóstico. Alguns fatores clínicos como idade, índice de *Karnofsky* (KPS), grau de RPA (*recursive partitioning analysis*) e a extensão da ressecção cirúrgica são classificados como importantes fatores prognósticos. Nos últimos anos, estudos moleculares têm sido realizados para melhor avaliar esses tumores. O objetivo do nosso trabalho é avaliar a expressão das proteínas EGFR, p53, bcl2, bclx, p27, p21 em glioblastoma, relacionando-os com os fatores clínicos e com a sobrevida. Avaliamos retrospectivamente 55 casos de GBM. Todos os pacientes foram operados no Hospital do Câncer - Antônio Cândido Camargo (São Paulo) e todos receberam radioterapia, no período compreendido entre janeiro de 1982 e dezembro de 2003. As informações clínicas dos pacientes (sexo, idade, KPS e RPA) e as características decorrentes do tratamento (extensão da ressecção cirúrgica, dose de radioterapia e uso de quimioterapia) foram obtidas através da revisão de prontuários. Na realização da imunoistoquímica, utilizou-se a técnica de *tissue microarray*. A maioria dos pacientes foi do sexo masculino, com idade média de 50 anos e, na análise das expressões protéicas, apenas o Bclx apresentou uma hiperexpressão. Em relação à sobrevida e aos fatores clínicos, apenas idade acima de 50 anos, grau de RPA maior do que 4 e o uso de quimioterapia influenciaram significativamente na sobrevida. Na análise da sobrevida com as expressões protéicas, apenas a baixa expressão de EGFR e a alta expressão de p27 influenciaram significativamente. Ao avaliarmos a expressão das proteínas com os fatores clínicos, apenas as relações p53 e KPS, p21 no citoplasma e KPS e p21 no núcleo com idade e grau de RPA foram significativas. Nossos achados sugerem que a expressão oncogênica pode ser relacionada com

fatores prognósticos clínicos. No entanto, novos estudos serão necessários para confirmar nossos resultados.

SUMMARY

Leite ACC. **[Avaliation of EGFR and apoptosis markers expression in GB and their correlation with clinical prognostic]**. São Paulo; 2006. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antonio Prudente].

Glioblastomas (GB) are the most common and the most aggressive malignant tumor of the central nervous system. The standard treatment includes surgery and postoperative radiotherapy. However, the results are poor and the majority of the patients still die within a year after the initial diagnosis. Some clinical prognostic factors such as age, preoperative performance status (KPS), Recursive Partitioning Analysis and the extent of resection have already been studied. More recently molecular biology studies have also been done. The aim of this study is to determine the EGFR, p53, bcl2, bclx, p27, p21 expression in glioblastomas and its relation to the clinical prognostic factors. This is a retrospective study and we analyzed 55 patients with GB. All patients were operated at the Hospital do Cancer A. C. Camargo, Sao Paulo, between January 1982 and December 2003 and received radiotherapy. Clinical information (sex, age, KPS and RPA) and treatment characteristics (extent of resection, chemotherapy and total and fraction dose of radiotherapy) were obtained from patient's notes. Immunohistochemistry for EGFR, p53, bcl2, bclx, p27 and p21 was performed using the tissue microarray technology. Most patients were male and the mean age was 50 years. The protein expression was analyzed and only bclx had a high expression. The statistical analyses showed that chemotherapy, age and RPA affect the survival. On the immunohistochemistry evaluation only low expression of EGFR and high expression of p27 affected the survival. When we analyzed protein expression and clinical prognostic factors, a significant correlation is observed between relationship with p53 and KPS, p21 in the cytoplasm and KPS, e p21 in the nucleus and age and RPA was significant. Our data suggest that oncogene expression may be related to clinical prognostic factors. However more studies will be needing to confirm our results.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Classificação histológica dos Gliomas	1
Figura 2	Fotomicrografias de cortes histológicos obtidos de um bloco de TMA com cilindros de 1mm de diâmetro.	18
Figura 3	Expressão positiva de EGFR (pequeno aumento).	19
Figura 4	Expressão positiva de EGFR (grande aumento).	20
Figura 5	Expressão nuclear do p53.	20
Figura 6	Curva de sobrevida.	25
Figura 7	Curva de sobrevida em relação à idade (<i>Kaplan-Meier</i>).	25
Figura 8	Curva de sobrevida em relação ao sexo.	26
Figura 9	Curva de sobrevida em relação à quimioterapia.	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Escala de <i>Karnofsky</i> .	6
Tabela 2	Grau de <i>RPA</i> .	7
Tabela 3	Características clínicas dos pacientes.	15
Tabela 4	Características referentes ao tratamento.	16
Tabela 5	Avaliação do número de casos em relação ao grau de positividade dos marcadores.	22
Tabela 5.1	Avaliação do número de casos em relação ao grau de positividade dos marcadores citoplasmáticos.	22
Tabela 6	Distribuição de frequência dos marcadores de acordo com os pontos de cortes utilizados.	23
Tabela 6.1	Medidas de tendência central e de variabilidade da expressão dos marcadores.	23
Tabela 7	Relação significativa entre a expressão de p53 com sexo e KPS.	24
Tabela 8	Relação significativa entre a expressão de p21 no núcleo com a idade e KPS.	24
Tabela 9	Relação significativa entre a expressão de p21 no citoplasma com KPS.	24
Tabela 10	Relação significativa da sobrevida em relação às características dos pacientes e do tratamento.	27
Tabela 11	Relação significativa da sobrevida em relação à expressão dos anticorpos EGFR e p27 núcleo.	27
Tabela 12	Risco relativo para morte pelo modelo de regressão de cox uni e multivariado.	28

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Astrocitoma Anaplásico
cGy	<i>Centigray</i>
EGFR	Receptor do crescimento epidérmico
GBM	Glioblastoma Multiforme
Gy	<i>Gray</i>
HE	Hematoxilina Eosina
IC	Intervalo de Confiança
IMRT	Radioterapia com modulação da intensidade do feixe
KPS	Índice de performance status de <i>Karnofsky</i>
Na	Anormal
NI	Normal
OMS	Organização Mundial da Saúde
QT	Quimioterapia
RPA	<i>Recursive Partitioning Analysis</i>
RR	Risco Relativo
RT	Radioterapia
RTOG	<i>Radiation Therapy Oncology Group</i>
TMA	Tissue Microarray
MV	Megavolt

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Oncogenes e Genes Supressores envolvidos na Gênese do GBM	8
2	OBJETIVOS	13
3	MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1	Construção do <i>Tissue Microarray</i>	16
3.2	Análise Estatística	21
4	RESULTADOS	22
5	DISCUSSÃO	29
5.1	Oncogenes e Genes Supressores	33
6	CONCLUSÃO	40
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

ANEXOS

Anexo 1 Protocolo de reações - TMA

Anexo 2 Relação da Expressão do EGFR com os fatores prognósticos

Anexo 3 Relação da Expressão do p53 com os fatores prognósticos

Anexo 4 Relação da Expressão do p21 no núcleo com os fatores
prognósticos

Anexo 5 Relação da Expressão do p21 no citoplasma com os fatores
prognósticos

Anexo 6 Relação da Expressão do p27 no núcleo com os fatores
Prognósticos

Anexo 7 Relação da Expressão do p27 no citoplasma com os fatores prognósticos

Anexo 8 Relação da Expressão do bcl2 com os fatores prognósticos

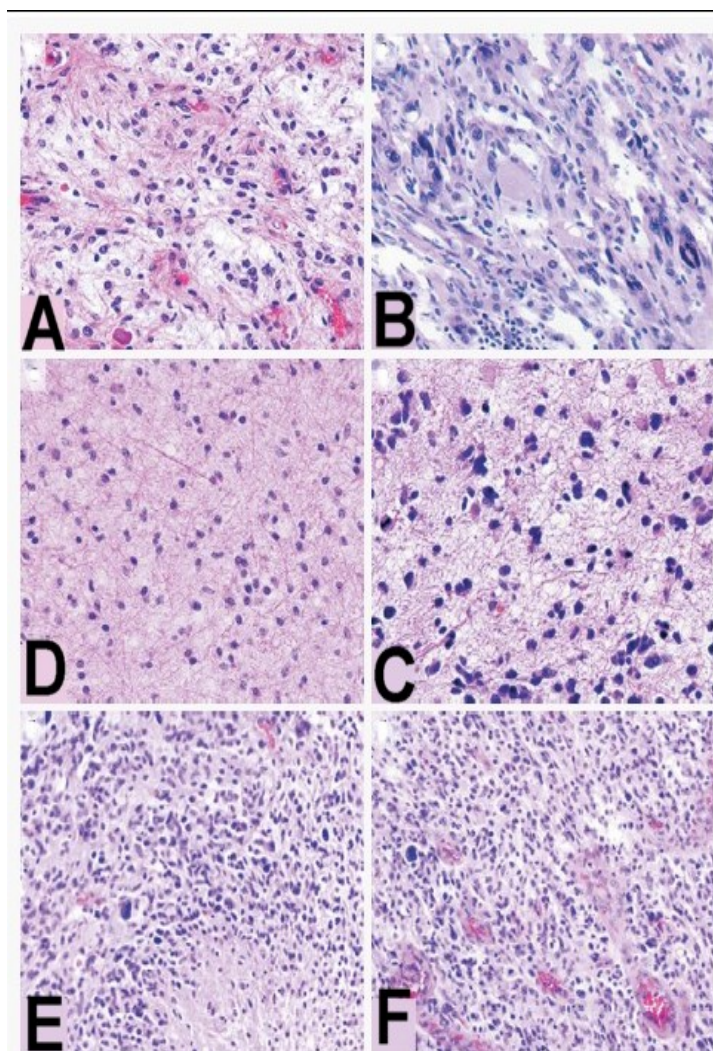
Anexo 9 Relação da Expressão do bclx com os fatores prognósticos

Anexo 10 Sobrevida dos pacientes

Anexo 11 Ficha para coleta de dados

1 INTRODUÇÃO

Os tumores primários do cérebro representam 2% de todos os cânceres em adultos (STUPP e HEGI 2003). Desses, 60% são gliomas malignos, sendo o glioblastoma multiforme (GBM) o de maior frequência. Os gliomas são classificados pela Organização Mundial da Saúde com base no grau de diferenciação. Quanto maior o grau, mais indiferenciado é o glioma (Figura 1).



Legenda -Fotomicrografia A: Glioma Grau 1 (Baixo grau); B e C: Glioma Grau 2 (Baixo grau); D: Glioma Grau 3 (Alto Grau); E e F: Glioma Grau 4 (Alto Grau)

Figura 1 - Classificação histológica dos gliomas.

O glioblastoma multiforme (GBM), classificado como grau quatro, é considerado o de maior letalidade, com sobrevida média em torno de 12 meses a partir do diagnóstico (LACROIX et al. 2001). O GBM manifesta-se em qualquer idade, apresentando maior prevalência e maior incidência entre a quarta e a sétima décadas de vida. A sua localização principal é evidenciada na substância branca subcortical dos hemisférios cerebrais, em particular no lobo temporal (FERRIGNO e SALVAJOLI 1999).

Apesar de sua baixa incidência (2%), os tumores cerebrais possuem uma alta morbidade, trazendo consequências trágicas para a família e para a produção econômica da sociedade. Esse fato ocorre porque esses tumores, na maioria das vezes, atingem o indivíduo adulto em uma faixa etária economicamente ativa, o que, freqüentemente, o impossibilita de desenvolver suas funções profissionais e sociais (FERRIGNO e SALVAJOLI 1999).

Alguns fatores prognósticos como a idade, classificação do desempenho funcional pela escala de *karnofsky* (índice de performance status - KPS), extensão da ressecção tumoral, “*Recursive Partitioning Analysis*” (RPA) e dose de radioterapia vêm sendo avaliados pela literatura mundial e considerados influenciadores da sobrevida (LACROIX et al. 2001).

Analisando 49 pacientes portadores de GBM tratados no Departamento de Radioterapia do Hospital do Câncer A C Camargo entre 1998 e 2003 (dados não publicados), evidenciou-se que a extensão da ressecção tumoral foi o principal fator prognóstico que influenciou na sobrevida. Os pacientes submetidos à ressecção radical da lesão apresentaram uma probabilidade de sobrevida em dois anos de 49,71% contra os 7,36% dos pacientes com ressecção parcial ($p=0,0328$).

Atualmente o tratamento padrão para GBM inclui a ressecção cirúrgica e a radioterapia pós-operatória na dose de 60Gy, administradas em 30 frações, com doses diárias de 2Gy (FERRIGNO e SALVAJOLI 1999, JEREMIC et al. 2003). No entanto, os resultados não são animadores, visto que a sobrevida média é baixa, normalmente em torno de 12 meses. Em virtude desses resultados desanimadores, em uma tentativa de melhorar o prognóstico, foram realizados, na última década, vários estudos alterando-se a forma de tratamento (JEREMIC et al. 2003).

NAKAGAWA et al. (1998) elaboraram um estudo retrospectivo cujo objetivo foi avaliar o impacto de altas doses de radiação na sobrevida dos pacientes com GBM. Foram avaliados 38 pacientes que receberam doses de radiação variando entre 60 a 90Gy. O resultado final permitiu afirmar que não houve alteração na sobrevida e nem no padrão de recorrência com o aumento da dose de prescrição.

CHANG et al. (2003) levantaram a casuística do Hospital M D Anderson e avaliaram a influência do aumento da dose por fração em relação à sobrevida em 59 pacientes tratados com doses de 2,5Gy por fração, mantendo a mesma dose final. Não houve modificação na taxa de sobrevida e a única vantagem desse esquema foi a redução do tempo total do tratamento. O mesmo resultado desanimador foi encontrado em uma revisão de literatura dos trabalhos publicados entre janeiro de 1997 e junho de 2002. A dose por fração variou de 1,2Gy a 2,65Gy, sem alteração na sobrevida (NIEDER et al. 2004).

