

**O CONTROLE DA TRADUÇÃO PELA
VIA mTOR NOS MECANISMOS DE
TUMORIGÊNESE EM GLIOMAS**

ARTHUR WILLIAM ALVARENGA

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

Área de Concentração: Oncologia

Orientadora: Dra. Glauca Noeli Maroso Hajj

**Co-Orientadora: Dra. Isabela Werneck da
Cunha**

São Paulo

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Alvarenga, Arthur William

O controle da tradução pela via mTOR nos mecanismos de tumorigênese em gliomas / Arthur William Alvarenga – São Paulo; 2012. 63p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientadora: Glauca Noeli Maroso Hajj

Descritores: 1. CÂNCER. 2. NEOPLASIAS. 3. GLIOMA. 4. SISTEMA NERVOSO CENTRAL. 5. TRANSFORMAÇÃO CELULAR NEOPLÁSICA. 6. TUMORIGÊNESE. 7. BIOSÍNTESE DE PROTEÍNAS.

“A tarefa não é tanto ver o que ninguém viu ainda,
mas pensar o que ninguém pensou
sobre algo que todos vêem.”

Arthur Schopenhauer

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação à **Deus** e a tudo o que Ele representa em minha vida e à minha **família**, imprescindíveis no meu viver.

AGRADECIMENTOS

À Deus, primeiramente, agradeço por ter me dado esta oportunidade, por ter guiado meus passos nesta jornada, por todos os dias da minha existência me dando força e proteção!

À Dra. Glauca Hajj, por sua orientação séria e dedicada, e por ter acreditado em meu trabalho. Minha imensa gratidão pelos ensinamentos transmitidos ao decorrer deste trabalho, com certeza serão levados para vida toda. Muito obrigado pela chance que eu recebi em me tornar um profissional e uma pessoa melhor!

À Dra. Vilma Martins, por me aceitar em seu laboratório, e pelo exemplo de dedicação incansável à ciência. Seus conselhos e modo de agir são inspiradores!

À Dra. Isabela Werneck, minha co-orientadora, por estar sempre disponível e atenciosa para me auxiliar. Obrigado por todo o conhecimento transmitido!

Ao Dr. Fernando Werneck, meu primeiro mentor científico, que sempre me motivou e ainda me motiva em fazer ciência mesmo à distância. Obrigado por seus sempre oportunos conselhos e ensinamentos!

Ao Dr. Rafael Malagoli, por todo tempo disponível, conselhos e dicas.

Aos meus amigos, Dra. Nicolle Queiroz-Hazarbassanov, Dr. Dominique Bourgeon, Bruna Roz e Giovanna de Brito, pelas “brainstorms”, idéias mirabolantes, os conselhos, dicas, piadas, sorrisos, desabafos, vocês foram fundamentais na realização deste sonho. Muito obrigado!!!

À todos os colegas do laboratório de Biologia Celular e Molecular – BCM, agradeço pela amizade, instruções, pela troca de conhecimentos e pela disposição em sempre colaborar!

Aos meus pais, Carlos e Leny, por serem os primeiros a sempre acreditarem e investirem em mim, pelo apoio incondicional em todas as horas, pelas suas orações, por sempre criarem um ambiente favorável cheio de amor e de atenção para o meu desenvolvimento! Por sempre me ensinar o valor da

honestidade, do trabalho e da dedicação, me ajudando a nunca desistir de um sonho. Essa conquista também é de vocês. Amo vocês!!!

Aos meus irmãos Elber e Willie, por todo o apoio, preocupação, amizade, troca de conhecimentos e por todos os momentos de descontração.

Aos meus avós, pelo apoio mesmo a distância, por me motivarem e acreditarem em mim e por suas sempre constantes orações.

À minha namorada Jaqueline, por seu constante incentivo, apoio, compreensão e paciência. Muito obrigado, amo-te!

Aos meus amigos mais queridos, pelo apoio, e todas as palavras de incentivo durante a realização de todo o mestrado.

Ao Centro Internacional de Pesquisa e Ensino – CIPE, aos professores, funcionários e demais alunos que muito contribuíram para a realização deste trabalho.

À Fundação Antônio Prudente pela oportunidade de concretizar um sonho. Por ter me proporcionado experiências acadêmicas e de vida extremamente importantes.

À Capes/CNPq, pela bolsa de Mestrado e pelo apoio financeiro na realização desse projeto.

RESUMO

Alvarenga AW. **O controle da tradução pela via mTOR nos mecanismos de tumorigênese em gliomas**. São Paulo; 2012. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

A síntese de novas proteínas é um processo essencial para a proliferação celular e, portanto, as vias de controle da tradução podem exercer um papel chave na tumorigênese. O controle da tradução pela via de mTOR é bem conhecido e, interessante, mutações genéticas encontradas em diversos tipos tumorais, incluindo gliomas e glioblastomas, levam a uma super-ativação de mTOR. A proteína mTOR forma os complexos mTORC1 (formado pelas proteínas mTOR e Raptor, entre outras) e mTORC2 (formado pelas proteínas mTOR e Rictor, entre outras). O primeiro complexo é susceptível ao inibidor rapamicina e está relacionado ao controle da tradução, proliferação, autofagia e hipóxia. Já mTORC2 é insensível a rapamicina e regula eventos relativos à adesão e migração celulares. A ativação de elementos de mTORC1 em tumores foi amplamente observada na literatura, no entanto, existem poucos trabalhos observando a expressão destas proteínas em gliomas, um tipo tumoral que ainda hoje apresenta altos índices de morbidade. Já a expressão de proteínas do complexo mTORC2 em tumores humanos foi pouco estudada. A rapamicina tem sido utilizada atualmente em ensaios clínicos de terapia anti-tumoral. No entanto, a resistência à rapamicina pode ser observada, reduzindo a eficácia do tratamento, o que poderia estar relacionado com a presença do complexo mTORC2. Assim, a atividade de mTOR, bem como a expressão de proteínas dos complexos mTORC1 e 2 (como Raptor e Rictor, respectivamente) em gliomas poderia contribuir para orientar uma conduta terapêutica diferencial para um tipo tumoral que apresenta baixa responsividade às terapias atuais. Utilizando um tissue microarray de 190 casos de gliomas de diferentes graus, pudemos observar uma alta

expressão das proteínas da via de PI3K/mTOR, que aumentavam com a progressão da doença. Por outro lado, o componente do complexo mTORC2, Rictor, apresentou expressão que diminuía com a progressão tumoral. Observando a sobrevida global dos indivíduos acometidos, verificamos uma correlação estatisticamente significativa em pAKT e mTOR, aonde os indivíduos que tinham uma menor expressão sobreviviam mais do que aqueles que tinha uma expressão alta destas proteínas. Quando utilizamos mais de uma proteína da via para realizar as análises de sobrevida, estes resultados ficaram mais evidentes, mostrando que estas proteínas poderiam ser aplicadas para estimativas de prognóstico. Em conjunto, nossos dados evidenciam a importância da via de PI3K/mTOR na progressão tumoral em glioblastomas e sugere que inibidores desta via sejam potenciais alvos terapêuticos para este tipo tumoral.

SUMMARY

Alvarenga AW. **[The control of the translation mechanisms in the mTOR pathway in tumorigenesis gliomas]**. São Paulo, 2012. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

The synthesis of new proteins is a key process for cell proliferation, thus translation control may play a role in tumorigenesis. The control of the translation by the mTOR pathway is well known and, interestingly, genetic mutations found in several tumor types, including gliomas and glioblastomas, lead to an over-activation of mTOR. mTOR forms the complexes mTORC1 (formed by the proteins mTOR and Raptor, among others) and mTORC2 (formed by Rictor and mTOR proteins, among others). The first complex is susceptible to the inhibitor rapamycin and is related to the control of translation, proliferation, autophagy and hypoxia. mTORC2 is insensitive to rapamycin and regulates events related to cell adhesion and migration. mTORC1 activation in tumors has been widely reported in the literature, however, there are few studies looking at the expression of these proteins in gliomas, a tumor type that still has high morbidity. The expression of mTORC2 proteins in human tumors hasn't been extensively approached. Rapamycin is currently in use in clinical trials for antitumor therapy. However, resistance to rapamycin may be observed, reducing the effectiveness of treatment, which could be related to the presence of mTORC2. Thus, the activity of mTOR and protein expression of complexes mTORC1 and 2 in gliomas may help to guide a therapeutic differential for a tumor type that has low responsiveness to current therapies. Using a tissue microarray of 190 cases of gliomas of different degrees, we observed a high expression of the proteins of the PI3K/mTOR pathway, which increases with disease progression. On the other hand, the component of the mTORC2 complex, Rictor, showed decreased expression in tumor progression. Observing global survival of the affected individuals, we found a statistically significant

correlation in pAkt and mTOR, where individuals who had a lower expression survived longer than those who had a high expression of these proteins. When using more than one protein of the pathway to perform the survival analyzes, the results were more evident, indicating that these proteins could be applied to estimate disease prognosis. Together, our data show the importance of the PI3K/mTOR pathway in tumor progression in glioblastomas and suggests that inhibitors of this pathway are potential therapeutic agents for this tumor type.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Modelo ilustrando a via AKT/mTOR.....	6
Figura 2	Imunoistoquímica representativa de marcações fracas e fortes em tecidos de amostras de gliomas.....	23
Figura 3	Concordância entre os sistemas automatizados de análise de imagem (núcleos marcados).....	26
Figura 4	Concordância entre os sistemas automatizados de análise de imagem (pixels marcados).....	26
Figura 5	Quantificação de ensaio imunoistoquímico positivo (AKT e pAKT).....	28
Figura 6	Quantificação de ensaio imunoistoquímico positivo.....	31
Figura 7	Quantificação de ensaio imunoistoquímico positivo (Rictor)....	34
Figura 8	Quantificação de ensaio imunoistoquímico positivo com (a) anti-raptor no citoplasma.....	35
Figura 9	Quantificação de ensaio imunoistoquímico positivo com (a) anti-4E-BP1 no citoplasma.....	38
Figura 10	Sobrevida global de pacientes nos diversos graus apresentando alta ou baixa expressão de anti-AKT e anti-pAKT.....	40
Figura 11	Sobrevida global de pacientes grau IV apresentando alta ou baixa expressão de anti-AKT e anti-pAKT.....	41

Figura 12	Sobrevida global de pacientes nos diversos graus apresentando alta ou baixa expressão de anti-mTOR e anti-pmTOR.....	42
Figura 13	Sobrevida global de pacientes de grau IV apresentando alta ou baixa expressão de anti-mTOR e anti-pmTOR.....	43
Figura 14	Sobrevida global de pacientes nos diversos graus apresentando alta ou baixa expressão de anti-Raptor e anti-Rictor.....	44
Figura 15	Sobrevida global de paciente de grau IV apresentando alta ou baixa expressão de anti-Raptor e anti-Rictor.....	45
Figura 16	Sobrevida global de pacientes nos diversos graus apresentando alta ou baixa expressão de anti-4E-BP1.....	46
Figura 17	Sobrevida global de paciente de grau IV apresentando alta ou baixa expressão de anti-4E-BP1.....	47
Figura 18	Sobrevida global combinada anti-AKT com anti-Rictor no citoplasma.....	48
Figura 19	Sobrevida global combinada anti-raptor com anti-AKT.....	49
Figura 20	Sobrevida global combinada anti-rictor com anti-mTOR.....	50
Figura 21	Sobrevida global combinada anti-rictor com anti-pAKT somente no grau IV.....	51
Figura 22	Sobrevida global combinada anti-mTOR com anti-pAKT somente no grau IV.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Concentração dos anticorpos utilizados para as reações de imunoistoquímica.....	18
Tabela 2	Classificação por número de indivíduos por sexo e média de idade de acordo com o grau de gliomas dos indivíduos.....	21
Tabela 3	Classificação por localização anatômica de acordo com o grau dos gliomas.....	21
Tabela 4	Análise do TMA por observadores humanos (anti-pAKT).....	24
Tabela 5	Análise do TMA por observadores humanos (anti-pmTOR).....	25
Tabela 6	Correlação de AKT e pAKT com a proliferação medida através da marcação de Ki67.....	29
Tabela 7	Correlação de AKT e pAKT com PTEN.....	30
Tabela 8	Correlação de mTOR e pmTOR com a proliferação medida através da marcação de Ki67.....	32
Tabela 9	Correlação de mTOR e pmTOR com PTEN.....	33
Tabela 10	Correlação de Rictor com a proliferação medida através da marcação de Ki67.....	34
Tabela 11	Correlação de Rictor com PTEN.....	35
Tabela 12	Correlação de Raptor com a proliferação medida através da marcação de Ki67.....	36

Tabela 13	Correlação de Raptor com PTEN.....	37
Tabela 14	Correlação de 4EBP1 com a proliferação medida através da marcação de Ki67.....	38
Tabela 15	Correlação de 4EBP1 com PTEN.....	38

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

4E-BP	4E binding protein
5'TOP	5' Terminal Oligo Pyrimidine tract
ATP	Adenosine-5'-triphosphate
DAB	Tetra-hidrocloroeto de 3,5-diamino-benzidina
DEPTOR	DEP domain containing MTOR-interacting protein
DMSO	Dimetilsulfóxido
eIF4E	eukaryotic initiation factor 4E
FRAP	FK506-binding protein 12 and rapamycin-associated protein
GBM	Glioblastoma multiforme
mLST8/GβL	Mammalian LST8/G-protein β -subunit like protein
MMP-2	Metalloproteinase-2
MMP-9	Matrix metalloproteinase 9
mRNA	Messenger RNA (RNA mensageiro)
MT1-MMP	Membrane type 1 metalloprotease
mTOR	Mammalian target of rapamycin
mTORC1	Mammalian target of rapamycin complex 1
mTORC2	Mammalian target of rapamycin complex 2
ODC	Ornitina descarboxilase
p70S6K	Ribosomal S6 kinase
PBS	Tampão Fosfato Salino (Phosphate Buffered Saline)
PKA	Quinase dependente de fosfoinosítidos-1 (phosphoinositidedependent kinase)
PI3K	Fosfatidilinositol 3-Quinase (Phosphoinositide 3-kinase)
PRAS40	proline-rich Akt substrate of 40 kDa
RAFT1	Rapamycin and FKBP12 target-1
RAPT1	Rapamycin target-1
RAPTOR	Regulatory associated proteína of TOR
RICTOR	RPTOR independent companion of mTOR
TOR1	Target of rapamycin 1
TOR2	Target of rapamycin 2
TMA	Tissue Microarray
TSC1/TSC2	Tuberous sclerosis protein 1/ Tuberous sclerosis protein 2
VEGF	Vascular endothelial growth factor

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	13
3	CASUÍSTICA E MÉTODOS	14
3.1	Critérios de inclusão	14
3.2	Critérios de exclusão	14
3.3	Técnica de tissue microarray (TMA).....	14
3.4	Estudo imunoistoquímico.....	16
3.5	Concentração de anticorpos.....	17
3.6	Análise manual e automática das reações de imunoistoquímica	18
3.7	Análise estatística.....	19
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1	Dados de prontuário	20
4.2	Análise das reações de imunoistoquímica.....	21
4.3	AKT	27
4.4	mTOR.....	30
4.5	RICTOR.....	33
4.6	RAPTOR.....	35
4.7	4EBP-1	37
5	ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA GLOBAL.....	40
5.1	Análise combinatória utilizando dois marcadores.....	47
6	CONCLUSÃO	53
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

ANEXOS

Anexo 1 A comparison between manual and automated evaluation of tissue microarray patterns of protein expression

1 INTRODUÇÃO

Gliomas são os tipos mais comuns de tumores primários do sistema nervoso central e estão localizados normalmente nos hemisférios cerebrais na substância branca sub-cortical, são agressivos, altamente invasivos e frequentemente apresentam reincidência em seus portadores em um maior grau do que a lesão anterior, talvez por serem tumores que possuam tanto na parte genética e histológica uma composição muito heterogênea (PRADOS e LEVIN 2000).

Segundo a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS), os tumores oriundos do tecido neuroepitelial podem ser classificados como tumores: astrocíticos, oligodendrogliais, mistos, ependimários, do plexo coróide, gliais de origem incerta, neuroblásticos, do parênquima da pineal e embrionários. Sendo que os tumores astrocíticos incluem o astrocitoma difuso, astrocitoma anaplásico, glioblastoma multiforme (GBM), xantastrocitoma pleomórfico e astrocitoma subependimário de células gigantes. Estes diversos tipos de tumores são também classificados de acordo com o seu comportamento biológico, variando o grau de malignidade entre I (menor agressividade) e IV (maior agressividade) (KLEIHUES et al. 2000; MAHER et al. 2001).

Os tumores de grau I e II são referidos como gliomas de baixo grau e os tumores de grau III e IV são referidos como gliomas de alto grau. Esta classificação é baseada nas características das células tumorais, tais como,

índice mitótico, atipia nuclear, proliferação microvascular, características invasivas, capacidade de necrose e no comportamento clínico destes tumores. Geralmente, os de grau I apresentam células bem diferenciadas e são considerados benignos e curáveis com a completa ressecção cirúrgica.

Em contraste, os astrocitomas difusos correspondem ao grau II e são caracterizados por um alto grau de diferenciação celular, crescimento lento e infiltração difusa das estruturas cerebrais vizinhas. Estas lesões afetam adultos jovens e têm uma tendência à progressão maligna (KLEIHUES et al. 1993; LOUIS et al. 2007).

Os astrocitomas anaplásicos, classificados como grau III, são definidos como astrocitoma difusamente infiltrante com anaplasia focal ou dispersa e um acentuado potencial proliferativo. São referidos como astrocitoma de alto grau, que podem tanto se originar de um de baixo grau como não terem indicação de uma lesão precursora. Apresentam uma tendência de progressão para a forma mais agressiva da doença, GBM (KLEIHUES et al. 1993).

Os Glioblastomas multiformes correspondem ao grau IV e são os tumores astrocíticos mais malignos. São compostos por astrócitos neoplásicos pobremente diferenciados. Afetam principalmente adultos e podem se desenvolver a partir de um astrocitoma difuso grau II ou III (secundário) ou podem se originar “de novo”, sem uma lesão precursora menos maligna (primário) Este representa 17% de todos os tumores cerebrais primários e sua incidência aumenta de acordo com a idade, afetando principalmente pessoas na faixa entre 45 e 70 anos. A sobrevida

média dos pacientes é de curto prazo, sendo estimada em 12 a 15 meses após o diagnóstico (KLEIHUES et al. 2000; MAHER et al. 2001; MAHER e RAFFEL 2004; GALLI et al. 2004; STUPP et al. 2005; Central Brain Tumor Registry of the United States-CBTRUS 2010).

