

**DETERMINAÇÃO DAS PRINCIPAIS ALTERAÇÕES
PROTÉICAS ASSOCIADAS À PROGRESSÃO
DAS NEOPLASIAS GLIAIS DO SISTEMA
NERVOSO CENTRAL**

PEDRO HENRIQUE PIZZO

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

Área de concentração: Oncologia

**Orientadora: Dra Maria Dirlei Ferreira de Souza
Begnami**

São Paulo

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Pizzo, Pedro Henrique

Determinação das principais alterações protéicas associadas à progressão das neoplasias gliais do sistema nervoso central / Pedro Henrique Pizzo - São Paulo, 2013.

87p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientadora: Maria Dirlei Ferreira de Souza Begnami

Descritores: 1. NEOPLASIAS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL. 2. TUMORES DE CÉLULAS GLIAIS. 3. PROGRESSÃO DA DOENÇA. 4. IMUNOISTOQUÍMICA

DEDICATÓRIA

A minha esposa Daniela

Aos meus pais Pedro e Dora

AGRADECIMENTOS

Esta dissertação foi fruto de muito esforço e colaboração. Agradeço pela amizade e força de todos aqueles que me ajudaram.

Agradeço a minha esposa, Daniela, pela paciência e apoio em todos os momentos desse trabalho. Sem sua colaboração tudo seria mais difícil.

Agradeço aos meus pais, Pedro e Dora, pelos valores que me ensinaram ao longo da vida, muito úteis para a realização de todas as etapas do Mestrado.

Agradeço a todos os meus familiares pelo apoio e inspiração.

Agradeço a minha orientadora, Maria Dirlei Ferreira de Souza Begnami, por ter me dado esta oportunidade e confiança. Agradeço também toda a sua atenção e apoio mesmo nos momentos de dificuldades.

Agradeço ao diretor da pós-graduação Prof. Dr Fernando Augusto Soares pela oportunidade.

Agradeço a paciência e compreensão de todos os colegas do Laboratório Stecca de Patologia, especialmente ao Dr. Fausto pela ajuda com as congelações na minha ausência.

Agradeço aos colegas e professores do Departamento de Patologia da Faculdade de Patologia de Sorocaba pelo apoio.

Agradeço a todos os técnicos e auxiliares do departamento de Anatomia Patológica, que direta ou indiretamente me ajudaram nesse trabalho.

Agradeço ao Dr. Antônio Hugo José Froes Marques Campos pelas análises estatísticas.

Agradeço a minha colega patologista e de pós-graduação Mariana Petaccia de Macedo pela amizade e colaboração.

Agradeço a Suely por toda atenção, orientação e ajuda com a formatação e bibliografia.

Agradeço a toda a equipe da pós-graduação pela rapidez e qualidade no atendimento.

Agradeço a todos os funcionários da Biblioteca pela atenção e esclarecimentos nas várias etapas desse trabalho.

Agradeço à Fundação Antonio Prudente/ Hospital AC Camargo pela oportunidade de aprimoramento intelectual e científico.

RESUMO

Pizzo PH. **Determinação das principais alterações protéicas associadas à progressão das neoplasias gliais do sistema nervoso central.** São Paulo; 2013. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

INTRODUÇÃO: As neoplasias gliais são as neoplasias primárias mais comuns do SNC. O seu diagnóstico é baseado principalmente nos achados histopatológicos, porém estes dados são falhos na determinação de fatores prognósticos ou terapêuticos. Nos últimos anos, vários estudos demonstram que a expressão de p53, amplificação do EGFR e metilação do MGMT, são achados moleculares com implicações clínicas revelantes em alguns tipos de astrocitomas. **OBJETIVOS:** Neste estudo, avaliamos a expressão das proteínas p53, EGFR, p16, PTEN, ATM, Topoisomerase II alfa, MGMT, Nestina e WT1 através de imunoistoquímica em Astrocitomas de baixo e alto grau diagnosticados e tratados no Hospital A C Camargo no período de 1980 a 2005, correlacionamos com os subtipos histológicos e definimos o perfil de expressão das neoplasias gliais. **MÉTODOS:** A imunoistoquímica foi realizada em 2 blocos de *tissue microarray* (TMA), constituídos por 249 casos de tecido não neoplásico e de neoplasias gliais, utilizando o sistema de amplificação com o uso do polímero não biotinilado (NovoLink, Novocastra). A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico comum. Os dados das expressões imunoistoquímicas e histopatológicos foram analisados com o programa de computador MedCalc (versão 12.3.0.0, MedCalc Software bvba, Bélgica). **RESULTADOS:** As expressões de p53 (41,5% vs 17,5%), EGFR (29,7% vs 4,8%), ATM (35,7% vs 21,3%) , Topoisomerase II α (39,3% vs 5,6%), Nestina (80,4% vs 46,2%), WT1 (80,4% vs 20,4%) e Ki-67 foram mais frequentemente positivas nos Astrocitomas de alto grau em relação aos de baixo grau. **CONCLUSÕES:** O perfil de expressão imunoistoquímica dos Astrocitomas de alto grau é caracterizado pela positividade dos marcadores p53, Nestina, EGFR, WT-1, ATM, e Topoisomerase II α , e negatividade de MGMT, sendo a expressão de Nestina e WT1 mais frequentemente encontrada nos Glioblastomas.

SUMMARY

Pizzo PH. **[Determination of main protein alterations associated with progression of glial neoplasms of central nervous system]**. São Paulo; 2013. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

INTRODUCTION: The astrocytic neoplasms are the most common primary tumors of the CNS. The diagnosis is mainly based on histopathological findings, but these data are failure in determining therapeutic or prognostic factors. In recent years, many studies demonstrate that expression of p53, EGFR amplification and MGMT methylation, are molecular alterations found to be clinical implications in some types of gliomas. **OBJECTIVES:** This study evaluated the expression of p53, EGFR, p16, PTEN, ATM, Topoisomerase II α , MGMT, WT1 and nestin by immunohistochemistry in Astrocytomas of low and high degrees diagnosed and treated at Hospital AC Camargo from 1980 to 2005, correlated with histological subtypes and define the expression profile of astrocytic neoplasms. **Methods:** Immunohistochemistry was performed in two blocks of tissue microarray (TMA) consisting of 249 cases of non-neoplastic tissue and glial tumors using the non-biotinylated polymer (Novolink, Novocastra) amplification system. The specimens were examined in optical microscope. Data from histopathological and immunohistochemical expression were analyzed using the computer program MedCalc (version 12.3.0.0, MedCalc Software bvba, Belgium). **RESULTS:** Expression of p53 (41.5% vs. 17.5%), EGFR (29.7% vs 4.8%), ATM (35.7% vs 21.3%), Topoisomerase II α (39, 3% vs 5.6%), nestin (80.4% vs 46.2%), WT1 (80.4% vs 20.4%) and Ki-67 were more often positive in high-grade astrocytomas in relation to low grade. **CONCLUSIONS:** The immunohistochemical expression profile of high-grade astrocytomas are characterized by positivity of p53, nestin, EGFR, WT-1, ATM, and Topoisomerase II α , and negativity of MGMT, the expression of nestin and WT1 most frequently found in Glioblastomas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Gráfico da porcentagem de casos positivos para p53 de acordo com os graus histológicos da OMS.....	20
Figura 2	Expressão Imunoistoquímica de p53 em Neoplasias astrocitárias (Tamanho original 40x).....	21
Figura 3	Gráfico da porcentagem de casos de acordo com os escores de expressão do EGFR e os graus histológicos das neoplasias.....	23
Figura 4	Expressão de EGFR nas neoplasias astrocitárias (Tamanho original 40x).....	23
Figura 5	Gráfico da porcentagem de casos positivos para p16 em relação aos graus histológicos das neoplasias astrocitárias.....	24
Figura 6	Marcação de p16 nas neoplasias astrocitárias (Tamanho original 40x).....	25
Figura 7	Gráfico da porcentagem de casos positivos para WT1 em relação aos graus histológicos das neoplasias astrocitárias.....	26
Figura 8	Marcação de WT-1 nas neoplasias astrocitárias (Tamanho original 40x).....	27
Figura 9	Gráfico da porcentagem de casos positivos para ATM em relação aos graus histológicos pela OMS.....	28
Figura 10	Gráfico da porcentagem de casos positivos para Nestina em relação aos graus histológicos.....	30

Figura 11	Marcação de Nestina nas neoplasias astrocitárias (Tamanho original 40x).....	31
Figura 12	Gráfico referente à porcentagem de casos positivos para Topoisomerase II α em relação aos graus histológicos.....	32
Figura 13	Gráfico referente à porcentagem de casos positivos para MGMT em relação aos graus histológicos.....	34
Figura 14	Marcação de MGMT em neoplasias astrocitárias(Tamanho original 40x).....	34
Figura 15	Gráfico referente à porcentagem de casos positivos para PTEN em relação aos graus histológicos.....	36
Figura 16	Marcação de PTEN em relação às lesões astrocitárias (Tamanho original 40x).....	36
Figura 17	Gráfico referente à porcentagem de casos positivos para Ki-67 em relação aos graus histológicos.....	38
Figura 18	Gráfico referente à porcentagem de casos positivos para p53 em relação aos grau de agressividade das neoplasias astrocitárias.....	40
Figura 19	Gráfico referente à distribuição da expressão de EGFR em relação ao grau de agressividade das neoplasias astrocitárias.....	41
Figura 20	Gráfico referente à porcentagem de casos com expressão positiva para p16 ao grau de agressividade das neoplasias astrocitárias.....	43

Figura 21	Gráfico da porcentagem de casos com expressão positiva para WT-1 em relação ao grau de agressividade das neoplasias astrocitárias.....	44
Figura 22	Gráfico referente à porcentagem de casos com expressão positiva para ATM em relação ao grau de agressividade das neoplasias astrocitárias	46
Figura 23	Gráfico referente à porcentagem de casos com expressão positiva para Nestina em relação ao grau de agressividade das neoplasias astrocitárias.....	47
Figura 24	Gráfico referente à porcentagem de casos com expressão positiva para Topoisomerase II α em relação ao grau de agressividade das neoplasias astrocitárias.....	49
Figura 25	Gráfico referente à porcentagem de casos com expressão positiva para p53 em relação ao grau de agressividade das neoplasias astrocitárias.....	50
Figura 26	Gráfico referente à porcentagem de casos com expressão positiva para PTEN em relação ao grau de agressividade das neoplasias astrocitárias.....	52
Figura 27	Gráfico referente à porcentagem de casos com expressão positiva para Ki-67 em relação ao grau de agressividade das neoplasias astrocitárias.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Número de casos referentes aos tipos histológicos da amostra estudada.....	18
Tabela 2	Número de casos referentes aos graus histológicos da OMS.....	18
Tabela 3	Número de casos referentes ao grau de agressividade da amostra estudada.....	19
Tabela 4	Expressão de p53 de acordo com os graus histológicos das neoplasias astrocitárias da OMS.....	20
Tabela 5	Escore de expressão de EGFR de acordo com os graus histológicos das neoplasias astrocitárias da OMS.....	22
Tabela 6	Frequência de expressão de p16 entre os Graus histológicos das neoplasias astrocitárias pela OMS.....	24
Tabela 7	Frequência de expressão de WT1 entre os Graus histológicos das neoplasias astrocitárias pela OMS.....	26
Tabela 8	Frequência de expressão de ATM entre os Graus histológicos das neoplasias astrocitárias pela OMS.....	28
Tabela 9	Frequência de expressão de Nestina entre os Graus histológicos das neoplasias astrocitárias pela OMS.....	29
Tabela 10	Frequência de expressão de Topoisomerase II α entre os Graus histológicos das neoplasias astrocitárias pela OMS.....	32

Tabela 11	Frequência de expressão de MGMT entre os Graus histológicos das neoplasias astrocitárias pela OMS.....	33
Tabela 12	Frequência de expressão de PTEN entre os Graus histológicos das neoplasias astrocitárias pela OMS.....	35
Tabela 13	Frequência de expressão de Ki-67 entre os Graus histológicos das neoplasias astrocitárias pela OMS.....	38
Tabela 14	Correlação entre a expressão de p53 e o grau de agressividade das neoplasias astrocitárias	39
Tabela 15	Correlação entre o padrão de expressão de EGFR e o grau de agressividade das neoplasias astrocitárias.....	41
Tabela 16	Correlação entre a expressão de p16 e o grau de agressividade das neoplasias astrocitárias	42
Tabela 17	Correlação entre a expressão de WT-1 e o grau de agressividade das neoplasias astrocitárias.....	44
Tabela 18	Correlação entre a expressão de ATM e o grau de agressividade das neoplasias astrocitárias.....	45
Tabela 19	Correlação entre a expressão de Nestina e o grau de agressividade das neoplasias astrocitárias.....	47
Tabela 20	Correlação entre a expressão de Topoisomerase e o grau de agressividade das neoplasias astrocitárias.....	48
Tabela 21	Correlação entre a expressão de MGMT e o grau de agressividade das neoplasias astrocitárias.....	50

Tabela 22	Correlação entre a expressão de PTEN e o grau de agressividade das neoplasias astrocitárias.....	51
Tabela 23	Correlação entre a expressão de Ki-67 e o grau de agressividade das neoplasias astrocitárias	53
Tabela 24	Correlação entre a expressão de cada proteína estudada nas neoplasias astrocitárias.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS

ATM	Ataxia telangiectasia mutated
DBA	Diamino benzidine Tetrahydrochloride
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGFR	Epidermal growth factor receptor
GBM	Glioblastoma multiforme
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
HE	Hematoxilina e eosina
MGMT	O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase
MTOR	Mammalian target of rapamycin
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Phosphatase Buffered Saline
PI3K	Phosphatidylinositide 3-kinases
PDGF	Platelet-derived growth factor
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
SNC	Sistema Nervoso Central
TA	Temperatura ambiente
TMA	Tissue microarray
WT1	Wilms Tumour gene

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Alterações Moleculares Associadas aos Tumores do Sistema Nervoso Central.....	6
2	JUSTIFICATIVA.....	10
3	OBJETIVOS.....	11
4	MATERIAIS E MÉTODOS	12
4.1	Casuística	12
4.1.1	CrITÉRIOS de Inclusão	13
4.1.2	CrITÉRIOS de Exclusão	13
4.2	Imunoistoquímica.....	13
4.3	Análise dos Marcadores Imunoistoquímicos	15
4.4	Análises Estatísticas	16
5	RESULTADOS.....	17
5.1	Casuística e dados da Amostra.....	17
5.1.1	Dados morfológicos	17
5.2	Expressão dos Marcadores de Imunoistoquímica.....	19
5.2.1	p53.....	19
5.2.2	EGFR	21
5.2.3	p16.....	23
5.2.4	WT-1	25
5.2.5	ATM.....	27
5.2.6	Nestina	29
5.2.7	Topoisomerase Iialfa.....	31
5.2.8	MGMT	33
5.2.9	PTEN.....	35
5.2.10	Ki-67	37

5.3	Relação entre as Expressões dos Marcadores de Imunoistoquímica e o Grau de Agressividade das Neoplasias Astrocitárias.....	39
5.3.1	p53.....	39
5.3.2	EGFR	40
5.3.3	p16.....	42
5.3.4	WT-1	43
5.3.5	ATM.....	45
5.3.6	Nestina	46
5.3.7	Topoisomerase II α	48
5.3.8	MGMT	49
5.3.9	PTEN.....	51
5.3.10	Ki-67	52
5.4	Correlações entre os Marcadores de Imunoistoquímica nas Neoplasias Astrocitárias	54
6	DISCUSSÃO.....	56
6.1	p53.....	57
6.2	EGFR	59
6.3	p16.....	60
6.4	MGMT	62
6.5	WT-1	65
6.6	Ki-67	67
6.7	Nestina	70
6.8	Topoisomerase II α	72
6.9	PTEN.....	73
6.10	ATM.....	75
7	CONCLUSÕES.....	77
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

1 INTRODUÇÃO

Os gliomas constituem um grupo heterogêneo de neoplasias primárias do Sistema Nervoso Central (SNC). São tumores neuroectodérmicos originados em células da glia, incluindo os astrócitos e oligodendrócitos.