O uso de partículas pesadas, como os nêutrons, ao invés de fotonterapia (raio X e cobaltoterapia), também foi estudado no tratamento dos pacientes com GBM. A radiação de partículas pesadas tem como característica depositar grande quantidade de energia em uma curta distância (LEHNERT 1999). Diante dessa diferença radiobiológica, KOLKER et al. (1990) avaliaram o uso de um reforço de dose (*boost*)

com nêutrons após a teleterapia com fótons. Dose de reforço foi administrada em toda área que continha a lesão antes da cirurgia, acrescida de uma margem de 1,0 cm. Cinco anos mais tarde, esse mesmo autor colaborou em um trabalho no qual foi adicionada quimioterapia em relação ao esquema anterior (KRISHNASAMY et al. 1995). Em ambos não houve qualquer alteração na sobrevida.

A braquiterapia intersticial como forma de tratamento em pacientes com GBM foi estudada em um protocolo na Universidade da Califórnia (NCOG nº 6G 82.2). Nesse estudo foram avaliados, de forma não randomizada, 107 pacientes. Todos foram submetidos à teleterapia com 60Gy seguida de braquiterapia intersticial de alta taxa de dose com Iodo¹²⁵ e de quimioterapia. Não houve alteração significativa na sobrevida. Metade dos pacientes precisaram ser reoperados após 46 semanas do implante em razão da piora do quadro neurológico ou por maior dependência de esteróides, ou ainda, pela presença de um maior efeito de massa (GUTIN et al. 1991). Três anos mais tarde, ao se avaliar o padrão de recorrência, SNEED et al. (1994) perceberam que, na maioria dos casos, o tumor recorreu no sítio primário onde foi realizado o implante.

A modulação da intensidade de feixes de irradiação (IMRT) vem sendo estudada no tratamento do GBM. IMRT é uma forma de planejamento mais preciso, o qual permitiu administrar uma maior dose no tumor, poupando estruturas vizinhas (XIA et al. 2004). Ao ser comparado às técnicas de planejamento nos pacientes de GBM, o uso da IMRT mostrou-se eficiente e viável. Essa técnica permite a administração de um reforço de dose no tumor sem comprometer as estruturas normais ao redor (CHAN et al. 2003; SUZUKI et al. 2003). Não há publicações que comparem as formas de planejamento tridimensional com a sobrevida dos pacientes.

A radiocirurgia, como *boost*, vem sendo estudada e discutida. Recentemente, um estudo do RTOG (9305), conduzido por SOUHAMI et al. (2004), avaliou 203 pacientes randomizados após a cirurgia, para receberem ou não radiocirurgia associada à teleterapia e quimioterapia. Concluiu-se que o uso de radiocirurgia associada à teleterapia e quimioterapia não modificou a sobrevida e nem a função cognitiva dos pacientes (SOUHAMI et al. 2004).

Atualmente o uso de quimioterapia adjuvante em GBM vem sendo amplamente discutido (DEUTSCH et al. 1989). STUPP et al. (2005) observaram, em trabalho randomizado, melhora na sobrevida com a adição de Temozolamida no tratamento dos pacientes com GBM. No entanto, WASSERFALLEN et al. (2004) avaliaram em estudo fase II a relação custo x benefício do uso de Temozolamida nos pacientes com GBM. Concluiu-se que há necessidade de trabalhos fase III randomizados para avaliar a real vantagem da quimioterapia na referida doença, uma vez que a droga é de alto custo e o ganho da sobrevida, apesar de ter sido significativo, foi de alguns meses.

A escala de *Karnofsky*, que avalia a *performance status* dos pacientes, é um importante fator prognóstico (LACROIX et al. 2001; JEREMIC et al. 2003). Esse índice gradua a capacidade do paciente para exercer suas atividades normais e as limitações decorrentes da doença (Tabela 1).

Tabela 1 - Escala de *Karnofsky*.

Escala de <i>Karnofsky</i> (Descrição)	Escala de <i>karnofsky</i> (%)
Nenhuma queixa: ausência de evidências da doença	100
Capaz de levar sua vida normal: sinais menores ou sintomas da doença	90
Alguns sinais ou sintomas de doença com o esforço.	80
Capaz de cuidar de si mesmo; incapaz de levar suas atividades normais ou de exercer um trabalho ativo.	70
Necessita de assistência ocasional, mas ainda é capaz de prover a maioria de suas necessidades.	60
Requer assistência considerável e cuidados médicos freqüentes.	50
Incapaz; requer cuidados especiais e assistência.	40
Muito incapaz; indicada hospitalização, apesar de a morte não ser eminente.	30
Muito debilitado; hospitalização necessária; necessitando de tratamento de apoio ativamente.	20
Moribundo, processos letais progredindo lentamente	10
Morto	0

CURRAN et al. (1993), na tentativa de classificar melhor os pacientes portadores de gliomas malignos, avaliaram a contribuição de fatores prognósticos pré-tratamento, como a idade, a histologia e o KPS. Nesse estudo foram avaliados 1578 pacientes que pertenciam a três estudos do RTOG sobre gliomas malignos entre 1974 e 1989. Ao avaliarem os resultados, perceberam que a idade foi o principal ponto de corte em relação à sobrevida. Pacientes com menos de 50 anos de idade tiveram no grau histológico o principal fator prognóstico, enquanto que, nos pacientes com mais de 50 anos de idade, o principal fator foi o KPS (70-100 x < 70), seguido do tipo histológico. Após esse estudo, foram criados seis grupos, *Recursive Partitioning Analysis (RPA)* que serviram para classificar os pacientes (Tabela 2).

Tabela 2 - Grau de *RPA*.

Classe	Definição	Sobrevida	
		Mediana	2 anos (%)
I	AA, idade <50, SM nl	58,6	76
II	AA, idade <50, KPS $\geq$ 70	37,4	68
III	GBM, idade < 50, KPS 90-100	17,9	35
IV	GBM, idade < 50, KPS <90	11,1	15
V	GBM, idade $\geq$ 50, KPS $\geq$ 70	8,9	6
VI	GBM, idade $\geq$ 50, KPS < 70, SM na	4,6	4

AA astrocitoma anaplásico, GBM glioblastoma, SM status mental, nl normal, na anormal

Na classificação de *RPA* não são levados em consideração parâmetros moleculares.

O tratamento através de radiações ionizantes tem como objetivo causar danos ao DNA que poderão ser reparados ou levar à morte celular. A morte celular é dividida em morte clonogênica e apoptose. A morte clonogênica caracteriza-se pela perda da capacidade de divisão celular, isto é, a célula se torna estéril, porém morfológicamente íntegra. A apoptose é um mecanismo de morte celular que ocorre em situações fisiológicas e também pode ser induzida por agentes agressores, como a radiação. As células apoptóticas apresentam características morfológicas próprias como condensação e fragmentação da cromatina. Nesse processo de morte celular, estão envolvidos proto-oncogenes, como bcl-2 (inibidor da apoptose), e genes supressores de tumor, como o p53 (indutor da apoptose) (LEHNERT 1999).

Em razão dos avanços da pesquisa na área da biologia celular e molecular, o conhecimento científico das alterações genéticas e protéicas que envolvem as células tem aumentado significativamente. Tais conhecimentos permitiram a formulação de novas modalidades terapêuticas para os pacientes oncológicos, como a terapia

molecular (MISCHEL e CLOUGHESY 2003). O GBM é um tumor suscetível a esse tipo de terapia, pois suas alterações moleculares já são conhecidas e, conseqüentemente, as mudanças que elas acarretam nas vias de sinalização (ZHU et al. 1996). Nesses tumores, é comum observar-se o aumento da expressão de certos *oncogenes* envolvidos no processo de apoptose. Certamente, no futuro, as classificações da agressividade e a resposta terapêutica das neoplasias envolverão parâmetros relacionados às características moleculares.

1.1 ONCOGENES E GENES SUPRESSORES ENVOLVIDOS NA GÊNESE DO GBM

O *oncogene* amplificado mais freqüente no GBM é o *gene* que codifica o receptor de crescimento epidérmico (*EGFR*) (KRISHNAN et al. 2003). O *EGFR* é um receptor transmembrânico muito expresso em células epiteliais. Ele é responsável por vários processos de sinalização celular, entre os quais a função de regular a proliferação celular (KRISHNAN et al. 2003). A amplificação do *EGFR* é encontrada em 40% dos GBMs, em especial nos pacientes mais idosos, e em um terço dos casos há presença de mutações neste *gene*. A mutação pode levar a alterações na região extracelular, intracelular ou justa membrana do receptor. A deleção da parte extracelular é a mutação que ocorre com maior freqüência. Essa deleção não permite que o ligante conecte-se ao receptor, e a molécula torna-se ativa, estimulando constantemente a proliferação celular de forma desordenada (SHINOJIMA et al. 2003). Alguns estudos demonstraram uma menor sobrevida e uma progressão mais rápida da doença nos pacientes com tumores que apresentaram

aumento da expressão do *EGFR* ou sua mutação (HUANG et al. 1997; FELDKAMP et al. 1999; NISHIZAKI et al. 2000; ELEY et al. 2000).

BARKER et al. (2001b) mostraram maior radio-resistência nos GBM em pacientes idosos e em tumores com superexpressão do *EGFR*. LAMMERING et al. (2004) também perceberam que o aumento da expressão do EGFR estaria associado a uma maior resistência à radioterapia. A resistência tumoral está associada a uma maior repopulação celular durante a radioterapia. Dessa forma, o uso dos anticorpos anti-EGFR aperfeiçoaria a resposta desses tumores à radiação. Um outro papel do inibidor do EGFR seria a função de redistribuição das células do período S para o período G2 do ciclo celular. As células na fase G2 são mais sensíveis à radiação do que na fase S (KRISHNAN et al. 2003).

Dentre os marcadores de apoptose, o *TP53* é um *gene* de supressão tumoral localizado no cromossomo 17p13q. Este gene codifica a proteína p53, responsável por vários processos celulares, como a indução da apoptose, a diferenciação celular, a resposta a danos no DNA e a neovascularização (BOGLER et al. 1995). O aumento da expressão da proteína p53 é um indicativo de mutação, pois a proteína truncada apresenta meia vida mais longa e, conseqüentemente, maior detectabilidade em reações imunoistoquímicas. A perda ou a mutação desse *gene* é um dos primeiros eventos genéticos na gênese e progressão dos astrocitomas difusos e é usualmente encontrada em GBM de pacientes mais jovens. A associação da expressão de p53 em relação à resposta ao tratamento tem sido motivo de alguns estudos e discussões. BIRNER et al. (2002) mostraram que pacientes com GBM nos quais era detectado o aumento da expressão de p53 apresentaram melhor sobrevida após tratamento adjuvante com radio e quimioterapia. DEININGER et al. (2000) evidenciaram uma diminuição na expressão de p53 nos GBM recidivados que receberam radioterapia.

Essa redução estava associada a maior sobrevida. KYRITSIS et al. (1995) avaliaram 122 pacientes com GBM e não encontraram uma associação significativa da expressão de p53 com a melhora do prognóstico. KIM et al. (2001) estudaram células de gliomas com p53 mutado que receberam, através de um vetor, o *gene* p53 selvagem seguido de radioterapia. Observaram que nas células com o alelo selvagem houve maior citotoxicidade, associada a um maior índice de apoptose. O ciclo celular também sofreu alterações, como aumento da fase G1 e menor tempo na fase S, que é menos sensível à radioterapia. HAAS-KOGAN et al. (1999) não tiveram sucesso na tentativa de demonstrar melhoras da sobrevida quando se associou a expressão do p53 com mudanças no fracionamento da radioterapia.

As proteínas p21 e p27 funcionam como reguladoras da progressão do ciclo celular, pois inibem complexos responsáveis pela progressão da fase G1 para a fase S através da inibição do complexo ciclina-CDK (HARPER et al. 1993). Conseqüentemente a célula permanece mais tempo em G1, permitindo corrigir eventuais erros no DNA antes de ocorrer a duplicação. Em relação à radioterapia, a presença da célula em G1 é vantajosa, pois essa fase é mais rádio-sensível do que a fase S de duplicação (LEHNERT 1999).

Apesar de apresentarem papéis importantes no ciclo celular, o número de trabalhos publicados na literatura internacional que estudam as alterações dessas proteínas, em especial a p27, é bem menor que os trabalhos envolvendo p53 e EGFR. KIRLA et al. (2003) mostraram que, apesar das proteínas p21 e p27 possuírem funções similares, apenas a p27 resultou em um fator independente e significativo na sobrevida dos pacientes com astrocitomas maligno. Pacientes que evidenciaram tumores com expressão menor de p27 apresentaram menor sobrevida quando comparados aos que tinham maior expressão. Esse mesmo trabalho apresenta a

hipótese de que níveis baixos da relação p21/p27 estariam relacionados a um pior prognóstico e a menor sobrevida. WANG et al. (2001) transfectaram células de glioblastoma com três diferentes tipos de *genes* supressores de tumor. Observaram que as células que receberam os *genes* p21 ou p16 tiveram redução mais significativa do seu crescimento em relação às células que receberam o p53.

As proteínas Bcl2 e Bclx pertencem à família Bcl2 e têm a função de inibir a apoptose celular. O aumento da expressão dessas proteínas, além de ocasionar uma perda do controle proliferativo, facilita a sobrevivência da célula em várias circunstâncias adversas, como perda da adesão e exposições às irradiações. Isso permite a associação do aumento dessas proteínas a uma maior resistência tumoral à radioterapia e à quimioterapia (STREFFER et al. 2002; SORENSON et al. 2004). No entanto, não há na literatura um consenso quanto ao papel dessas proteínas na evolução dos glioblastomas.