São notificados a cada ano aproximadamente 18.000 novos casos e aproximadamente 13.000 mortes nos Estados Unidos (JEMAL et al. 2006). No Brasil, foram estimados aproximadamente 8.461 casos, sendo que a razão mortalidade/incidência no país é de 92% contra 73% para o restante do mundo (Ministério da Saúde 2012).

A síntese de proteínas possui um papel fundamental na proliferação celular, portanto os mecanismos pelos quais ocorre o controle da tradução podem estar correlacionados com o desenvolvimento e progressão tumoral. Uma das vias que parece exercer importante papel no desenvolvimento de diversos tipos tumorais, inclusive dos glioblastomas, é a via PI3K/AKT/mTOR (KOUL 2008; WONG et al. 2010).

Observando os aspectos moleculares dos gliomas notamos, que em semelhança ao que ocorre em outros tecidos humanos o processo de tumorigênese em gliomas também resulta de uma acumulação sequencial de alterações genéticas e epigenéticas, podendo ser tanto, deleções e amplificações de regiões cromossômicas, mutações e metilações em genes. Um dos genes que aparecem frequentemente alterados em gliomas é o gene PTEN, localizado na posição 10q23.3 do cromossomo. Este gene exerce a função de supressor de tumor através da inibição da via de sinalização intracelular de AKT (BOURNE e SCHIFF 2010). As mutações em

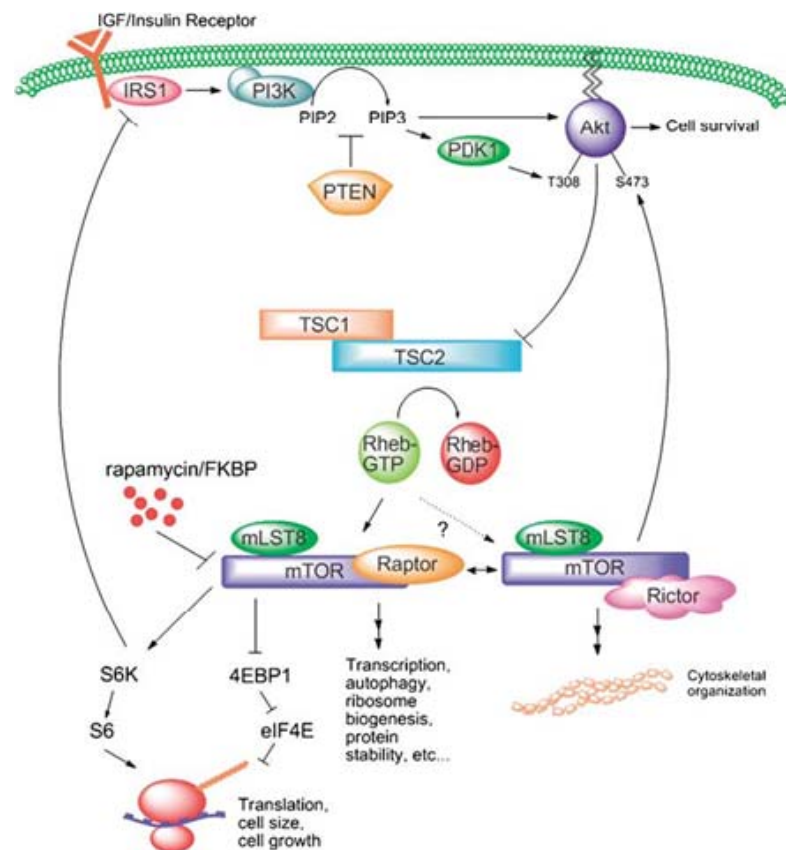
PTEN são importantes no desenvolvimento de glioblastomas de novo, com uma prevalência de 69% dos casos (OHGAKI 2005). Por outro lado, alterações de metilação na região promotora de PTEN parecem ser importantes no desenvolvimento dos gliomas de baixo grau e na sua progressão para glioblastomas secundários visto que em 63% dos casos encontramos alterações neste gene (OHGAKI 2005; RIEMENSCHNEIDER et al. 2010), sugerindo um mecanismo epigenético de redução da expressão do PTEN na tumorigênese. Adicionalmente, estes estudos também demonstram que a metilação da região promotora de PTEN, encontrada em gliomas de baixo grau, estava associada a um aumento na fosforilação de AKT (OKADA et al. 2008). O aumento exacerbado na atividade da via da PI3K/Akt pode levar à transformação através da combinação de: aumento da proliferação, diminuição da apoptose, modificações na motilidade e adesão celular (WIENCKE et al. 2007; BOURNE e SCHIFF 2010).

A via de sinalização de PI3K/AKT tem sido considerada uma via regulatória fundamental nos processos de tradução, que envolvem proliferação, migração, invasão, crescimento, diferenciação, sobrevivência e metabolismo celular (MENG et al. 2006). O primeiro passo para que ocorra o estímulo dessa via é através da ativação de PI3K pela ligação de fatores de crescimento aos seus receptores (CANTLEY 2002). A proteína PI3K, através de fosforilações provoca a translocação de AKT para a membrana plasmática (SCHEID e WOODGETT 2001). Após sua translocação, AKT é fosforilada por PDK1 (*3-phosphoinositide-dependent kinase-1*) (VARA et al. 2004), inibindo a atividade de TSC1/TSC2 (Tuberous sclerosis protein 1

“Hamartina”/ Tuberous sclerosis protein 2 “Tuberina”) (POTTER et al. 2002), e causando o aumento da atividade de Rheb, que por sua vez, promove a ativação de mTOR (*mammalian target of rapamycin*) (LONG et al. 2005).

A proteína mTOR, também chamada FRAP (*FK506-binding protein 12 and rapamycin-associated protein*), RAFT1 (*rapamycin and FKBP12 target-1*) ou RAPT1 (*rapamycin target-1*), é uma proteína tirosino-quinase serina/treonina (ser/thr) identificada e clonada no início dos anos 90, pouco tempo após a descoberta dos genes TOR1 e TOR2 (KUNZ et al. 1993; SABATINI et al. 1994), ortólogos correspondentes presentes em *Sacharomyces cerevisiae* (SARBASSOV et al. 2004).

A proteína mTOR forma dois complexos funcionais distintos (mTORC1 e mTORC2), que controlam vários processos celulares. Quando mTOR está associada à proteína Raptor (*regulatory associated proteína of TOR*), mLST8/G β L (*mammalian LST8/G-protein β -subunit like protein*), PRAS40 (*proline-rich Akt substrate of 40 kDa*) e DEPTOR (também conhecido como, *DEPDC6, DEP domain-containing protein 6*), constitui-se o complexo mTORC1 (SARBASSOV et al. 2004).



Fonte: CORRADETTI e GUAN (2006)

Figura 1 - Modelo ilustrando a via AKT/mTOR.

mTORC1 participa na resposta a vários sinais extracelulares e intracelulares. Na presença de aminoácidos e ATP, a ativação de mTORC1 aumenta a síntese geral de proteínas que são essenciais para o crescimento e proliferação celular. Já a redução da sinalização de mTORC1 é capaz de promover macroautofagia, que é um processo de degradação que tem como objetivo aumentar a sobrevivência celular em resposta a diminuição da disponibilidade de nutrientes, através da quebra dos constituintes celulares, em aminoácidos e em outras pequenas moléculas (LUM et al. 2005).

As funções de mTORC1 são atingidas através da fosforilação de moléculas efetoras, dentre as mais estudadas estão 4E-BP (*4E binding protein*) e p70S6K (*ribosomal S6 kinase*) (HAY e SONENBERG 2004; MENG et al. 2006). As proteínas 4E-BPs são capazes de interagir e controlar a ação de eIF4E (eukaryotic initiation factor 4E), um fator de início de tradução (MARCOTRIGIANO et al. 1999). Quando as 4E-BP encontram-se hipofosforiladas possuem alta afinidade por eIF4E. A hiperfosforilação de 4E-BP, desencadeada por mTOR, resulta no rompimento da sua ligação com eIF4E, permitindo o início do processo de tradução (GINGRAS et al. 2001). A proteína p70S6K, por sua vez, quando fosforilada por mTOR na região Thr389, irá fosforilar a proteína S6, um componente da sub-unidade ribossomal 40S. Alguns estudos mostram que a fosforilação de S6 pode aumentar a tradução de RNAs denominados 5'TOP (*terminal oligopyrimidine tract*) (MEYUHAS e HORNSTEIN 2000) que, por codificarem componentes da maquinaria traducional (como por exemplo proteínas ribossomais, fatores de alongamento e fatores de iniciação) são capazes de aumentar os níveis de tradução globais da célula (CASTEDO et al. 2002; HAY e SONENBERG 2004).

Além dos mecanismos de controle de tradução global, existem mecanismos que favorecem a tradução de mRNAs específicos. Entre os mRNAs seletivamente traduzidos podemos encontrar aqueles envolvidos na progressão do ciclo celular, como ciclina D1, ornitina descarboxilase (ODC) que parece ter um papel importante na transformação neoplásica e na

regulação do crescimento celular (SHANTZ e PEGG 1994) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (KEVIL et al. 1996).

O complexo mTORC2 é menos compreendido que mTORC1, ele também é constituído por mTOR associado à mLST8/GβL e DEPTOR, mas ao invés da proteína Raptor e PRAS40, possui outras três proteínas que não fazem parte de mTORC1, Rictor (*rapamycin-insensitive companion of mTOR*), mSin1 (*mitogen-activated-protein kinase-associated protein 1*) e PRR5 (*Proline-rich protein*, também conhecida como *protor*) que tem a sua função ainda pouco compreendida (SABATINI 2006; WOO et al. 2007).

Rictor foi a primeira subunidade identificada como sendo exclusiva do complexo mTORC2. Estudos mostram que Rictor se encontra superexpressa em linhagens celulares e em amostras primárias de glioma, levando a um aumento da formação de complexos mTORC2 e de sua atividade, promovendo proliferação, migração e contribuindo para o caráter invasivo das células de glioma (MASRI et al. 2007).

Ao contrário de mTORC1, que é sensível à rapamicina, o complexo mTORC2 é conhecido por ser insensível a ela. Alguns estudos, no entanto, têm mostrado que em algumas linhagens celulares, mTORC2 pode ser inibido por rapamicina após tratamento prolongado. mTORC2 fosforila diretamente proteínas constituintes de uma classe conservada de quinases chamadas AGC (quinases para proteína quinase A, G e C), levando a ativação das mesmas. (SARBASSOV et al. 2004; SARBASSOV et al. 2005).

A primeira função observada para o complexo mTORC2, foi a regulação da organização do citoesqueleto de actina através de PKCα

(SARBASSOV et al. 2004). Recentemente foi observado que este complexo também pode estar envolvido no controle do tamanho das células e na progressão do ciclo celular (MASRI et al. 2007). O complexo mTORC2 também é considerado um regulador positivo de mTORC1, já que é capaz de fosforilar diretamente AKT (HRESKO e MUECKLER 2005). Assim, a superativação da via mTOR pode desempenhar um papel chave na promoção do crescimento e sobrevivência das células tumorais.

Inesperadamente, estudos através de análises de Western blot e abordagens de imunoprecipitação revelaram que os componentes dos complexos de mTOR também podem ser detectados no núcleo, sendo esta realocação mediada por um mecanismo de translocação por meio de proteínas transportadoras, semelhante ao utilizado pelas MAP quinases (ANDJELKOVIC et al. 1997; MEIER e HEMMINGS 1999). Surpreendentemente, a própria proteína mTOR possui um sinal de localização nuclear, que medeia seu transporte (BACHMANN et al. 2006). mTOR, mLST8, Rictor e sin1 são menos abundante no núcleo do que no citoplasma de células não transformadas. Raptor é abundante no núcleo, porém o complexo mTORC1 é predominantemente citoplasmático, enquanto o complexo mTORC2 é abundante em ambos os compartimentos (ROSNER e HENGSTSCHLÄGER 2008).

Embora o papel dessas proteínas no compartimento nuclear ainda permaneça incerto, investigações têm demonstrado que AKT nuclear pode estar relacionada à tumorigênese e a supressão de estímulos apoptóticos, através do bloqueio de DNase ativada por caspase e inibição da

condensação da cromatina. Também foi visto que AKT quando localizada no núcleo e sob estímulo de fatores de crescimento, liga-se à fosfoproteína nucleolar B23 (responsável pela biogênese de ribossomos e promoção da entrada na fase S do ciclo celular) protegendo-a da degradação por caspase-3, promovendo a sobrevivência celular (MARTELLI et al. 2006; LEE et al. 2008).

Apesar de seu papel fundamental em processos tumorais, encontramos um pequeno número de trabalhos publicados avaliando a presença dos complexos mTOR e de suas proteínas em tumores humanos, o que reflete a falta de conhecimento sobre a natureza da interação destas proteínas nestes tumores, que ainda possuem um alto índice de mortalidade e curta sobrevida após o diagnóstico. Alguns trabalhos da literatura descrevem a presença da forma fosforilada de mTOR e raptor em adenocarcinoma endometrial relacionado com melhor sobrevida (CHOI et al. 2010). Por outro lado, a presença de mTOR fosforilado e raptor em carcinomas esofageais está relacionado com um pior prognóstico (HIRASHIMA et al. 2010). A presença de mTOR fosforilado câncer cervical foi relacionada com resistência ao tratamento com radiação (KIM et al. 2010), enquanto a de raptor foi relacionada com a transformação maligna em adenocarcinomas de próstata de alto grau (EVREN et al. 2010) e carcinoma gástrico (XU et al. 2010). Já a presença de rictor foi relacionada com proliferação e formação de tumor em câncer de colón (JOHNSON et al. 2009; ROULIN et al. 2010) e em carcinomas uroteliais (WU et al. 2009). Deste modo, avaliar simultaneamente a presença de mTOR fosforilado e dos

componentes de mTORC1 e 2 nas mesmas amostras, correlacionando estes dados com índices de proliferação e dados clínicos dos pacientes ajudará a delinear um panorama, no qual poderemos observar se a presença de um ou outro complexo poderá ser associada a um prognóstico mais benigno ou maligno.

Atualmente, um conhecido inibidor de mTOR, a rapamicina, foi reconhecido como um agente antineoplásico e potente inibidor do crescimento das células tumorais (SEHGAL et al. 1975; SUPKO e MALSPEIS 1994). Desde então, a rapamicina e seus análogos (tensirolimus, ridaforolimus e everolimus) tem sido utilizados para o tratamento de uma série de malignidades avançadas; como metástase de tumores de tecido de partes moles, osteossarcomas, malignidades hematológicas e carcinomas de pulmão, mama e renais (HARTFORD e RATAIN 2007). Em tumores do sistema nervoso central, dentre eles principalmente os gliomas, a rapamicina já demonstrou *in vitro* ser um potente agente citotástico, antiangiogênico (inibe secreção de VEGF) e anti-invasivo (reduz a expressão de MT1-MMP, MMP-2 e MMP-9) (HEIMBERGER et al. 2005). *In vivo*, encontramos uma crescente de ensaios clínicos de fase I, II e III (REARDON et al. 2010), mostrando a sua eficácia. Entre os ensaios clínicos disponíveis, a rapamicina está sendo testada em gliomas de baixo grau (NCT00823459), alto grau (NCT00047073), recorrentes (NCT00831324), primários e metastáticos (NCT00784914). No entanto, mesmo utilizando concentrações sistêmicas adequadas para bloquear mTORC1, a resposta efetiva no tumor nem sempre é adequada (CHANG et al. 2005; GALANIS et al. 2005;

REARDON et al. 2006), observando-se eficácia limitada na redução da progressão da doença e no aumento da sobrevida.

A descoberta de que mTOR possui atividade em dois complexos distintos (mTORC1 e mTORC2) mas apenas um é afetado de forma aguda pelo tratamento com rapamicina, pode ser um dos fatores que diminuiriam a eficácia desta droga nas terapias anti-tumorais. Não está claro se a sensibilidade à rapamicina de um câncer em particular é determinada pelo grau de inibição de mTORC1 ou ainda pela presença do complexo mTORC2.

Assim, o nosso estudo busca determinar os complexos de mTOR presentes na maioria dos gliomas, contribuindo para a avaliação da contribuição destas proteínas nos mecanismos tumorais. Além disso, estabelecer a presença de um ou outro complexo em determinado tumor poderia indicar a viabilidade ou não de um potencial tratamento com rapamicina. Como os dois complexos distintos mTORC1 e mTORC2 possuem sensibilidade diferencial à esta droga, este pode ser um importante fator decisivo para o desenvolvimentos de novas abordagens terapêuticas contra os gliomas, visto que a incidência desses tumores têm aumentado ao longo dos últimos 30 anos (JEMAL et al. 2006) e o prognóstico para os pacientes permanece muito ruim (KONOPKA e BONNI 2003).

2 OBJETIVOS

Avaliar a expressão proteica por imunohistoquímica em gliomas humanos de grau I a IV, dos complexos mTORC1 e mTORC2 (mTOR e sua forma fosforilada, Raptor, Rictor, 4EBP1).

Correlacionar a expressão de PTEN, com a ativação de AKT e presença dos complexos mTORC1 e 2.

Correlacionar o grau de expressão destas proteínas com o grau de proliferação medido através da marcação com Ki-67.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram analisadas 190 amostras parafinadas obtidas do acervo do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo de pacientes diagnosticados com tumores gliais de grau I a IV. Todos os dados clínicos e patológicos foram obtidos a partir de prontuários médicos da instituição.

Todo material desta pesquisa, representado pelo bloco de parafina e suas respectivas lâminas estão arquivados no Departamento de Anatomia Patológica do Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer A C Camargo.

3.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídas amostras onde não havia representação adequada da neoplasia no bloco de parafina.

3.3 TÉCNICA DE *TISSUE MICROARRAY* (TMA)

Essa técnica possibilita o estudo da expressão protéica de tumores em larga escala através de ensaios de imunohistoquímica. Permite a análise

rápida de até mil casos diferentes em apenas uma lâmina histológica, com uma acurácia comprovada que justifica seu emprego com vantagens de custo e de tempo para pesquisas em grandes centros com grandes bancos de dados (MILANES-YARSELEY et al. 2002; GULMANN et al. 2003).

A construção do TMA foi realizada após ser escolhida e identificada a área adequada na neoplasia através de uma marcação circular em cada nova lâmina de vidro na região mais representativa do tumor e correspondente ao bloco de parafina escolhido.

Usando o *tissue microarrayer* (Beecher Instruments, Silver Spring, Maryland) a área de interesse foi retirada com um “core” de 0,6mm de cada bloco doador e transferido para um outro bloco chamado de receptor. A partir desse novo bloco foram preparados cortes histológicos seriados em lâminas de vidro cortadas através de microtomia mecânica na espessura de 4µm.