Os Astrocitomas compreendem um grande número de neoplasias que diferem entre si quanto à localização, idade e sexo prevalentes, potencial de crescimento, características morfológicas e curso clínico. Os tipos histológicos mais comuns na população são os Astrocitomas pilocíticos, Astrocitomas Difusos, Astrocitomas Anaplásicos e Glioblastomas multiformes (LOUIS et al. 2007). Há também os tumores raros que são os Astrocitomas Subependimários de células gigantes, Xantoastrocitomas Pleomórficos e Gliossarcomas.

As neoplasias do SNC são histologicamente classificadas em baixo e alto graus de acordo com a Classificação da Organização Mundial da Saúde-OMS. Os gliomas de baixo grau compreendem os Graus I e II, apresentam crescimento lento, e menor agressividade. Dependendo da extensão da ressecção da neoplasia, total ou parcial, podem apresentar altas taxas de sobrevida, 7 a 10 anos no Grau II e até 20 anos no Grau I. Os graus III e IV ficam reservados para as neoplasias de alto grau, que apresentam rápido crescimento e são extremamente agressivos. Como regra geral, sempre voltam a crescer, mesmo após a excisão cirúrgica completa. A sobrevida global varia entre 2-3 anos nos Gliomas grau III e é cerca de 1 ano nos Gliomas grau IV (LOUIS et al. 2007).

O Astrocitoma Pilocítico é uma neoplasia de evolução lenta e comportamento benigno na grande maioria dos casos. São mais comuns em crianças, sem predileção por sexo. A maioria acomete o cerebelo, mas podem ser encontrado em outros sítios como nervo óptico e hemisférios cerebrais (TIBBETTS et al. 2009). A etiologia desses tumores não é muito bem esclarecida, entretanto fatores genéticos influenciam na susceptibilidade, como os casos ligados a Neurofibromatose tipo 1, onde aproximadamente 15% desenvolvem Astrocitoma Pilocítico (LEWIS et al. 1984). A sintomatologia é variável de acordo com a localização, como cefaléia, aumento da pressão intracraniana em tumores do córtex cerebral e perda visual nos que acometem o nervo óptico (LOUIS et al. 2007). Histologicamente são neoplasias bem diferenciadas e com baixa celularidade. Geralmente, coexistem dois padrões histológicos básicos, podendo um prevalecer sobre o outro. O padrão pilocítico é caracterizado pela presença de células com longos e finos prolongamentos que se dispõem em feixes, como uma cabeleira. Não raro são observadas estruturas hialinas, chamadas fibras de Rosenthal, que lembram pequenas cenouras, entre os prolongamentos celulares (TIBBETTS et al. 2009). O padrão protoplasmático é caracterizado pela presença de microcistos situados entre as células neoplásicas (degeneração microcística). Na imunoistoquímica, são GFAP positivos com baixo índice de proliferação pelo Ki-67 (LOUIS et al. 2007). O tratamento de escolha é controverso. Alguns autores afirmam que a total excisão cirúrgica é suficiente para a cura do paciente, sendo o papel da radiação questionada em relação às recidivas ou progressão tumoral (PARSA e GIVRAD 2008; QADDOUMI et al. 2009; ISHKANIAN et al. 2011).

O Astrocitoma difuso é uma neoplasia grau II OMS e já exibe certa tendência para progredir para graus elevados de malignidade. Representam 10-15% dos astrocitomas cerebrais sendo mais comumente encontrado entre 20-45 anos, com um pico de incidência perto do 30 anos. Os sintomas incluem cefaléias, tonturas, alterações do olfato e visão, além de alterações motoras (LOUIS et al. 2007). A etiologia não está muito bem relatada, entretanto fatores genéticos como as mutações do TP53 podem interferir na evolução dessa neoplasia. As neoplasias que exibem mutação desse gene tendem a evoluir mais rapidamente para formas mais malignas (YUE et al. 2009; OHGAKI et al 1993). Macroscopicamente situam-se na substância branca de um dos hemisférios cerebrais. São mal delimitados, mesclando-se imperceptivelmente com o tecido nervoso ao redor. Nunca são encapsulados. A consistência é semelhante com o tecido nervoso normal. Histologicamente são constituídos por células que lembram astrócitos normais. Os astrócitos podem ser fibrilares, quando produzem muitas fibrilas gliais, geralmente com poucas atipias, e podem até confundir-se com uma área de gliose. As células têm prolongamentos filamentosos, e o espaço entre as células é preenchido por uma trama fibrilar. Já os protoplasmáticos produzem poucas fibrilas gliais. Têm maior celularidade que os fibrilares e os prolongamentos celulares são curtos. Não raro apresentam pequenos cistos contendo material amorfo basófilo entre as células. Há ainda os Astrocitomas gemistocíticos, que marcados pela presença de células que lembram os astrócitos gemistocíticos reacionais. Contudo, há perda da relação núcleo-citoplasma, atipias nucleares e multinucleação. Estes vários padrões podem ocorrer em diferentes áreas do mesmo tumor. Não se observam figuras de mitoses atípicas ou necrose (LOUIS et al. 2007). O prognóstico varia muito nesses tumores. Em pacientes mais jovens, a

ressecção total dos tumores é fator principal associado à não progressão da neoplasia (PERAUD et al. 1998). Outro fato já citado que influencia a progressão tumoral é a mutação no gene TP53, cuja associação com o tumor acelera a progressão para as formas mais agressivas (YUE et al. 2009). Imunoistoquimicamente, o índice Ki-67 maior que 7,5% tem sido relacionado ao pior prognóstico destas neoplasias (PERAUD et al. 1998).

Os Astrocitomas Anaplásicos são neoplasias grau III da OMS com grande potencial maligno. Eles podem originar da evolução de um Astrocitoma difuso, mas também podem ser primários. A média de idade de apresentação clínica é de 41 anos, tendo um pico de incidência de 30-40 anos. Sua localização mais comum é nos hemisférios cerebrais. Macroscopicamente não é possível diferenciar um Astrocitoma difuso de um Anaplásico, entretanto observam-se certas áreas mais firmes ou granulosas e opacas. Microscopicamente, apresentam como principais características aumento acentuado da celularidade, atipias nucleares e atividade mitótica. Proliferação vascular e necrose estão ausentes (LOUIS et al. 2007). Diferentemente dos Astrocitomas difusos, o índice de Ki-67 mais elevado é esperado, no entanto valores mais baixos podem confundir com Astrocitomas Grau II e valores mais altos com Glioblastoma (KARAMITOPOLOU et al 1994). Estudos moleculares classificam estes tumores como um estágio intermediário na progressão de um Astrocitoma difuso para um Glioblastoma. Mais de 90% dos casos exibem mutações do TP53. Outras mutações, geralmente ligadas a genes ligados a regulação do ciclo celular incluem deleção do gene p16^{INK4a}, alterações do gene RB e mutações do PTEN (USHIO et al. 2003).

O Glioblastoma Multiforme (GBM) é a neoplasia maligna primária do sistema nervoso cerebral mais frequente. É comum em pacientes adultos com localização preferencial nos hemisférios cerebrais. Podendo acometer pacientes de todas as faixas etárias, sendo mais frequente em indivíduos da quarta a sétima décadas de vida. Observa-se um discreto predomínio do sexo masculino, 1,5: 1, sendo também mais comum na raça branca. A sobrevida dos pacientes é muito pobre, sendo em média de 9 a 12 meses (LOUIS et al. 2007). A maioria dos Glioblastomas (90%) apresenta crescimento rápido com sinais e sintomas de curta duração (usualmente menor que três meses). Os principais sintomas estão associados ao aumento de pressão intracraniana, como cefaléia, náuseas e vômitos e papiledema. Aproximadamente, 1/3 dos pacientes apresentam epilepsia e alterações de comportamento (LOUIS et al. 2007). Os glioblastomas podem ser divididos em primários ou *de novo* ou secundários (OHGAKI e KLEIHUES 2007). Os primários são os mais frequentes e não mostram evidência clínica ou histopatológica de lesão precursora de baixo grau pré-existente. Estes, tipicamente acometem pacientes mais velhos (média de 62 anos) e frequentemente mostram alterações no gene EGFR, com amplificações presentes em torno de 40% dos casos. Perdas de gene p16^{INK4a} estão presentes em 31% dos casos e mutações de PTEN estão presentes em 25% destes tumores (OHGAKI e KLEIHUES 2007). Já os secundários originam-se da progressão de gliomas de baixo grau, ou seja, gliomas graus I e II que se transformam com o tempo em gliomas de alto grau (OHGAKI et al. 1999). Eles acometem principalmente pacientes jovens e são menos frequentes (menos que 10% de todos os GBMs). Histologicamente, são neoplasias heterogêneas compostas por células com acentuado pleomorfismo celular e elevada atividade mitótica.

Proliferação endotelial é proeminente e há frequentes áreas de necrose. Células gigantes ou fusiformes podem estar presentes, bem como focos de oligodendrogliomas. Marcação imunoistoquímica para GFAP pode ser detectada nas células neoplásicas, sendo incomum nos GBM de pequenas células (KAINA et al. 2007).

1.1 ALTERAÇÕES MOLECULARES ASSOCIADAS AOS TUMORES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

As principais alterações genéticas e moleculares descritas nos astrocitomas revelam considerável variabilidade entre os tumores do mesmo tipo e grau histológico. Esta heterogeneidade pode justificar as limitações encontradas em estabelecer fatores preditivos baseados somente nas características histopatológicas dos gliomas. Portanto, uma classificação baseada nas principais alterações moleculares pode apresentar mais acurácia no diagnóstico e predizer resposta à terapia nas neoplasias gliais (FULLER e PERRY 2005; RUIZ e LESSER 2009).

Semelhante a outros tumores malignos, os astrocitomas se proliferam rapidamente. Este fenótipo de alta proliferação está associado principalmente às alterações e perdas de função dos genes relacionados ao controle do ciclo celular como as ciclinas, p53, p27 e p16. Mutações do gene p53 e perdas de expressão do p16 tem sido frequentemente encontradas nos gliomas de alto grau (Astrocitomas grau III e Glioblastomas) (GLADSON et al. 2010).

Outra característica frequentemente observada nos gliomas é o fenótipo invasivo. Este fenótipo tem sido associado às alterações dos receptores dos fatores de

crescimento celular como c-met, EGFR e PDGFR. Aumento de expressão destes marcadores tem sido associado ao maior potencial maligno dos astrocitomas (ARGYRIOU e KALOFONOS 2009).

Outra via molecular que tem sido associada à tumorigênese dos astrocitomas é a via do PI3K/ Akt/ mTOR. Esta via está alterada em vários tipos de neoplasias e está relacionada ao controle de outras vias moleculares importantes como ciclo celular, apoptose e proliferação. Aumento da expressão de mTOR tem sido encontrado principalmente em glioblastomas e este gene tem sido apontado como potencial alvo terapêutico destes tumores. O gene PTEN, localizado no cromossomo 10, é um dos principais genes que regulam a ativação da via do PI3K/ Akt/ mTOR. Estudos recentes têm demonstrado inativação deste gene em cerca de 40% dos Astrocitomas de alto grau, sendo incomum nos de baixo grau (GRZMIL e HEMMINGGS 2010).

Gene do Tumor de Wilms (WT1) está superexpresso em vários tumores sólidos e hematológicos e tem sido considerado como potencial alvo terapêutico e marcador de doença residual em pacientes com leucemia. Estudos anteriores mostram que as células neoplásicas das neoplasias astrocitárias de alto grau frequentemente expressam a proteína WT1, sendo esta expressão incomum nas neoplasias de baixo grau, sugerindo o uso deste marcador como potencial marcador diagnóstico e prognóstico destas neoplasias (RUSHING et al 2010).

Assim como o WT-1, alguns estudos suportam o papel da Nestina na tumorigênese ou na progressão tumoral, apresentando aumento da imunoreatividade nos Astrocitomas de alto grau comparados com os de baixo grau (RUSHING et al 2010).

Algumas vezes, especialmente em amostras pequenas, obtidas por esterotaxia, o diagnóstico baseado apenas nas alterações morfológicas torna-se difícil. Assim para melhorar a acurácia, alguns marcadores que estimam a proliferação tumoral têm sido empregados. Trabalhos recentes sugerem que o uso do Ki-67 poder ser útil da distinção entre Astrocitomas grau 2 e grau 3 (HSU et al 1997). Por outro lado, na última classificação da Organização mundial da saúde, ele não foi incluído, por conta da variedade de índices utilizados nos diferentes estudos e falta de consenso (LOUIS et al. 2007).

A preservação da integridade genômica é um processo essencial para preservar a homeostase celular. Algumas proteínas estão relacionadas ao reparo do DNA, elas são ativadas após algum dano, e tentam interromper o ciclo celular. O ATM é um desses genes, e tem sido descrito em diversos tipos de neoplasias (BARTKOVA et al. 2005). A perda de pelo menos uma cópia de ATM foi observada em glioblastomas (SQUATRITO et al. 2010).

A Topoisomerase II α é uma enzima que regula a topologia do DNA, sendo expressa durante as fases S-G2-M do ciclo celular. A sua alta expressão está relacionada a progressão tumoral nas neoplasia astrocitárias (FARIA et al. 2006; HABBERSTAD et al. 2011). Outros estudos inferem que a sua expressão pode fornecer informações importantes quanto ao prognóstico das neoplasias astrocitárias (BREDEL et al. 2002).

Agentes alquilantes, como a Temozolomida, têm sido largamente utilizados no tratamento de Astrocitomas de alto grau. Nesses casos o status de MGMT tem importância, uma vez que a metilação do seu promotor diminui a sua atividade e aumenta a resposta ao tratamento quimioterápico. Estudos moleculares, assim como

estudos da expressão proteica através da imunoistoquímica podem determinar o status de MGMT (CHRISTMANN et al. 2010; BALAÑA et al. 2011).

2 JUSTIFICATIVA

Os Astrocitomas são as neoplasias primárias mais comuns do SNC. Embora tenhamos observado avanços nas técnicas diagnósticas e de tratamento como nos exames de imagem e técnicas neurocirúrgicas; avanço significativo na descoberta de fatores prognósticos e de sobrevida não tem um desafio para os pesquisadores. Existem casos de astrocitomas que apresentam comportamento mais agressivo que outros do mesmo grau histológico, sugerindo a existência de uma heterogeneidade biológica.

Sabemos que várias alterações moleculares como ativação dos oncogenes e inativação dos genes supressores tumorais estão associadas à tumorigênese glial. Estudos anteriores trazem evidências que a progressão de um Astrocitoma de baixo grau para um de alto grau está associada a alterações genéticas que podem ser avaliadas através da imunoistoquímica no nível celular. O exemplo mais clássico é o do TP53, o qual está relacionado a menores taxas de sobrevida em Astrocitomas difusos.