Diversas técnicas têm sido utilizadas no estudo do perfil molecular dos tumores astrocíticos, dentre elas a imunoistoquímica, que é uma técnica de baixo custo e de grande valor para análise de expressão protéica em neoplasias. Avanços técnicos recentes, como o *tissue microarray* (TMA), têm aumentado a aplicabilidade da imunoistoquímica. O TMA consiste na confecção de um bloco recipiente, no qual são depositados cilindros de tecido tumoral de cada bloco doador, utilizando-se um *tissue arrayer*, que realiza as perfurações no bloco doador e transfere os cilindros de tecido para o bloco receptor em coordenadas definidas pelo equipamento. Em seguida, a partir desse bloco, são preparadas lâminas. Desta forma, a imunoistoquímica pode ser aplicada em um grande número de casos simultaneamente, ao invés de lâmina por lâmina, o que permite economia de anticorpos e rápido acesso às centenas de amostras. Além disso, as reações são feitas

em lâminas seqüenciais, o que permite a análise da expressão protéica de uma mesma área tumoral com diversos anticorpos.

Através de novos conhecimentos gerados em larga escala, será possível, em um futuro próximo, o desenvolvimento de novas drogas, como os inibidores de *Kinase* e os anticorpos monoclonares. Esses, por sua vez, poderão atuar em moléculas envolvidas na proliferação e morte celular com o objetivo de inibir o crescimento celular desordenado (MISCHEL e CLOUGHESY 2003).

Estudos moleculares de glioblastomas mostram alterações genéticas heterogêneas. De acordo com a literatura, a frequência com que os marcadores envolvidos na progressão de tumores astrocíticos (como amplificação de EGFR e mutação do p53) é variável, e, em geral, os estudos dessas moléculas são realizados separadamente. Até o momento, não há na literatura estudos de expressão protéica em GBM utilizando a técnica de *tissue miccrray* (TMA), que permite a análise simultânea da expressão dessas proteínas na mesma área neoplásica. Também não há trabalhos correlacionando essas expressões com a evolução clínica e com a resposta ao tratamento radioterápico. Esses conhecimentos podem contribuir para uma melhor definição quanto ao comportamento do GBM.

2 OBJETIVOS

Esse trabalho teve como objetivos:

1. Avaliar a expressão do EGFR e marcadores de apoptose (p53, Bcl2, Bclx, p27, p21) em glioblastoma;
2. Comparar os padrões de expressão desses marcadores com a sobrevida global;
3. Avaliar a relação dos fatores prognósticos conhecidos como: idade, índice de *performance status* (KPS), extensão da ressecção tumoral, *Recursive Partitioning Analysis* (RPA) e dose de radioterapia com a sobrevida e com a expressão dos marcadores;
4. Verificar os marcadores como possíveis fatores prognósticos independentes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Neste trabalho, de carácter retrospectivo, foram avaliados marcadores de apoptose (Bcl-2, Bclx, p53, p21, p27), e o EGFR (Anexo 1) em GBM. A expressão destes marcadores foi correlacionada com fatores prognósticos conhecidos, como idade, extensão da ressecção, índice de performance status (KPS), dose de radioterapia, quimioterapia adjuvante e *Recursive Partitioning Analysis (RPA)*. Foram estudados, inicialmente, 85 casos diagnosticados como glioblastomas pelos critérios da OMS/2000, atendidos no Hospital do Câncer entre os anos de 1982 e 2003. Todos os 85 pacientes tinham prontuários acessíveis e amostra patológica do tumor em quantidade suficiente no bloco de parafina para desenvolvimento deste projeto. Como a sobrevida média de pacientes com GBM é menor que 12 meses, o período final de seguimento foi o ano de 2003.

Inicialmente, todos os prontuários foram revistos para obtenção de dados clínicos como: idade ao diagnóstico, sexo, extensão da ressecção cirúrgica, tratamentos adjuvantes - incluindo radioterapia e quimioterapia - e tempo de sobrevida (Anexo 11). Os dados foram colocados numa planilha do *Microsoft Excel*.

Dos 85 pacientes selecionados para o TMA, foram descartadas as crianças, os adolescentes (idade menor que 18 anos) e os pacientes que já tinham tido outro tipo de câncer no decorrer da vida, exceto tumores de pele que não fossem melanomas. Descartamos também 14 pacientes que não tinham realizado radioterapia, pois faleceram antes do início do tratamento. Após esses cortes, selecionou-se uma amostra de 55 pacientes.

O tempo de seguimento variou entre 1,4 e 41,8 meses, com uma mediana de 12,7 meses e uma média de 14 meses. Dos 55 pacientes, apenas 6 estavam vivos e em acompanhamento.

Inicialmente os pacientes foram estratificados quanto às características clínicas e de tratamento (Tabela 3).

Em relação às características clínicas, a maioria era do sexo masculino (62%) e tinha idade superior a 50 anos (67,2%). A idade de corte utilizada foi de 50 anos, em semelhança ao ponto de corte utilizado na classificação do *RPA (Recursive Partitioning Analysis)*. A maioria dos pacientes apresentou índice de *performance status* (KPS) superior a 70 (84,0%) e um grau de *RPA* superior a 4 (64%). Observou-se equilíbrio quanto à extensão de ressecção, com uma discreta prevalência dos pacientes que tiveram ressecção completa (52%).

Tabela 3 - Características clínicas dos pacientes.

Variável	Categoria	Nº de pacientes (%)
Idade	≤ 50	18 (32,8)
	> 50	37 (67,2)
Sexo	Masculino	34 (61,82)
	Feminino	21 (38,18)
KPS	< 70	8 (16,0)
	≥ 70	42 (84,0)
<i>RPA</i>	≤ 4	18 (36,0)
	> 4	32 (64,0)

Em relação às características referentes ao tratamento, a maioria dos pacientes foi tratada em aceleradores de 4 MV (65,96%), com uma dose superior a 5900cGy (76,0%). Notou-se prevalência do fracionamento diário de 200cGy (72,22%) em

relação ao de 180cGy e a maioria dos pacientes não recebeu quimioterapia (Tabela 4).

Tabela 4 - Características referentes ao tratamento.

Variável	Categoria	Nº de casos (%)
Fracionamento	180 cGy	15 (27,78)
	200 cGy	39 (72,22)
Energia	Cobalto	4 (8,51)
	4 Mv	31 (65,96)
	6 Mv	12 (25,53)
Quimioterapia	Sim	10 (18,5)
	Não	45 (81,5)
Dose	<61GY e >59Gy	38 (69,0)
	> 61Gy	4 (7,0)
	< 59Gy	13 (24,0)

3.1 CONSTRUÇÃO DO *TISSUE MICROARRAY*

Para a realização das reações de imunoistoquímica, utilizou-se a técnica de *tissue microarrayer*, o que possibilitou avaliar várias amostras diferentes em uma mesma lâmina.

Na preparação do TMA, inicialmente foram selecionados os blocos de parafina com material suficiente existentes no arquivo do serviço de Anatomia de Patológica do Hospital do Câncer. Em seguida confeccionamos uma lâmina de cada bloco que foi corada com hematoxilina-eosina (H&E), visando à confirmação do diagnóstico.

Após a confecção, demarcamos em cada lâmina áreas com conteúdo celular viável para o estudo. Primeiramente selecionamos áreas com predomínio de células neoplásicas viáveis e a assinalamos no bloco de parafina correspondente.

Glioblastomas são neoplasias heterogêneas em sua morfologia, e, na medida

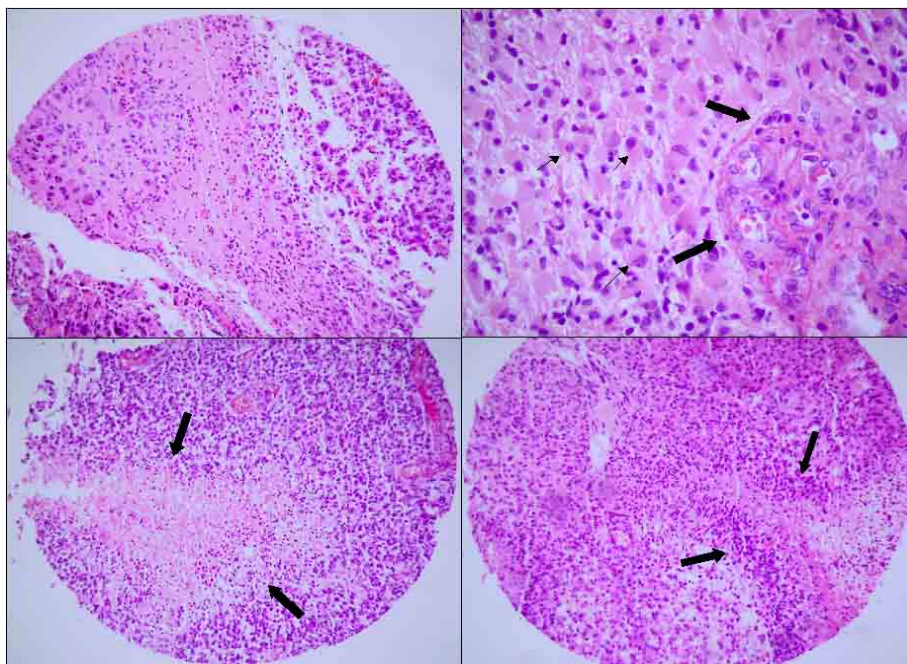
do possível, selecionamos áreas contendo, além de células gliais neoplásicas, vasos com proliferação endotelial e focos de necrose em paliçada.

Empregando-se a técnica de TMA, foram retiradas das áreas de interesse assinaladas em cada bloco duas amostras de tecido tumoral em forma de cilindros (1,0 mm de diâmetro). Para isso, utilizou-se a extremidade cortante do *tissue microarrayer* (Beecher Instruments, Silver Spring, MD). Em um estudo preliminar, observou-se que cilindros de 1,0mm de diâmetro são suficientes para a representação de áreas heterogêneas em glioblastomas (Figura 2).

Em continuidade, esses cilindros foram transferidos para o mesmo bloco receptor na coordenada definida pelo aparelho. Ao final do procedimento, formou-se um bloco receptor contendo amostras em duplicata de cada tumor.

Após a construção do bloco receptor, foram realizados cortes seqüenciais de 4µm em lâminas previamente tratadas com película aderente até o desgaste completo do bloco de TMA. A cada 10 (dez) lâminas cortadas, 01 (uma) foi corada por HE para verificação histológica.

Nas reações imunoistoquímicas, as lâminas contendo cortes de 4µm foram desparafinadas, desidratadas e incubadas com os anticorpos anti Bcl-2, Bcl-x, p21, p27, p53 e EGFR de acordo com protocolo utilizado no laboratório de imunoistoquímica do Departamento de Anatomia Patológica do Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer A. C. Camargo (Anexo 1). Para cada anticorpo, foram realizadas reações em duas lâminas de níveis diferentes, acarretando uma análise em quadruplicata, o que aumentou a representatividade tumoral. Por exemplo: lâmina 2 e lâmina 42, de modo que a distância entre a primeira e a segunda fosse de, pelo menos, 80µm.



Legenda: A) Glioblastoma com áreas hipercelulares (aumento 20X); B) Proliferação microendotelial (seta) e gemistocitos (aumento 40X); C e D) Glioblastoma com área de necrose (setas), podendo se observar a paliçada na letra D (aumento 20X).

Figura 2 - Fotomicrografias de cortes histológicos obtidos de um bloco de TMA com cilindros de 1mm de diâmetro.