Estas lâminas foram examinadas no microscópio óptico para observar a representatividade das células neoplásicas. A avaliação da representação celular da neoplasia foi definida como aproveitamento do TMA. Para uma amostragem ser considerada satisfatória é necessária uma representação de pelo menos 10% de área circular do core de 0,6mm após uma análise no microscópio óptico de vários níveis de corte.

3.4 ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO

Os cortes provenientes dos TMAs foram desparafinizados pela incubação a 60°C por 24 horas, seguido de banhos sucessivos em duas soluções de xilol a 56°C por 30 minutos cada, posteriormente hidratados em soluções com concentrações decrescentes de etanol (100%, 95%, 80%, 70%) e lavadas em água corrente e destilada.

Para a recuperação antigênica as lâminas foram incubadas em solução tampão de citrato 10mM pH 6.0 em panela de pressão elétrica por 30 minutos com um pré-aquecimento de 14 minutos. Para o bloqueio da peroxidase endógena será utilizado uma solução com H₂O₂ 10%, Após isso, as lâminas foram permeabilizadas utilizando uma solução de tris 0.1% triton por 15 minutos. A seguir, todas as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário, (AKT e mTOR e suas formas fosforiladas, Raptor e Rictor) diluído em título pré-estabelecido em tampão de PBS contendo albumina bovina (BSA) 1% (Sigma, A9647, USA) por 18 horas a 4°C em câmara úmida.

Então foi realizada uma etapa de incubação com o anticorpo secundário, diluído em PBS, por 30 minutos a 37°C, seguida de lavagem em tampão de PBS com 3 trocas de 3 minutos cada. A seguir as lâminas foram incubadas, por 30 minutos a 37°C, também seguidas de 2 lavagens em tampão com Tris-HCl pH 7.6 de 5 minutos cada.

Para revelação foi feita a incubação das lâminas em solução substrato: 3, 3' Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB) 60 mg% (Sigma, D-5637, USA); 1 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO); 1 mL de H₂O₂ 6% (água

oxigenada 20 vol); 100 mL de PBS; por 5 minutos a 37°C e ao abrigo da luz. Após isso, a reação foi parada através da imersão das lâminas em tampão com Tris-HCl pH 7.6. Em seguida foram contra-coradas em hematoxilina de Harris por 10 minutos e lavadas em água corrente para a realização da desidratação das lâminas em soluções com concentrações crescentes de etanol e sua posterior montagem.

Todas as reações foram acompanhadas de um controle positivo, em tecido sabidamente positivo para cada anticorpo testado.

3.5 CONCENTRAÇÃO DE ANTICORPOS

Para avaliar os níveis de expressão proteica dos componentes dos complexos envolvidos na via de AKT/mTOR foram realizadas padronizações de anticorpos em amostras de gliomas de grau I a IV do acervo do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo para determinar a concentração mais adequada para cada anticorpo utilizado.

Todos os anticorpos utilizados são comerciais e foram testados para saber sua especificidade e sensibilidade, sendo AKT, pAKT, mTOR, pMTOR, Raptor e 4ebp-1 (Cell Signalling), Rictor (Abcam), Ki67 (Dako) e Pten (Cascade).

Tabela 1 - Concentração dos anticorpos utilizados para as reações de imunohistoquímica

Anticorpos	Concentração (µg/ml)
AKT	4
p-AKT	20
mTOR	20
p-mTOR	20
Rictor	2,5
Raptor	20
4EBP1	20

3.6 ANÁLISE MANUAL E AUTOMÁTICA DAS REAÇÕES DE IMUNOISTOQUÍMICA

As análises automáticas das lamínas foram realizadas utilizando os aparelhos ScanScope XT (Aperio) e ACIS III (Dako). As lâminas foram escaneadas pelo próprio aparelho e se utilizou os algoritmos internos de cada sistema para detecção do número de núcleos marcados e número total de pixels positivos.

Para a análise manual, dois observadores qualificados avaliaram todos os *spots* do TMA classificando como: 0 (sem marcação), 1 (1 à 25% de células marcadas), 2 (26% à 50% de células marcadas) e 3 (mais que 50% de células marcadas). A análise foi realizada de maneira cega e de forma independente. As pontuações foram comparadas com os resultados obtidos a partir da análise automatizada, utilizando o teste de Kappa.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na análise estatística foram utilizados testes não paramétricos ou paramétricos de acordo com a distribuição de dados. As informações de dados clínicos e anátomo-patológicos desta pesquisa foram armazenadas no banco de dados do Programa *Statistical Package for Social Science* (SPSS) for Windows ou GraphPad Prism.

Para as análises, foram usados o Teste de Kappa, ANOVA, pós teste de Tukey, Teste T de Student, Teste de Qui-Quadrado para realizar a associação entre as variáveis; a análise pelo método de Kaplan-Meier e modelos de risco proporcionais de Cox para análise de fatores prognósticos, como por exemplo, a curva de sobrevivência, e o Teste de Log-Rank para a comparação entre as curvas.

No teste Kappa, a concordância entre a análise manual e automática é verificada através da fórmula:

$$K = \frac{\text{Concordância observada} - \text{Concordância esperada}}{1 - \text{Concordância esperada}}$$

Valores de coeficiente Kappa entre 0.00 a 0.20 indicam nenhuma força de concordância, entre 0.21 a 0.40 indicam uma concordância fraca, entre 0.41 a 0.60 indicam uma concordância moderada, entre 0.61 a 0.80 indicam uma alta concordância e entre 0.81 a 1.00 representam uma concordância excelente.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DADOS DE PRONTUÁRIO

Foram levantados dados dos prontuários dos pacientes cujas amostras foram utilizadas. Encontramos uma maior presença dos tumores gliais em indivíduos do sexo masculino, porém esta diferença não apresentava uma correlação estatisticamente significativa em nenhum dos graus. A faixa mediana de idade dos indivíduos estudados foi de 39 anos, sendo que se observarmos a doença em seus diferentes graus, notamos que a faixa mediana de idade se modifica principalmente nos graus I e IV para baixo e para cima, respectivamente (**Tabela 2**).

Quanto à localização, verificamos uma diversidade muito grande dos sítios tumorais, com predominância na região cerebral frontal, entretanto se observarmos os graus separadamente podemos verificar que no grau I da doença, o sítio tumoral predominante é o cerebelo. Este mesmo grau atinge preferencialmente indivíduos jovens e crianças e demonstra menor agressividade da doença (**Tabela 3**).

Tabela 2 - Classificação por número de indivíduos por sexo e média de idade de acordo com o grau de gliomas dos indivíduos.

Grau	Masculino	Feminino	Mediana de Idade	Desvio Padrão
Grau I	17	17	6.500	7.329
Grau II	26	21	35.00	17.31
Grau III	09	08	35.00	16.80
Grau IV	52	39	53.00	18.97
Total	104	85	39.00	22.39

Tabela 3 - Classificação por localização anatômica de acordo com o grau dos gliomas.

Localização	Grau I	Grau II	Grau III	Grau IV	Total
IV Ventrículo	03	01	-	01	05
Bulbo Cervical	-	01	-	-	01
Cerebelo	19	01	02	02	24
Frontal	01	24	11	62	98
Parietal	02	04	01	22	29
Pineal	-	01	-	-	01
Selar/Supra-selar	02	-	-	-	02
Tálamo	01	02	01	01	05
Temporal	03	19	04	30	56
Vias Ópticas	05	01	-	-	06

4.2 ANÁLISE DAS REAÇÕES DE IMUNOISTOQUÍMICA

Utilizando *tissue microarrays* contendo no total, 190 casos de tumores gliais de diferentes graus (I a IV), foram realizadas reações de imunistoquímica utilizando anticorpos anti-Akt, anti-pAkt, anti-mTOR, anti-pmTOR, anti-Rictor, anti-Raptor, anti-4EBP1, anti-PTEN e anti-Ki67.

Pudemos observar uma grande heterogeneidade na expressão protéica entre os tumores, seja em amostras do mesmo grau bem como em graus diferentes, observando-se uma marcação que variou desde fraca até forte **(Figura 2)**.

Após as reações de imunistoquímica, decidimos avaliar o melhor método de quantificação das amostras, através de diferentes equipamentos de aquisição de imagem e contagem automatizada disponíveis na instituição. Para isso, utilizamos o método de Kappa, que é um índice estatístico utilizado para calcular a reprodutibilidade quando as variáveis são ordinais e os resultados podem ser expressos por mais de duas categorias. Este método confere uma maior importância à discordância, atribuindo-lhe maior peso quando se procede ao cálculo da reprodutibilidade (LANDIS e KOCH 1977).

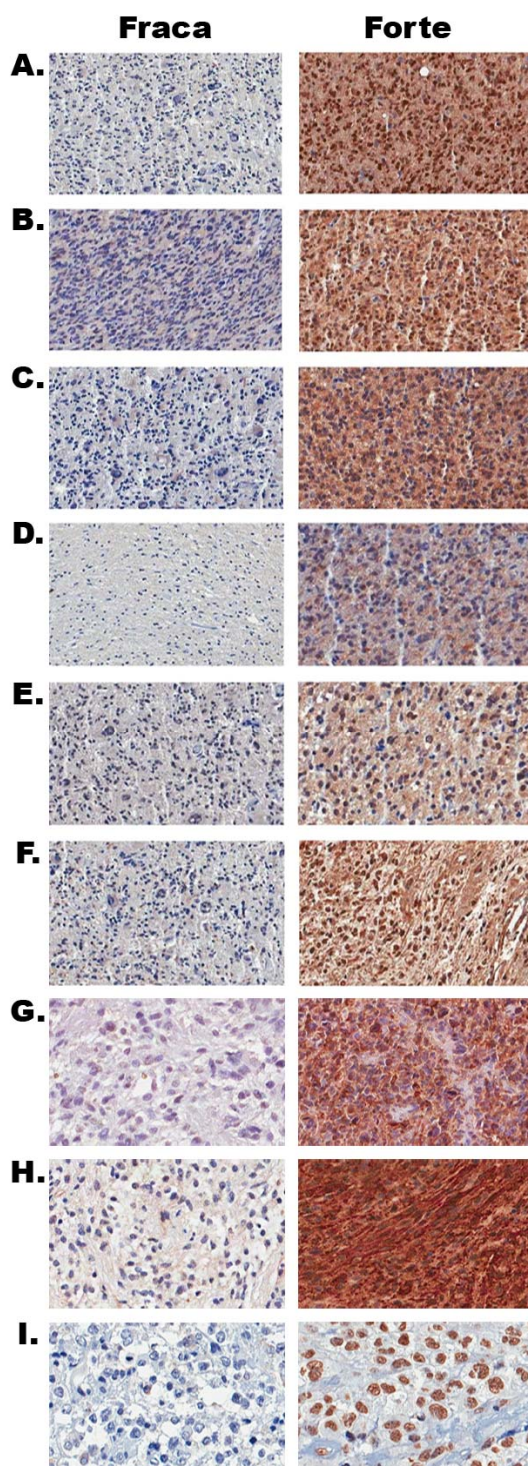


Figura 2 - Imunoistoquímica representativa de marcações fracas e fortes em tecidos de amostras de gliomas. (A) anti-AKT, (B) anti-pAKT (C) anti-mTOR, (D) anti-pmTOR, (E) anti-raptor, (F) anti-Rictor, (G) anti-4E-BP1, (H) anti-PTEN, (I) anti-Ki67.

Para validar a quantificação automatizada, esta foi comparada à quantificação feita independentemente por dois observadores. A quantificação realizada pelos dois observadores também foi comparada entre si, para que se pudesse ter certeza da reprodutibilidade e confiabilidade das quantificações. Primeiramente, realizamos um teste de reprodutibilidade entre os “scores” visuais dados pelos dois observadores, utilizando a marcação de pAKT e pmTOR. Cada amostra foi classificada numa escala de “0” a “3”, onde “0” possui uma marcação totalmente negativa, “1” apresenta uma marcação até 25% de células marcadas de positividade, “2” de 25% à 50% de células marcadas e “3” uma marcação que possua mais que 50% de células marcadas.

Quando aplicado o teste, pudemos verificar que houve uma correlação excelente entre os observadores, variando entre um valor de kappa de 0.805 a 0.905 para ambos marcadores (**Tabelas 4 e 5**).

Tabela 4 - Análise do TMA por observadores humanos (anti-pAKT).

Categoria	Observador 1	Observador 2
0	0 (0%)	0 (0%)
1	97 (47.78%)	98 (48.27%)
2	66 (32.51%)	59 (29.06%)
3	40 (19.70%)	46 (22.66%)
Correlação	(kappa) = 0.905	

0 (ausência absoluta de coloração), 1 (1 a 25% de células positivas), 2 (26 a 50% de células positivas), 3 (mais que 50% de células positivas). A cada *spot* foi dado um escore de acordo com a percentagem de células positivamente marcadas com anticorpo anti-pAKT.

Tabela 5 - Análise do TMA por observadores humanos (anti-pmTOR).

Categoria	Observador 1	Observador 2
0	0 (0%)	0 (0%)
1	97 (47.78%)	98 (48.27%)
2	66 (32.51%)	59 (29.06%)
3	40 (19.70%)	46 (22.66%)
Correlação	(kappa) = 0.805	

A cada *spot* foi dado um escore de acordo com a percentagem de células positivamente marcadas com anticorpo anti-pmTOR. 0 (ausência absoluta de coloração), 1 (1 a 25% de células positivas), 2 (26 a 50% de células positivas), 3 (mais que 50% de células positivas).

A seguir, comparamos a concordância entre as análises realizadas automaticamente por dois sistemas disponíveis na instituição, AcisIII (Dako) e ScanScope (Aperio). Observamos se havia concordância tanto na análise da marcação nuclear quanto citoplasmática de cada amostra, para ambos os anticorpos contra pAKT e pmTOR. De modo geral, embora houvessem casos onde a análise de uma mesma amostra apresentasse uma disparidade muito grande entre os sistemas; tanto no núcleo como no citoplasma observamos uma correlação e significância excelente (**Figuras 3 e 4**).

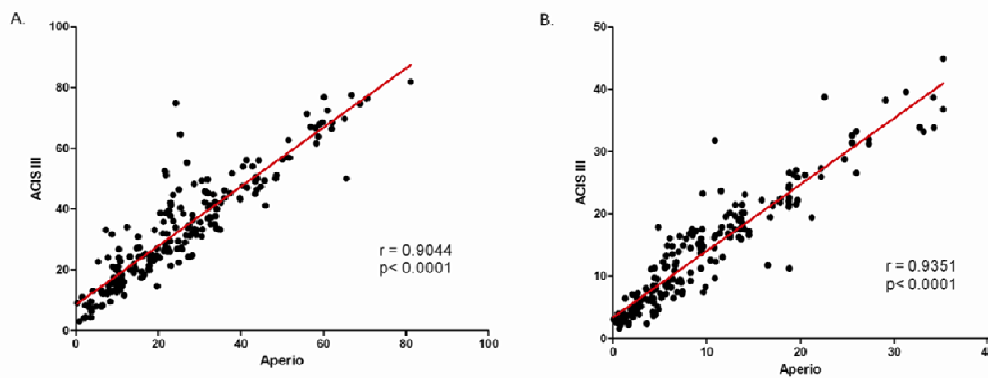


Figura 3 - Concordância entre os sistemas automatizados de análise de imagem (núcleos marcados). Reações em TMA com anti-pAKT. (A) e anti-pmTOR-(B) foram analisados em dois sistemas automatizados diferentes para o número de núcleos marcados.

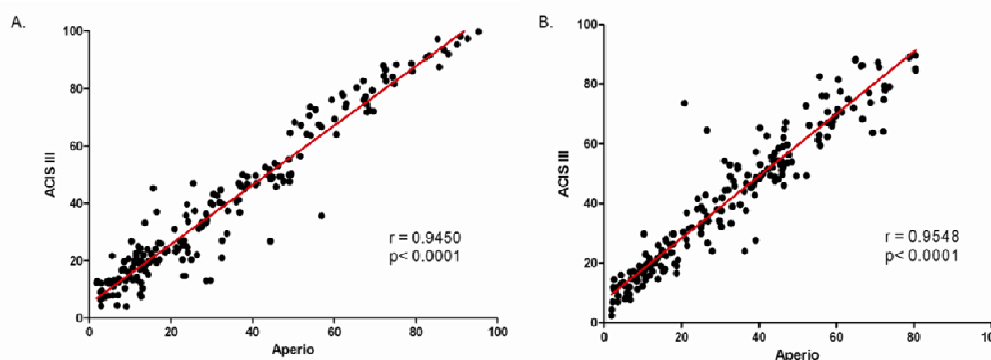


Figura 4 - Concordância entre os sistemas automatizados de análise de imagem (pixels marcados). Reações em TMA com anti-pAKT. (A) e anti-pmTOR-(B) foram analisados em dois sistemas automatizados diferentes para o número de pixels marcados.

Depois de compararmos os sistemas automatizados entre si, o próximo passo foi comparar a análise proveniente de cada sistema automatizado com a análise realizada pelos dois observadores, verificando sua concordância. Pudemos observar que o sistema Aperio apresentou uma maior força de concordância com os observadores do que o sistema ACIS III, com índice kappa variando entre 0.855 à 0.879. Já o sistema ACIS III

obteve apenas uma concordância ótima com os observadores, com índice kappa variando entre 0.765 à 0.793. Estes resultados também foram descritos em um manuscrito atualmente submetido à publicação, que encontra-se em anexo (**Anexo 1**).

Deste modo, concluímos que a análise automática das lâminas de TMA é de alta eficiência e confiabilidade, sendo o equipamento ScanScope da Aperio aquele que apresentou maior reprodutibilidade com os observadores. Assim, nas análises apresentadas a seguir foi utilizado o equipamento ScanScope.

4.3 AKT

Ao estudarmos a expressão de AKT e sua forma fosforilada (*upstream* da via de mTOR) nos TMAs pudemos observar um incremento na expressão de ambas as formas em relação ao controle composto por tecido cerebral não-tumoral, que aumentava de acordo com a progressão dos graus tumorais (**Figuras 5A; 5C**). Considerando a expressão nuclear de ambas as formas, vemos que este padrão se repete, porém há uma redução da expressão nos tecidos de tumores grau IV em relação aos demais graus (**Figuras 5B; 5D**). Estes resultados demonstram que uma maior expressão e ativação de AKT podem estar relacionados com o surgimento e progressão tumoral em gliomas (WANG e BRATTAIN 2006).