Portanto a determinação do perfil de expressão proteica em associação com os achados histopatológicos em gliomas de baixo e alto grau, pode contribuir para o diagnóstico mais preciso e possível seleção terapêutica dos pacientes.

3 OBJETIVOS

Os principais objetivos deste estudo são:

- Estudar a expressão protéica de p53, EGFR, p16, PTEN, ATM, Topoisomerase 2 α , MGMT, Nestina, WT1 e Ki-67 nos tecido cerebral não neoplásico, astrocitomas de baixo e alto graus diagnosticados e tratados no Hospital A.C. Camargo
- Correlacionar os achados de imunoistoquímica com o grau histológico dos Astrocitomas;
- Selecionar os marcadores que possam estar associados a progressão tumoral.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA

Neste estudo utilizamos 2 blocos de *tissuemicroarray* (TMA) já confeccionados e disponíveis no Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo. Um dos blocos de TMA (TMA A) é constituído por 170 casos, sendo 30 tecido cerebral não neoplásico, 40 Astrocitomas pilocíticos (Grau I), 52 Astrocitomas difusos (Grau II), 18 Astrocitomas anaplásicos (Grau III), 10 Glioblastomas (Grau IV), 7 Astrocitomas gemistocíticos e 13 Oligodendrogliomas. O outro bloco de TMA (TMA B) é constituído exclusivamente por 86 Glioblastomas. Ambos os blocos de TMA foram confeccionados com cilindros de 1 mm de diâmetro de duas áreas representativas dos tumores ou tecido neural não neoplásico.

Sistema de coordenadas, a partir de tabelas em Excel, foi utilizado para a determinação e identificação exata dos casos no TMA, tendo como referência o cilindro de tecido hepático ou placenta.

Previamente à construção dos TMAs, as lâminas contendo os cortes histológicos dos tumores e das áreas não neoplásicas foram coradas pela coloração de hematoxilina e eosina (HE) e classificadas utilizando os critérios histopatológicos estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para a classificação das neoplasias do Sistema Nervoso Central e graduadas em Astrocitomas graus I, II, III e IV (LOUIS et al. 2007).

4.1.1 Critérios de Inclusão

Os critérios de inclusão são: casos de neoplasias Gliais de baixo e alto graus diagnosticados e tratados no Hospital A.C. Camargo sem tratamento prévio.

4.1.2 Critérios de Exclusão

Serão excluídos os casos com material insuficiente para as análises.

4.2 IMUNOISTOQUÍMICA

A partir dos blocos de TMA foram preparados cortes histológicos seriados em lâminas de vidro carregadas eletricamente, utilizadas para reação imunoistoquímica para avaliação da expressão protéica de p53, EGFR, p16, PTEN, ATM, Topoisomerase 2 α , MGMT, Nestina, WT1 e Ki-67.

Para as reações imunoistoquímicas, utilizamos o sistema de amplificação com o uso do polímero não biotinilado (NovoLink, Novocastra). Os passos técnicos que foram utilizados são os descritos na literatura.

O protocolo está descrito passo a passo:

1. Desparafinização dos cortes histológicos com 3 μ m de espessura, dos materiais incluídos em parafina e colocados em lâminas carregadas eletricamente, e deixadas em estufa a 60° C por 24 horas.
2. Incubação em xilol a temperatura ambiente (Ta) por 5 minutos cada, quatro passagens em etanol (100%, 95%, 70%) por 5 minutos cada e lavagem em água corrente por 5 minutos;
3. Recuperação antigênica por calor em solução Citrato pH 6,0 à 125° C (30 segundos após atingir 125°C e pressão entre 20 e 25 psi) na panela de pressão

ou 2 tempos de 9 minutos no forno microondas, ou em EDTA pH 8,0 à 95° C por 40 minutos;

4. Lavagem das lâminas em água corrente e destilada por 5 minutos;
5. Bloqueio da peroxidase endógena com água a 3% (água oxigenada 10 volumes) por 5 minutos;
6. Lavagem das lâminas em PBS/Tween por 5 minutos;
7. Bloqueio das proteínas inespecíficas (ProteinBlock-serumfree, DAKO) por 20 minutos;
8. Incubação com o anticorpo primário, anti-p53 (30CC1/32AB) (Ventana - cloneDO-7), anti-EGFR (30CC1/32AB) (clone 3C6), anti-ATM (diluição 1:200) (Epitomics - clone Y170), anti-Nestina (diluição 1:400) (ABCAM – clone 10C2), anti-Topoisomerase (diluição 1:800) (Dako – clone SWT3D1), anti-MGMT (diluição 1:50) (Santa Cruz – clone SPM 287), anti-PTEN (diluição 1:500) (Cascade – clone 6H2.1), anti-Ki-67 (60CC1/16AB) (Ventana – clone 30-9) por 2 horas em temperatura ambiente (Ta), em câmara úmida;
9. Lavagem em tampão PBS/Tween por 5 minutos (3 repetições);
10. Incubação com anticorpo secundário não-biotinilado (Advance HRP Link – DAKO) por 30 minutos (Ta);
11. Lavagem em tampão PBS/Tween por 5 minutos sob as mesmas condições citadas no passo 9;
12. Incubação com polímero (Advance HRP Enzyme – DAKO) por 30 minutos;
13. Lavagem das lâminas em PBS/Tween por 5 minutos;
14. Revelação das reações com solução substrato cromógeno 3,3 Diamino benzidine Tetrahydrochloride (DAB) por 5 minutos, 37° C, ao abrigo de luz

(Kit Liquid DAB + Substrate Chromogen System, DAKO Cytomation, Carpinteria, Califórnia);

15. Lavagem das amostras em água corrente e destilada por 5 minutos;
16. Contra coloração com Hematoxilina de Harris por 2 minutos;
17. Lavagem em água corrente e destilada por 5 minutos;
18. Desidratação das lâminas - 6 passagens em etanol a 50%, 80%, 95% e 100%, sendo três delas em 100%;
19. Montagem das lâminas em Entellanneu (Merck, Germany).
As reações foram acompanhadas de controles positivos, em tecidos

sabidamente positivos para o anticorpo testado, e controles negativos. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico, sendo os casos classificados de acordo com um escore de positividade previamente descrito para cada marcador.

4.3 ANÁLISE DOS MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS

Foi utilizado um cut-off de 5%, sendo considerados negativos todos os casos sem imunoreatividade, ou marcação em menos de 5% das células nos seguintes marcadores: p53, p16, PTEN, MGMT, ATM, Topoisomerase 2alfa e WT-1. Para o Ki-67, utilizamos um escore baseado na porcentagem de células positivas, sendo escore 0= ausência de marcação, 1= positividade em menos de 10% das células neoplásicas, 2=positividade entre 10 a 25% das células neoplásicas, 3= positividade entre 25 a 50% das células neoplásicas, 4= positividade entre 50 a 75% das células neoplásicas e 5= positividade em mais de 75% das células neoplásicas). O escore utilizado para o EGFR foi o utilizado para a avaliação do HER2, sendo escore 0= marcação ausente, escore 1= marcação fraca e incompleta de membrana em qualquer

proporção de células neoplásicas/ ou coloração fraca e completa em menos de 10% das células, escore 2= Coloração completa de membrana que não é uniforme / ou coloração fraca, mas com óbvia distribuição circunferencial, em no mínimo em 10% das células / ou intensa e completa coloração de membrana em 30% ou menos das células neoplásicas invasivas, escore 3= coloração forte em toda a membrana em mais de 30% das células. Para a Nestina duas variáveis foram levadas em consideração. A porcentagem de células positivas (0= negativo, 1= < 30%, 2= 30-60%, 3= > 60%) e a intensidade da marcação citoplasmática (0= sem marcação, 1= fraca, 2= moderada, 3= forte). O escore final é a multiplicação das duas variáveis. Os escores entre 0-2 foram considerados negativos, enquanto que os escores 3-9 foram considerados positivos.

4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados das expressões imunoistoquímicas e histopatológicos foram armazenadas em um banco de dados informatizado (Excel®, versão 2003, Microsoft) e posteriormente analisados com o programa de computador MedCalc (versão 12.3.0.0, MedCalc Software bvba, Bélgica). Para a caracterização da população do estudo, utilizamos a estatística descritiva, empregando-se porcentagens, médias e medianas. Para a análise das variáveis categóricas utilizamos o teste de qui-quadrado ou teste exato de Fisher, dependendo dos valores esperados nas tabelas de contingência.

5 RESULTADOS

5.1 CASUÍSTICA E DADOS DA AMOSTRA

5.1.1 Dados morfológicos

Para este estudo foi utilizado um TMA, previamente construído e utilizado em outros estudos nesta Instituição, composto por 256 casos, representados por 30 amostras de tecido cerebral normal ou reacional, e por 226 amostras de neoplasias gliais. Todos os casos de Oligodendrogliomas não foram utilizados na nossa casuística.

Dos 256 casos disponíveis, 5 foram descartados, por se tratarem de material insuficiente, não sendo possível a avaliação de nenhum marcador imunoistoquímico. O número total de casos estudado para cada marcador foi variável, devido ao desgaste dos blocos de TMA. O marcador com maior número de casos estudados foi o PTEN com 251 casos. Já o Ki-67, último marcador a ser estudado apresentou apenas 236 casos na sua casuística.

Os tipos histológicos das neoplasias gliais estudadas podem ser vistos na Tabela 1. O tipo histológico mais frequente foi o Glioblastoma multiforme 96 (38,2%), seguido dos Astrocitomas difusos 49 (19,5%), enquanto que os Astrocitomas anaplásicos corresponderam a apenas 17 casos (6,8%). Os tipos histológicos foram agrupados em categorias de diagnóstico, conforme os graus preconizados pela classificação da OMS, sendo os gliomas grau I constituídos pelos Astrocitomas pilocíticos, gliomas grau II constituídos pelos Astrocitomas difusos e

gemistocíticos, gliomas grau III constituídos pelos Astrocitomas anaplásicos e os gliomas grau IV constituídos pelos Glioblastomas. A tabela 2 mostra o número de casos e a porcentagem de cada subtipo de acordo com o grau da OMS. Os casos foram também agrupados em neoplasias de baixo e alto grau de acordo com o potencial de agressividade das lesões. Sendo os Astrocitomas grau I e II classificados como Astrocitomas de baixo grau e os graus III e IV agrupados como Astrocitomas de alto grau. Estes dados estão expostos na Tabela 3. Os de alto grau corresponderam a 47,5% dos casos e os de baixo grau a 39,9%. Os casos de gliose reacional e tecido não neoplásico corresponderam a 12,6% da amostra.

Tabela 1 - Número de casos referentes aos tipos histológicos da amostra estudada

Variáveis	Número de casos	Porcentagem
Normal	14	5,9
Gliose	16	6,7
Astrocitoma Pilocítico	39	16,4
Astrocitoma Difuso	49	20,6
Astrocitoma Anaplásico	17	7,2
Glioblastoma Multiforme	96	40,3
Astrocitoma Gemistocítico	7	2,9

Tabela 2 - Número de casos referentes aos graus histológicos da OMS

Variáveis	Números de casos	Porcentagem
Normal e gliose	30	12,6
Gliomas grau I	39	16,4
Gliomas Grau II	56	23,5
Gliomas Grau III	17	7,2
Gliomas grau IV	96	40,3

Tabela 3 - Número de casos referentes ao grau de agressividade da amostra estudada

Variáveis	Número de casos	Porcentagem
Normal e Gliose	30	12,6
Gliomas de baixo grau	95	39,9
Gliomas de alto grau	113	47,5

5.2 EXPRESSÃO DOS MARCADORES DE IMUNOISTOQUÍMICA

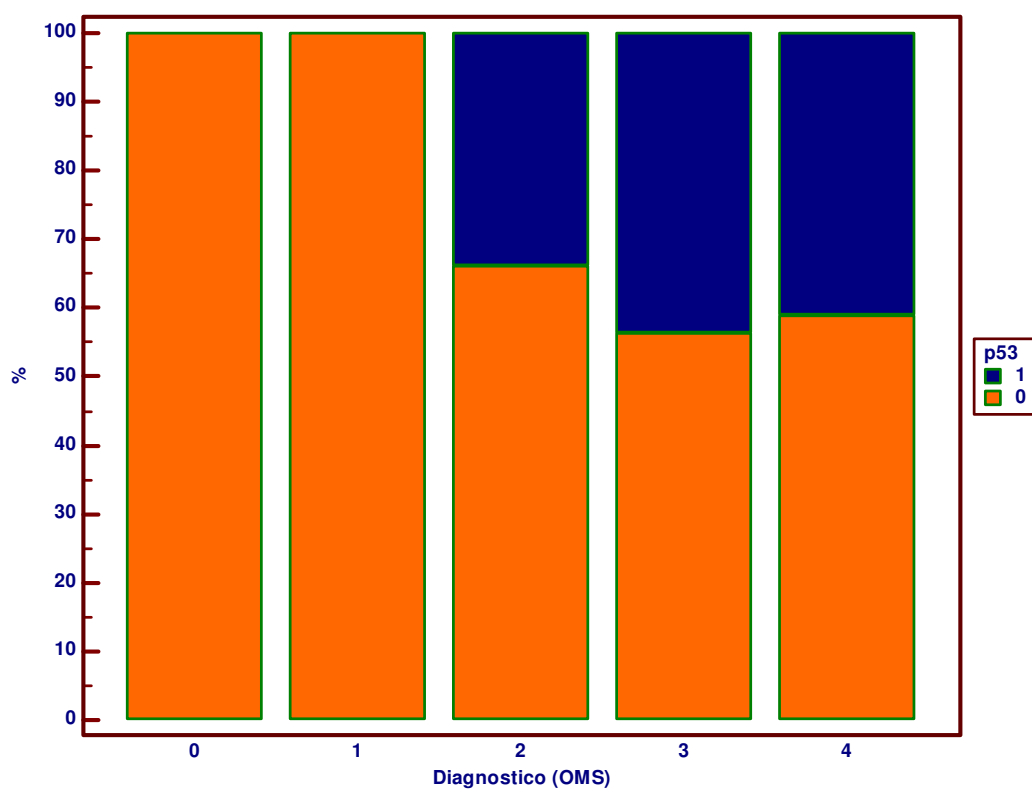
5.2.1 p53

Do total de 232 casos estudados, positividade para p53 foi observada em 64 (27,6%) e 168 (72,4%) foram negativos para este marcador. A expressão da proteína p53 esteve ausente em todos os tecidos cerebrais normais ou com gliose. Observamos o aumento da frequência da expressão de p53 conforme o grau das neoplasias, sendo 41,1% dos Glioblastomas multiformes positivos para este marcador (Figura 2). Essas informações são encontradas na Tabela 4 e Figura 1.

A diferença na porcentagem de casos positivos para p53 nos diferentes subtipos histológicos das neoplasias astrocitárias foi estatisticamente significativa ($p=0.001$).