Para os anticorpos Bclx, Bcl2, p21, p27 e EGFR, cuja expressão é citoplasmática ou em membrana (Figura 3 e 4), foi estabelecido um *score* de 0 a 4 para intensidade (0 = negativo, 1 = fracamente positivo, 2 = moderadamente positivo, 3 = fortemente positivo e 4 = intensamente positivo) e percentagem de células positivas (0 = negativa, 1 = < 25% das células positivas, 2 = 25 - 50% das células positivas, 3 = 50 - 95% das células positivas, 4 = > 95% das células positivas). O resultado final para cada caso foi calculado multiplicando-se o valor da intensidade pelo valor do número de células e o resultado dividido por 4 (número de amostras por caso). O valor final foi obtido através da média aritmética dos escores das quatro amostras de cada caso (total dividido por quatro). Foram estabelecidas 4

categorias de *scores* I (0 – 4), II (5 – 8), III (9 – 12) e IV (13 – 16). Para os anticorpos, como o p53 (Figura 5), cuja expressão é nuclear, utilizou-se um *score* de 0 a 4, de acordo com o número de núcleos positivos. (0 = negativo, 1 = < 25% dos núcleos positivos, 2 = 25 - 50% dos núcleos positivos, 3 = 50 – 95% dos núcleos positivos, 4 = > 95% dos núcleos positivos)

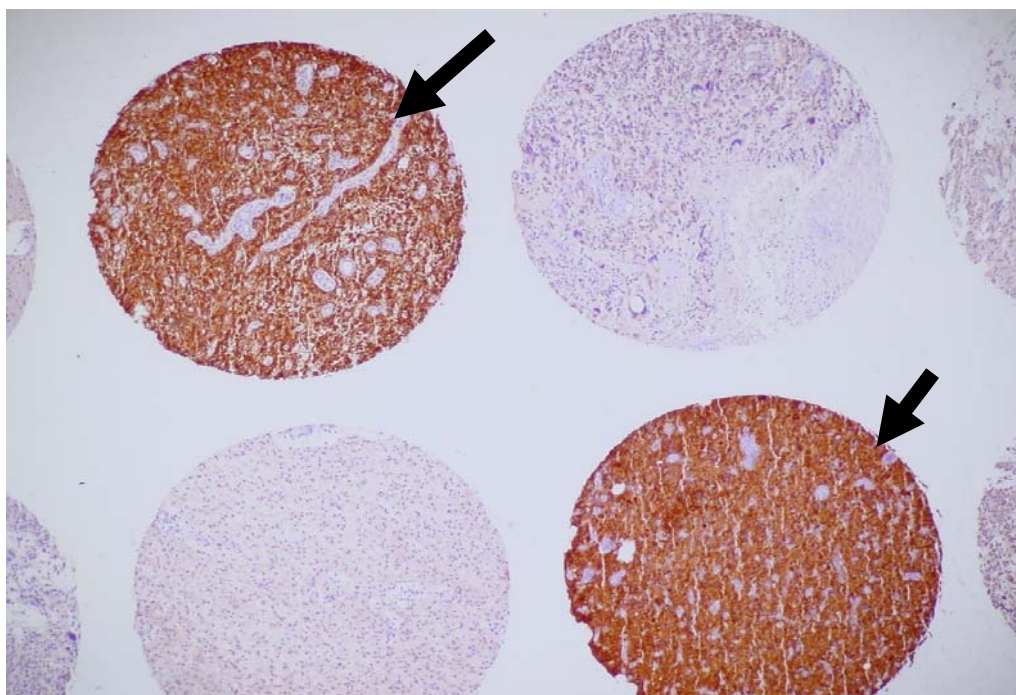


Figura 3 - Expressão positiva (cor marrom) de EGFR em pequeno aumento (seta)

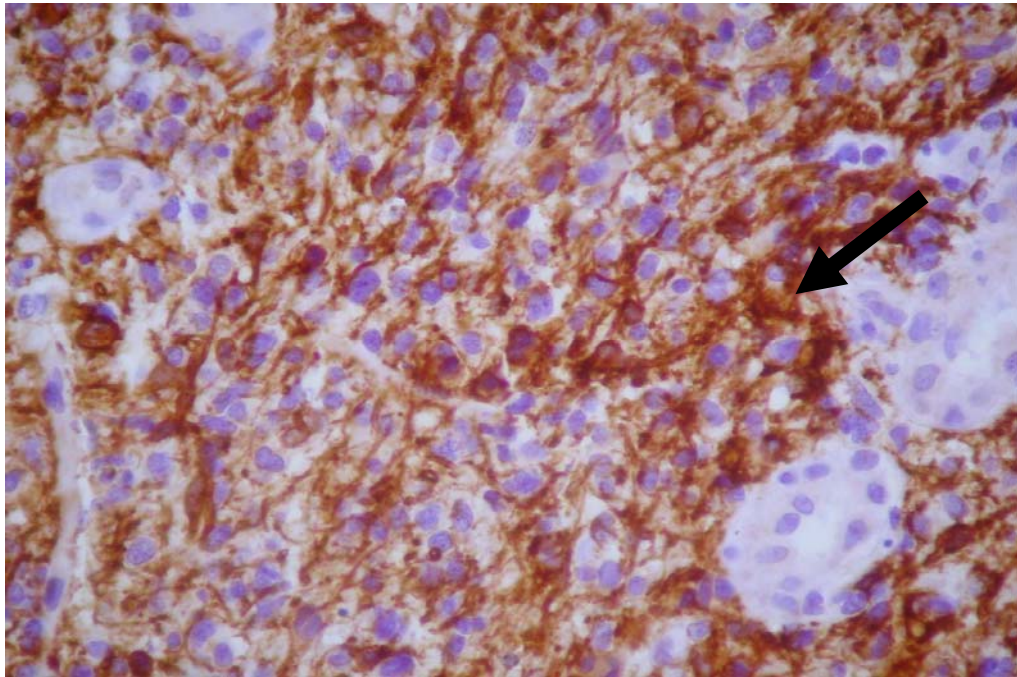


Figura 4 – Fotomicrografia em grande aumento mostrando forte expressão (cor marrom) do EGFR na membrana celular (seta).

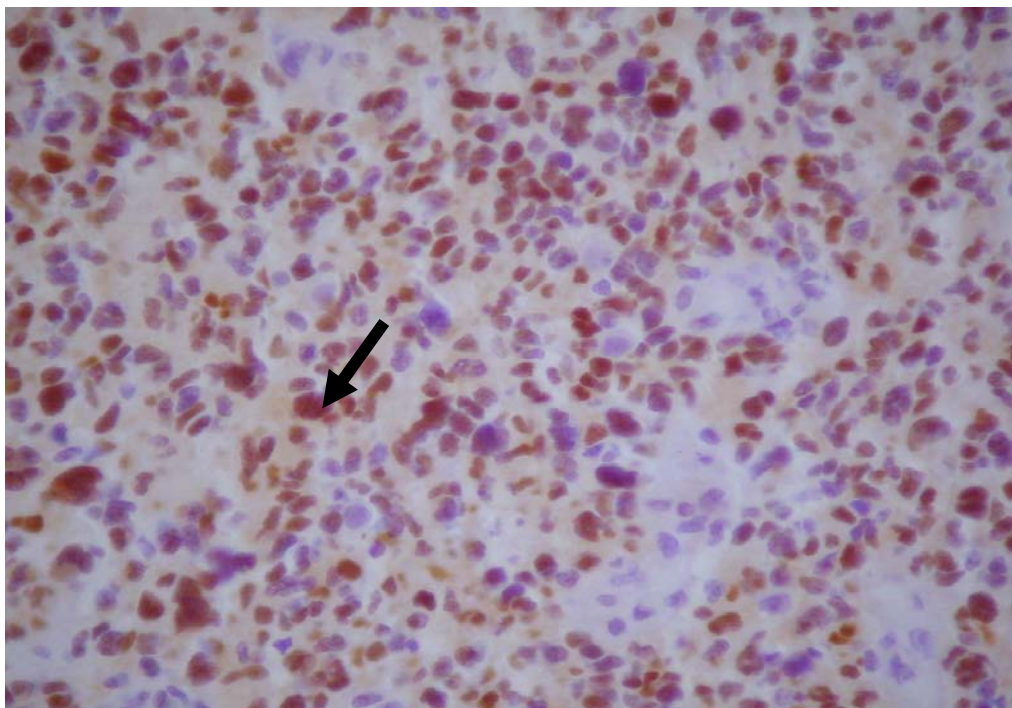


Figura 5 - Fotomicrografia em grande aumento mostrando expressão p53 (cor marrom) no núcleo (seta)

3.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na análise estatística, foram utilizadas e analisadas variáveis como idade, extensão da ressecção (categorias: radical, parcial e ignorada), KPS, dose de radioterapia, uso ou não de quimioterapia, o grau de *RPA* e os marcadores biológico-moleculares.

Estatísticas descritas como distribuição de frequências e medidas de tendência central e de variabilidade foram adotadas para caracterizar a casuística.

Foram criados pontos de corte (*cut off*) através da mediana para variáveis quantitativas (a expressão dos marcadores). Para cada anticorpo, a sua associação com as demais variáveis (categóricas) do estudo foi realizada através do teste de frequência do qui-quadrado e, quando pelo menos uma frequência esperada era menor que cinco, o teste exato de *Fish* foi adotado.

O tempo de seguimento foi calculado em meses, tomando-se por início a data do diagnóstico - obtida através de cirurgia - até a data do óbito ou da última informação do paciente. A sobrevida global foi calculada pelo método de Kaplan-Meier.(KAPLAN e MEIER 1958). Utilizou-se ainda o teste de Longrank para comparar as curvas de sobrevida de cada anticorpo e demais variáveis (Mantel N, Haenswel W. 1959). O nível de significância de 5% foi considerado para todos os testes.

O modelo uni e multivariado de Regressão de Cox foi utilizado para estimar o *Hazard Ratio* (HR) e, assim, avaliar os anticorpos como possíveis fatores prognósticos independentes, considerando-se intervalo de confiança de 95% (COX 1972). A técnica *stepwise* foi utilizada e, para a inclusão das variáveis ao modelo de regressão de cox, o valor de $p \leq 0,10$ foi considerado.

4 RESULTADOS

Ao se avaliar os níveis de reatividade dos anticorpos, como uma medida da expressão das proteínas em questão, percebe-se que, na maioria dos casos, o grau de positividade ficou entre negativo e fracamente positivo (Tabela 5 e Tabela 5.1).

Tabela 5 - Avaliação do número de casos em relação ao grau de positividade dos marcadores nucleares.

Marcadores Nucleares	Categoria de Score de Positividade				
	Negativo (%)	Fracamente positivo	Moderadamente positivo	Fortemente positivo	Intensamente positivo
		número de casos (%)			
p21 no núcleo	19 (35)	36 (65)	0	0	0
p27 no núcleo	13 (24)	36 (63)	6 (11)	1 (2)	0
p53	32 (58)	9 (16)	5 (9)	7 (12)	2 (5)

Tabela 5.1 - Avaliação do número de casos em relação ao grau de positividade dos marcadores citoplasmáticos.

Marcadores Citoplasmáticos	Categoria de Score de Positividade			
	I (%) (0-4)	II (%) (5 – 8)	III (%) (9 – 12)	IV (%) (13 – 16)
	número de casos (%)			
p21 no citoplasma	51 (42,73)	4 (7,27)	0	0
p27 no citoplasma	48 (87,27)	7 (22,73)	0	0
bcl2	53 (96,36)	2 (3,64)	0	0
bclx	2 (3,63)	15 (27,27)	19 (34,55)	19 (34,55)
EGFR	40 (72,72)	5 (9,09)	3 (5,45)	7 (12,74)

Na análise dos marcadores, em relação às outras variáveis, foi utilizada como ponto de corte a mediana dos valores obtidos por anticorpo (Tabela 6 e 6.1).

Tabela 6 - Distribuição de frequência dos marcadores de acordo com os pontos de cortes utilizados.

Marcadores tumorais	Valor da Mediana	Nº	%
EGFR	$\leq 0,75$	28	(50,91)
	$> 0,75$	27	(49,09)
p53	$\leq 0,75$	31	(56,0)
	$> 0,75$	24	(44,0)
p21 núcleo	$\leq 0,25$	29	(52,73)
	$> 0,25$	26	(47,27)
p21 citoplasma	$\leq 0,75$	28	(50,91)
	$> 0,75$	27	(49,09)
p27 núcleo	$\leq 0,75$	29	(52,73)
	$> 0,75$	26	(47,27)
p27 citoplasma	$\leq 1,0$	26	(47,27)
	$> 1,0$	29	(52,73)
bcl2	$\leq 0,3$	27	(49,09)
	$> 0,3$	28	(50,91)
bclX	≤ 12	29	(52,73)
	> 12	26	(47,27)

Tabela 6.1 - Medidas de tendência central e de variabilidade da expressão dos marcadores.

Marcadores	Variação	Mediana	Média	Desvio padrão
EGFR	0 - 16	0,75	3,65	5,36
p53	0 - 4	0,75	1,19	1,3
p21 núcleo	0 - 1,25	0,25	0,37	0,36
p21 citoplasma	0 - 6,75	0,75	1,5	1,8
p27 núcleo	0 - 3	0,75	0,9	0,82
p27 citoplasma	0 - 7,5	1,0	1,75	2,09
bcl2	0 - 5,25	0,3	0,72	1,11
bclx	3 - 16	12	10,9	3,41

Na avaliação dos fatores prognósticos clínicos com a expressão de cada anticorpo (Anexos 2 a 9), as únicas relações significativas foram p53 com sexo e KPS, p21 no núcleo com idade e *RPA* e p21 citoplasma com KPS (Tabelas 7 a 9).

Tabela 7 - Relação significativa entre a expressão de p53 com sexo e KPS.

Variante	Categoria	p53		
		$\leq 0,75$	$> 0,75$	p
Sexo	Masculino	16	18	0,077
	Feminino	15	6	
KPS	< 70	8	0	0,009
	≥ 70	21	21	

Tabela 8 - Relação significativa entre a expressão de p21 no núcleo com idade e KPS.

Variante	Categoria	p21 núcleo		
		$\leq 0,25$	$> 0,25$	p
Idade	≤ 50	14	4	0,009
	> 50	15	22	
<i>RPA</i>	≤ 4	13	5	0,032
	> 4	13	19	

Tabela 9 - Relação significativa entre a expressão de p21 no citoplasma com KPS.

Variante	Categoria	p21 citoplasma		
		$\leq 0,25$	$> 0,25$	p
KPS	< 70	2	6	0,095
	≥ 70	24	18	

A sobrevida global no primeiro ano foi de 60,38%, caindo, de forma significativa, para 14,57% no segundo ano e para 2,43% no terceiro (Figura 6).

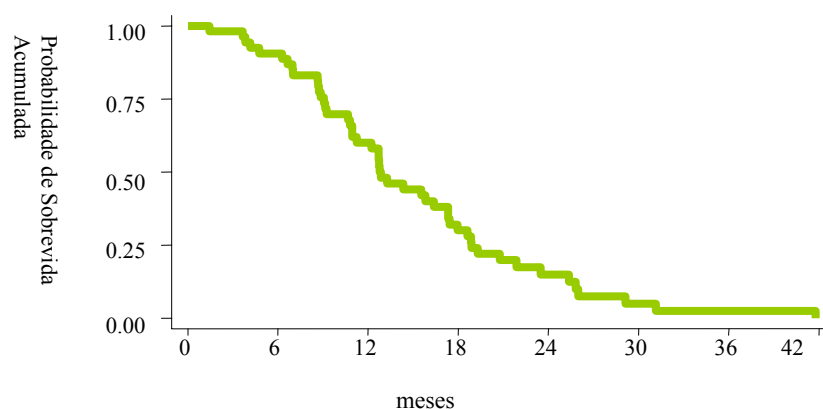


Figura 6 - Curva de Sobrevida.