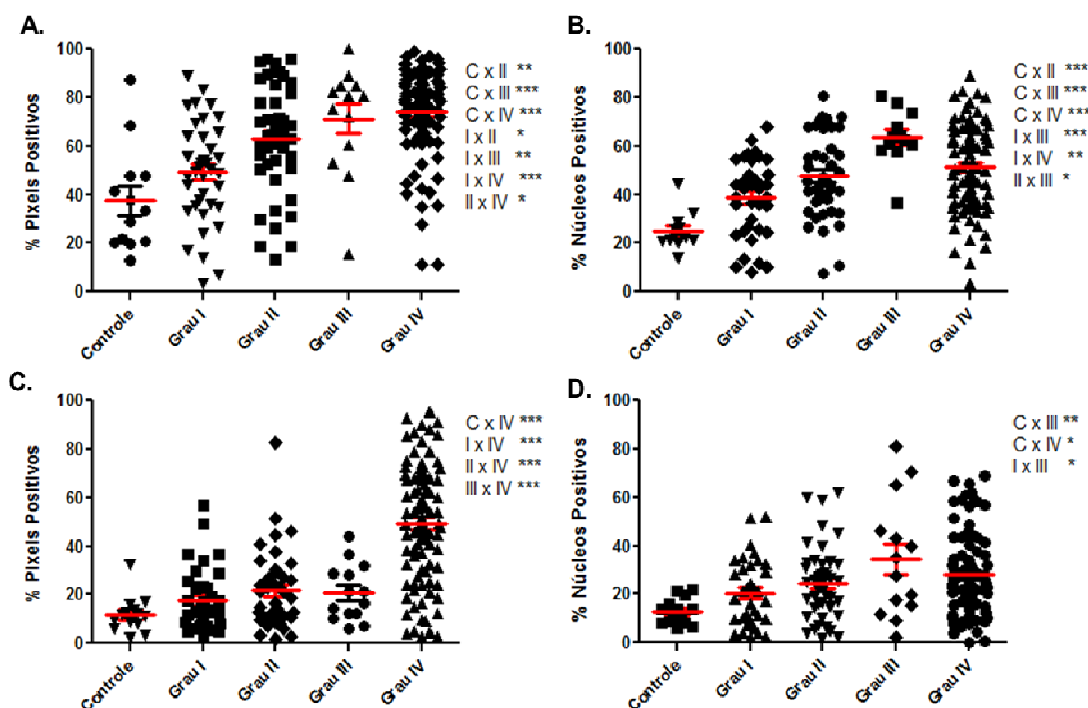


Figura 5 - Quantificação de ensaio imunoistoquímico positivo (AKT e pAKT). (A) anti-AKT no citoplasma, (B) anti-AKT no núcleo, (C) anti-pAKT no citoplasma, (D) anti-pAKT no núcleo. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ por ANOVA.

Interessantemente, AKT quando expressa em tumores de menor agressividade mostra uma correlação forte com a proliferação, porém em tumores com maior agressividade essa correlação diminui gradativamente (**Tabela 6**). Este fato pode indicar que nos tumores de baixo grau ainda se observaria um controle da proliferação pela via de AKT, mas nos glioblastomas essa relação seria perdida. Na forma fosforilada de AKT não podemos observar tal tendência de comportamento, exceto no grau I, houve correlação moderada da presença de fosfo-AKT e Ki-67 em todos os graus (**Tabela 6**).

Tabela 6 - Correlação de AKT e pAKT com a proliferação medida através da marcação de Ki67.

Correlação com a proliferação medida através da marcação de Ki67			
		P	R
AKT	I	0.0004	0.6431
	II	0.0896	0.2831
	III	0.9602	-0.0181
	IV	0.0002	0.3813
	I+II	0.0010	0.4039
	III+IV	0.0005	0.3412
	I a IV	<0.0001	0.3862
pAKT	I	0.9964	0.0009
	II	0.0002	0.5816
	III	0.2551	0.3566
	IV	<0.0001	0.4387
	I+II	0.0061	0.3498
	III+IV	<0.0001	0.4168
	I a IV	<0.0001	0.3445

A proteína PTEN inibe a ativação de AKT através da desfosforilação do lipídeo PIP3. Em gliomas, perda da expressão de PTEN ou mutações que levam a sua inativação são muito comuns (MYERS et al. 1997; SIMPSON e PARSONS 2001) e, de uma maneira geral, tumores que expressam maiores níveis de PTEN estão correlacionados com um melhor prognóstico (LIN et al. 1998). Em nosso caso, não houve correlação significativa entre a expressão de PTEN e a fosforilação AKT. No entanto, houve correlação significativa entre a expressão de AKT total e a de PTEN em tumores de baixo grau, que decrescia conforme o grau do tumor (**Tabela 7**). Estes dados parecem indicar que há uma relação entre PTEN e AKT nos tumores, que é perdida conforme se progride para os graus mais altos da doença.

Tabela 7 - Correlação de AKT e pAKT com PTEN

Correlação com PTEN no citoplasma			
		p	R
AKT	I	0.0038	0.5678
	II	0.0033	0.4894
	III	0.9338	-0.0303
	IV	0.6287	-0.0994
	I+II	<0.0001	0.5020
	III+IV	0.7804	-0.0481
	I a IV	0.1058	0.1595
pAKT	I	0.1850	0.2866
	II	0.4708	0.1300
	III	0.5717	0.1818
	IV	0.7488	-0.0659
	I+II	0.1124	0.2145
	III+IV	0.3357	-0.1605
	I a IV	0.6013	-0.0545

4.4 mTOR

Ao contrário de AKT, cuja expressão aumentava de acordo com o grau tumoral, o perfil de expressão da proteína mTOR e de sua forma fosforilada mostram um aumento específico no citoplasma celular no grau IV (**Figura 6**). Este dado poderia indicar que esta seria uma alteração chave para o processo tumoral, levando a uma progressão da doença para o seu último estágio. Interessantemente, a presença de AKT fosforilada, segue o mesmo padrão de mTOR e sua forma fosforilada, com expressão aumentada somente nos gliomas grau IV.

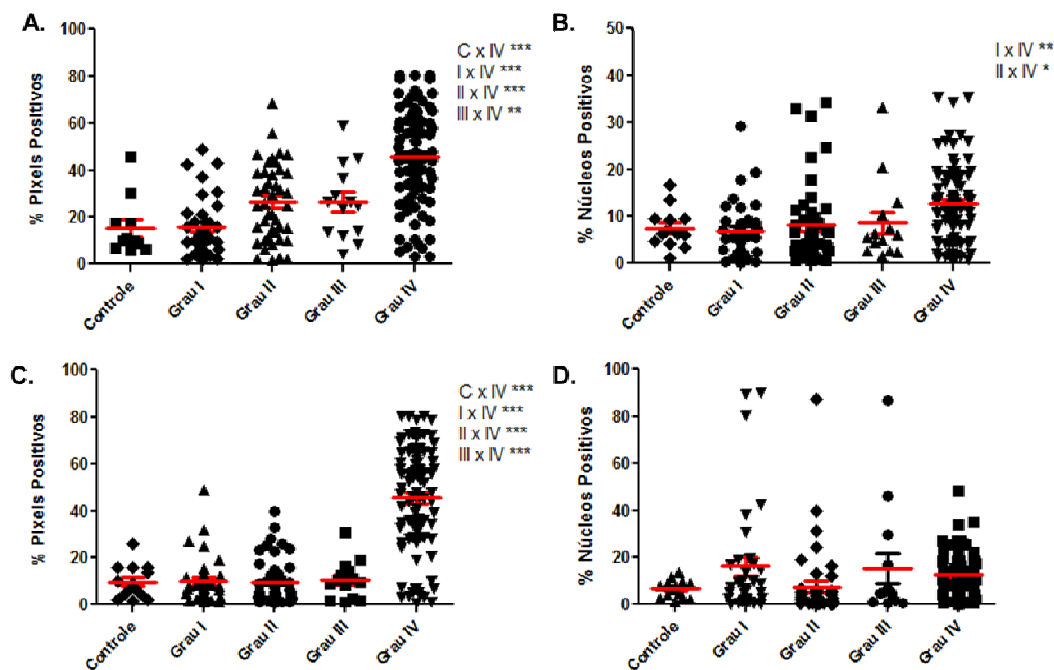


Figura 6 - Quantificação de ensaio imunohistoquímico positivo. (A) anti-mTOR no citoplasma, (B) anti-mTOR no núcleo, (C) anti-pmTOR no citoplasma, (D) anti-pmTOR no núcleo. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ por ANOVA

Também verificamos em mTOR, que a correlação com a proliferação através da marcação com Ki67 era variável, sem apresentar padrão reconhecível. Já a correlação com a forma fosforilada de mTOR era muito baixa em todos os casos (**Tabela 8**).

A correlação de mTOR com a expressão de PTEN segue o mesmo padrão visto com AKT, existe correlação somente nos graus mais baixos da doença, com perda da correlação nos graus mais altos (**Tabela 9**). Neste caso, este padrão também se repetiu quando considerada a forma fosforilada de mTOR. Neste caso, a perda de correlação poderia refletir um acúmulo de alterações adicionais nas células dos tumores de alto grau que

levariam à completa desregulação e perda da interdependência entre os componentes da via.

Tabela 8 - Correlação de mTOR e pmTOR com a proliferação medida através da marcação de Ki67.

Proliferação por marcação de Ki67			
		p	R
mTOR	I	0.7247	0.0796
	II	0.0052	0.4502
	III	0.0283	0.6294
	IV	0.6395	0.05062
	I+II	0.0328	0.2783
	III+IV	0.2010	0.1289
	I a IV	0.0001	0.3017
	pmTOR	I	0.7806
II		0.2069	0.2124
III		0.6967	0.1259
IV		0.6061	0.05540
I+II		0.2415	0.1522
III+IV		0.7906	0.02674
I a IV		0.0106	0.2003

Tabela 9 - Correlação de mTOR e pmTOR com PTEN.

Correlação com PTEN no citoplasma			
		p	R
mTOR	I	0.0114	0.5534
	II	0.0400	0.3540
	III	0.8970	0.0419
	IV	0.4379	-0.1590
	I+II	0.0042	0.3869
	III+IV	0.1679	0.2284
	I a IV	0.7063	0.0400
	<hr/>		
pmTOR	I	0.0337	0.6251
	II	0.0510	0.5810
	III	0.9970	0.1374
	IV	0.0901	0.0101
	I+II	0.0134	0.5971
	III+IV	0.3019	0.3391
	I a IV	0.8441	0.0510

4.5 RICTOR

Observamos que Rictor, um dos componentes do complexo 2 de mTOR apresentou uma forte expressão tanto no citoplasma como no núcleo dos tumores gliais de grau I, porém de acordo com a progressão tumoral esta expressão se torna menor, tanto no citoplasma quanto no núcleo das amostras tumorais (**Figura 7**).

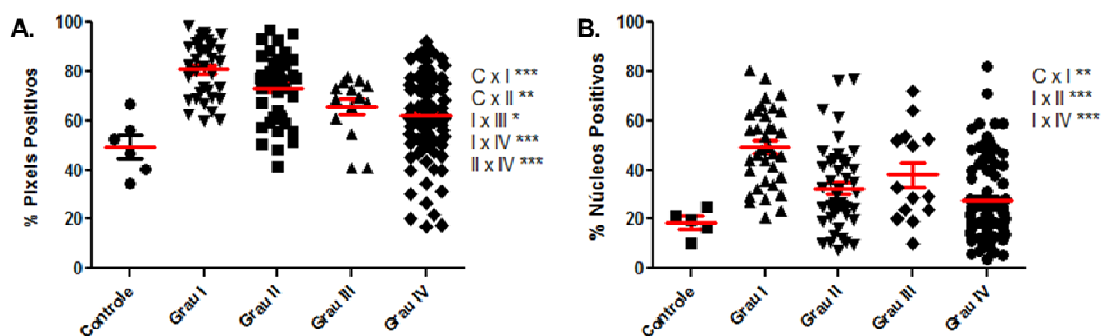


Figura 7 - Quantificação de ensaio imunohistoquímico positivo (Rictor). (A) anti-rictor no citoplasma, (B) anti-rictor no núcleo. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 por ANOVA

Da mesma maneira que o observado para as proteínas mostradas anteriormente, Rictor apresenta uma correlação positiva com a presença de Ki-67 nos tumores de baixo grau, sendo esta correlação perdida nos tumores grau IV (**Tabela 10**). Por outro lado, este marcador apresentou uma baixa correlação com a presença de PTEN em todos os graus (**Tabela 11**). Este fato era esperado, pois a influência de PTEN se dá sobre o complexo 1 de mTOR.

Tabela 10 - Correlação de Rictor com a proliferação medida através da marcação de Ki67.

Proliferação por marcação de Ki67		
		p
		R
Rictor	I	0.2963
	II	0.0029
	III	0.0006
	IV	0.8169
	I+II	0.0242
	III+IV	0.7475
	I a IV	0.7150

Tabela 11 - Correlação de Rictor com PTEN.

Correlação com PTEN no citoplasma			
		p	R
Rictor	I	0.2826	0.2526
	II	0.5424	0.1100
	III	0.3663	0.2867
	IV	0.9331	0.0176
	I+II	0.2676	0.1551
	III+IV	0.1586	0.2366
	I a IV	0.1836	0.1418

4.6 RAPTOR

Quando observamos a expressão de Raptor nos tecidos tumorais não pudemos observar nenhum aumento considerável em nenhum dos compartimentos celulares nos diferentes graus tumorais quando comparados a tecidos controle não tumorais (**Figura 8**).

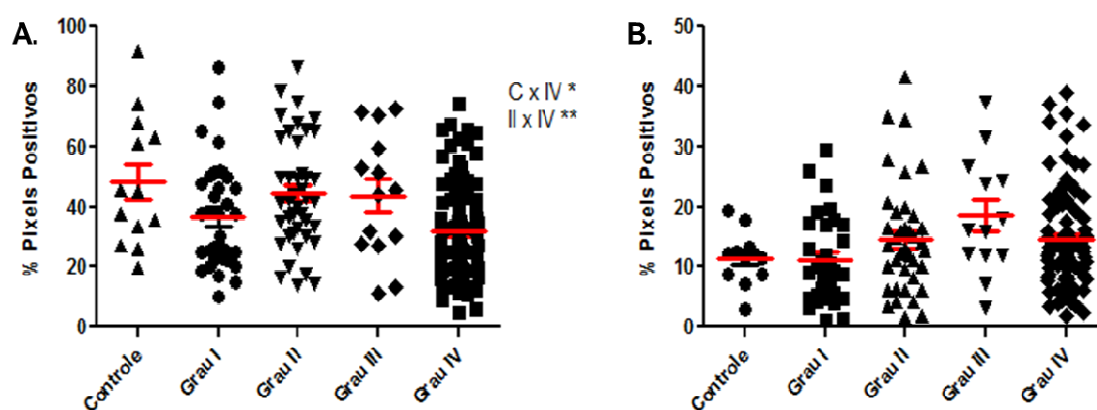


Figura 8 - Quantificação de ensaio imunohistoquímico positivo com (a) anti-raptor no citoplasma. (a) anti-raptor no citoplasma, (B) anti-raptor no núcleo. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 por ANOVA

Interessantemente, de maneira oposta ao que observamos com Rictor, Raptor não apresentou uma correlação forte com a proliferação nos graus I, II e III. No entanto, essa correlação aumentou significativamente no grau IV (Tabela 12). Estes dados poderiam indicar que os complexos mTORC1 e mTORC2 atuam de maneiras e em momentos distintos.

Por outro lado, a expressão de Raptor está correlacionada com a de PTEN nos tumores gliais de menor grau, porém quando observamos o grau IV vemos que esta correlação se perde (**Tabela 13**). Este mesmo padrão é observado para a correlação de PTEN com AKT e mTOR, porém não é visto na correlação entre PTEN e Rictor.

Tabela 12 - Correlação de Raptor com a proliferação medida através da marcação de Ki67.

Proliferação por marcação de Ki67		
		p
		R
Raptor	I	0.6633
	II	0.1849
	III	0.7293
	IV	<0.0001
	I+II	0.5848
	III+IV	0.0007
	I a IV	0.0102

Tabela 13 - Correlação de Raptor com PTEN.

Correlação com PTEN no citoplasma			
		p	R
Raptor	I	0.0619	0.4143
	II	0.0560	0.3526
	III	0.0065	0.7343
	IV	0.8306	0.0441
	I+II	0.0059	0.3804
	III+IV	0.0196	0.3772
	I a IV	<0.0001	0.4755

4.7 4EBP-1

Ao observarmos a expressão de 4EBP-1, pudemos observar um aumento contínuo da sua expressão de acordo com a evolução da doença, no entanto, devido a dispersão dos dados este dado não foi considerado estatisticamente significativo (**Figura 9**).

Se observarmos a correlação da expressão de 4E-BP1 com o marcador de proliferação Ki-67, notamos que semelhantemente a AKT, há de acordo com a progressão da malignidade da doença, uma diminuição da força de correlação que se perde totalmente quando se atinge o grau IV (**Tabela 14**). Da mesma maneira, existe uma correlação entre a expressão de 4E-BP e PTEN nos tumores de baixo grau, que é perdida nos tumores de alto grau (**Tabela 15**).

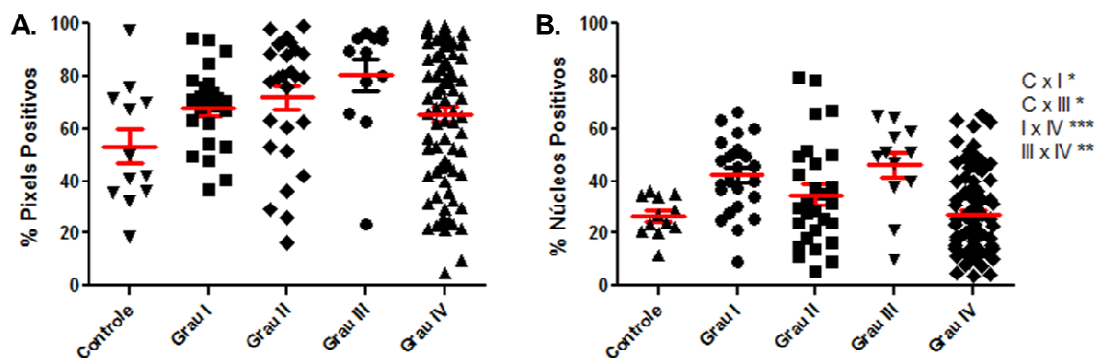


Figura 9 - Quantificação de ensaio imunohistoquímico positivo com (a) anti-4E-BP1 no citoplasma, (B) anti-4ebp1 no núcleo. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ por ANOVA.

Tabela 14 - Correlação de 4EBP1 com a proliferação medida através da marcação de Ki67.

Proliferação por marcação de Ki67			
		P	
		R	
4EBP1	I	0.0007	0.6680
	II	0.0093	0.4828
	III	0.2861	0.3357
	IV	0.8689	0.0188
	I+II	<0.0001	0.6322
	III+IV	0.7913	0.02813
	I a IV	0.5967	0.04494

Tabela 15 - Correlação de 4EBP1 com PTEN.