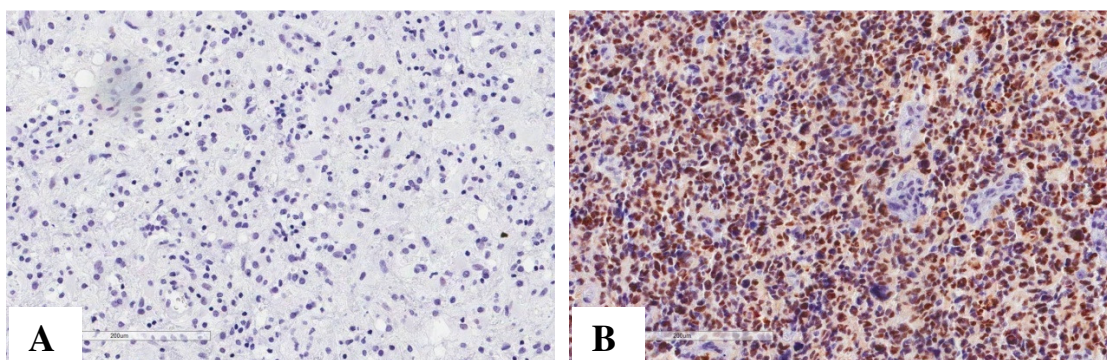
Tabela 4 - Expressão de p53 de acordo com os graus histológicos das neoplasias astrocitárias da OMS.

p53	Grau histológico OMS					Total	Valor de <i>p</i>
	0	1	2	3	4		
Negativo	30 (100%)	38 (100%)	35 (66%)	9 (56,2%)	56 (58,9%)	168 (72,4%)	<0.001
Positivo	0	0	18 (34%)	7 (43,8%)	39 (41,1%)	64 (27,6%)	
Total	30 (100%)	38 (100%)	53 (100%)	16 (100%)	95 (100%)	232 (100%)	



Legenda: 0=negativo; 1=positivo

Figura 1 - Gráfico referente à porcentagem de casos positivos para p53 de acordo com os graus histológicos da OMS.



Legenda: Ausência de marcação em Astrocitoma difuso (A); Glioblastoma positivo para p53 (B).

Figura 2 - Expressão Imunoistoquímica de p53 em Neoplasias astrocitárias.

5.2.2 EGFR

De acordo com o escore de interpretação do EGFR observamos que 168 (72,1%) casos foram escore 0, 15 (6,3%) casos foram classificados como escore 1, 13 (5,5%) casos como escore 2, e 37 (15,8%) casos como escore 3. Todos os casos normais, gliose e astrocitomas grau I foram classificados como escore 0. Dos 15 casos classificados como escore 1, 13 (73,3%) deles eram gliomas grau 2. Do total de casos com escore 3, 31 casos eram Glioblastomas Multiformes (Figura 4). Estas diferenças de número de casos com expressão de EGFR nos diferentes graus das neoplasias gliais pela OMS foram estatisticamente significativas ($p=0.001$), mostrando que o escore de expressão de EGFR é maior de acordo com o grau das neoplasias gliais. Estes dados estão expostos na Tabela 5 e Figura 3.

Tabela 5 - Escore de expressão de EGFR de acordo com os graus histológicos das neoplasias astrocitárias da OMS.

EGFR	Grau histológico OMS					Total	Valor de <i>p</i>
	0	1	2	3	4		
Escore 0	30 (100%)	38 (100%)	33 (61,1%)	10 (62,5%)	57 (60%)	168 (72,1%)	<0.001
Escore 1	0	0	11 (20,3%)	2 (12,5%)	2 (2,1%)	15 (6,3%)	
Escore 2	0	0	6 (11,1%)	2 (12,5%)	5 (5,3%)	13 (5,5%)	
Escore 3	0	0	4 (7,7%)	2 (12,5%)	31 (32,6%)	37 (15,8%)	
Total	30 (100%)	38 (100%)	54 (7,4%)	16 (100%)	95 (100%)	233 (100%)	

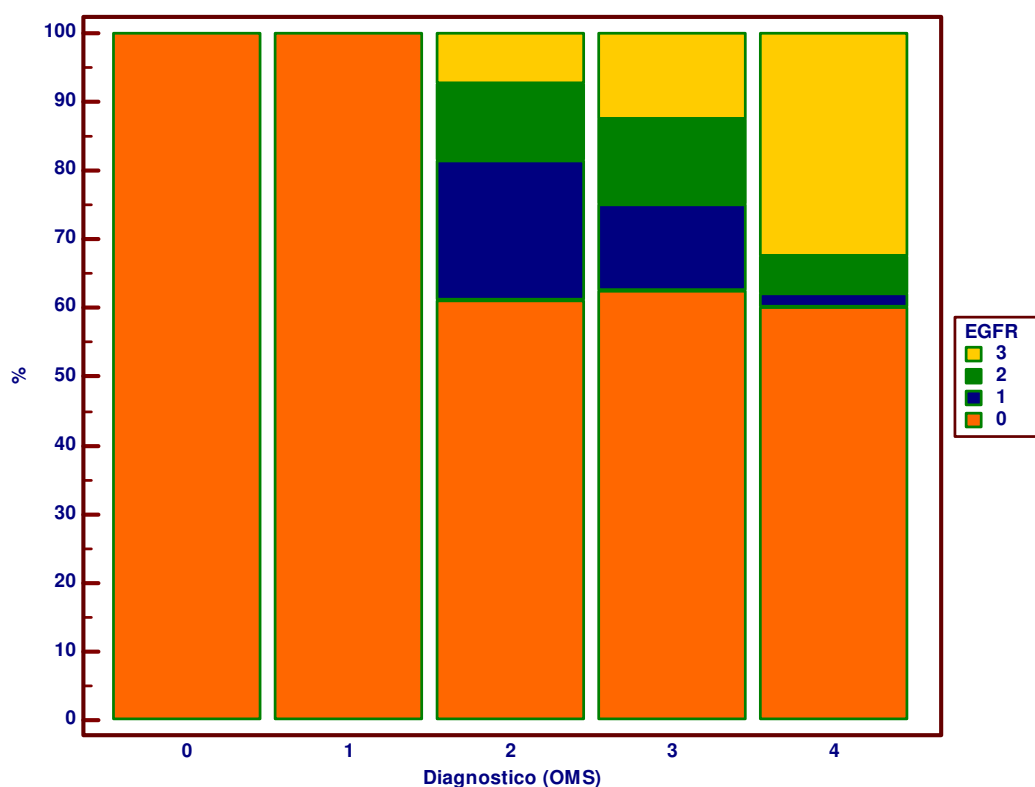
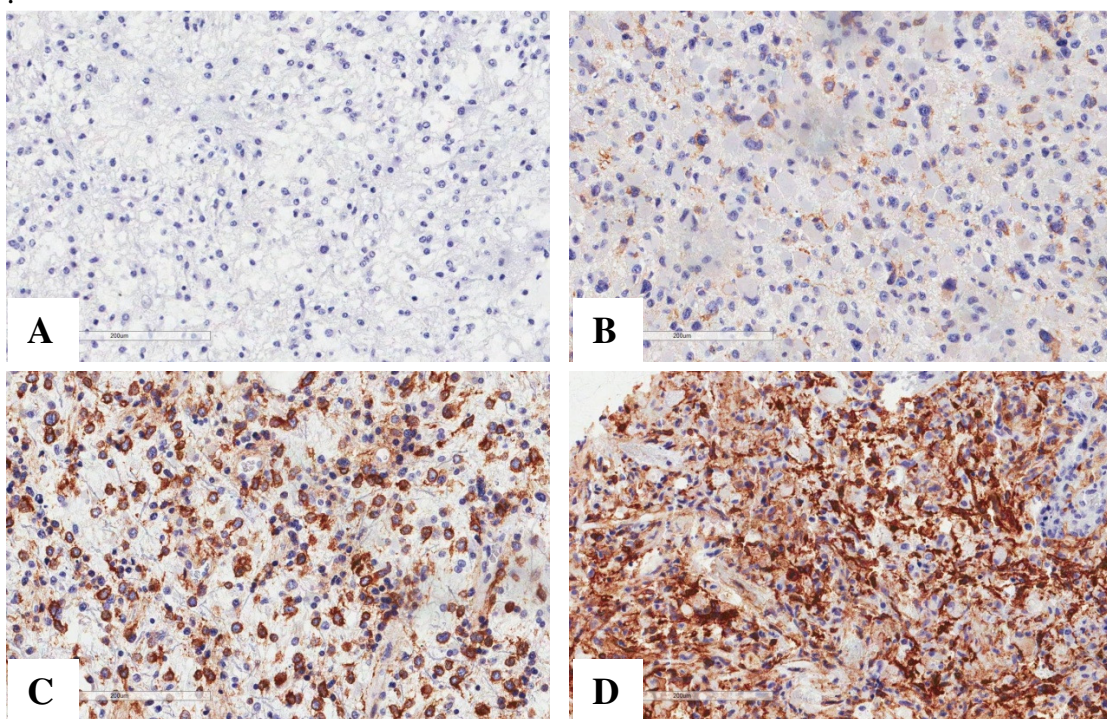


Figura 3 - Gráfico referente à porcentagem de casos de acordo com os escores de expressão do EGFR e os graus histológicos das neoplasias.



Legenda: Ausência de expressão em Astrocitomapiolocítico (A); Padrão de marcação escore 1+ em Astrocitoma difuso (B), Astrocitoma anaplásico com escore 3+ (C); Padrão de marcação escore 3+ em Glioblastoma multiforme (D).

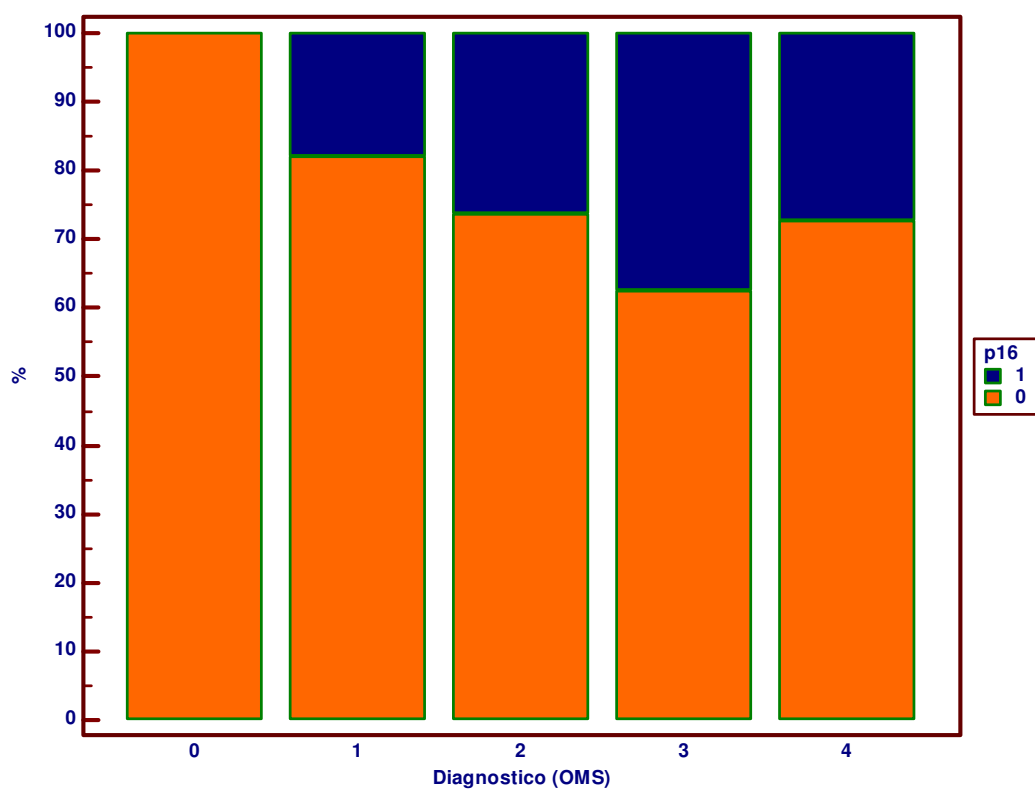
Figura 4 - Expressão de EGFR nas neoplasias astrocitárias

5.2.3 p16

No nosso estudo observamos que 180 (77,2%) casos foram negativos para p16 e 53 (22,8%) foram positivos. Todos os casos de tecido normal ou gliose foram negativos para p16, assim como 39 casos dos astrocitomas grau 2. Positividade para este marcador foi observada 14 (26,4%) astrocitomas grau 2, 6 (11,3%) Astrocitomas Anaplásicos 3 e 26 (49) Glioblastomas (Figura 6). Desta forma observamos que a perda da expressão de p16 é frequente nos Glioblastomas multiformes. Esta diferença de expressão de p16 entre os diferentes graus tumorais e tecido normal também foi estatisticamente significativa ($p=0.072$). Estes dados estão expostos na Tabela 6 e Figura 5.

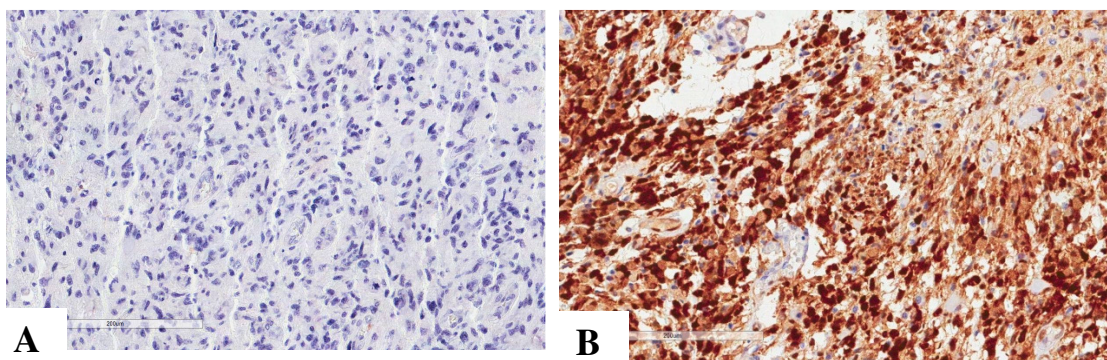
Tabela 6 - Frequência de expressão de p16 entre os Graus histológicos das neoplasias astrocitárias pela OMS.

p16	Grau histológico OMS					Total	Valor de p
	0	1	2	3	4		
Negativo	30 (100%)	32 (82%)	39 (73,5%)	10 (62,5%)	69 (72,6%)	180 (77,2%)	0.0072
Positivo	0	7 (18%)	14 (26,5%)	6 (37,5%)	26 (27,4%)	53 (22,8%)	
Total	30 (100%)	39 (100%)	65 (100%)	16 (100%)	95 (100%)	233 (100%)	



Legenda: 0= negativo; 1= positivo

Figura 5 - Gráfico referente à porcentagem de casos positivos para p16 em relação aos graus histológicos das neoplasias astrocitárias



Legenda: Perda da expressão de p16 em Glioblastoma multiforme (A); Glioblastoma multiforme com forte expressão de p16 (B).