Na análise da sobrevida em relação às características dos pacientes e do tratamento (Anexo 11), apenas os tópicos como idade (Figura 7), sexo (Figura 8), *RPA* e uso de quimioterapia (Figura 7) foram significativos. Os pacientes do sexo masculino com idade inferior a 50 anos e com *RPA* inferior a 4 e que receberam quimioterapia tiveram melhor sobrevida. As demais variáveis clínicas não influenciaram na sobrevida (Tabela 10).

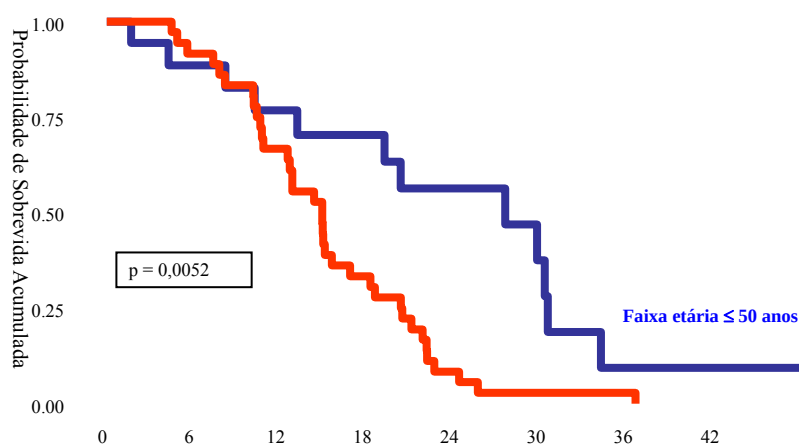


Figura 7 - Curva de sobrevida em relação à Idade. (Kaplan-Meier).

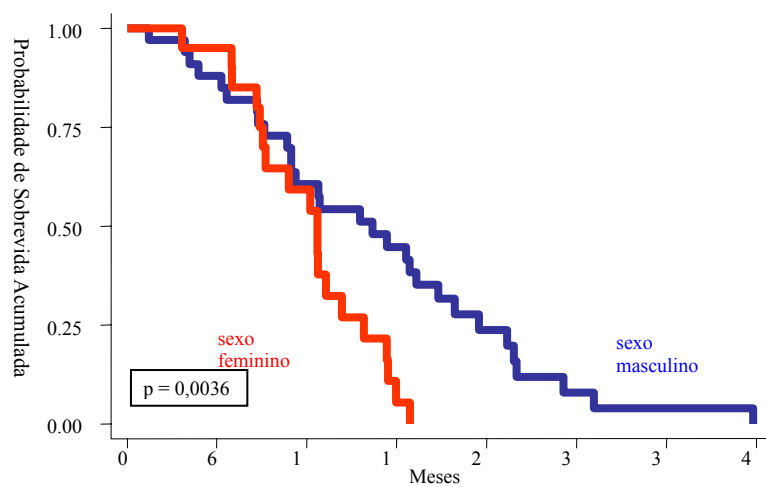


Figura 8 - Curva de sobrevida em relação ao Sexo.

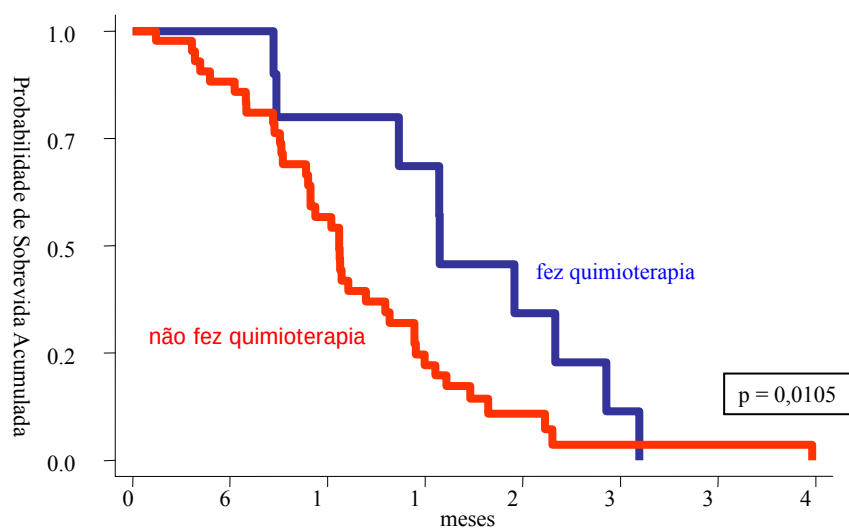


Figura 9 - Curva de sobrevida em relação à quimioterapia.

Tabela 10 - Relação significativa da sobrevida em relação às características dos pacientes e do tratamento.

Variável	Categoria	Sobrevida (%)			p
		1 ano	2 anos	3 anos	
Idade	≤ 50	69,70	46,46	9,29	0,0036
	> 50	56,16	2,81	00,00	
Sexo	Masculino	60,61	23,57	3,93	0,0105
	Feminino	60,0	00,00		
RPA	≤ 4	70,59	42,35	8,47	0,0005
	> 4	54,84	00,00		
Quimioterapia	Sim	78,95	33,83	00,00	0,0548
	Não	57,65	10,48	3,49	
	> 0,75	62,96	11,11	00,00	

Na avaliação da influência de sobrevida, apenas o EGFR e o p27 nuclear influenciaram significativamente no aumento da sobrevida dos pacientes (Tabela 11).

Tabela 11 - Relação significativa da sobrevida em relação à expressão dos anticorpos EGFR e p27 núcleo.

Variável	Categoria	Sobrevida (%)			p
		1 ano	2 anos	3 anos	
EGFR	≤ 0,75	47,17	6,74	00,00	0,075
	> 0,75	73,58	21,88	4,38	
p27 núcleo	≤ 0,75	68,42	22,81	4,56	0,0218
	> 0,75	51,02	4,64	00,00	

Através do modelo de regressão de cox, a idade maior que 50 anos, EGFR menor ou igual a 0,75, e não receber o tratamento quimioterápico mostraram-se como fatores prognósticos independentes (Tabela 12).

Tabela 12 - Risco relativo para morte pelo modelo de regressão de cox uni e multivariado.

Variável	Categoria	RR bruto* IC (95%)	p	RR multiv** IC (95%)	p
Idade (anos)	≤ 50	1,0 (ref)	0,005	1,0 (ref)	0,005
	> 50	2,71 (1,3-5,4)		2,95 (1,4-6,2)	
EGFR	> 0,75	1,0 (ref)	0,005	1,0 (ref)	0,006
	≤ 0,75	1,68 (0,9 – 3,0)	0,079	2,43 (1,43 – 4,6)	
QT	Sim	1,0 (ref)	0,005	1,0 (ref)	0,012
	Não	2,06 (1,0 – 4,4)	0,060	2,88 (1,3 – 6,6)	

*Risco relativo para morte bruta (univariada)

** Risco relativo para morte multivariado

IC: Intervalo de confiança

Ref: referência categórica

5 DISCUSSÃO

5.1 CARACTERÍSTICAS DOS DOENTES

Diferentes fatores prognósticos clínicos e terapêuticos são conhecidos em GBM, todavia a sua correlação com marcadores moleculares é pouco estudada.

A extensão da ressecção tumoral sofreu influência do tamanho do tumor, da sua localização e da habilidade do cirurgião e foi considerada como um importante fator prognóstico. Há trabalhos na literatura afirmando que pacientes com tumor ressecado por completo obtiveram maior sobrevida em relação aos pacientes com ressecção subtotal ou submetidos a apenas uma biópsia. Nessas séries, a extensão da ressecção é avaliada com ressonância nuclear magnética seguida de cirurgia (LACROIX et al. 2001; JEREMIC et al. 2003). No entanto, há trabalhos, como os de BARKER et al. (2001a), em que a extensão da ressecção não foi uma variável significativa para a sobrevida. Em nosso trabalho, pacientes submetidos à ressecção radical tiveram uma melhor sobrevida em 12 meses (69,23%) em relação aos pacientes com ressecção parcial (55,10%). No entanto, essa diferença não foi significativa ($p=0,34$). Uma possível explicação para essa situação é a não realização e também, a depender da época, a não disponibilidade na rotina de exames de imagem no pós-operatório. Sendo assim, a classificação da extensão da ressecção se baseou no relato do cirurgião escrito no prontuário, o que é pouco preciso e subjetivo.

Um dos fatores prognósticos de grande importância em nosso trabalho foi a idade dos pacientes, considerada fator prognóstico independente (Tabela 12). Uma das explicações para essa vantagem seria a de que pacientes mais jovens teriam um melhor KPS e estariam propícios a uma ressecção mais extensa. A “idade de corte” utilizada foi de 50 anos, pois é a mesma utilizada na classificação do *RPA*. Há vários trabalhos na literatura mostrando que pacientes mais jovens apresentam melhor sobrevida (SALCMAN et al. 1982; BURGER e GREEN 1987; CURRAN et al. 1993; LACROIX et al. 2001; JEREMIC et al. 2003). BARKER et al. (2001a) avaliaram, em um trabalho prospectivo, a influência da idade nos pacientes com GBM que foram tratados com cirurgia seguida de radioterapia associada ou não à quimioterapia. Em ambos os grupos (com e sem radioterapia), pacientes mais jovens tiveram uma melhor resposta ao tratamento, tanto nas análises uni quanto na multivariada. SIMMONS et al. (2001) avaliaram a relação da idade e da expressão protéica do EGFR com a sobrevida nos pacientes com GBM. Eles utilizaram como corte a idade de 55 anos, que foi a média de idade dos pacientes. O resultado foi a super expressão do EGFR associada a um pior prognóstico nos pacientes mais jovens (menores de 55 anos) em relação aos pacientes com idade mais avançada (maiores de 55 anos). No nosso trabalho, não evidenciamos relação entre a expressão de EGFR e a idade dos pacientes.

Visando melhorar o entendimento dos fatores prognósticos pré-tratamento, CURRAN et al. (1993) criaram uma forma de avaliar os pacientes com gliomas através do grau de *RPA*. O *RPA* estratifica os pacientes através da histologia (astrocitoma anaplásico e glioblastoma), da idade (maior ou menor que 50 anos) e pelo KPS. Em nosso trabalho, pacientes com *RPA* com valor menor ou igual a 4 apresentaram uma melhor sobrevida no primeiro (70,59% x 54,84%) e no segundo

ano (42,35 x 00,00) pós-tratamento ($p = 0,0005$). Cinco anos mais tarde, SCOTT et al. (1998) reavaliaram o trabalho do RTOG 96 e concluíam que o grau de *RPA* serve para definir grupos distintos de pacientes com GBM e as suas perspectivas de sobrevida. Em nosso trabalho, o *RPA* mostrou-se como um importante fator prognóstico, devendo, com isso, fazer parte das anamneses dos pacientes.

No atual trabalho, pacientes com o índice de *performance status* (KPS) maior ou igual a 70 apresentaram melhor sobrevida em 12 meses (62,5% x 50,0%). No entanto, essa diferença não foi significativa ($p = 0,64$), diferente de alguns trabalhos (LACROIX et al. 2001; JEREMIC et al. 2003). Todavia, existem algumas dúvidas que podem influenciar no resultado. Entre essas, estariam a falta de consenso do valor de corte para se avaliar a influência do KPS e qual o momento ideal para avaliarmos: pré-tratamento, pós-cirurgia ou pré-radioterapia. No presente estudo, adotamos KPS igual a 70, em semelhança ao utilizado na *RPA*, bem como o período pré-tratamento para a avaliação. Trabalhos na literatura que apresentam KPS como um importante fator prognóstico (LACROIX et al. 2001; JEREMIC et al. 2003) utilizam valores variando entre 80% e 90%.

A associação com quimioterapia mostrou-se também como influenciadora da sobrevida nesta análise e foi considerada fator prognóstico independente através do método de regressão de cox (Tabela 12). Pacientes que receberam quimioterapia tiveram melhor sobrevida em relação aos que não receberam o tratamento (78,95 x 57,65%). No entanto, vale ressaltar que o número de pacientes que receberam quimioterapia (dez pacientes) foi menor em relação aos pacientes que não receberam (44 pacientes). O tratamento quimioterápico utilizado na época foi o BCNU e não há registros nos prontuários do motivo pelo qual foi optado pelo uso de quimioterapia.

O uso de quimioterapia em GBM vem sendo amplamente discutido na literatura internacional. STUPP et al. (2005) mostraram aumento de sobrevida com o uso do Temozolamida e, após essa publicação, alguns centros já adotam a Temozolamida como droga na adjuvância. No entanto, a discussão de quimioterapia em GBM está longe do consenso. Há quem critique o uso da droga em GBM questionando o seu custo x benefício em razão do alto custo e do aumento, apesar de significativo, de apenas alguns meses na sobrevida. WASSERFALLEN et al. (2004) concluíram que há necessidade de um ensaio clínico fase três para avaliar melhor a relação custo x benefício da referida droga.