Correlação com PTEN no citoplasma			
		P	
		R	
4EBP1	I	0.0053	0.6478
	II	0.0067	0.4310
	III	0.6308	0.0508
	IV	0.0944	0.0801
	I+II	<0.0001	0.5097
	III+IV	0.5004	0.0481
	I a IV	0.0956	0.3951

Desta maneira podemos perceber um padrão que se repete em todas as proteínas da via de PI3K/mTORC1, uma correlação com PTEN que diminui com a progressão da malignidade. Estes resultados indicam que a presença de PTEN está modulando a via de PI3K/mTORC1 nos tumores de baixo grau, sendo esta regulação perdida nos tumores de alto grau. Por outro lado, não parece haver influência de PTEN no complexo de mTORC2. É interessante ressaltar que ao observar o mesmo padrão de expressão em proteínas relacionadas mas não em proteínas pertencentes a vias distintas, se adiciona um importante grau de confiabilidade aos resultados obtidos até o momento.

5 ANÁLISE DE SOBREVIDA GLOBAL

A partir dos dados obtidos nos prontuários dos pacientes, realizamos uma análise de sobrevida global dos de acordo com a expressão das proteínas da via de AKT/mTOR nos diversos graus da doença.

Avaliando a sobrevida global em relação à expressão de AKT total e de sua forma fosforilada quando presentes no citoplasma, observou-se que indivíduos que apresentavam pouca expressão tinham uma sobrevida muito maior do que aqueles que expressavam altos níveis da proteína. Já quando observamos a expressão nuclear destas proteínas, não existe impacto da expressão de AKT ou sua forma fosforilada na sobrevida (**Figura 10**).

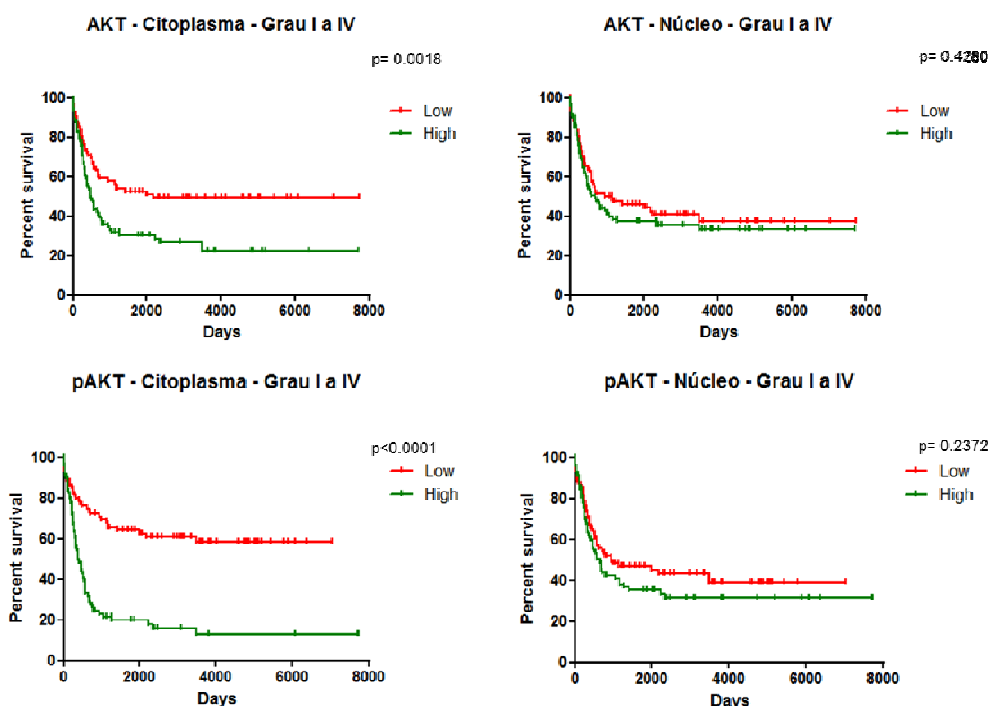


Figura 10 - Sobrevida global de pacientes nos diversos graus apresentando alta ou baixa expressão de anti-AKT e anti-pAKT.

Por outro lado, avaliamos também a sobrevida global apenas nos pacientes que apresentavam tumores grau IV, já que nestes casos a existência de um fator prognóstico seria de especial importância.

Infelizmente, quando realizamos a análise de sobrevida considerando apenas o grau IV, notamos que a presença de AKT total e sua forma fosforilada não influem na sobrevida dos indivíduos (**Figura 11**).

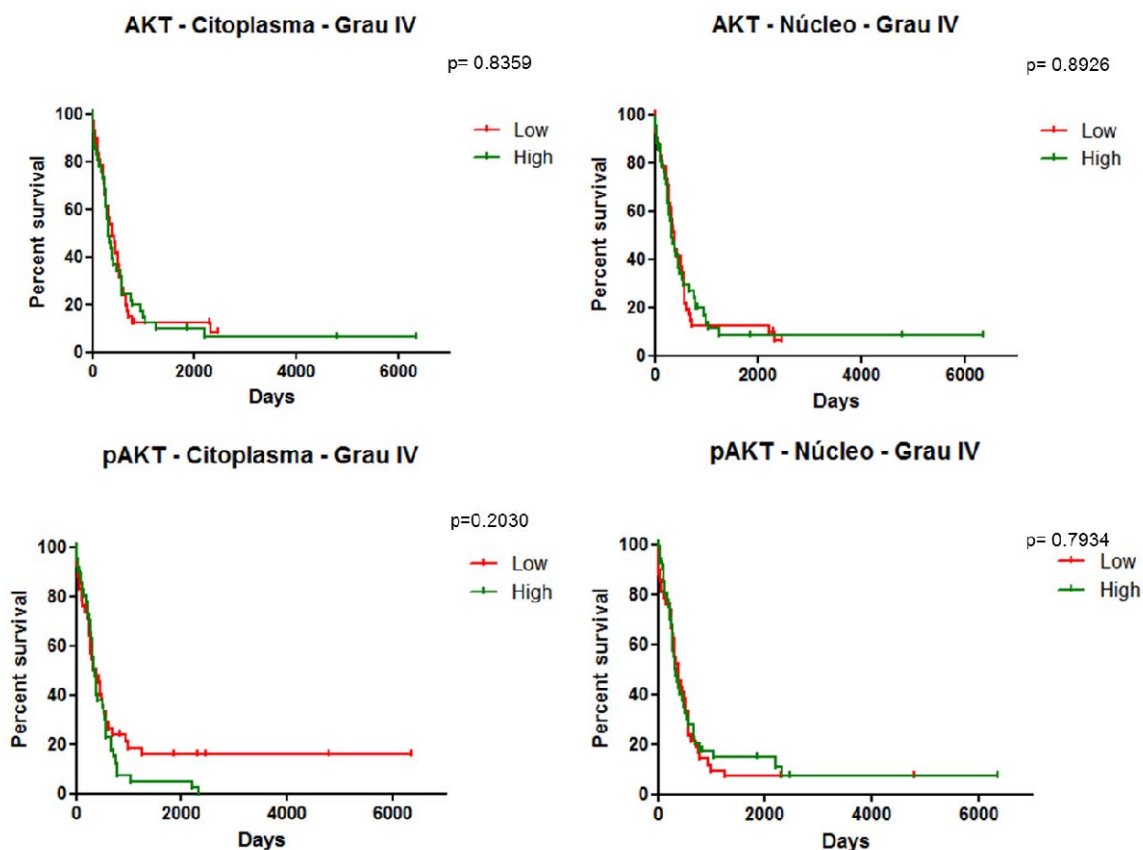


Figura 11 - Sobrevida global de pacientes grau IV apresentando alta ou baixa expressão de anti-AKT e anti-pAKT.

Ao considerarmos a proteína mTOR e sua forma fosforilada, verificamos que tanto no citoplasma quanto no núcleo, os indivíduos que expressavam menores quantidades destas proteínas possuíam uma sobrevida muito maior do que os indivíduos que apresentaram altos níveis de expressão (**Figura 12**). Quando a análise considerou somente os pacientes com glioblastoma grau IV, diminuiu muito a influência da presença de mTOR e sua forma fosforilada na sobrevida, no entanto, fomos capazes de determinar uma diferença estatisticamente significativa ao considerarmos a expressão total de mTOR no citoplasma (**Figura 12**).

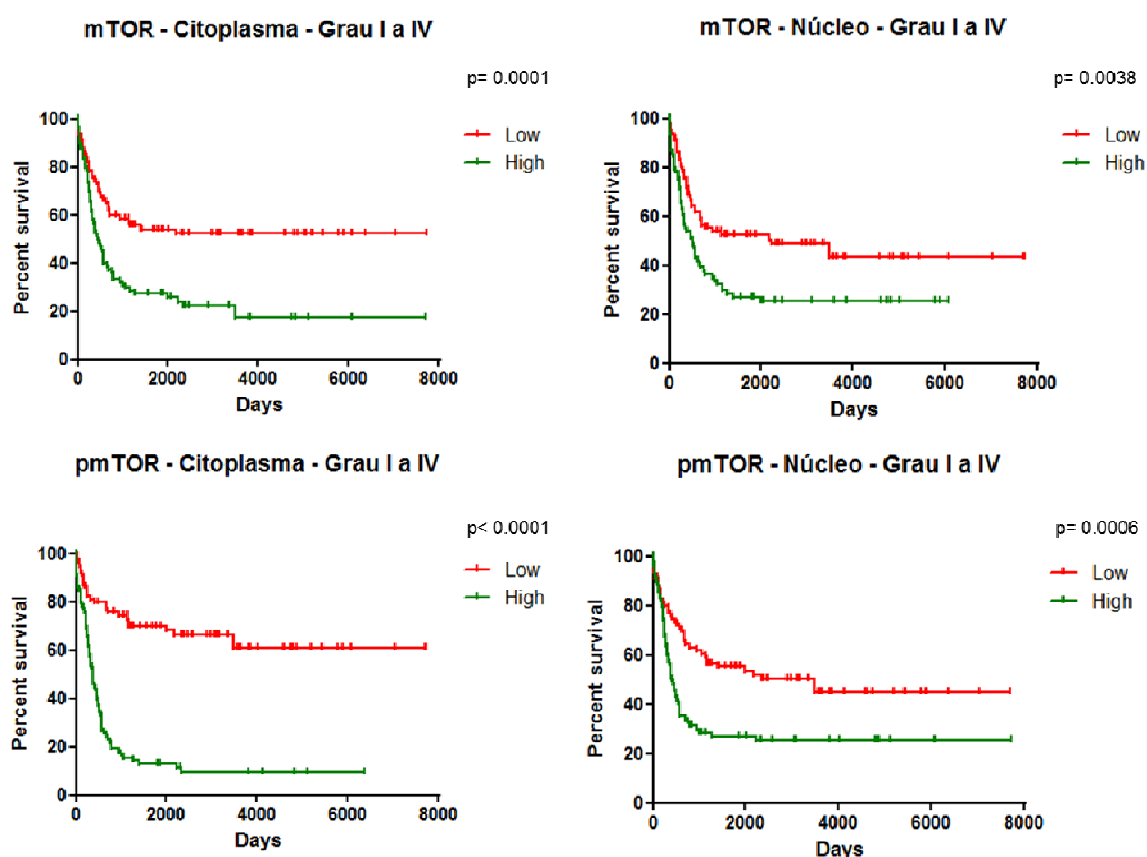


Figura 12 - Sobrevida global de pacientes nos diversos graus apresentando alta ou baixa expressão de anti-mTOR e anti-pmTOR.

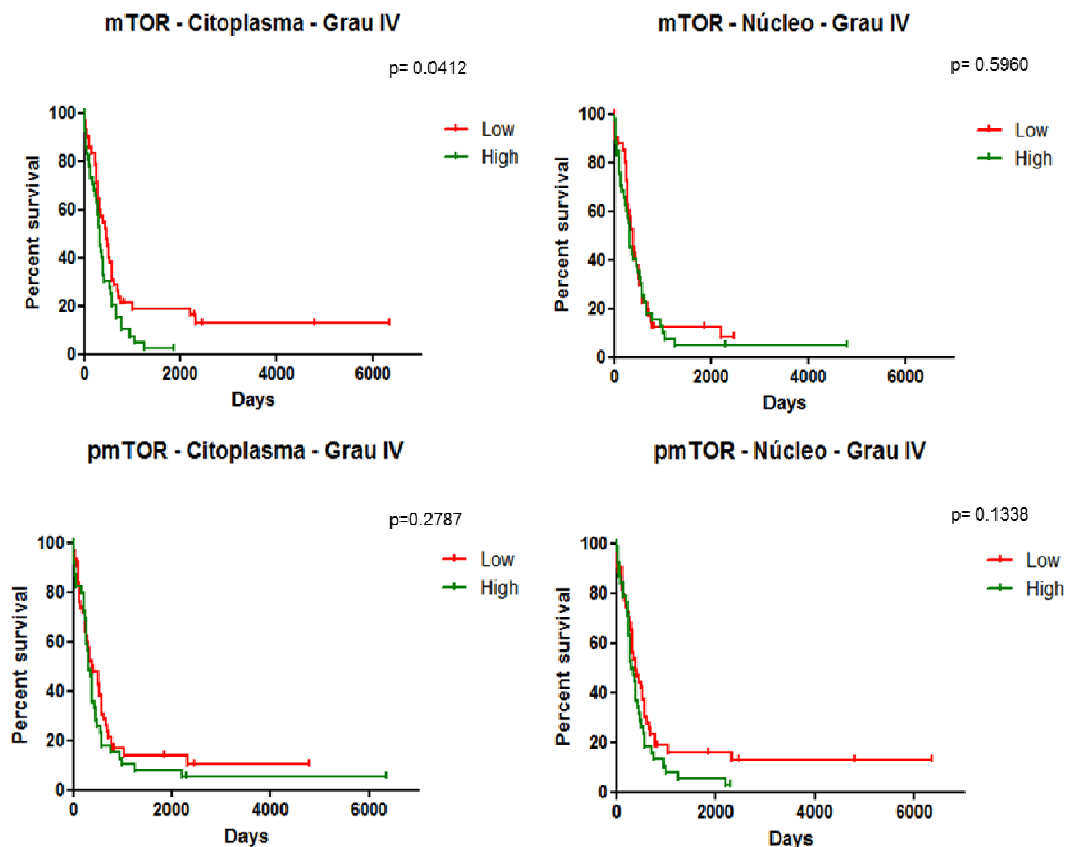


Figura 13 - Sobrevida global de pacientes de grau IV apresentando alta ou baixa expressão de anti-mTOR e anti-pmTOR.

Já para Rictor e Raptor detectamos um fenômeno diferente, observamos que os indivíduos que expressavam mais destas proteínas no citoplasma obtiveram uma sobrevida maior do que aqueles que expressavam pouco. Entretanto, quando foi observada a expressão nuclear destes marcadores, notamos que para Raptor a presença no núcleo não afeta a sobrevida, enquanto para Rictor, esta diferença aumenta consideravelmente (**Figura 14**).

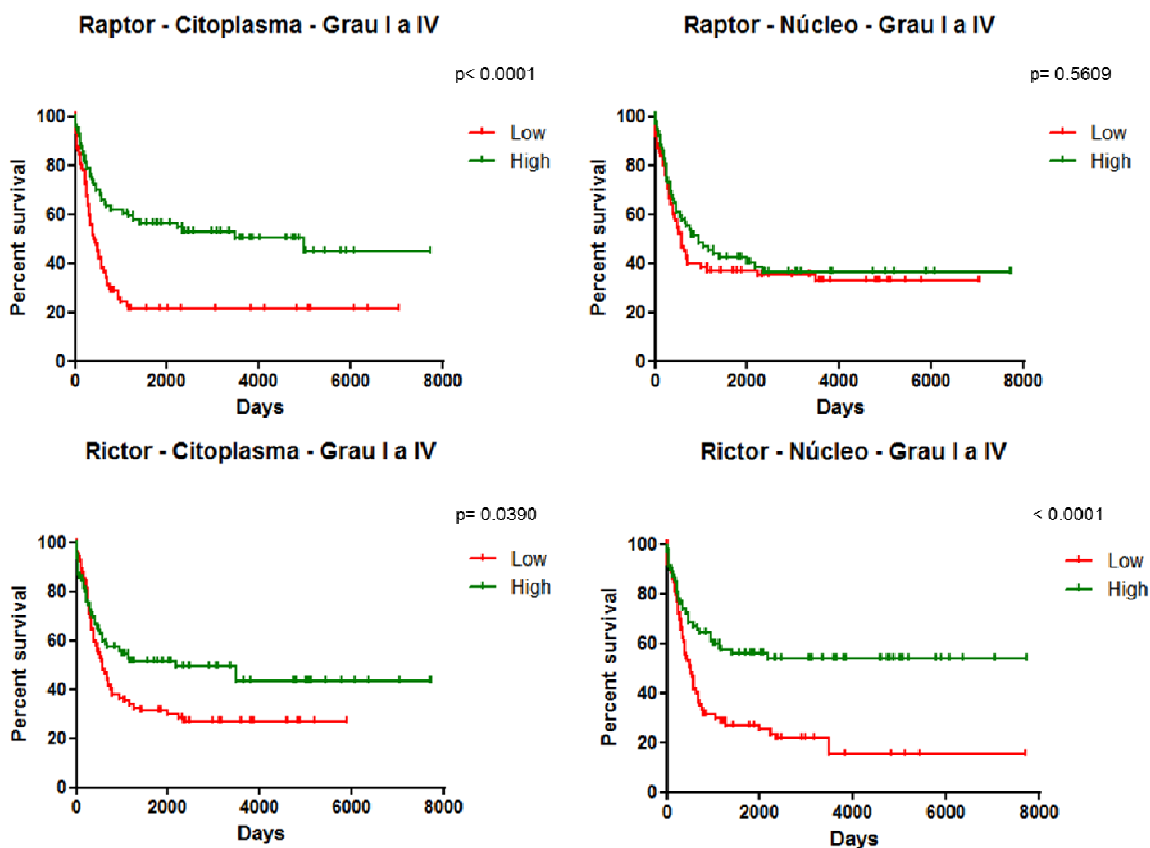


Figura 14 - Sobrevida global de pacientes nos diversos graus apresentando alta ou baixa expressão de anti-Raptor e anti-Rictor.

De igual modo, analisando somente indivíduos acometidos por gliomas de grau IV, o ganho real de sobrevida para os pacientes que expressavam as proteínas Raptor ou Rictor foi muito baixo, independentemente do compartimento celular considerado. Ainda assim, a presença de altos níveis de Rictor no núcleo foi correlacionada a uma melhor sobrevida, com a diferença entre as curvas atingindo $p=0.052$ (**Figura 15**).