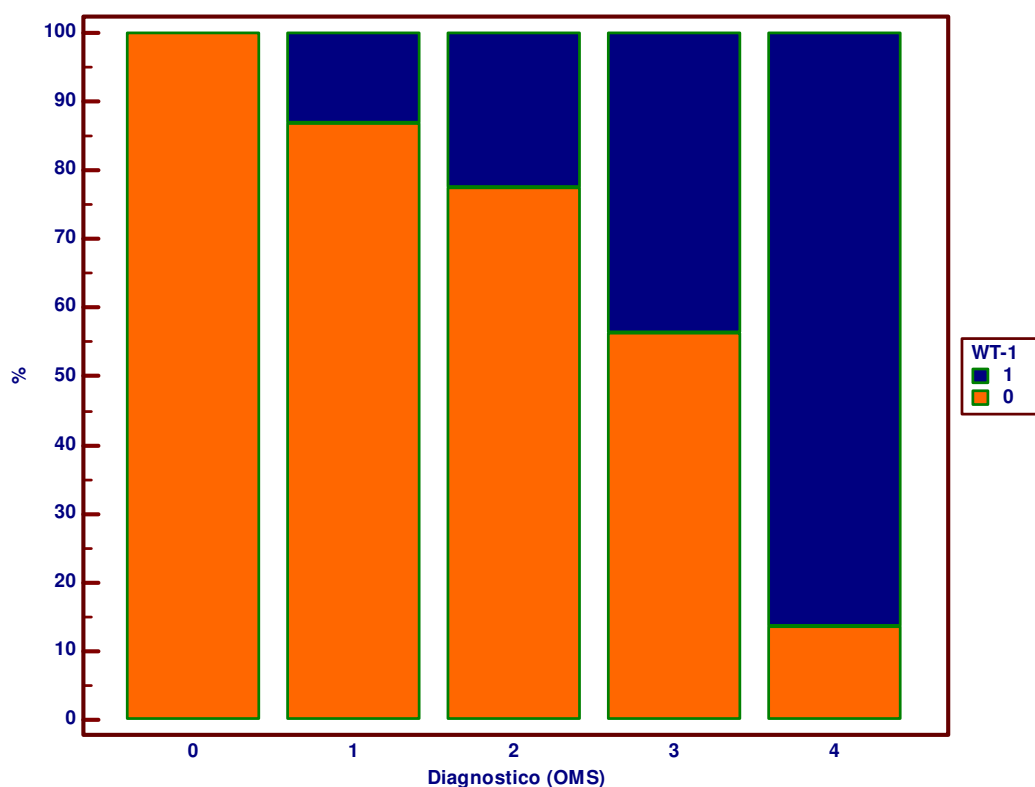
Figura 6 - Marcação de p16 nas neoplasias astrocitárias

5.2.4 WT-1

A expressão do WT1 foi observada no citoplasma das células neoplásicas, sendo 107 (45,9%) casos classificados como positivos e 126 (53,1%) como negativos. A expressão imunoistoquímica deste marcador demonstrou diferenças estatisticamente significantes em relação aos subtipos e graus histológicos das neoplasias estudadas ($p < 0,0001$). A expressão de WT-1 foi frequentemente encontrada nos Glioblastomas multiformes, sendo considerados positivos 83 casos de 96 (86,45%) estudados (Figura 8). Nos Astrocitomas Grau 2, a expressão foi de 22,7%, respectivamente. Todos os casos normais ou de gliose foram negativos para este marcador. No grupo dos Astrocitomas anaplásicos 7 (43,8%) casos foram positivos para WT1. Estes dados estão expostos na Tabela 7 e Figura 7.

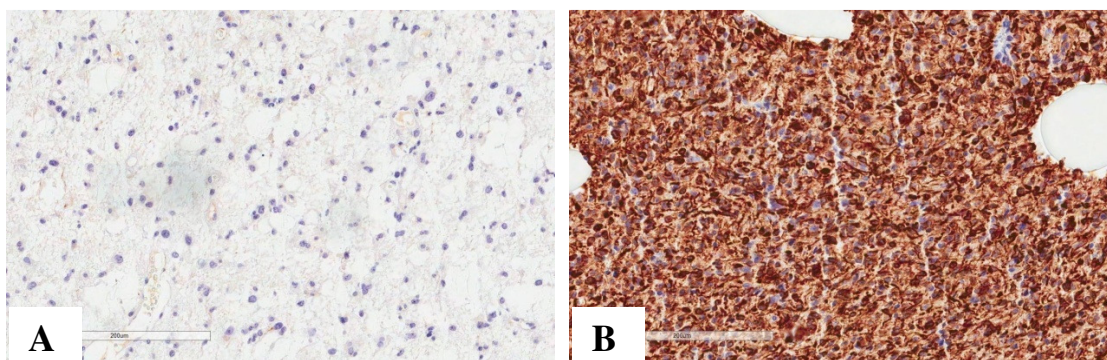
Tabela 7 - Frequência de expressão de WT1 entre os Graus histológicos das neoplasias astrocitárias pela OMS.

WT-1	Grau histológico OMS					Total	Valor de p
	0	1	2	3	4		
Negativo	30 (100%)	33 (86,9%)	41 (77,3%)	9 (56,2%)	13 (13,5%)	126 (54,%)	<0.001
Positivo	0	5 (13,1%)	12 (22,7%)	7 (43,8%)	83 (86,5%)	107 (46%)	
Total	30 (100%)	38 (100%)	53 (100%)	16 (100%)	96 (100%)	233 (100%)	



Legenda: 0= negativo; 1= positivo

Figura 7 - Gráfico referente à porcentagem de casos positivos para WT1 em relação aos graus histológicos das neoplasias astrocitárias



Legenda: Ausência de expressão de WT-1 em Astrocitoma difuso (A). Marcação positiva e forte em Glioblastoma multiforme (B).

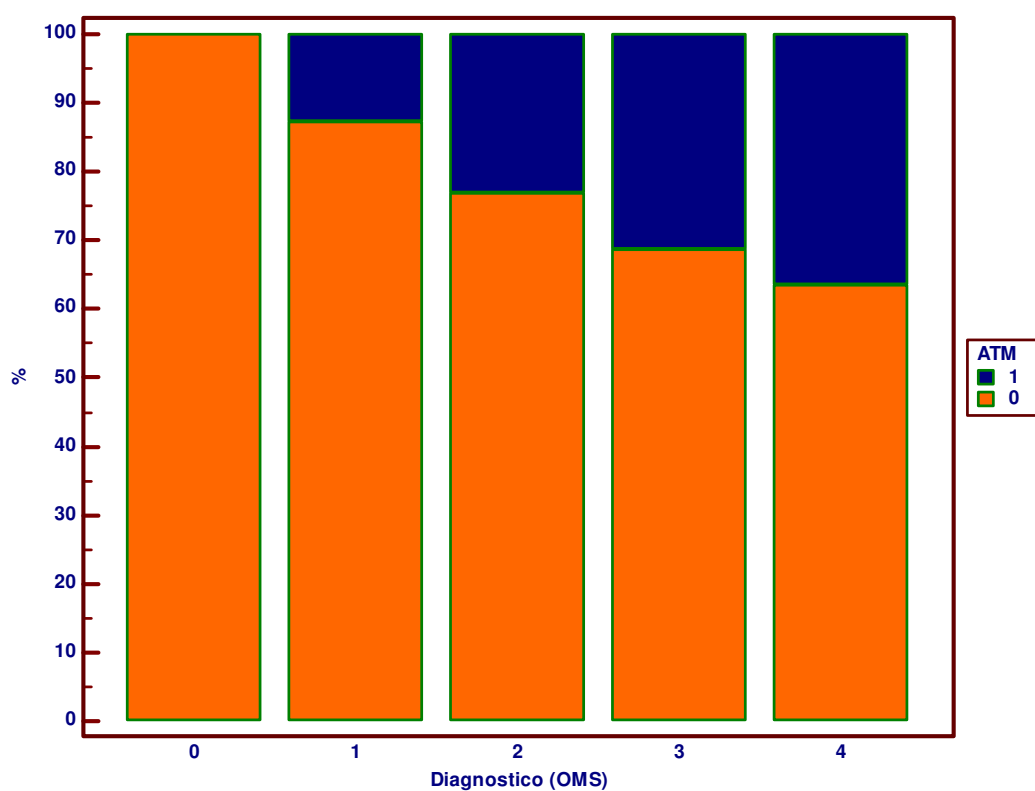
Figura 8 - Marcação de WT-1 nas neoplasias astrocitárias.

5.2.5 ATM

Semelhante ao observado no marcador imunoistoquímico EGFR, a maioria dos casos foram negativos para ATM, 179 (74,8%) de 237. Contudo, observou-se um aumento de casos positivos para ATM de acordo com o grau histológico. Novamente observamos 100% de negatividade nos tecidos normais ou com gliose. Os Glioblastomas multiformes e Astrocitomas anaplásicos mostraram grande frequência de casos positivos para este marcador, 35 em 96 (36,4%) e 5 em 16 (31,3%), respectivamente. A correlação entre os resultados de expressão imuno-histoquímica em relação aos subtipos histológicos e aos graus histológicos das neoplasias demonstrou significância estatística ($p=0.0005$). Estes dados estão expostos na Tabela 8 e Figura 9.

Tabela 8 - Frequência de expressão de ATM entre os Graus histológicos das neoplasias astrocitárias pela OMS.

ATM	Grau histológico OMS					Total	Valor de p
	0	1	2	3	4		
Negativo	30 (100%)	34 (87,2%)	43 (76,7%)	11	61 (68,8%)	179 (75,5%)	0.0005
Positivo	0	5 (12,8%)	13 (23,3%)	5 (31,3%)	35 (36,4%)	58 (24,5%)	
Total	30 (100%)	39 (100%)	56 (100%)	16 (100)	96 (100%)	237 (100%)	



Legenda: 0= negativo; 1= positivo

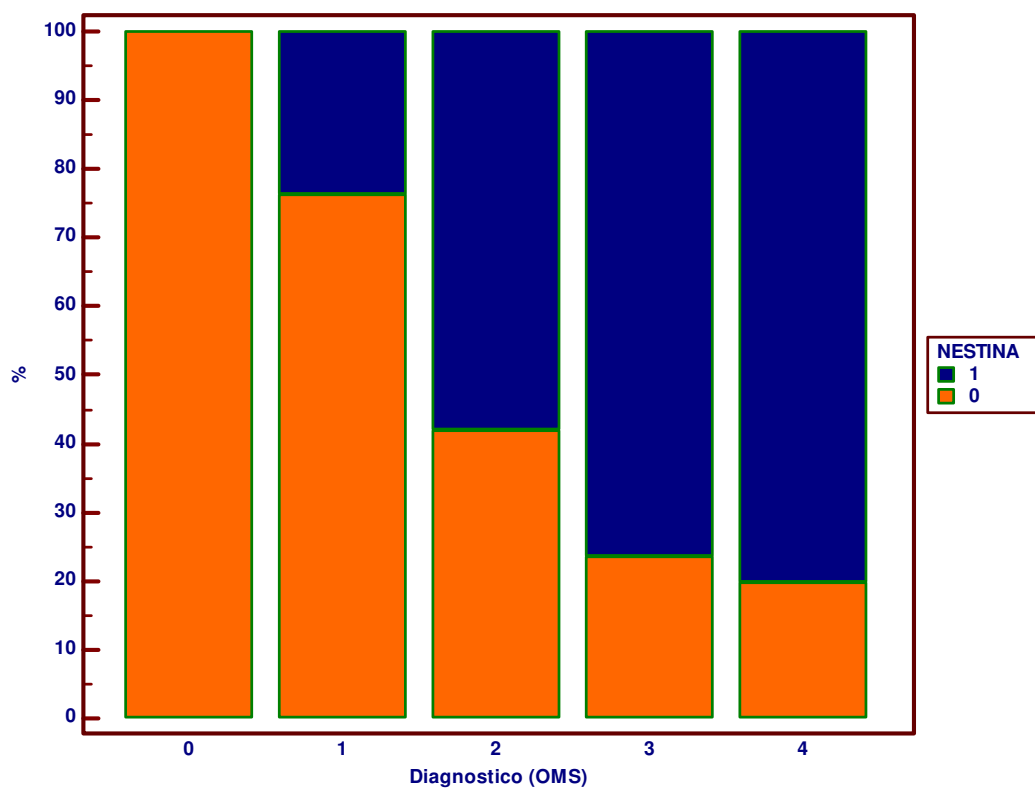
Figura 9 - Gráfico referente à porcentagem de casos positivos para ATM em relação aos graus histológicos pela OMS

5.2.6 Nestina

As correlações entre os resultados da expressão imunoistoquímica da Nestina demonstraram diferenças estatisticamente significantes para o grau e subtipos histológicos ($p < 0.0001$). As porcentagens de casos positivos e negativos foram equivalentes, 55% e 45 %, respectivamente. A expressão de Nestina apresentou um aumento gradativo em relação aos graus histológicos, sendo positivos 58,2% dos Astrocitomas grau 2, 76,5% dos Astrocitomas grau 3 e 80,2% dos Glioblastomas 4. Dos 127 casos positivos, 86 eram gliomas de alto grau e 49 gliomas de baixo grau (Figura 11). Os tecidos cerebrais normais assim como os tecidos cerebrais com gliose reacional foram todos negativos. Estes dados estão expostos na Tabela 9 e Figura 10.

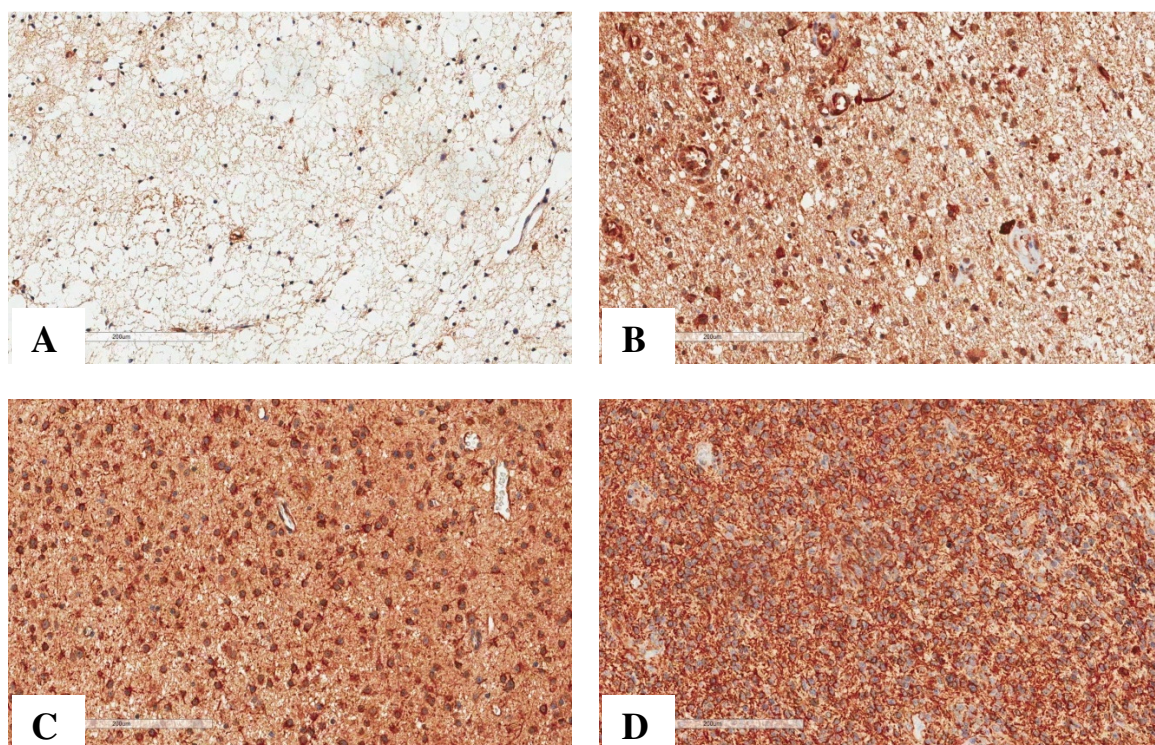
Tabela 9 - Frequência de expressão de Nestina entre os Graus histológicos das neoplasias astrocitárias pela OMS.