Os parâmetros técnicos relacionados à radioterapia, como dose total, dose por fração, energia e fracionamento não influenciaram na sobrevida. Em relação à dose de tratamento, pacientes que receberam dose entre 59Gy e 60Gy tiveram melhor sobrevida (61,64%), apesar de não significativa ($p = 0,67$), em relação aos pacientes com doses maiores de 60Gy (50,0%) ou menores de 59Gy (60,0%). Esse mesmo resultado foi encontrado por NAKAGAWA et al. (1998), que avaliaram a sobrevida de 38 pacientes com GBM tratados com doses entre 60Gy a 90Gy. Concluiu-se que, mesmo com doses superiores a 60Gy, a sobrevida não se modificou.

Em nosso estudo, a dose por fração variou entre 180cGy e 200cGy. Em relação à sobrevida, os pacientes que receberam 180cGy tiveram melhor sobrevida no primeiro ano (85,71% x 50,0%) e, nos demais (segundo e terceiro ano), essa diferença quase não existiu (12,24% x 12,86%; 00,00 x 00,00). Um dos possíveis motivos da diferença de sobrevida no primeiro ano pode ser justificada pelo fato de que houve uma prevalência no fracionamento de 200cGy (72,22% x 27,78%).

O aumento da dose por fração já foi estudado por CHANG et al. (2003), que mostraram que, mesmo com o aumento da dose diária para 2,5Gy, a sobrevida se

mantém a mesma, sem aumento aparente da toxicidade. O autor sugere a utilização de doses maiores por fração com o objetivo de diminuir o tempo de tratamento.

Em relação ao tipo de energia, não houve, no que diz respeito à sobrevida, alteração significativa quando se utilizaram diferentes intensidades de energia, como a do cobalto ou a dos aceleradores de 4Mv e 6Mv (75% x 58,62% x 50,0%). Essas energias possuem as mesmas características, pois são energias eletromagnéticas e muito se aproximam em relação à radiobiologia. Sendo assim, era de se esperar que não influenciassem na sobrevida (LEHNERT et al. 1999). Nos trabalhos que avaliam a influência do tipo de energia, é realizada uma comparação entre energias do tipo eletromagnéticas isoladas ou associadas com nêutrons (boost). Nesses trabalhos, não houve mudanças na sobrevida com a alteração do tipo de energia (KOLKER et al. 1990; KRISHNASAMY et al. 1995).

5.2 ONCOGENES E GENES SUPRESSORES

Durante o nosso trabalho, percebemos que não há um consenso acerca do papel da expressão dessas proteínas nos casos de GBM. Um dos motivos de tal indefinição deve-se à ausência de um ponto de corte para se classificar uma célula como positiva ou negativa para uma determinada proteína e qual o melhor método para a sua avaliação. No nosso trabalho, foi estabelecido um *score* de 0 a 4 para intensidade (0 = negativa, 1 = fracamente positivo, 2 = moderadamente positivo, 3 = fortemente positivo e 4 = intensamente positivo) e percentagem de células positivas (0 = negativa, 1 = < 25% das células positivas, 2 = 25 - 50% das células positivas, 3 = 50 - 95% das células positivas, 4 = > 95% das células positivas) e, na análise

estatística, empregou-se como ponto de corte a mediana dos valores obtidos pelo anticorpo.

O *gene* do receptor do fator de crescimento de epitélio (EGFR) é o *oncogene* mais comumente amplificado nos indivíduos adultos com GBM. Uma mutação do *gene*, conhecida como EGFRvIII, é freqüentemente encontrada nos pacientes com GBM. Nessa mutação, o receptor perde o seu domínio extracelular, permanecendo constantemente ativado (KRISHNAN et al. 2003). Alguns estudos evidenciaram correlação da expressão aumentada do EGFR com uma maior radio-resistência (LAMMERING et al. 2004).

ZHU et al. (1996), ao avaliarem 55 pacientes tratados com radioterapia, evidenciaram uma relação significativa entre o aumento do número de células que expressavam EGFR e uma menor sobrevida global ($p = 0,0016$) e sobrevida livre de doença ($p = 0,0182$). Nesse estudo, não houve relação significativa da expressão do EGFR com as variáveis analisadas, como idade (≥ 50 anos ou <50 anos) e sexo, e nem dessas variáveis com a sobrevida global e livre de doença.

BARKER et al. (2001b) avaliaram em 170 pacientes a expressão de EGFR e de p53 em relação à resposta à radioterapia. Para isso, utilizou-se de imunoistoquímica e da comparação de exames de imagem como Tomografia Computadorizada ou Ressonância Nuclear Magnética realizados após a cirurgia e após a radioterapia. Concluiu-se, com esse trabalho, que pacientes com maior expressão de EGFR tiveram pior resposta ao tratamento com radiações ionizantes. Não houve uma relação significativa da expressão de p53 e do índice de resposta à radioterapia.

Apesar dos resultados apresentados acima, o papel do EGFR nos GBM está longe de ser plenamente esclarecido.

SMITH et al. (2001) não encontraram, através de análises uni e multivariadas, uma relação significativa entre a expressão da proteína EGFR e a sobrevida dos pacientes.

QUAN et al. (2005) avaliaram, através de um trabalho retrospectivo, a amplificação do EGFR em 107 pacientes com GBM. O resultado evidenciou que a amplificação não foi um fator prognóstico significativo para sobrevida global mesmo quando estratificado o resultado por idade. Em pacientes com idade inferior a 60 anos, a sobrevida média com ou sem amplificação do EGFR foi de 13,6 e 12,1 meses ($p = 0,94$). Nos pacientes acima de 60 anos, com e sem amplificação do EGFR, a sobrevida foi de 8 meses e 7,1 meses ($p = 0,37$) respectivamente.

Um estudo conduzido pelo RTOG avaliou, em 155 pacientes, a relação do nível de expressão da proteína EGFR com a sobrevida. Após a avaliação dos resultados, não se constatou diferença na sobrevida global ou livre de doença nos pacientes que apresentavam aumento ou diminuição da expressão da proteína (CHAKRAVARTI et al. 2005).

Parte da dificuldade de avaliação, na literatura, do papel do EGFR está no fato de que alguns estudos avaliam a amplificação, enquanto outros avaliam o aumento da sua expressão. Outro fator relevante é que nem sempre a mesma técnica é utilizada para a avaliação da expressão protéica. Em alguns estudos é utilizada a técnica de imunoistoquímica, enquanto que em outros é adotada a Western blot (QUAN et al. 2005).

Há tendência de se encontrar maior expressão do EGFR em pacientes mais idosos. Esse fato pode ser explicado pela constatação de que os GBM's são, na grande maioria, tumores que acometem pessoas mais idosas.

No presente estudo, diferentemente de outros, uma pior sobrevida dos pacientes foi associada a uma menor expressão do EGFR, que, pelo método de Cox, foi considerada como fator independente (Tabela 12) e não teve relação com a idade dos pacientes. Um dos fatores que pode explicar essa diferença é que, no nosso trabalho, utilizamos a mediana das expressões como ponto de corte. Um outro fator é que na maioria dos trabalhos os pacientes eram identificados como tendo um aumento da expressão do EGFR independente da intensidade da reação imunoistoquímica. (ZHU et al. 1996; BARKER et al. 2001b; SHINOJIMA et al. 2003).

No que tange à proteína p53, o presente estudo não mostrou relação entre o aumento da expressão com a sobrevida dos pacientes. Semelhante resultado foi encontrado por KYRITSIS et al. (1995) ao estudarem a expressão tumoral de p53 nos pacientes com GBM. Não houve diferença significativa ($p = 0,438$) nas sobrevidas considerando os pacientes cujos tumores expressavam ou não p53 (49 semanas versus 53 semanas).

SHIRAISHI et al. (2001) também estudaram a influência da mutação de p53 nos pacientes com GBM. Os dados finais concluíram que a presença da mutação não alterou a sobrevida. A média de sobrevida nos pacientes que apresentavam a mutação foi de 69,7 semanas e de 71,2 semanas para os que não tinha a mutação ($p > 0,05$).

A influência da expressão de p53 nos GBM ainda é objeto de discussão. Destacamos como BIRNER et al. (2002), diferentemente dos dados anteriores, mostraram que nos pacientes tratados com radio e quimioterapia adjuvante o aumento da expressão de p53 estaria associada a uma melhora da sobrevida. A taxa de sobrevida nos primeiros 12 meses resultou 72,5% nos pacientes positivos para p53 contra 44,7% para os que não expressavam a proteína ($p = 0,0399$). Na análise

univariada, além da expressão de p53, o KPS pós-operatório (≥ 80 vs <80) e idade (≥ 60 vs <60 anos) também influenciaram significativamente na sobrevida.

Alguns trabalhos mostraram forte influência da mutação do p53 em pacientes mais jovens. Esses tumores são classificados como secundários, pois, na maioria das vezes, tiveram lesão precursora de menor malignidade (BURTON et al. 2002, BIRNER et al. 2002). Esse fato poderia explicar os nossos achados, uma vez que utilizamos pacientes adultos sem história de segunda neoplasia.

A parada no ciclo celular em G1 após a ativação da p53 envolve a transcrição do *gene* que codifica a proteína p21. A indução da p21 leva à inibição da atividade da proteína do retinoblastoma (pRB), que se mantém hipofosforilada, levando à parada do ciclo celular em G1. Essa parada, como mencionado, é de fundamental importância para permitir o reparo do DNA danificado antes que ocorra sua duplicação na fase S (CARIOU et al. 1998).

Semelhante ao presente trabalho, KIRLA et al. (2000) avaliaram a expressão das proteínas envolvidas na progressão do ciclo celular em astrocitomas de alto grau tratados com radioterapia. O resultado encontrado mostrou que nem a expressão de p53 e nem de p21 estavam relacionadas à sobrevida.

A função da proteína p27 e sua influência na sobrevida dos pacientes vêm sendo estudadas em outros tumores, como mama, há algum tempo e numa frequência muito maior do que em tumores cerebrais em especial o GBM (CARIOU et al. 1998).

A proteína p27, similar à p21, também tem a função de regular a passagem da fase G1 para a fase S do ciclo celular. Essa regulação ocorre quando a proteína inibe a ciclina E, que é responsável pela fosforilação da proteína Rb. Essa inibição faz com que a célula não avance para a fase S do ciclo. Não há números significativos de

trabalhos na literatura que estudem a influência dessas proteínas em GBM. A presença, por mais tempo, da célula tumoral na fase G1 seria importante no tratamento com radiações ionizantes, uma vez que é na fase S que se tem a maior radio-resistência do ciclo celular.

Diferentemente dos nossos resultados, KIRLA et al. (2003) mostraram que o aumento da expressão de p27 estaria associado à maior sobrevida. No entanto, em seu estudo avaliou-se somente o p27 nuclear, não estabelecendo graduação de positividade como na presente análise, sendo consideradas positivas apenas células que apresentavam forte fixação do corante na reação de imunoistoquímica.

PARK et al. (2004), através dos conhecimentos da terapia gênica, infectaram uma linhagem celular de GBM com p27. Após a infecção, observaram uma diminuição do ritmo de crescimento e considerável aumento dos níveis de apoptose (2,85 x 12,9%) em relação às células não infectadas. Os autores concluíram que a terapia gênica envolvendo p27 poderá vir a tornar-se uma grande opção no tratamento dos pacientes com GBM.

A família Bcl2 é formada por *genes* inibidores e promotores de apoptose. As duas proteínas, Bcl2 e Bclx, têm a função inibidora na apoptose. Alguns estudos *in vitro* mostram relação entre a expressão de Bcl-2 e uma radio-resistência em GBM. STREFFER et al. (2002), através de um trabalho *in vitro* com células de GBM, concluíram que altos níveis de Bclx estão associados a uma maior radio-resistência.

Em similaridade a alguns trabalhos na literatura, as expressões de Bcl2 e Bclx não se mostraram, no presente estudo, influenciadoras do prognóstico dos pacientes com GBM.

NEWCOMB et al (1998) avaliaram as expressões de EGFR, p53 e bcl-2 em pacientes com GBM, e verificaram que não houve relação entre a expressão destas proteínas com a idade dos pacientes e nem com a sobrevida.

STRIK et al. (1999) concluíram, também, que não houve alteração significativa da sobrevida livre de doença em relação aos pacientes que expressavam ou não a proteína (8 meses x 12 meses).

RIBEIRO et al. (2004), semelhante ao presente trabalho, compararam a expressão de bcl-2 e p53 em relação à sobrevida e idade dos pacientes. Não houve relação significativa entre a expressão protéica e as demais variáveis. Na literatura não existe um consenso sobre o papel dessas proteínas na história natural do GBM.

KRAUS et al. (2001) avaliaram, também, a expressão de p53 e bcl-2 em relação à progressão livre de doença e não encontraram diferenças. Apesar de as expressões de p53 e bcl2 (29% e 67%) serem maiores nos pacientes com tempo de recidiva superior a 12 meses em relação aos pacientes com tempo de recidiva menor que seis meses (17% e 61%), essa diferença não foi significativa.

FELS et al. (2000) não evidenciaram relação significativa do aumento da expressão com aumento da sobrevida nos pacientes com GBM. Em análise multivariada, o padrão de positividade de bcl2 não foi considerado como um prognóstico negativo.

O tratamento do GBM é, sem dúvida, um grande desafio para a comunidade médica científica mundial. Nosso trabalho mostrou que há alguns pontos divergentes em relação a alguns trabalhos na literatura. Sendo assim, trabalhos multicêntricos, além de unir um maior número de casos, resultaria na padronização das técnicas de execução e de avaliação dos resultados. Isso sem dúvida seria um importante passo

na tentativa de se conhecer uma pouco mais da biologia desse agressivo tumor e ajudaria no desenvolvimento de novas terapias.