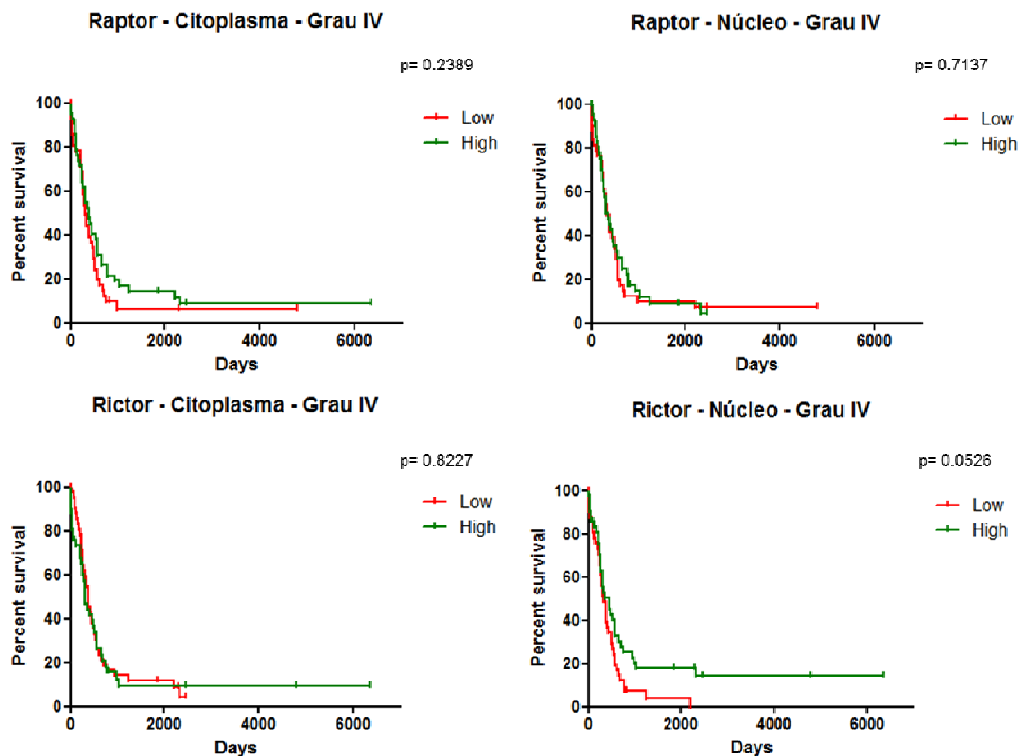


Figura 15 - Sobrevida global de paciente de grau IV apresentando alta ou baixa expressão de anti-Raptor e anti-Rictor.

Por último, ao observamos a sobrevida dos indivíduos em relação à presença de 4E-BP1, notamos que há pouca diferença na sobrevida entre alta ou baixa expressão de 4E-BP no citoplasma. Porém, o panorama se torna completamente diferente quando verificamos a sobrevida dos indivíduos com esta proteína no compartimento nuclear, visto que indivíduos que expressam muito desta proteína obtiveram uma sobrevida muito maior do que aqueles que a expressavam em menor quantidade (**Figura 16**). Nas análises considerando somente os gliomas grau IV, novamente se perde esta diferença, embora o nível de significância estatística atinja $p=0,26$ (**Figura 17**).

Deste modo, fomos capazes de identificar a relevância da presença de todos os marcadores estudados na sobrevida de pacientes de gliomas grau I a IV, mostrando a importância da via de mTOR no processo de tumorigênese e progressão tumoral. Novamente, a concordância entre os resultados obtidos com mais de uma molécula da mesma via de sinalização aumenta muito o grau de confiabilidade do nosso estudo. Quando consideramos somente a sobrevida dos pacientes grau IV, conseguimos obter uma significância estatística somente para a presença de mTOR e Rictor, o que provavelmente se deve ao alto índice de morbidade destes pacientes.

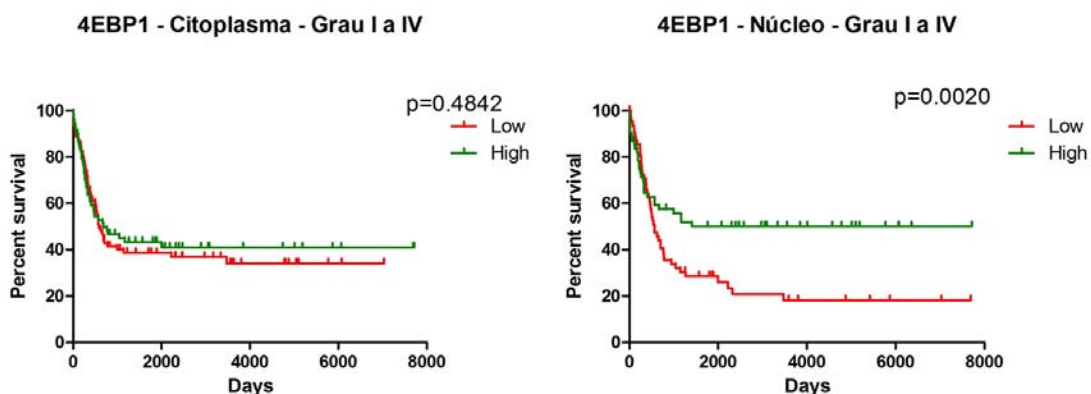


Figura 16 - Sobrevida global de pacientes nos diversos graus apresentando alta ou baixa expressão de anti-4E-BP1.

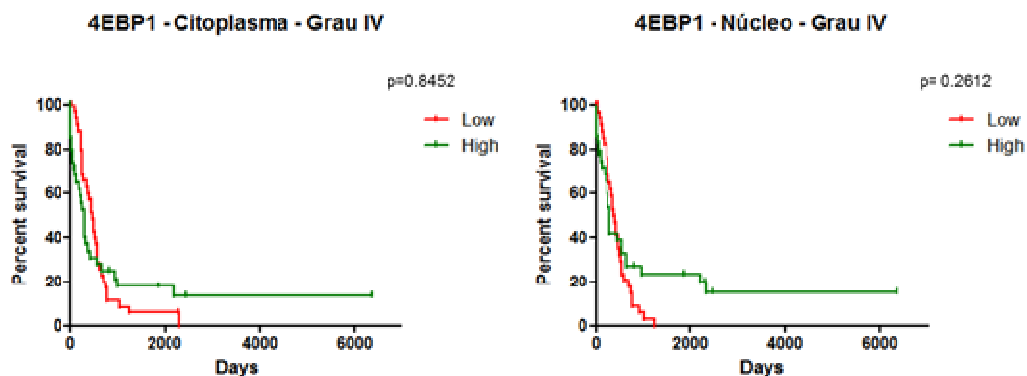


Figura 17 - Sobrevida global de paciente de grau IV apresentando alta ou baixa expressão de anti-4E-BP1.

5.1 ANÁLISE COMBINATÓRIA UTILIZANDO DOIS MARCADORES

Considerando que os glioblastomas apresentam poucos fatores prognósticos e que os marcadores apresentados neste trabalho foram capazes de se relacionar com a sobrevida global, realizamos análises combinatórias com o objetivo de criar testes que possibilitem a real avaliação do fator prognóstico para estes pacientes.

Utilizando as análises apresentadas no item anterior, construímos curvas de sobrevida utilizando dois marcadores em conjunto. Pudemos observar que utilizando a marcação de AKT e Rictor no citoplasma se denota uma grande separação entre os braços (**Figura 18**). É possível notar que cerca de 70% dos pacientes que expressam altos níveis de Rictor e baixos níveis de AKT sobrevivem mais de 6000 dias (16,4 anos), enquanto somente 20% dos pacientes de perfil molecular oposto (alta expressão de

AKT e baixa expressão de Rictor) sobreviveram por até 1000 dias (2,7 anos) e nenhum sobreviveu mais de 3000 dias (8,2 anos).

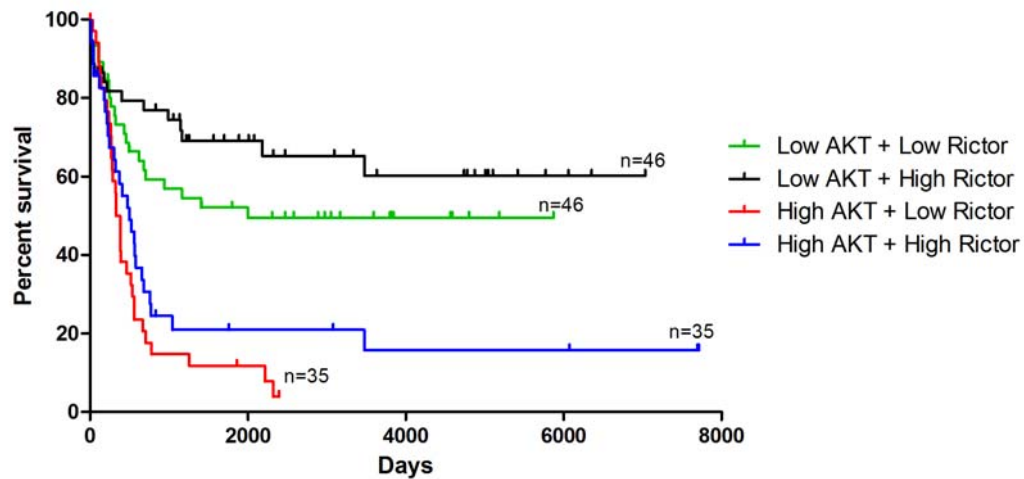


Figura 18 - Sobrevida global combinada anti-AKT com anti-Rictor no citoplasma.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.001$ – pós teste de Tukey.

Low AKT + Low Rictor vs High AKT + Low Rictor***

Low AKT + Low Rictor vs High AKT + High Rictor*

Low AKT + High Rictor vs High AKT + Low Rictor***

Low AKT + High Rictor vs High AKT + High Rictor***

Na análise combinatória entre AKT e Raptor no citoplasma, existe uma separação ainda maior dos braços no gráfico: o braço que possui alta expressão de AKT e baixa expressão de Raptor possui sobrevida que gira por volta de 20%, enquanto no braço que apresenta baixa expressão de AKT e alta expressão de Raptor, a sobrevida gira em torno de 80% (**Figura 19**).

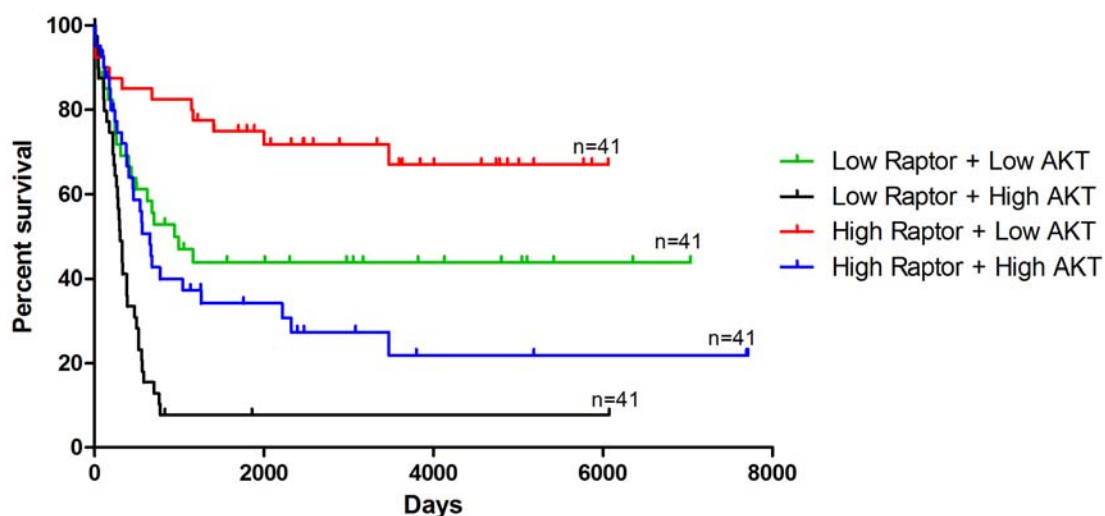


Figura 19 - Sobrevida global combinada anti-raptor com anti-AKT.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.001$ – pós teste de Tukey.

Low Raptor + Low AKT vs Low Raptor + High AKT**

Low Raptor + Low AKT vs High Raptor + Low AKT***

Low Raptor + High AKT vs High Raptor + Low AKT***

High Raptor + Low AKT vs High Raptor + High AKT**

O mesmo perfil é encontrado quando realizamos uma análise combinatória com Rictor e mTOR. Podemos observar uma grande separação entre os braços no gráfico: aos 6000 dias, existe uma sobrevida de 70% dos pacientes com alta expressão de Rictor e baixa expressão de mTOR, contra 10% de sobrevida dos pacientes com perfil molecular oposto (Figura 20).

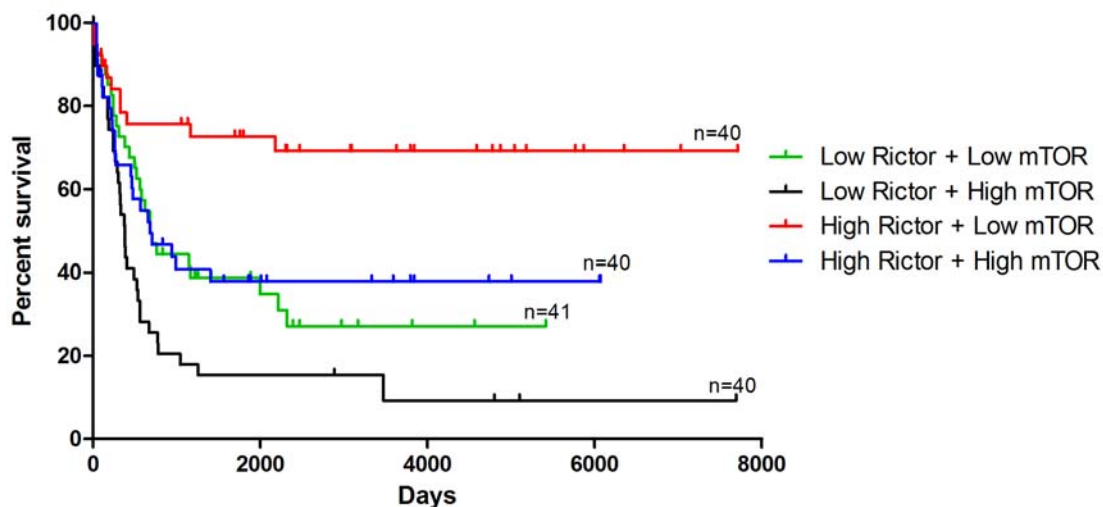


Figura 20 - Sobrevida global combinada anti-riCTOR com anti-mTOR.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.001$ – pós teste de Tukey.

Low Rictor + Low mTOR vs High Rictor + Low mTOR**

Low Rictor + High mTOR vs High Rictor + Low mTOR***

Low Rictor + High mTOR vs High Rictor + High mTOR*

High Rictor + Low mTOR vs High Rictor + High mTOR*

Estes dados sugerem que independentemente do grau da doença, estes marcadores em conjunto poderiam ser utilizados como fatores prognósticos para a doença.

Realizamos também estas análises somente para os pacientes com grau IV, buscando algum padrão de expressão proteica que pudesse separar os pacientes de melhor e pior prognóstico. Mesmo utilizando várias combinações entre os marcadores, não foi possível observar uma sobrevida maior que 30%, o que reflete o alto índice de morbidade destes pacientes. No entanto, utilizando a combinação entre Rictor no núcleo e fosfo-AKT no citoplasma, podemos observar no gráfico (**Figura 21**), uma grande separação entre os braços. Os pacientes que expressam grandes quantidades de Rictor e baixas quantidades de AKT fosforilada apresentam

sobrevida maior do que aqueles que expressam qualquer outra combinação destas duas proteínas.

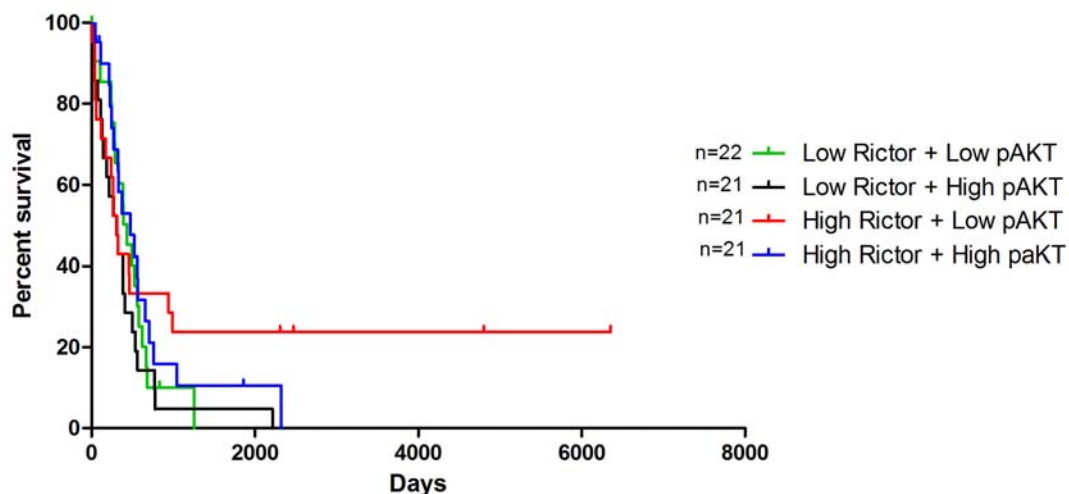


Figura 21 - Sobrevida global combinada anti-rictor com anti-pAKT somente no grau IV.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.001$ – pós teste de Tukey.

Low Rictor + Low pAKT vs High Rictor + Low pAKT*

Low Rictor + High pAKT vs High Rictor + Low pAKT*

High Rictor + Low pAKT vs High Rictor + High pAKT*

Da mesma maneira, utilizando a combinação entre mTOR e pAKT, podemos observar que mais de 20% dos pacientes que expressam baixas concentrações de ambas as proteínas tem sobrevivência que ultrapassa os 6000 dias (16 anos), enquanto todos os pacientes que apresentam grandes quantidades de ambas as proteínas faleceram em até 1000 dias (2,7 anos) (**Figura 22**).

Desta maneira, ainda permanece o desafio de desvendar a identidade molecular desse pequeno número de pacientes portadores de glioma grau IV cuja sobrevivência é de longo prazo, que pode nos dar pistas importantes sobre os mecanismos da doença.