Nestina	Grau histológico OMS					Total	Valor de p
	0	1	2	3	4		
Negativo	30 (100%)	29 (76,3%)	23 (41,8%)	4 (23,5%)	18 (19,8%)	104 (45%)	<0.0001
Positivo	0	9 (23,7%)	32 (58,2%)	13 (76,5%)	73 (80,2%)	127 (55%)	
Total	30 (100%)	38 (100%)	55 (100%)	17 (100%)	91 (100%)	231 (100%)	



Legenda: 0= negativo; 1= positivo

Figura 10 - Gráfico referente à porcentagem de casos positivos para Nestina em relação aos graus histológicos.



Legenda: Marcação focal e fraca em Astrocitomas pilocíticos (A); Marcação moderada em Astrocitoma Difuso (B); Marcação forte e difusa em Astrocitoma Anaplásico (C); Marcação muito forte e difusa em Glioblastoma Multiforme (D).

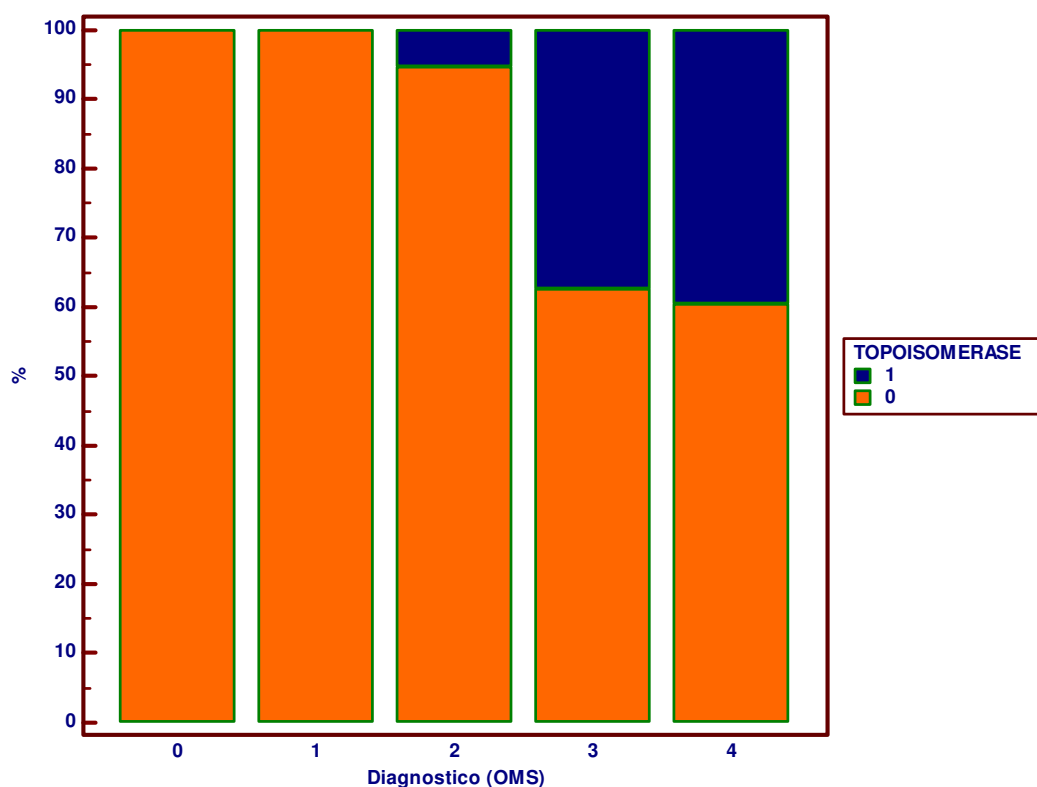
Figura 11 - Marcação de Nestina nas neoplasias astrocitárias.

5.2.7 Topoisomerase II α

A Topoisomerase II α também apresentou ausência de expressão na maioria dos casos, cerca de 80,1% dos casos foram negativos para este marcador e somente 47 casos foram positivos (19,9%). Dentre os casos positivos, 38 (80,8%) correspondiam aos Glioblastomas multiformes. Não se observaram tecido cerebral normal ou com gliose positivos para este marcador. Apenas 3 casos de Astrocitomas grau 2 e 6 de Astrocitomas grau 3 foram positivos para este marcador. Estas diferenças de expressão entre os tipos histológicos foram estatisticamente significantes ($p < 0.0001$) Estes dados estão expostos na Tabela 10 e Figura 12.

Tabela 10 - Frequência de expressão de Topoisomerase II α entre os Graus histológicos das neoplasias astrocitárias pela OMS.

Topoisomerase	Grau histológico OMS					Total	Valor de p
	0	1	2	3	4		
Negativo	30 (100%)	39 (100%)	53 (94,6%)	10 (62,5%)	58 (60,4%)	190 (80,1%)	<0.0001
Positivo	0	0	3 (5,4%)	6 (37,5%)	38 (39,6%)	47 (19,9%)	
Total	30 (100%)	39 (100%)	56 (100%)	16 (100%)	96 (100%)	237 (100%)	



Legenda: 0= negativo; 1= positivo

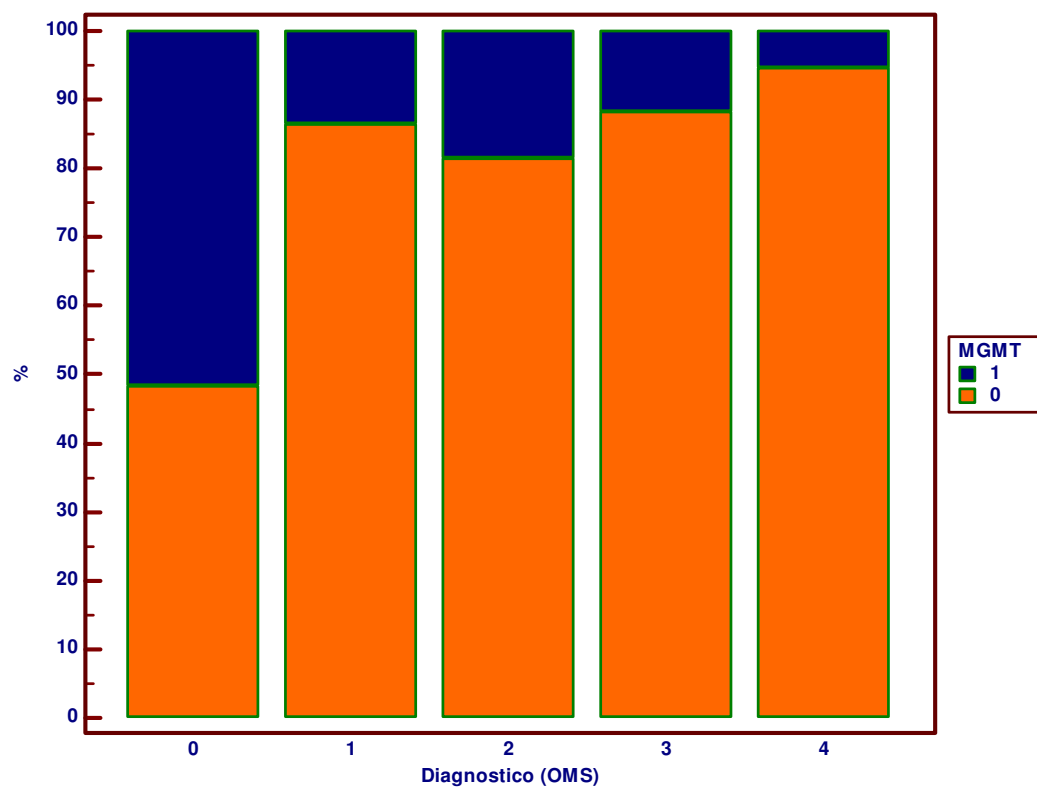
Figura 12 - Gráfico referente à porcentagem de casos positivos para Topoisomerase II α em relação aos graus histológicos.

5.2.8 MGMT

Nesse caso o que se observou foi a perda progressiva da expressão de MGMT conforme o grau histológico. Dos 29 casos não neoplásicos, 15 (51,7%) foram positivos. Nos Astrocitomas grau 2 a expressão deste marcador foi observada em apenas 10 casos dos 54 (18,6%) casos estudados. Em relação ao Astrocitomas grau 3, apenas 2 casos do total de 17 (11,7%) foram positivos e somente 5 casos do total de 92 (5,4%) dos Glioblastomas expressaram MGMT (Figura 14). Portanto, a frequência de expressão de MGMT diminui de acordo com o grau histológico das neoplasias. Estas diferenças de expressão foram estatisticamente significantes ($p < 0.0001$). Estes dados estão expostos na Tabela 11 e Figura 13.

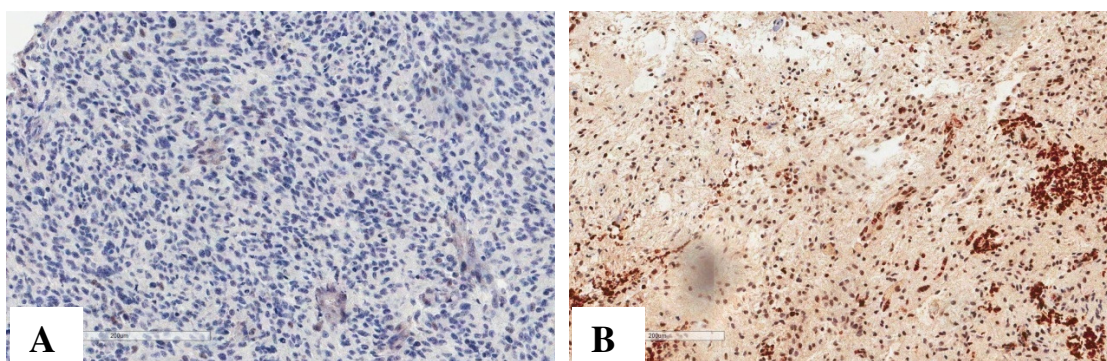
Tabela 11 – Frequência de expressão de MGMT entre os Graus histológicos das neoplasias astrocitárias pela OMS.

MGMT	Graus histológicos OMS					Total	Valor de p
	0	1	2	3	4		
Negativo	14 (48,3%)	32 (86,5%)	44 (81,4%)	15 (88,2%)	87 (94,6%)	192 (83,8%)	<0.001
Positivo	15 (51,7%)	5 (13,5%)	10 (18,6%)	2 (11,8%)	5 (5,4%)	37 (16,2%)	
Total	29 (100%)	37 (100%)	54 (100%)	17 (100%)	92 (100%)	229 (100%)	



Legenda: 0= negativo; 1= positivo

Figura 13 - Gráfico referente à porcentagem de casos positivos para MGMT em relação aos graus histológico.



Legenda: Perda da expressão em Glioblastoma multiforme (A); Marcação positiva de MGMT em Astrocitoma pilocítico (B).

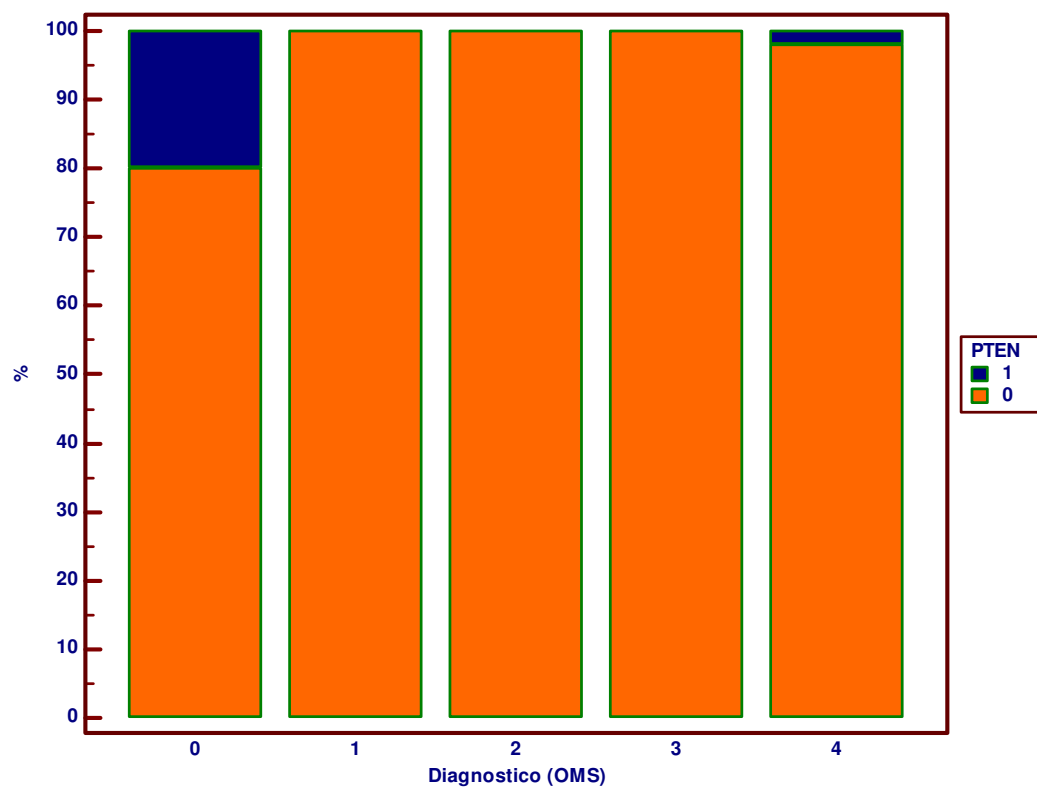
Figura 14 - Marcação de MGMT em neoplasias astrocitárias

5.2.9 PTEN

A marcação de PTEN foi rara e fraca em toda a amostra, sendo que apenas 8 casos foram positivos, 6 deles em tecidos cerebrais normais e 2 em Glioblastomas (Figura 16). Estas diferenças de expressão foram estatisticamente significantes ($p < 0.0001$). Nossos dados mostraram que a perda de expressão de PTEN é comum nas neoplasias gliais sendo a positividade mais frequente nos tecidos normais ou com gliose. Estes dados estão expostos na Tabela 12 e Figura 15.

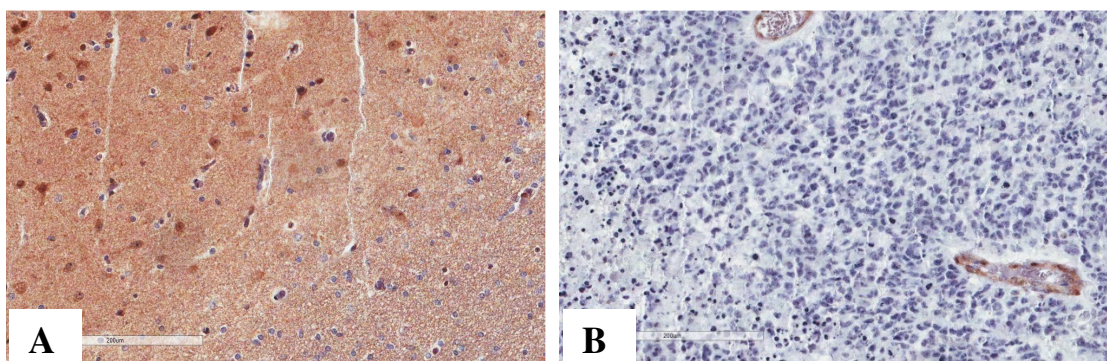
Tabela 12 - Frequência de expressão de PTEN entre os Graus histológicos das neoplasias astrocitárias pela OMS.