6 CONCLUSÃO

1. Os marcadores, de uma forma geral, não tiveram uma hiper-expressão nas amostras avaliadas. A exceção ocorreu com bclx que, na maioria das vezes, apresentou-se hiper-expresso.
2. Em relação à sobrevida global e à expressão dos marcadores tumorais, apenas ausências da expressão de EGFR e o aumento da expressão de p27 nuclear influenciaram na sobrevida dos pacientes com GBM.
3. Na análise das características clínicas, apenas a idade, o sexo e o grau de *RPA* foram significativos na sobrevida.
- 3.1 Ao se avaliar as características clínicas com a expressão dos marcadores, as únicas relações significativas foram o p53 com sexo, p53 com KPS, p21 no núcleo com idade, p21 no núcleo com o *RPA* e p21 no citoplasma com KPS.
4. Ao se avaliar os marcadores através do modelo de regressão de *cox*, apenas a ausência da expressão do EGFR foi considerada fator prognóstico independente.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Barker FG 2nd, Chang SM, Larson DA, et al. Age and radiation response in glioblastoma multiforme. **Neurosurgery** 2001a; 49:1288-98.

Barker FG 2nd, Simmons ML, Chang SM, et al. EGFR overexpression and radiation response in glioblastoma multiforme. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2001b; 51:410-8.

Birner P, Piribauer M, Fischer I, et al. Prognostic relevance of p53 protein expression in glioblastoma. Institute of Clinical Pathology, University of Vienna, Vienna, Austria. **Oncol Rep** 2002; 9:703-7.

Bogler O, Huang HJ, Kleihues P, Cavenee WK. The p53 *gene* and its role in human brain tumors. **Glia** 1995; 15:308-27.

Burger PC, Green SB. Patient age, histologic features, and length of survival in patients with glioblastoma multiforme. **Cancer** 1987; 59:1617-25.

Burton EC, Lamborn KR, Forsyth P, et al. Aberrant p53, mdm2, and proliferation differ in glioblastomas from long-term compared with typical survivors. **Clin Cancer Res** 2002; 8:180-7

Cariou S, Catzavelos C, Slingerland JM. Prognostic implications of expression of the cell cycle inhibitor protein p27Kip1. **Breast Cancer Res Treat** 1998; 52:29-41.

Chakravarti A, Seiferheld W, Tu X, et al. Immunohistochemically determined total epidermal growth factor receptor levels not of prognostic value in newly diagnosed glioblastoma multiforme: report from the Radiation Therapy Oncology Group. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2005; 62:318-27.

Chan MF, Schupak K, Burman C, Chui CS, Ling CC. Comparison of intensity-modulated radiotherapy with three-dimensional conformal radiation therapy planning for glioblastoma multiforme. **Med Dosim** 2003; 28:261-5

Chang EL, Yi W, Allen PK, Levin VA, Sawaya RE, Maor MH. Hypofractionated radiotherapy for elderly or younger low-performance status glioblastoma patients: outcome and prognostic factors. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2003; 56:519-28.

Cox DR. Regression models and life-tables. **J Roy Statist Soc** 1972; 34: 187-220

Curran WJ Jr, Scott CB, Horton J, et al. Recursive partitioning analysis of prognostic factors in three Radiation Therapy Oncology Group malignant glioma trials. **J Natl Cancer Inst** 1993; 85:704-10.

Deininger MH, Grote E, Wickboldt J, Meyermann R. Distinct radiochemotherapy protocols differentially influence cellular proliferation and expression of p53 and Bcl-2 in glioblastoma multiforme relapses in vivo. **J Neurooncol** 2000; 48:121-9.

Deutsch M, Green SB, Strike TA, et al. Results of a randomized trial comparing BCNU plus radiotherapy, streptozotocin plus radiotherapy, BCNU plus hyperfractionated radiotherapy, and BCNU following misonidazole plus radiotherapy in the postoperative treatment of malignant glioma. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 1989; 16:1389-96.

Eley GD, Wang X.-Y, Frederick L. et al. Genetic characterization of the EGFR amplicons in glioblastoma multiforme [abstract]. **Neuro-Oncology** 2000; 2:260.

Feldkamp MM, Lala P, Lau N, et al. Expression of activated epidermal growth factor receptors, Ras-guanosine triphosphate, and mitogen-activated protein Kinase in human glioblastoma multiforme specimens. **Neurosurgery** 1999; 45:1442-53.

Fels C, Schafer C, Huppe B, et al. Bcl-2 expression in higher-grade human glioma: a clinical and experimental study. **J Neurooncol** 2000; 48:207-16.

Ferrigno R, Salvajoli JV. Tumores do sistema central do adulto. In: Savajoli JV, Souhami L, Faria SL, editores. **Radioterapia em oncologia**. Rio de Janeiro: MEDSI; 1999. p.865-921.

Gutin PH, Prados MD, Phillips TL, et al. External irradiation followed by an interstitial high activity iodine-125 implant "boost" in the initial treatment of malignant gliomas: NCOG study 6G-82-2. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 1991; 21:601-6.

Haas-Kogan DA, Kogan SS, Yount G, et al. p53 function influences the effect of fractionated radiotherapy on glioblastoma tumors. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 1999; 43:399-403.

Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. **Cell** 1993; 75:805-16.

Huang HS, Nagane M, Klingbeil CK, et al. The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling. **J Biol Chem** 1997; 272:2927-35.

Jeremic B, Milicic B, Grujcic D, Dagovic A, Aleksandrovic J. Multivariate analysis of clinical prognostic factors in patients with glioblastoma multiforme treated with a combined modality approach. **J Cancer Res Clin Oncol** 2003; 129:477-84.

Kaplan, EL, Meier P: Non parametric estimation from incomplete observations. **J Am Stat Assoc** 1958; 53:447-57,

Kim IA, Yang YJ, Yoon SC, et al. Potential of adenoviral p53 *gene* therapy and irradiation for the treatment of malignant gliomas. **Int J Oncol** 2001; 19:1041-7.

Kirla RM, Haapasalo HK, Kalimo H, Salminen EK. Low expression of p27 indicates a poor prognosis in patients with high-grade astrocytomas. **Cancer** 2003; 97:644-8.

Kirla R, Salminen E, Huhtala S, et al. 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** 2000; 46:71-80.

Kolker JD, Halpern HJ, Krishnasamy S, et al. "Instant-mix" whole brain photon with neutron boost radiotherapy for malignant gliomas. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 1990; 19:409-14.

Kraus JA, Wenghoefer M, Glesmann N, et al. 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** 2001; 52:263-72.

Krishnan S, Rao RD, James CD, Sarkaria JN. Combination of epidermal growth factor receptor targeted therapy with radiation therapy for malignant gliomas. **Front Biosci** 2003; 8:e270-80.

Krishnasamy S, Vokes EE, Dohrmann GJ, et al. Concomitant chemoradiotherapy, neutron boost, and adjuvant chemotherapy for anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme. **Cancer Invest** 1995; 13:453-9.

Kyritsis AP, Bondy ML, Hess KR, et al. Prognostic significance of p53 immunoreactivity in patients with glioma. **Clin Cancer Res** 1995; 1:1617-22.

Lacroix M, Abi-Said D, Fourney DR, et al. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. **J Neurosurg** 2001; 95:190-8.

Lammering G, Valerie K, Lin PS, Hewit TH, Schmidt-Ullrich RK. Radiation-induced activation of a common variant of EGFR confers enhanced radioresistance. **Radiother Oncol** 2004; 72:267-73.

Lehnert S. Radiobiologia. In: Savajoli JV, Souhami L, Faria SL, editores. **Radioterapia em oncologia**. Rio de Janeiro: MEDSI; 1999. p.91-118.

Mantel N, Haenswel W. Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. **Cancer Chemother Rep** 1966; 50:163-70,

Mischel PS, Cloughesy TF. Targeted molecular therapy of GBM. **Brain Pathol** 2003; 13:52-61.

Nakagawa K, Aoki Y, Fujimaki T, et al. High-dose conformal radiotherapy influenced the pattern of failure but did not improve survival in glioblastoma multiforme. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 1998; 40:1141-9.

Newcomb EW, Cohen H, Lee SR, et al. Survival of patients with glioblastoma multiforme is not influenced by altered expression of p16, p53, EGFR, MDM2 or Bcl-2 genes. **Brain Pathol** 1998; 8:655-67.

Nieder C, Andratschke N, Wiedenmann N, Busch R, Grosu AL, Molls M. Radiotherapy for high-grade gliomas: does altered fractionation improve the outcome? **Strahlenther Onkol** 2004; 180:401-7.

Nishizaki T, Kubota H, Harada K, et al. Clinical evidence of distinct subgroups of astrocytic tumors defined by comparative genomic hybridization. **Hum Pathol** 2000, 31:608-14.

Park KH, Lee J, Yoo CG, et al. Application of p27 gene therapy for human malignant glioma potentiated by using mutant p27. **J Neurosurg** 2004; 101:505-10.

Quan AL, Barnett GH, Lee SY, et al. Epidermal growth factor receptor amplification does not have prognostic significance in patients with glioblastoma multiforme. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**. 2005; 63:695-703.

Ribeiro M de C, Coutinho LM, Hilbig A. The role of apoptosis, cell proliferation index, bcl-2, and p53 in glioblastoma prognosis. **Arq Neuropsiquiatr** 2004; 62:262-70.

Salcman M. Brain tumors and the geriatric patient. **J Am Geriatr Soc** 1982; 30:501-8.

Scott CB, Scarantino C, Urtasun R, et al. Validation and predictive power of Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) recursive partitioning analysis classes for malignant glioma patients: a report using RTOG 90-06. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 1998; 40:51-5.

Shiraishi S, Tada K, Nakamura H, et al. Influence of p53 mutations on prognosis of patients with glioblastoma. **Cancer** 2002; 95:249-57.

Shinojima N, Tada K, Shiraishi S, et al. Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme. **Cancer Res** 2003; 63:6962-70.

Simmons ML, Lamborn KR, Takahashi M, et al. Analysis of complex relationships between age, p53, epidermal growth factor receptor, and survival in glioblastoma patients. **Cancer Res** 2001; 61:1122-8.

Smith JS, Tachibana I, Passe SM, et al. PTEN mutation, EGFR amplification, and outcome in patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme. **J Natl Cancer Inst** 2001 93:1246-56.

Sneed PK, Gutin PH, Larson DA, et al. Patterns of recurrence of glioblastoma multiforme after external irradiation followed by implant boost. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 1994; 29:719-27.

Sorenson CM. Bcl-2 family members and disease. **Biochim Biophys Acta** 2004; 1644:169-77.

Souhami L, Seiferheld W, Brachman D, et al. Randomized comparison of stereotactic radiosurgery followed by conventional radiotherapy with carmustine to conventional radiotherapy with carmustine for patients with glioblastoma multiforme: report of Radiation Therapy Oncology Group 93-05 protocol. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2004; 60:853-60.

Streffer JR, Rimner A, Rieger J, Naumann U, Rodemann HP, Weller M. BCL-2 family proteins modulate radiosensitivity in human malignant glioma cells. **J Neurooncol** 2002; 56:43-9.

Strik H, Deininger M, Streffer J, et al. BCL-2 family protein expression in initial and recurrent glioblastomas: modulation by radiochemotherapy. **J Neurol Neurosurg Psychiatry** 1999; 67:763-8.

Stupp R, Hegi ME. Recent developments in the management of malignant glioma. In: Perry MC, editor. **ASCO 2003 Educational Book**. Alexandria: American Society of Clinical Oncology; 2003. p.779-88.

Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. **N Engl J Med** 2005; 352:987-96.

Suzuki M, Nakamatsu K, Kanamori S, et al. Feasibility study of the simultaneous integrated boost (SIB) method for malignant gliomas using intensity-modulated radiotherapy (IMRT). **Jpn J Clin Oncol** 2003; 33:271-7

Wang TJ, Huang MS, Hong CY, Tse V, Silverberg GD, Hsiao M. Comparisons of tumor suppressor p53, p21, and p16 *gene* therapy effects on glioblastoma tumorigenicity in situ. **Biochem Biophys Res Commun** 2001; 287:173-80.

Wasserfallen JB, Ostermann S, Pica A, et al. Can we afford to add chemotherapy to radiotherapy for glioblastoma multiforme? Cost-identification analysis of concomitant and adjuvant treatment with temozolomide until patient death. **Cancer** 2004; 101:2098-105.

Xia P, Amols IH, Ling CC. Three-dimensional conformal radiotherapy and intensity-modulated radiotherapy. In: Leibel SA, Phillips TL, editores. **Text book of radiation oncology**. Philadelphia: Saunders; 2004. p.163-86.

Zhu A, Shaeffer J, Leslie S, Kolm P, El-Mahdi AM. Epidermal growth factor receptor: an independent predictor of survival in astrocytic tumors given definitive irradiation. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 1996; 34:809-15.

Anexo 1 –PROTOCOLO DE REAÇÕES - TMA

O bloco de TMA é cortado no micrótomo rotativo na espessura de 5 µm. Coloca-se o tape contra o bloco de TMA e corta-se. O tape com o material é colado na lâmina apropriada e com a pressão manual de um rolo o tape é fixado na lâmina. A lâmina com o tape sofre a irradiação com UV por 30 min, sendo em seguida mergulhada em solução solvente (TPC) e seca a temperatura ambiente. Os tapes são retirados após a secagem. As lâminas sofrem banho de parafina, estando prontas para o armazenamento em freezer.

Desparafinização das lâminas deixadas por 24 horas em estufa a 60°C:

Xilol a 60°C por 20 minutos

Xilol à temperatura ambiente por 20 minutos

Etanol 100% 30 segundos

Etanol 95% 30 segundos

Etanol 70% 30 segundos

Lavar as lâminas em água corrente e destilada.