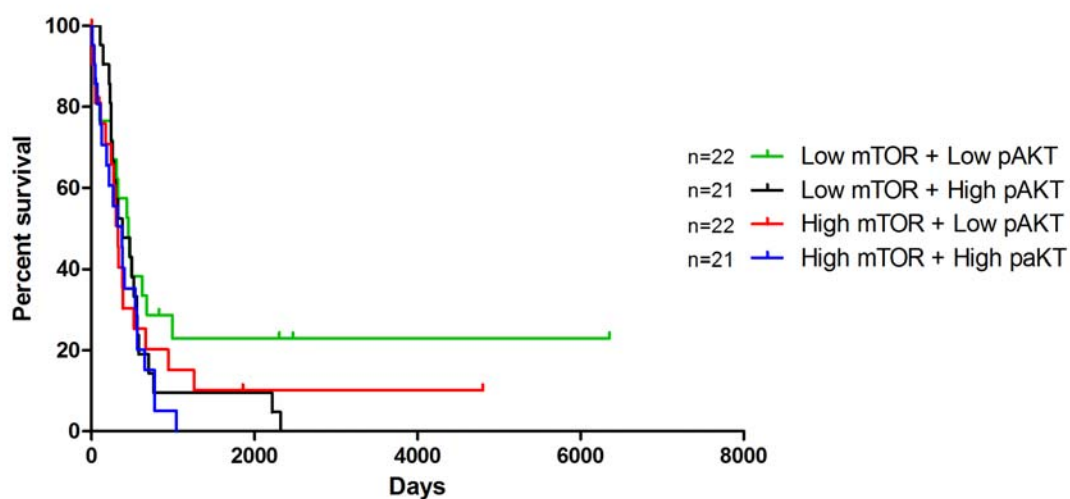


Figura 22 - Sobrevida global combinada anti-mTOR com anti-pAKT somente no grau IV.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.001$ – pós teste de Tukey.

Low mTOR + Low pAKT vs Low mTOR + High pAKT*

Low mTOR + Low pAKT vs High mTOR + High pAKT*

6 CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstram uma alteração na via de AKT/mTOR em gliomas, observado através de um aumento progressivo da expressão de AKT e de sua forma fosforilada, bem como da proteína mTOR e de sua forma fosforilada em gliomas de diferentes graus. Além disso, observamos também uma diminuição de um componente do complexo de mTORC2, Rictor, nos glioblastomas de alto grau, sugerindo que pacientes portando este tipo específico da doença poderiam se beneficiar de uma estratégia de tratamento baseada no uso da rapamicina.

Também pudemos verificar que o caráter proliferativo dos tumores, avaliado por Ki67, era muito mais correlacionado com a expressão das proteínas da via de AKT nas formas mais brandas da doença, demonstrando uma dependência da proliferação por esta via. Do mesmo modo, as correlações dos marcadores encontradas com PTEN eram muito maiores em tumores de baixo grau, ressaltando a importância de PTEN para a ativação desta via. Além disso, estas análises reforçam nossos dados por mostrar a concordância de comportamento entre os componentes da mesma via de sinalização e demonstram a importância da via para o surgimento e progressão desse tipo tumoral.

Observamos também, que a expressão alterada da via de AKT/mTOR, seja pelo aumento ou diminuição das proteínas envolvidas, tem um impacto importante na sobrevida global dos indivíduos acometidos por

gliomas em seus diferentes graus. Analisando a sobrevida global utilizando apenas um dos marcadores não se ressaltam diferenças muito significativas, no entanto quando realizamos análises combinatórias com duas proteínas, percebemos que o ganho de sobrevida é considerável. Mesmo realizando as análises somente em tumores grau IV, podemos perceber o poder da utilização de mais uma proteína pertencente à mesma via, o que aumentou significativamente a separação entre pacientes de melhor e pior prognóstico.

Portanto estudos futuros na via de AKT/mTOR se tornam cada vez mais necessários para entender a complexidade e interatividade das proteínas envolvidas, a regulação dos dois complexos de mTOR e as causas da resistência ou suscetibilidade à rapamicina. Devido à importância dessa via, o descobrimento de novas moléculas inibitórias poderia contribuir para o desenvolvimento de terapias para os gliomas, tumores que ainda apresentam uma sobrevida de curto prazo e baixa responsividade aos tratamentos tradicionais.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andjelkovic M, Alessi DR, Meier R, et al. Role of translocation in the activation and function of protein kinase b. **J Biol Chem** 1997; 272:31515-24.

Bachmann RA, Kim JH, Wu AL, Park IH, Chen J. A nuclear transport signal in mammalian target of rapamycin is critical for its cytoplasmic signaling to S6 kinase 1. **J Biol Chem** 2006; 281:7357-63.

Bourne TD, Schiff D. Update on molecular findings, management and outcome in low-grade gliomas. **Nat Rev Neurol** 2010; 6:695-701.

[CBTRUS] Central Brain Tumor Registry of the United States. **CBTRUS Statistical Report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2004-2006**. 2010. Available from: <URL:<http://www.cbtrus.org/2010-NPCR-SEER/CBTRUS-WEBREPORT-Final-3-2-10.pdf>> [2012 jun 12]

Cantley LC. The phosphoinositide 3- kinase pathway. **Science** 2002; 296:1655-7.

Castedo M, Ferri KF, Kroemer G. Mammalian target of rapamycin (mTOR): pro- and anti-apoptotic. **Cell Death Differ** 2002; 9:99-100.

Chang SM, Wen P, Cloughesy T, et al. Phase II study of CCI-779 in patients with recurrent glioblastoma multiforme. **Invest New Drugs** 2005; 23:357-61.

Choi CH, Lee JS, Kim SR, et al. Clinical significance of pmTOR expression in endometrioid endometrial carcinoma. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol** 2010; 153:207-10.

Corradetti MN, Guan KL. Upstream of the mammalian target of rapamycin: do all roads pass through mTOR? **Oncogene** 2006; 25:6347-60.

Evren S, Dermen A, Lockwood G, Fleshner N, Sweet J. Immunohistochemical examination of the mTORC1 pathway in high grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN) and prostatic adenocarcinomas (PCa): a tissue microarray study (TMA). **Prostate** 2010; 70:1429-36.

Galanis E, Buckner JC, Maurer MJ, et al. Phase II trial of temsirolimus (CCI-779) in recurrent glioblastoma multiforme: a North Central Cancer Treatment Group Study. **J Clin Oncol** 2005; 23:5294-304.

Galli R, Binda E, Orfanelli U, et al. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. **Cancer Res** 2004; 64:7011-21.

Gingras AC, Raught B, Gygi SP, et al. Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1. **Genes Dev** 2001; 15:2852-64.

Gulmann C, Butler D, Kay E, Grace A, Leader M. Biopsy of a biopsy: validation of immunoprofiling in gastric cancer biopsy tissue microarrays. **Histopathology** 2003; 42:70-6.

Hartford CM, Ratain MJ. Rapamycin: something old, something new, sometimes borrowed and now renewed. **Clin Pharmacol Ther** 2007; 82:381-8.

Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. **Genes Dev** 2004; 18:1926-45.

Heimberger AB, Suki D, Yang D, Shi W, Aldape K. The natural history of EGFR and EGFRvIII in glioblastoma patients. **J Transl Med** 2005; 3:38.

Hirashima K, Baba Y, Watanabe M, et al. Phosphorylated mTOR expression is associated with poor prognosis for patients with esophageal squamous cell carcinoma. **Ann Surg Oncol** 2010; 17:2486-93.

Hresko RC, Mueckler M. mTOR/RICTOR is the Ser473 kinase for Akt/PKB in 3t3-L1 adipocytes. **J Biol Chem** 2005; 280:40406-16.

Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2006. **CA Cancer J Clin** 2006; 56:106-30.

Johnson SM, Gulhati P, Arrieta I, et al. Curcumin inhibits proliferation of colorectal carcinoma by modulating Akt/mTOR signaling. **Anticancer Res** 2009; 29:3185-90.

Kevil CG, De Benedetti A, Payne DK, Coe LL, Laroux FS, Alexander JS: Translational regulation of vascular permeability factor by eukaryotic initiation factor 4E: implications for tumor angiogenesis. **Int J Cancer** 1996; 65:785-90.

Kim MK, Kim TJ, Sung CO, et al. High expression of mTOR is associated with radiation resistance in cervical cancer. **J Gynecol Oncol** 2010; 21:181-5.

Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW. The new WHO classification of brain tumours. **Brain Pathol** 1993; 3:255-68.

Kleihues P, Burger PC, Collins VP, Newcomb EW, Ohgaki H, Cavenee WK. Glioblastoma. In: Kleihues P, Cavenee WK, editors. **Pathology and genetics: tumours of the nervous system**. Lyon: IARC Press; 2000. p.29-39. (World Health Organization Classification of Tumours).

Konopka G, Bonni A. Signaling pathways regulating gliomagenesis. **Curr Mol Med** 2003; 3:73-84.

Koul D. PTEN signaling pathways in glioblastoma. **Cancer Biol Ther** 2008; 7:1321-5.

Kunz J, Henriquez R, Schneider U, Deuter-Reinhard M, Movva NR, Hall MN. Target of rapamycin in yeast, TOR2, is an essential phosphatidylinositol kinase homolog required for G1 progression. **Cell** 1993; 73:585-96.

Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics** 1977; 33:159-74.

Lee SB, Xuan Nguyen TL, Choi JW, et al. Nuclear Akt interacts with B23/NPM and protects it from proteolytic cleavage, enhancing cell survival. **Proc Natl Acad Sci USA** 2008; 105:16584-9.

Lin H, Bondy ML, Langford LA, et al. Allelic deletion analyses of MMAC/PTEN and DMBT1 loci in gliomas: relationship to prognostic significance. **Clin Cancer Res** 1998; 4:2447-54.

Long X, Lin Y, Ortiz-Vega S, Yonezawa K, Avruch J. Rheb binds and regulates the mTOR kinase. **Curr Biol** 2005; 15:702-13.

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta Neuropathol** 2007; 114:97-109.

Lum JJ, DeBerardinis RJ, Thompson CB. Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2005; 6:439-48.

Maher CO, Raffel C. Neurosurgical treatment of brain tumors in children. **Pediatr Clin North Am** 2004; 51:327-57.

Maher EA, Furnari FB, Bachoo RM, et al. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. **Genes Dev** 2001; 15:1311-33.

Marcotrigiano J, Gingras A-C, Sonenberg N, Burley SK. Cap-dependent translation initiation in eukaryotes is regulated by a molecular mimic of eIF4G. **Mol Cell** 1999; 3:707-16.

Martelli AM, Faenza I, Billi AM, et al. Intranuclear 3'-phosphoinositide metabolism and Akt signaling: new mechanisms for tumorigenesis and protection against apoptosis? **Cell Signal** 2006; 18:1101-7.

Masri J, Bernath A, Martin J, et al. mTORC2 activity is elevated in gliomas and promotes growth and cell motility via overexpression of rictor. **Cancer Res** 2007; 67:11712-20.

Meier R, Hemmings BA. Regulation of protein kinase B. **J Recept Signal Transduct Res** 1999; 19:121-8.

Meng Q, Xia C, Fang J, Rojanasakul Y, Jiang BH. Role of PI3K and AKT specific isoforms in ovarian cancer cell migration, invasion and proliferation through the p70S6K1 pathway. **Cell Signal** 2006; 18:2262-71.

Meyuhas O, Hornstein E. Translational control of TOP mRNAs. In: Mathews MB, editor. **Translational control of gene expression**. New York: Cold Spring Harbor Lab Press; 2000. p.671-94.

Milanes-Yearsley M, Hammond ME, Pajak TF, et al. Tissue micro-array: a cost and time-effective method for correlative studies by regional and national cancer study groups. **Mod Pathol** 2002; 15:1366-73.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Distribuição das taxas de incidência, ajustadas por idade*, segundo o RCBP e período de referência.** Disponível em:

<URL:http://www.inca.gov.br/cancernobrasil/2010/docs/taxa_neoplasias/Parte458_registro_de_base_populacional_completo.pdf>. [2012 set 19].

Myers MP, Stolarov JP, Eng C, et al. P-TEN, the tumor suppressor from human chromosome 10q23, is a dual-specificity phosphatase. **Proc Natl Acad Sci USA** 1997; 94:9052-7.

Ohgaki H. Genetic pathways to glioblastomas. **Neuropathology** 2005; 25:1-7.

Okada M, Jang SW, Ye K. Akt phosphorylation and nuclear phosphoinositide association mediate mRNA export and cell proliferation activities by ALY. **Proc Natl Acad Sci USA** 2008; 105:8649-54.

Potter CJ, Pedraza LG, Xu T. Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2. **Nat Cell Biol** 2002; 4:658-65.

Prados MD, Levin V. Biology and treatment of malignant glioma. **Semin Oncol** 2000; 27(Suppl 6):1-10.

Reardon DA, Quinn JA, Vredenburgh JJ, et al. Phase I trial of gefitinib plus sirolimus in adults with recurrent malignant glioma. **Clin Cancer Res** 2006; 12:860-8.

Reardon DA, Desjardins A, Vredenburgh JJ, et al. Phase 2 trial of erlotinib plus sirolimus in adults with recurrent glioblastoma. **J Neurooncol** 2010; 96:219-30.

Riemenschneider MJ, Jeuken JW, Wesseling P, Reifenberger G. Molecular diagnostics of gliomas: state of the art. **Acta Neuropathol** 2010; 120:567-84.

Rosner M, Hengstschläger M. Cytoplasmic and nuclear distribution of the protein complexes mTORC1 and mTORC2: rapamycin triggers dephosphorylation and delocalization of the mTORC2 components rictor and sin1. **Hum Mol Genet** 2008; 17:2934-48.

Roulin D, Cerantola Y, Dormond-Meuwly A, Demartines N, Dormond O. Targeting mTORC2 inhibits colon cancer cell proliferation in vitro and tumor formation in vivo. **Mol Cancer** 2010; 9:57.

Sabatini DM, Erdjument-Bromage H, Lui M, Tempst P, Snyder SH. RAFT1: A mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. **Cell** 1994; 78:35-43.

Sabatini DM. mTOR and cancer: insights into a complex relationship. **Nat Rev Cancer** 2006; 6:729-34.

Sarbassov DD, Ali SM, Kim DH. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. **Curr Biol** 2004; 14:1296-302.

Sarbassov DD, Ali SM, Sabatini DM. Growing role for the mTOR pathway. **Curr Opin Cell Biol** 2005; 17:596-603.

Scheid MP, Woodgett JR. PKB/AKT: Functional insights from genetic models. **Nat. Rev Mol Cell Biol** 2001; 2:760-8.

Sehgal SN, Baker H, Vézina C. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic, II. Fermentation, isolation and characterization. **J Antibiot (Tokyo)** 1975; 28:727-32.

Shantz LM, Pegg AE. Overproduction of ornithine decarboxylase caused by relief of translational repression is associated with neoplastic transformation. **Cancer Res** 1994; 54:2313-6.

Simpson L, Parsons R. PTEN: life as a tumor suppressor. **Exp Cell Res** 2001; 264:29-41.

Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. **N Engl J Med** 2005; 352:987-96.

Supko JG, Malspeis L. Dose-dependent pharmacokinetics of rapamycin-28-N, N-dimethylglycinate in the mouse. **Cancer Chemother Pharmacol** 1994; 33:325-30.

Wang R, Brattain MG. AKT can be activated in the nucleus. **Cell Signal** 2006; 18:1722-31.

Wiencke JK, Zheng S, Jelluma N, et al. Methylation of the PTEN promoter defines low-grade gliomas and secondary glioblastoma. **Neuro Oncol** 2007; 9:271-9.

Wong K, Engelman JA, Cantley LC. Targeting the PI3K signaling pathway in cancer. **Curr Opin Genet Dev** 2010; 20:87-90.

Woo SY, Kim DH, Jun CB, et al. PRR5, a novel component of mTOR complex 2, regulates platelet-derived growth factor receptor beta expression and signaling. **J Biol Chem** 2007; 282:25604-12.

Wu M, Arcaro A, Varga Z, et al. Pulse mTOR inhibitor treatment effectively controls cyst growth but leads to severe parenchymal and glomerular hypertrophy in rat polycystic kidney disease. **Am J Physiol Renal Physiol** 2009; 297:F1597-605.

Xu DZ, Geng QR, Tian Y, et al. Activated mammalian target of rapamycin is a potential therapeutic target in gastric cancer. **BMC Cancer** 2010; 10:536.

Anexo 1 - A comparison between manual and automated evaluation of tissue microarray patterns of protein expression

Arthur W. Alvarenga¹, Rafael M. Rocha¹, Torres, L.F.B², Vilma R. Martins¹, Isabela W. da Cunha¹, Glaucia N. M. Hajj¹.

1- International Center for Research A.C. Camargo Hospital, São Paulo, Brazil, National Institute of Science and Technology in Oncogenomics.

2- Federal University of Paraná, Brazil.

Correspondence: Glaucia N. M. Hajj, PhD, International Center for Research, A. C. Camargo Hospital, Zip Code: 01509-010, São Paulo, Brazil. e-mail: ghajj@cipe.accamargo.org.br

Abstract

TMA technology enables us to evaluate the pattern of expression of almost any protein in a large number of different samples. However, data acquisition and analysis still represent a challenge, since manual evaluation is time consuming and can be prone to errors since it depends on human estimates. Automated analysis of protein expression is thus an essential tool speed up acquisition and analysis in a manner that is independent of subjective evaluation and that can be reproduced by independent laboratories. There are today many different manufacturers for automated systems of image acquisition and analysis and thus the reliability of such systems should be subjected to independent evaluation. Herein, we evaluated the expression of tumor marker candidates in normal human brain and glioma tissue samples. The expression of the proteins was evaluated through automated protein expression analysis of ScanScope XT, from Aperio, and ACIS III, from Dako, and compared it against the manual analysis of two human observers. We found a very good correlation between the analysis of human observers and

both automated systems. However small differences were found between systems, and Scanscope XT had the best correlation with the human observers.

Key words: immunohistochemistry, tissue microarray, automated analysis.

Introduction

In recent decades, the importance of studies to characterize the genetic profile in healthy or pathological conditions has increased. This leads to a continue need for new strategies for high-throughput research to explore temporal and spatial localization of protein, as well as new technologies to improve data acquisition and analysis.

Immunohistochemistry can be used to detect differential expression levels of specific antigens, with the advantages of preserving protein localization and the possibility of using low amounts of sample and samples preserved in paraffin. Immunohistochemistry has been widely used in tissue samples from cancer, for follow-up on tumor progression and aggressiveness (1, 2, 3). This method is commonly analyzed by qualified professionals using conventional optical microscopy, and though with every practice comes experience, is subject to errors (4). Therefore the implementation of automated mechanisms and digital documentation is needed for a more accurate assessment of the results.

Recently, the tissue microarray (TMA) has brought immunohistochemistry to the high-throughput methodologies, where a single slide can hold up to hundreds of samples that can be processed in one reaction. This ensures that the exactly same conditions are applied to each sample and maximizes reproducibility (5, 6). The development of this new technology now raises the need for automated means of quantification that can speed up the analysis and at the same time increase quality of the results.