PTEN	Grau histológico OMS					Total	Valor de p
	0	1	2	3	4		
Negativo	24 (80%)	39 (100%)	56 (100%)	17 (100%)	94 (97,9%)	230 (96,6%)	< 0.001
Positivo	6 (20%)	0	0	0	2 (2,1%)	8 (3,4%)	
Total	30 (100%)	39 (100%)	56 (100%)	17 (100%)	96 (100%)	238 (100%)	



Legenda: 0= negativo; 1= positivo

Figura 15 - Gráfico referente à porcentagem de casos positivos para PTEN em relação aos graus histológicos



Legenda: Tecido cerebral com área de gliose com expressão positiva para PTEN (A); Ausência de marcação em Glioblastoma multiforme, controle interno positivo em parede de vaso (B).

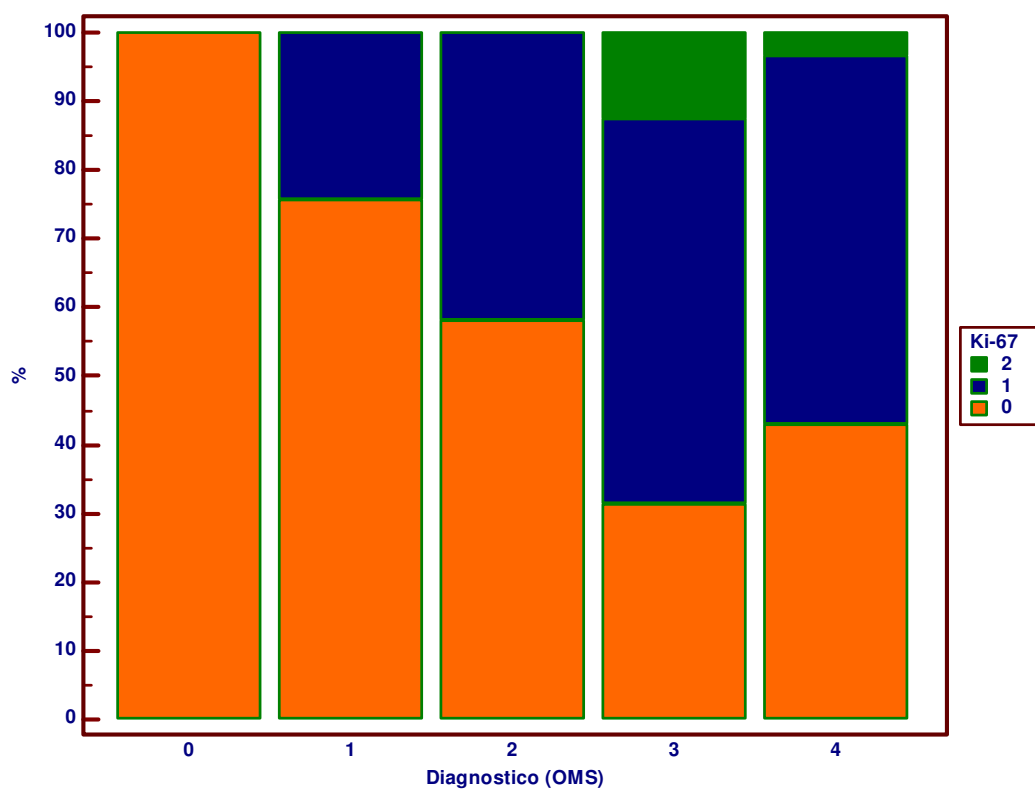
Figura 16 - Marcação de PTEN em relação às lesões astrocitárias.

5.2.10 Ki-67

A expressão de Ki67 foi encontrada somente nos tecidos neoplásicos, nenhum caso de tecido cerebral ou de gliose foi positivo para Ki-67. O índice de Ki-67 foi determinado de acordo com a porcentagem de células positivas. Nos Astrocitomas grau 2, esta positividade foi encontrada em 21 dos 50 casos (42%). Nos Astrocitomas anaplásicos, esta marcação foi observada em 9 de 16 (56,25%) casos e nos Glioblastomas esta marcação foi encontrada em 49 de 91 (53,84%) casos. Positividade para Ki-67 entre 10 a 20% das células foi encontrada somente nos Astrocitomas anaplásicos e Glioblastomas, 12,6% e 3,4% respectivamente. Estas diferenças de expressão foram estatisticamente significantes ($p < 0.0001$). Estes dados estão expostos na Tabela 13 e Figura 17.

Tabela 13 - Frequência de expressão de Ki-67 entre os Graus histológicos das neoplasias astrocitárias pela OMS

Ki-67	Grau histológico OMS					Total	Valor de p
	0	1	2	3	4		
Negativo	30 (100%)	28 (75,7%)	29 (58%)	5 (31,2%)	39 (42,8%)	131 (58,4%)	<0.0001
Até 10%	0	9 (24,3%)	21 (42%)	9 (56,2%)	49 (53,8%)	88 (39,2%)	
11 a 25%	0	0	0	2 (12,6%)	3 (3,4%)	5 (2,4%)	
Total	30 (100%)	37 (100%)	50 (100%)	16 (100%)	91 (100%)	224 (100%)	



Legenda: 0= negativo; 1= positivo em até 10% das células neoplásicas, 2= positivo entre 10 a 20% das células neoplásicas.

Figura 17 - Gráfico referente à porcentagem de casos positivos para Ki-67 em relação aos graus histológicos.

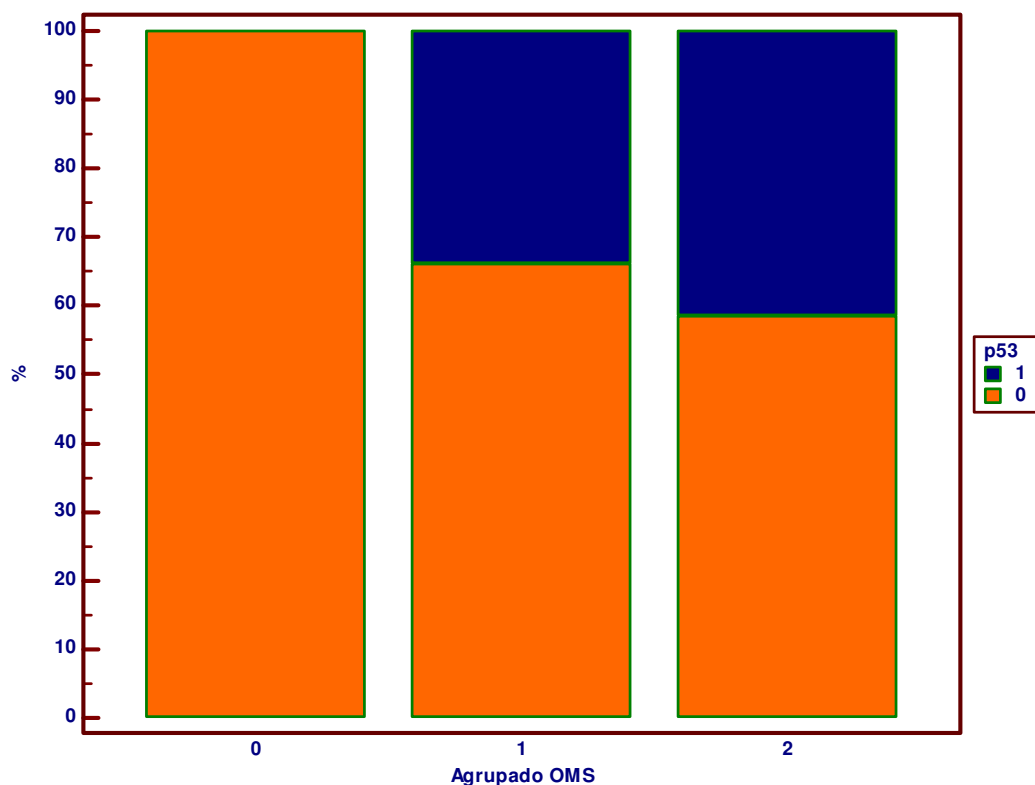
5.3 RELAÇÃO ENTRE AS EXPRESSÕES DOS MARCADORES DE IMUNOISTOQUÍMICA E O GRAU DE AGRESSIVIDADE DAS NEOPLASIAS ASTROCITÁRIAS

5.3.1 p53

A associação entre os resultados da expressão imunoistoquímica do p53 demonstraram diferenças estatisticamente significantes em relação ao grau de agressividade das neoplasias gliais ($p < 0.0001$). Nenhum caso de tecido não neoplásico foi positivo para p53. Dos 53 casos de Gliomas de baixo grau, apenas 18 (34%) foram positivos. Por outro lado, os gliomas de alto grau exibiram expressão de p53 em 46 dos 111 casos (41,4%). Estes dados estão expostos na Tabela 14 e Figura 18.

Tabela 14 - Correlação entre a expressão de p53 e o grau de agressividade das neoplasias astrocitárias.

p53	Grau de agressividade das neoplasias			Total	Valor de p
	Não neoplásico	Baixo Grau	Alto Grau		
Negativo	30 (100%)	35 (66%)	65 (58,5%)	130 (67%)	< 0.0001
Positivo	0	18 (34%)	46 (41,5%)	64 (33%)	
Total	30 (100%)	53 (100%)	111 (100%)	194 (100%)	



Legenda: 0= negativo; 1= positivo

Figura 18 - Gráfico referente à porcentagem de casos positivos para p53 em relação aos graus de agressividade das neoplasias astrocitárias

5.3.2 EGFR

A correlação entre os resultados de expressão imunoistoquímica demonstrou significância estatística em relação ao grau de agressividade das neoplasias gliais ($p < 0.0001$). Nenhum caso de tecido cerebral normal ou com gliose foi positivo, para EGFR assim como aconteceu com o marcador p53. O padrão de marcação correspondente ao escore 1 foi mais frequente nos gliomas de baixo grau, 11, contra apenas 4 dos de alto grau. Contudo, o padrão de marcação correspondente ao escore 3, foi encontrado em 37 dos 195 casos (18,9%), sendo 33 (89,1%) gliomas de alto grau e apenas 4 (10,9%) gliomas de baixo grau. Já o padrão escore 2 foi equivalente

nos gliomas de baixo grau e alto grau, 6 e 7 casos positivos, respectivamente. Estes dados estão expostos na Tabela 15 e Figura 19.

Tabela 15 - Correlação entre o padrão de expressão de EGFR e o grau de agressividade das neoplasias astrocitárias

EGFR	Grau de agressividade das neoplasias			Total	Valor de p
	Não neoplásico	Baixo grau	Alto grau		
Escore 0	30 (100%)	33 (61,1%)	67 (60,4%)	130 (66,6%)	<0.0001
Escore 1	0	11 (20,3%)	4 (3,6%)	15 (7,6%)	
Escore 2	0	6 (11,1%)	7 (6,3%)	13 (6,6%)	
Escore 3	0	4 (7,5%)	33 (29,7%)	37 (18,9%)	
Total	30 (100%)	54 (100%)	111 (100%)	195 (100%)	

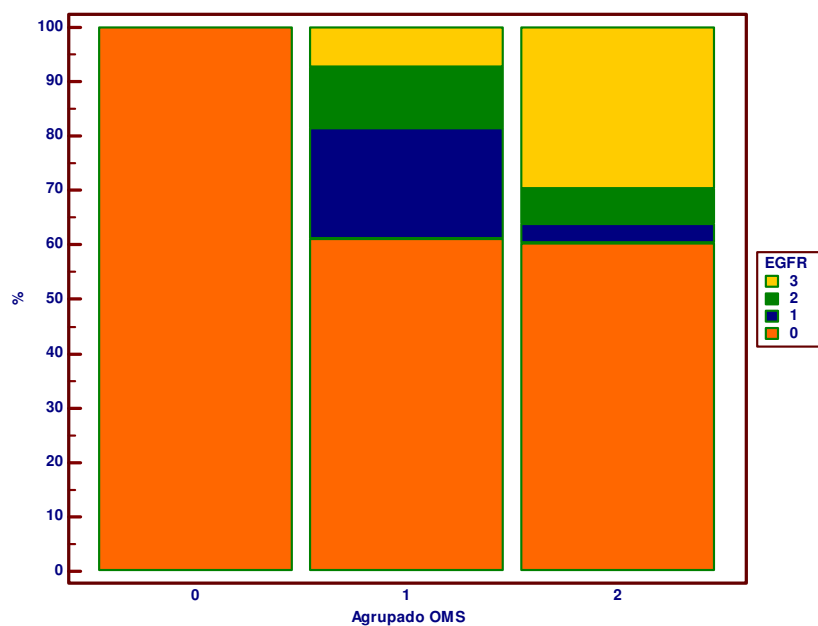


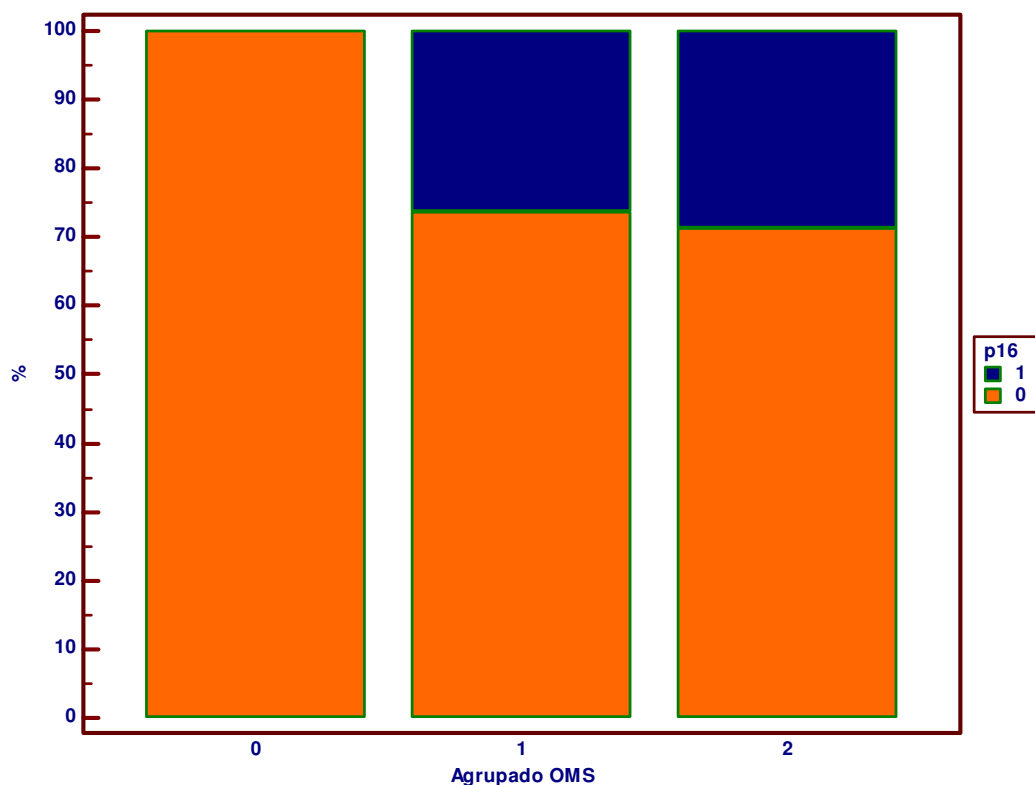
Figura 19 - Gráfico referente à distribuição da expressão de EGFR em relação ao grau de agressividade das neoplasias astrocitárias

5.3.3 p16

A correlação entre os resultados da expressão imunoistoquímica demonstraram diferenças estatisticamente significantes em relação ao grau de agressividade dos gliomas ($p=0.0039$). Dos 53 casos de gliomas de baixo grau, 39 foram negativos para p16 (73,5%), enquanto que 79 casos dos gliomas de alto grau foram negativos dentre um total de 111 (71,2%). Estes dados estão expostos na Tabela 16 e Figura 20.