Ferver a solução tampão citrato 10 mM pH 6.0 em panela de pressão (Eterna®, Nigro) destampada, mergulhar as lâminas e lacrar a panela com a válvula de segurança aberta.

Após a saída do vapor saturado, abaixar a válvula de segurança e aguardar a pressurização total. Contar 3 minutos após esse sinal (método de recuperação com calor úmido usando panela de pressão).

Deixar a panela fechada sob água corrente por 10 minutos. Destampar a panela com as lâminas e deixar por mais 10 minutos à temperatura ambiente.

Lavar as lâminas em água corrente e destilada.

Proceder ao bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ 3%, (água oxigenada 10 vol) com 4 trocas de 5 minutos cada.

Lavar em água corrente e destilada.

Lavar com solução salina tamponada com fosfatos (*PBS-phosphate buffered saline*) 10mM pH 7.4 por 5 minutos.

Incubar as lâminas com o anticorpo primário diluído em título pré-estabelecido conforme tabela abaixo em tampão PBS contendo albumina bovina (BSA) 1% (Sigma, A9647, EUA) e azida sódica (NaN₃) 0,1%, por 18 horas a 4°C em câmara úmida.

Anticórpors	Clones	Títulos	Fabricantes
P27	SX53G8	1:200	Dako M7203
P21	SX118	1:30	Dako M7202
BCI _x	poli	1:50	Dako A3535
BCI ₂	124	1:50	Dako M0887
P53	DO-7	1:500	Dako M7001
EGFR	H11	1:20	Novo Castra WCL-EGFR

Lavar em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada.

Incubar com o anticorpo secundário biotinilado-reagente C (*Biotinylated goat anti-mouse/rabbit Ig*) do kit StreptABComplex/HRP Duet (*mouse/rabbit*) (Dako A/S, K492, Dinamarca) no título pré-estabelecido de 1:200, diluído em PBS, por 30 minutos a 37°C.

Lavar em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada.

Incubar com o complexo - reagente A (*Streptavidin*) e reagente B (*Biotinylated peroxydase*) nos títulos pré-estabelecidos de 1:200, diluído em PBS, por 30 minutos a 37°C.

Lavar em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada.

Incubar as lâminas em solução substrato: 60 mg% de 3,3' Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB) (Sigma, D-5637, EUA); 1 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO); 1 mL de H₂O₂ 6% (água oxigenada 20 vol); 100 mL de PBS; por 5 minutos a 37°C, ao abrigo da luz.

Observar ao microscópio, nas lâminas controles, o desenvolvimento de precipitado castanho dourado, como produto final da reação.

Lavar em água corrente e água destilada por 3 minutos.

Contracorar com Hematoxilina de Harris por 1 minuto.

Lavar bem em água corrente e destilada
Imergir 2 vezes em água amoniacal (solução de hidróxido de amônio 0,5%),
lavando em seguida em água corrente e destilada.
Desidratar as lâminas em:
Etanol 80%, 30 segundos
Etanol 95%, 30 segundos
Etanol 100% 2 vezes, 30 segundos cada
Xilol 4 vezes, 30 segundos cada
Montagem das lâminas em Entellan neu (Merck, 1.07961, Alemanha)

Anexo 2 - Relação da Expressão do EGFR com os fatores prognósticos

Variante	Categoria	EGFR		
		$\leq 0,75$	$> 0,75$	p
		Nº	Nº	
Idade	≤ 50	10	8	0,631
	> 50	18	19	
Sexo	Masculino	17	17	0,218
	Feminino	11	10	
KPS	< 70	4	4	0,902
	≥ 70	20	22	
RPA	≤ 4	8	10	0,706
	> 4	16	16	
Extensão da Ressecção	Total	13	14	0,991
	Parcial	12	13	
Dose	59 a 61Gy	20	18	N/A
	> 61 Gy	2	2	
	< 59 GY	6	7	
Fracionamento	180 cGy	23	16	0,091
	200 cGy	5	10	
Energia	Cobalto	2	2	N/A
	4 Mv	16	15	
	6 Mv	7	5	
Quimioterapia	Sim	7	3	0,161
	Não	20	24	

Anexo 3 - Relação da expressão do p53 com os fatores prognósticos.

Variante	Categoria	P53		
		$\leq 0,75$	$> 0,75$	p
Idade	≤ 50	9	9	0,507
	> 50	22	15	
Sexo	Masculino	16	18	0,077
	Feminino	15	6	
KPS	< 70	8	0	0,009
	≥ 70	21	21	
RPA	≤ 4	11	7	0,738
	> 4	18	14	
Extensão da Ressecção	Total	13	14	0,148
	Parcial	17	8	
Dose	59 a 61Gy	21	17	N/A
	> 61 Gy	2	2	
	< 59 GY	8	5	
Fracionamento	180 cGy	8	7	0,707
	200 cGy	23	16	
Energia	Cobalto	2	2	N/A
	4 Mv	19	12	
	6 Mv	6	6	
Quimioterapia	Sim	5	5	0,600
	Não	26	18	

Anexo 4 - Relação da expressão do p21 no núcleo com os fatores prognósticos.

Variante	Categoria	p21 núcleo		
		$\leq 0,25$	$> 0,25$	p
Idade	≤ 50	14	4	0,009
	> 50	15	22	
Sexo	Masculino (1)	18	16	0,968
	Feminino (2)	11	10	
KPS	< 70	4	4	0,902
	≥ 70	22	20	
RPA	≤ 4	13	5	0,032
	> 4	13	19	
Extensão da Ressecção	Total	13	14	0,571
	Parcial	14	11	
Dose	59 a 61Gy	20	18	N/A
	> 61 Gy	1	3	
	< 59 GY	8	5	
Fracionamento	180 cGy	7	8	0,520
	200 cGy	22	17	
Energia	Cobalto	3	1	N/A
	4 Mv	14	17	
	6 Mv	9	3	
Quimioterapia	Sim	7	3	0,203
	Não	25	24	

Anexo 5 - Relação da expressão do p21 no citoplasma com os fatores prognósticos

Variante	Categoria	p21 citoplasma		p
		$\leq 0,75$	$> 0,75$	
Idade	≤ 50	10	8	0,631
	> 50	18	19	
Sexo	Masculino	19	15	0,348
	Feminino	9	12	
KPS	< 70	2	6	0,095
	≥ 70	24	18	
RPA	≤ 4	10	8	0,706
	> 4	16	16	
Extensão da Ressecção	Total	11	16	0,165
	Parcial	15	10	
Dose	59 a 61Gy	18	20	N/A
	> 61 Gy	2	2	
	< 59 Gy	8	5	
Fracionamento	180 cGy	19	20	0,457
	200 cGy	9	6	
Energia	Cobalto	3	1	N/A
	4 Mv	18	13	
	6 Mv	3	9	
Quimioterapia	Sim	3	7	0,161
	Não	24	20	

Anexo 6 - Relação da Expressão do p27 no núcleo com os fatores prognósticos

Variante	Categoria	P27 núcleo		
		$\leq 0,75$	$> 0,75$	p
Idade	≤ 50	11	7	0,385
	> 50	18	19	
Sexo	Masculino	20	14	0,249
	Feminino	9	12	
KPS	< 70	5	3	0,599
	≥ 70	22	20	
RPA	≤ 4	12	6	0,178
	> 4	15	17	
Extensão da Ressecção	Total	15	12	0,974
	Parcial	14	11	
Dose	59 a 61Gy	21	17	N/A
	> 61 Gy	2	2	
	< 59 Gy	6	7	
Fracionamento	180 cGy	5	10	0,091
	200 cGy	23	16	
Energia	Cobalto	2	2	N/A
	4 Mv	13	18	
	6 Mv	9	3	
Quimioterapia	Sim	7	3	0,252
	Não	22	22	

Anexo 7 - Relação da Expressão do p27 no citoplasma com os fatores prognósticos

Variante	Categoria	P27 citoplasma		p
		≤1,0	>1,0	
Idade	≤ 50	10	8	0,391
	> 50	16	21	
Sexo	Masculino	15	19	0,551
	Feminino	11	10	
KPS	< 70	4	4	0,804
	≥ 70	19	23	
RPA	≤ 4	9	9	0,670
	> 4	14	18	
Extensão da Ressecção	Total	12	15	0,974
	Parcial	11	14	
Dose	59 a 61Gy	18	20	N/A
	> 61Gy	2	2	
	< 59Gy	6	7	
Fracionamento	180 cGy	8	7	0,636
	200 cGy	18	21	
Energia	Cobalto	3	1	N/A
	4 Mv	16	15	
	6 Mv	8	7	
Quimioterapia	Sim	3	7	0,252
	Não	22	22	

Anexo 8 - Relação da expressão de Bcl2 com os fatores prognósticos.

Variante	Categoria	Bcl2		p
		≤0,3	> 0,3	
Idade	≤ 50	7	11	0,291
	> 50	20	17	
Sexo	Masculino	14	20	0,135
	Feminino	13	8	
KPS	< 70	5	3	0,517
	≥ 70	21	21	
RPA	≤ 4	10	8	0,706
	> 4	16	16	
Extensão da Ressecção	Total	12	15	0,262
	Parcial	15	10	
Dose	59 a 61Gy	17	21	N/A
	> 61Gy	3	1	
	< 59Gy	7	6	
Fracionamento	180 cGy	9	6	0,973
	200 cGy	17	22	
Energia	Cobalto	1	3	N/A
	4 Mv	14	17	
	6 Mv	8	4	
Quimioterapia	Sim	3	7	0,161
	Não	24	20	

Anexo 9 - Relação da Expressão bclx com os fatores prognósticos.

Variante	Categoria	Bclx		p
		≤ 12	> 12	
Idade	≤ 50	10	8	0,769
	> 50	19	18	
Sexo	Masculino	17	17	0,606
	Feminino	12	9	
KPS	< 70	5	3	0,599
	≥ 70	22	20	
RPA	≤ 4	11	7	0,449
	> 4	16	16	
Extensão da Ressecção	Total	16	11	0,416
	Parcial	12	13	
Dose	59 a 61Gy	23	15	
	> 61 Gy	0	4	
	< 59 Gy	6	7	
Fracionamento	180 cGy	8	7	
	200 cGy	21	18	
Energia	Cobalto	1	3	
	4 Mv	16	15	
	6 Mv	8	4	
Quimioterapia	Sim	6	4	0,658
	Não	23	21	

Anexo 10 - Sobrevida dos pacientes.

Variável	Categoria	Sobrevida (%)			p
		1 ano	2 anos	3 anos	
Global		60,38	14,57	2,43	
Idade	≤ 50	69,70	46,46	9,29	0,0036
	> 50	56,16	2,81	00,00	
Sexo	Masculino	60,61	23,57	3,93	0,0105
	Feminino	60,0	00,00		
KPS	< 70	50,0	21,43	00,00	0,64
	≥ 70	62,50	12,50	3,12	
RPA	≤ 4	70,59	42,35	8,47	0,0005
	> 4	54,84	00,00		
Extensão da Ressecção	Total	69,23	20,36	4,07	0,34
	Parcial	55,10	9,18	00,00	
Dose	59 - 60Gy	61,64	13,53	3,38	0,67
	> 60Gy	50,0	50,0	00,00	
	< 59Gy	60,0	8,57	00,00	
Fracionamento	200 cGy	50,0	12,86	00,00	0,221
	180 cGy	85,71	12,24	00,00	
	4 Mv	58,62	11,72	3,91	
Energia	6 Mv	50,00	4,55	00,00	0,567
	Cobalto	75,00	25,00	00,00	
Quimioterapia	Sim	78,95	33,83	00,00	0,0548
	Não	57,65	10,48	3,49	
EGFR	≤ 0,75	47,17	6,74	00,00	0,075
	> 0,75	73,58	21,88	4,38	
p53	≤ 0,75	66,10	20,77	4,15	0,36
	> 0,75	53,19	6,94	00,00	
p21 núcleo	≤ 0,25	60,00	14,48	00,00	0,72
	> 0,25	60,78	14,67	4,89	
p21 citoplasma	≤ 0,75	57,69	19,23	6,41	0,42
	> 0,75	62,96	11,11	00,00	
p27 núcleo	≤ 0,75	68,42	22,81	4,56	0,0218
	> 0,75	51,02	4,64	00,00	
p27 citoplasma	≤ 1,0	63,27	14,60	7,30	0,8883
	> 1,0	57,89	14,47	00,00	
bcl2	≤ 0,3	73,58	16,35	5,45	0,365
	> 0,3	47,17	12,86	00,00	
bclx	≤ 12	64,29	13,64	00,00	0,63
	> 12	56,00	15,68	5,23	

Anexo 11 - Ficha para coleta de dados

Nome: _____

Registro _____ Sexo: ☐ M ☐ F Raça _____

Idade (ao diagnóstico): _____ Procedência: _____

Dados Clínicos

Data do diagnóstico: ____/____/____

Extensão da ressecção: ☐ completo ☐ parcial ☐ ignorado

KPS _____ RPA: _____

Topografia do Tumor: _____

Data do tratamento (início): ____/____/____

Dose de radiação: _____ cGy Fracionamento: _____ x _____

Técnica de Radioterapia: ☐ RT crânio total ☐ RT localizada

Energia utilizada: _____

Quimioterapia: ☐ sim ☐ não Qual _____ nº de ciclos _____

Local da cirurgia: ☐ Hospital do Câncer ☐ Outro hospital

Número de ressecções cirúrgicas: ☐ 1 ☐ 2 ☐ Mais de duas

Data da última informação: ____/____/____

Status: _____
1) vivo 2) morte por câncer
3) morte por outra causa 4) Perdido de seguimento