On the contrary to conventional microscopy, where the evaluation criteria are qualitative or semiquantitative and result in categorical values for statistical analysis, computer-assisted microscopy generates a score that can

be used to assign continuous values, more precisely representing the true pattern (7, 8). Other advantages include greater reliability and reproducibility of the results, since computer measurements are not subject to external factors, such as human fatigue, illumination or ambient noise. However, automated evaluation is also prone to errors, due to the inability of the machine to deal with non-ideal situations, such as inadequate sample preparation, heterogeneous tissues, uneven color patterns, cells that appear merged, among others. Additionally, each manufacturer uses a proprietary mathematical algorithm to deal with these situations. Thus, each equipment should be independently tested for its ability to quantify immunohistochemistry reactions and deal with problems inherent to the technique itself.

In this work we evaluated the inter-platform reproducibility of two microscopy equipment from different manufacturers in samples of TMA and tested the reproducibility of these platforms against the values obtained by conventional microscopy by two qualified observers.

Materials and Methods

Sample selection and TMA

Fourteen brain samples from patients surgically treated for epileptic syndrome and 206 glioma samples, classified as grade I to grade IV according to the WHO classification, have been selected from the files of formalin-fixed paraffin embedded tissue of the Anatomic Pathology Department of AC Camargo Hospital. One mm punch was collected from representative tumor areas of each case and organized in a TMA.

Immunohistochemistry reactions

TMA sections were deparaffinized by incubation at 60°C for 24 hours, followed by two successive immersions in xylene at 56°C for 30 minutes each, followed by hydration in solutions with decreasing concentrations of ethanol (100%, 95%, 80%, 70%). For antigen retrieval, the slides were

incubated in 10 mM citrate buffer pH 6.0 in a pressure cooker for 30 minutes with a preheat of 14 minutes. To block endogenous peroxidase, sections were incubated in 10% H₂O₂. Sections were incubated with antibodies pAKT (20ug/ml, Cell Signaling) and mTOR (20ug/ml, Cell Signaling) diluted in 1% bovine serum albumin in PBS for 18 hours at 4°C in a humid chamber. Secondary antibody (Advance HRP Link, Dako) was diluted in PBS and incubated with the slides for 30 min at 37°C, followed by washing in PBS with 3 changes of 3 minutes each. Slides were incubated for 30 min at 37°C (Advance HRP enzyme, Dako), followed by two washes in Tris-HCl buffer pH 7.6 for 5 minutes each. Color was developed by incubation of the slides in substrate solution: 0,06% 3,3'Tetrahydrochloride diaminobenzidine (DAB) (Sigma D-5637, USA), 1% dimethyl sulfoxide (DMSO), 0.06% H₂O₂, in PBS, for 5 minutes at 37°C. Reaction was stopped by immersing the slides in 0.1M Tris-HCl pH 7.6. Sections were counter-stained with Harris hematoxylin, washed in water and dehydrated through increasing concentrations of ethanol followed by subsequent montage. Each slide had a positive control of tissue known to be positive for each antibody tested.

Image Analysis by Automated Equipment

The analyses of the slides were made using ScanScope XT from Aperio, and ACIS III from Dako. For each automated system, we used the internal algorithms for nuclei detection and total number of positive pixels.

Reliability Test

Two qualified observers (AWA and RMR) scored all TMA spots ranging from 0 (absolute lack of staining), 1 (1 to 25% of stained cells), 2 (26% to 50% of stained cells) to 3 (greater than 50% of stained cells). Observation was blindly and independently performed. Scores were further compared with the results obtained from the automated analysis.

Reliability test has been performed to compare scores generated by automated versus human analysis. *Kappa* (9, 10) has been used to calculate the reproducibility among all different evaluation methods. To classify the agreement strength of kappa coefficient, the classification established by

Landis and Koch (1977) has been used, in which the values of kappa between 0.00 to 0.20 indicates negligible agreement, between 0.21 to 0.40 indicates slight agreement, between 0.41 to 0.60 indicates moderate agreement, between 0.61 to 0.80 indicates high concordance and between 0.81 to 1.00 indicates excellent agreement.

Results

TMA sections containing 14 samples from normal brain tissue and 206 glioma tissue samples were subjected to immunohistochemistry reactions with antibodies to phosphorylated form of Akt (**Fig. 1**) and mTOR (**Fig. 2**). The reactions were highly specific since sharp and well-localized staining pattern with no background artifact has been observed. It was also observed that the expression of the proteins presented variability between samples (**Figs. 1 and 2**). Even though we maximized the quality of our samples and immunohistochemistry reactions, there were some spots where a small defect in the tissue could represent a problematic area for the automated analysis. Those include the displacement or bending of the tissue, overlapping with other tissues, or hematoxylin precipitates and other waste that can be deposited in the tissue, causing a false-positive mark (**Fig. 3**).

Samples analyzed by two different observers were categorized according to the percentage of positively labeled cells (**Tables 1 and 2**). The agreement between the two observers was calculated (**Tables 1 and 2**) and was considered excellent.

In the next step samples were evaluated using four automated systems. Two slides were analyzed and measurements of the percentage of positively labeled nuclei and the number of positive pixels were taken, representing nuclear and cytoplasmic staining respectively. The measurements obtained by each system were plotted against each other to verify the concordance among them and the correlation index was calculated for each situation (**Figs. 4 and 5**). The correlation between the two automated equipment was not perfect, reflecting the differences in the

algorithms used by each system. A high correlation index between each system was observed, but that correlation varied with the antibody used.

We then applied the kappa coefficient to analyze the confidence of the digital analysis systems (**Tables 3 and 4**). By applying the classification of Landis and Koch, we observed that there was reproducibility between two observers with Aperio, in a concordance force great to excellent in all grades of gliomas and control tissues, ranging from 0.477 to 1.0 in pAKT and 0.571 to 1.0 kappa value in mTOR. These data demonstrates that the score obtained in ScanScope could be considered reliable for analysis. When we performed the same procedure with the equipment ACISIII and observed that the kappa value ranged from 0.410 to 1.000 in pAKT and 0.429 to 1.0 in mTOR, showing a moderate to excellent concordance between all tumor grades. ACISIII had a moderate reproducibility specially in the normal and low grades, what could possibly reflect low discrimination in the cases where the expression of protein is not very high. When all grades and both proteins were considered for the calculation of a mean kappa coefficient, ScanScope received 0.855 and 0.879 and ACISIII received 0.765 and 0.793 (**Table 5**). All together these results indicate that even though there are variations among different systems, automated analysis of TMAs is reliable. In our hands, Aperio system displayed higher confidence with the two human observers.

Discussion

The determination of protein expression levels by immunohistochemical techniques has progressed towards a more quantitative type of assessment (11, 12) either for diagnostic purposes or clinical-pathological research (13, 14, 15). Thus, it becomes essential to produce reliable and reproducible high-throughput analysis of protein expression. Automated analysis of protein expression in TMAs has become then an essential tool for high-throughput research projects and diagnostic tools.

However, when analyzing immunohistochemistry reactions by a digital system many problematic situations could arise (16). The quality of the immunohistochemistry reactions may be altered by improper fixation of the tissue, method of antigenic reactivation or antibody dilution, leading to nonspecific signal or damaged tissue morphology, hindering the analysis after scanning. False-negatives also may arise due to the formation of air bubbles in the montage of the slide. In these cases is important to evaluate how the automated system deals with the problematic areas. Ideally, the machine should recognize and exclude areas with problems, but this is not always the case (**Figure 3**). In these cases, the manual exclusion of problematic areas is always possible, although this will slow down the efficiency of the analysis. Therefore, it is important to evaluate the quality of each step to ensure maximal fidelity of the data obtained.

Another category that requires attention is situations that rely on specific parameters of the algorithms used by each system. For example, ACISIII system was less able to detect positive cells in control tissues, which could be due to the threshold used by software to consider positive cells. Algorithms that measure cell nuclei can also provide mistakes, because nuclear sizes vary according to cell type and region. In some cases two or more nuclei are considered one or other structures may be considered as a nucleus, causing a bias in the analysis. The observer can manually exclude these problems, but again this is not the ideal situation.

Our study was performed with currently used TMA technology and automated analysis to evaluate the effect of potential biomarkers of interest. With this kind of approach, we showed a great (0.805) to excellent (0.905) concordance between human observers, and demonstrated that the scores generated by an automated analysis are consistent with the results generated by human observers in the identification of potential prognostic markers. In our hands, the Aperio ScanScope had the best discrimination algorithm and had an excellent correlation with the two human observers. ACISIII had a lower correlation with the human observers, which could be due to an algorithm that deals poorly with the problems highlighted above.

Thus, we believe automated systems can be used for high throughput analysis of TMAs and Aperio ScanScope had the best correlation with human observers. These data are important to independently validate automated analysis routinely used in our institution and other studies (7, 8).

In summary, automated technology provides us high-throughput analysis, showing an acceptable correlation between equipment and observers. Even though care has to be taken in each pre and post analytical steps, the benefit of its use in daily routine pathology laboratories can be important. In addition to providing reliable data, automation analysis of TMA decreases substantially the average time of diagnosis and include tools to allow Internet sharing of information with other observers (18).

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest. The authors do not have any relationship or funding from Aperio or Dako.

Acknowledgments

This work was supported by FAPESP grant to GNMH (2012/04370-4) and VRM (2009/14027-2). CAPES fellowship to AWA is acknowledged.

References

1. Harrington AM, Hari P, Kroft SH. Utility of CD56 immunohistochemical studies in follow-up of plasma cell myeloma. *Am J Clin Pathol*. 2009 Jul;132(1):60-6.
2. van Schaik FD, Oldenburg B, Offerhaus GJ, *et.al*. Role of immunohistochemical markers in predicting progression of dysplasia to advanced neoplasia in patients with ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2012 Mar;18(3):480-8.
3. Laurinavicius A, Laurinaviciene A, Ostapenko V, Dasevicius D, Jarmalaite S, Lazutka J. Immunohistochemistry profiles of breast ductal carcinoma: factor analysis of digital image analysis data. *Diagn Pathol*. 2012 Mar;16;7:27.

4. Rojo MG, Bueno G, Slodkowska J. Review of imaging solutions for integrated quantitative immunohistochemistry in the Pathology daily practice. *Folia Histochem Cytobiol.* 2009 Jan;47(3):349-54.
5. Jawhar NM. Tissue Microarray: A rapidly evolving diagnostic and research tool. *Ann Saudi Med.* 2009 Mar-Apr;29(2):123-7.
6. Dhir R. Tissue microarrays: an overview. *Methods Mol Biol.* 2008;441:91-103.
7. Rocha R, Vassallo J, Soares F, Miller K, Gobbi H. Digital slides: present status of a tool for consultation, teaching, and quality control in pathology. *Pathol Res Pract.* 2009;205(11):735-41.
8. Ong CW, Kim LG, Kong HH, *et al.* Computer-assisted pathological immunohistochemistry scoring is more time-effective than conventional scoring, but provides no analytical advantage. *Histopathology.* 2010 Mar;56(4):523-9.
9. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 1977; Mar;33(1):159–174.
10. Kundel HL, Polansky M. Measurement of observer agreement. *Radiology.* 2003 Aug;228(2):303-8.
11. Kayser K. Introduction of virtual microscopy in routine surgical pathology - a hypothesis and personal view from Europe. *Diagn Pathol.* 2012 Apr;30;7(1):48.
12. Cregger M, Berger A, Rimm D. Immunohistochemistry and quantitative analysis of protein expression. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2006; 130; 1026–1030.
13. Laurinaviciene A, Dasevicius D, Ostapenko V, Jarmalaite S, Lazutka J, Laurinavicius A. Membrane connectivity estimated by digital image analysis of HER2 immunohistochemistry is concordant with visual scoring and fluorescence in situ hybridization results: algorithm evaluation on breast cancer tissue microarrays. *Diagn Pathol.* 2011 Sep 23;6:87.

14. Jara-Lazaro AR, Thamboo TP, Teh M, Tan PH. Digital pathology: exploring its applications in diagnostic surgical pathology practice. *Pathology*. 2010;42(6):512-8.
15. Nap M, Teunissen R, Pieters M. A travel report of the implementation of virtual whole slide images in routine surgical pathology. *APMIS*. 2012 Apr;120(4):290-7.
16. Krupinski EA, Silverstein LD, Hashmi SF, Graham AR, Weinstein RS, Roehrig H. Observer Performance Using Virtual Pathology Slides: Impact of LCD Color Reproduction Accuracy. *J Digit Imaging*. 2012 May 1. [Epub ahead of print]
17. Ong CW, Kim LG, Kong HH, *et al*. Computer-assisted pathological immunohistochemistry scoring is more time-effective than conventional scoring, but provides no analytical advantage. *Histopathology*. 2010 Mar;56(4):523-9.
18. Kldiashvili E, Schrader T. Reproducibility of telecytology diagnosis of cervical smears in a quality assurance program: the Georgian experience. *Telemed J E Health*. 2011 Sep;17(7):565-8.

Figure 1: TMA reactions for phosphorylated Akt. A – low magnification images of the TMA showing variability between the spots. B – High magnification of a spot with weak immunoreactivity. C - High magnification of a spot with strong immunoreactivity.

Figure 2: TMA reactions for phosphorylated mTOR. A – low magnification images of the TMA showing variability between the spots. B – High magnification of a spot with weak immunoreactivity. C - High magnification of a spot with strong immunoreactivity.

Figure 3: Problematic situations in the digital image analysis. A – immunohistochemistry reaction denoting superposition of tissues in the slide, increasing the labeling color. B- evaluation of positive pixels by the ACIS III, demonstrating that in this case the equipment was not able to discriminate the problematic area. C- immunohistochemistry reaction denoting an

unspecific deposit; D – evaluation of number of positive nuclei performed by the Aperio ScanScope, demonstrating that in this case the apparatus was able to recognize the spot as unspecific staining. calibration bar: 50um.

Figure 4: Concordance among the automated systems of image analysis. TMA reactions with anti-phospho Akt (A) and anti-phospho-mTOR (B) were analyzed in two automated systems from different manufacturers for the number of labeled nuclei. The percentage of positive nuclei found in each system was plotted against each other and the correlation index was calculated.

Figure 5: Concordance among the automated systems of image analysis. TMA reactions with anti-phospho Akt (A) and mTOR (B) were analyzed in two automated systems from different manufacturers for the number of labeled pixels. The percentage of positive pixels found in each system was plotted against each other and the correlation index was calculated.

Category	Observer 1	Observer 2
0	0 (0%)	0 (0%)
1	97 (47.78%)	98 (48.27%)
2	66 (32.51%)	59 (29.06%)
3	40 (19.70%)	46 (22.66%)
Correlation index	(kappa) = 0.905	

Table 1: TMA analysis by human observers. Each spot was given a grade according to the percentage of positively labeled cells with pAKT antibody. 0 (absolute lack of staining), 1 (1 to 25% of stained cells), 2 (26% to 50% of stained cells) to 3 (greater than 50% of stained cells). The percentage of samples in each category as accessed by observers 1 and 2 is indicated.

Category	Observer 1	Observer 2
0	0 (0%)	0 (0%)
1	97 (47.78%)	98 (48.27%)
2	66 (32.51%)	59 (29.06%)
3	40 (19.70%)	46 (22.66%)
Correlation index	(kappa) = 0.805	

Table 2: TMA analysis by human observers. Each spot was given a grade according to the percentage of positively labeled cells with pmTOR antibody. 0 (absolute lack of staining), 1 (1 to 25% of stained cells), 2 (26% to 50% of stained cells) to 3 (greater than 50% of stained cells). The percentage of samples in each category as accessed by observers 1 and 2 is indicated.

Method	Tissue	Kappa	Concordance Force
Aperio x Observer 1	Control	0.632	Great
Aperio x Observer 2		1.000	Excellent
ACIS III x Observer 1	Control	0.440	Moderate
ACIS III x Observer 2		0.759	Great
Aperio x Observer 1	Grade I	0.784	Great
Aperio x Observer 2		0.833	Excellent
ACIS III x Observer 1	Grade I	0.477	Moderate
ACIS III x Observer 2		0.410	Moderate
Aperio x Observer 1	Grade II	0.786	Great
Aperio x Observer 2		0.829	Excellent
ACIS III x Observer 1	Grade II	0.780	Great
ACIS III x Observer 2		0.824	Excellent
Aperio x Observer 1	Grade III	0.851	Excellent
Aperio x Observer 2		0.837	Excellent
ACIS III x Observer 1	Grade III	1.000	Excellent
ACIS III x Observer 2		0.696	Great
Aperio x Observer 1	Grade IV	0.753	Great
Aperio x Observer 2		0.815	Excellent
ACIS III x Observer 1	Grade IV	0.782	Great
ACIS III x Observer 2		0.829	Excellent

Table 3: Comparison between observers and digital imaging systems in the total expression of phosphorylated AKT. The results obtained by each digital system was compared to the two human observers and the kappa index and the concordance force were indicated.

Method	Tissue	Kappa	Concordance Force
Aperio x Observer 1	Control	1.000	Excellent
Aperio x Observer 2		1.000	Excellent
ACIS III x Observer 1	Control	0.744	Moderate
ACIS III x Observer 2		0.744	Moderate
Aperio x Observer 1	Grade I	0.805	Great
Aperio x Observer 2		0.908	Excellent
ACIS III x Observer 1	Grade I	0.524	Moderate
ACIS III x Observer 2		0.643	Great
Aperio x Observer 1	Grade II	0.829	Excellent
Aperio x Observer 2		0.872	Excellent
ACIS III x Observer 1	Grade II	0.683	Great
ACIS III x Observer 2		0.645	Great
Aperio x Observer 1	Grade III	0.708	Great
Aperio x Observer 2		0.571	Moderate
ACIS III x Observer 1	Grade III	0.553	Moderate
ACIS III x Observer 2		0.429	Moderate
Aperio x Observer 1	Grade IV	0.915	Excellent
Aperio x Observer 2		0.931	Excellent
ACIS III x Observer 1	Grade IV	0.777	Great
ACIS III x Observer 2		0.827	Excellent

Table 4: Comparison between human observers and digital imaging systems in the total expression of phosphorylated mTOR. The results obtained by each digital system were compared to the two human observers and the kappa indexes and the concordance force were indicated.

Method	Kappa	Concordance Force
Aperio x Observer 1	0.855	Excellent
Aperio x Observer 2	0.879	Excellent
ACIS III x Observer 1	0.765	Great
ACIS III x Observer 2	0.793	Great

Table 5: Comparison between two observers and digital imaging systems considering all grades and the two antibodies used. The results obtained by each digital system was compared to the two human observers and the kappa index and the concordance force were indicated.