Tabela 16 - Correlação entre a expressão de p16 e o grau de agressividade das neoplasias astrocitárias

p16	Grau de agressividade das neoplasias			Total	Valor de p
	Não neoplásico	Baixo Grau	Alto Grau		
Negativo	30 (100 %)	39 (73,5 %)	79 (71,2 %)	148 (76,2 %)	0.0039
Positivo	0	14 (26,5 %)	32 (28,8 %)	46 (23,8 %)	
Total	30 (100 %)	53 (100 %)	111 (100 %)	194 (100 %)	



Legenda: 0= negativo; 1= positivo

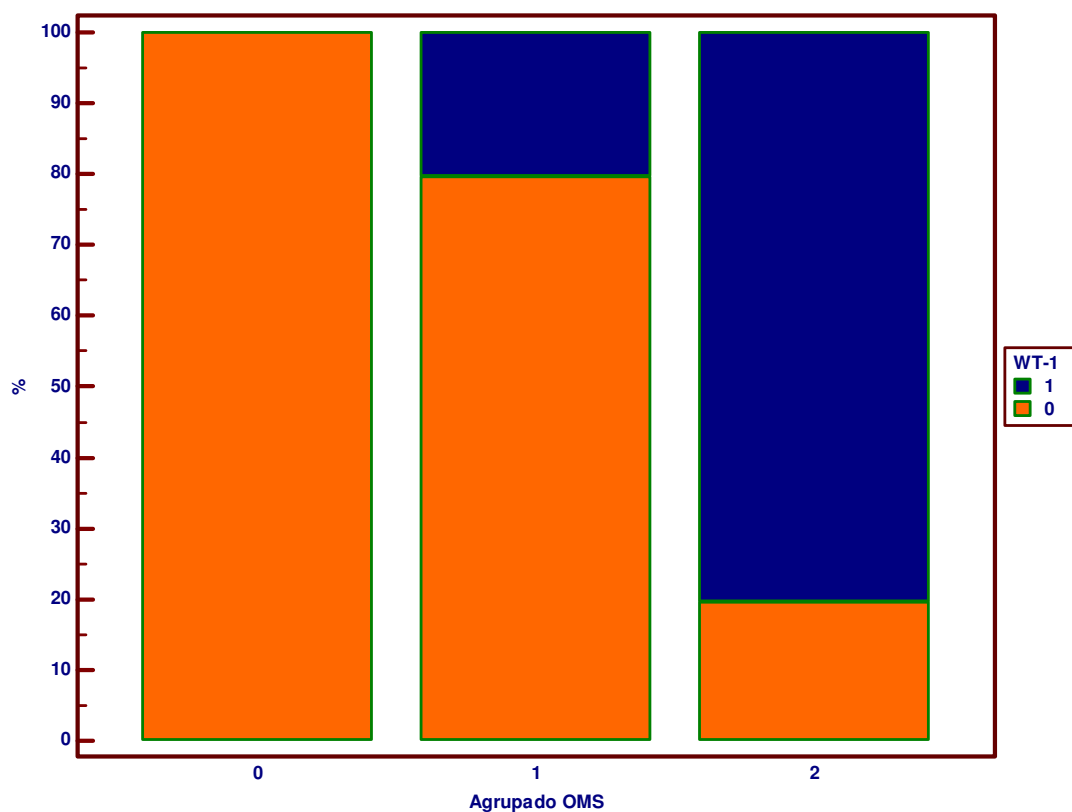
Figura 20 - Gráfico referente à porcentagem de casos com expressão positiva para p16 ao grau de agressividade das neoplasias astrocitárias

5.3.4 WT-1

A associação entre os resultados da expressão imunoistoquímica demonstraram diferenças estatisticamente significantes em relação ao grau de agressividade das neoplasias gliais ($p < 0.0001$). Os gliomas de alto grau foram positivos para WT-1 em 90 dos 112 casos (80,4%). No entanto, os gliomas de baixo grau apresentaram apenas 21 casos positivos do total de 53 (20,4%). Os tecidos cerebrais normais ou reacionais não apresentaram expressão do marcador. Estes dados estão expostos na Tabela 17 e Figura 21.

Tabela 17 - Correlação entre a expressão de WT-1 e o grau de agressividade das neoplasias astrocitárias.

WT-1	Grau de agressividade das neoplasias			Total	Valor de p
	Não neoplásico	Baixo Grau	Alto Grau		
Negativo	30 (100%)	41 (79,6%)	22 (19,6%)	93 (47,6%)	<0.0001
Positivo	0	12 (20,4%)	90 (80,4%)	102 (52,4%)	
Total	30 (100%)	53 (100%)	112 (100%)	195 (100%)	



Legenda: 0= negativo; 1= positivo

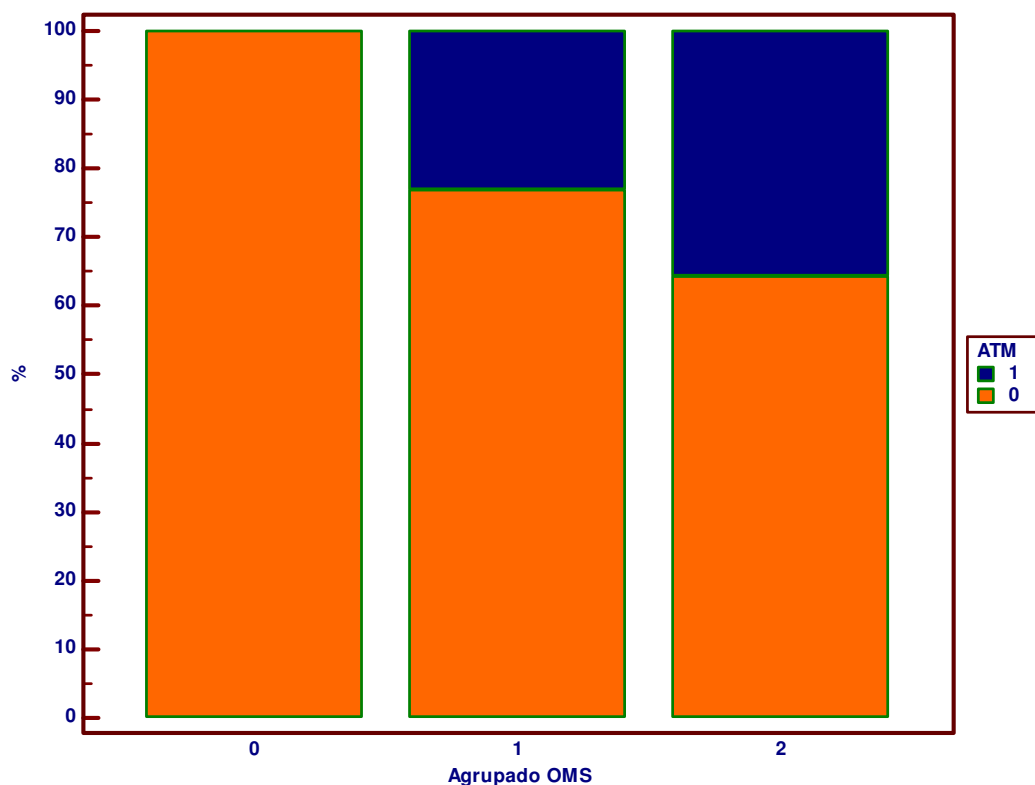
Figura 21 - Gráfico referente à porcentagem de casos com expressão positiva para WT-1 em relação ao grau de agressividade das neoplasias astrocitárias.

5.3.5 ATM

A correlação entre os resultados de expressão imunoistoquímica de ATM demonstrou significância estatística em relação ao grau de agressividade dos gliomas ($p < 0.0001$). Todos os casos não neoplásicos foram negativos para o marcador. Dos 53 casos positivos, 40 eram gliomas de alto grau (75,4%) e 13 de baixo grau (24,6%). Estes dados estão expostos na Tabela 18 e Figura 22.

Tabela 18 - Correlação entre a expressão de ATM e o grau de agressividade das neoplasias astrocitárias

ATM	Grau de agressividade das neoplasias			Total	Valor de p
	Não neoplásico	Baixo Grau	Alto Grau		
Negativo	30 (100%)	43 (76,7%)	72 (64,3%)	145 (73,2%)	0.0002
Positivo	0	13 (23,2%)	40 (35,7%)	53 (26,8%)	
Total	30 (100%)	56 (100%)	112 (100%)	198 (100%)	



Legenda: 0= negativo; 1= positivo

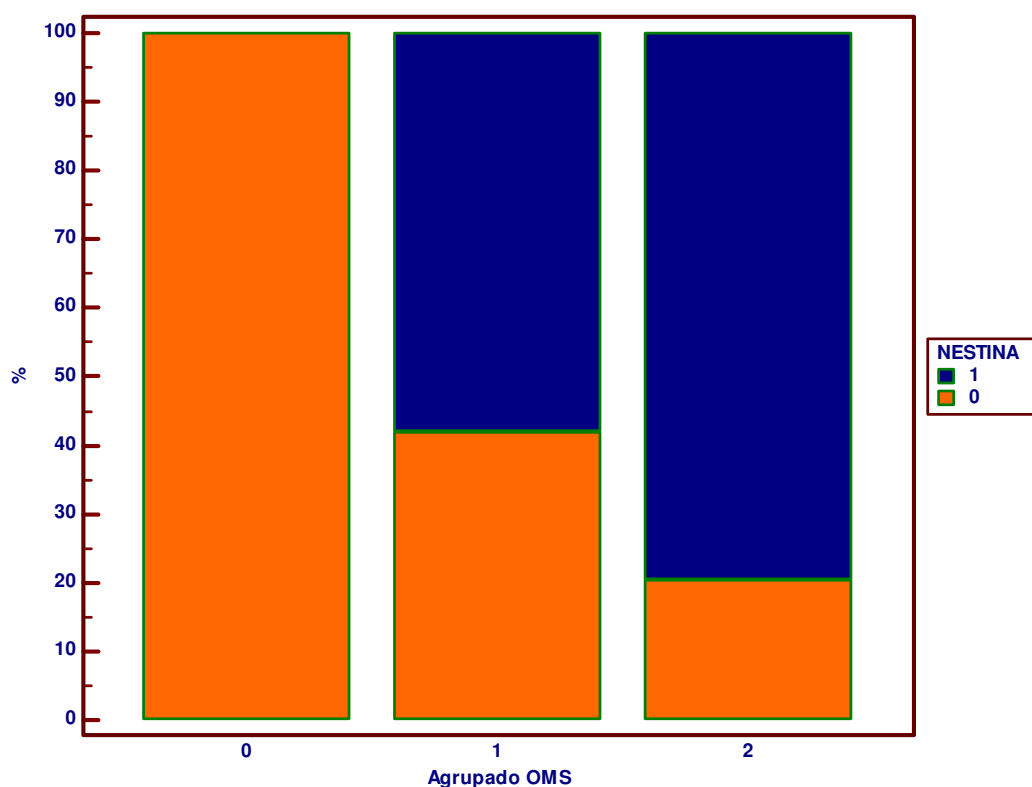
Figura 22 - Gráfico referente à porcentagem de casos com expressão positiva para ATM em relação ao grau de agressividade das neoplasias astrocitárias

5.3.6 Nestina

A correlação entre os resultados da expressão imunoistoquímica de Nestina demonstraram diferenças estatisticamente significantes em relação ao grau de agressividade dos gliomas das neoplasias gliais ($p < 0.0001$). A maioria dos casos de gliomas de alto grau foram positivos para Nestina. A expressão deste marcador foi observada em 86 dos 112 casos (80,4%) Já dos 55 casos de gliomas de baixo grau, apenas 32 foram positivos (58,2%). Estes dados estão expostos na Tabela 19 e Figura 23.

Tabela 19 - Correlação entre a expressão de Nestina e o grau de agressividade das neoplasias astrocitárias

Nestina	Grau de agressividade das neoplasias			Total	Valor de p
	Não neoplásico	Baixo Grau	Alto Grau		
Negativo	30 (100%)	23 (41,8%)	22 (19,6%)	75 (38,8%)	<0.0001
Positivo	0	32 (58,2%)	86 (80,4%)	118 (61,2%)	
Total	30 (100%)	55 (100%)	112 (100%)	193 (100%)	



Legenda: 0= negativo; 1= positivo

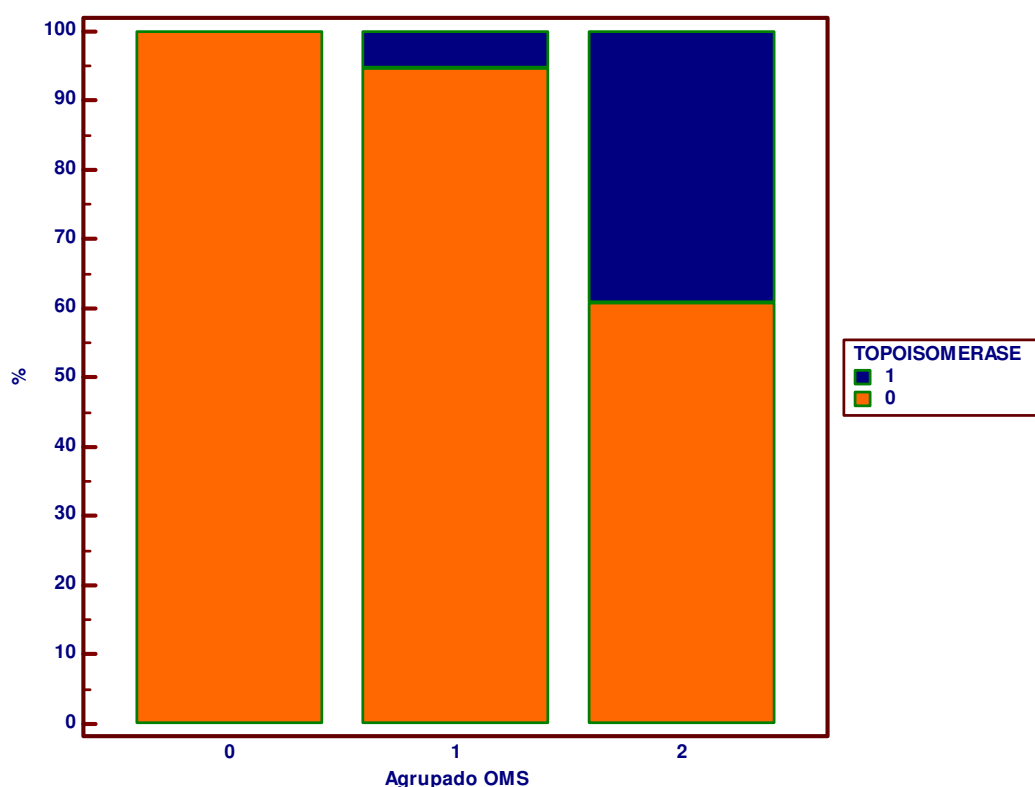
Figura 23 - Gráfico referente à porcentagem de casos com expressão positiva para Nestina em relação ao grau de agressividade das neoplasias astrocitárias

5.3.7 Topoisomerase II α

A associação entre os resultados da expressão imunoistoquímica de Topoisomerase II α demonstraram diferenças estatisticamente significantes em relação ao grau de agressividade das neoplasias gliais ($p < 0.0001$). Do total de casos (n:198) apenas 47 foram positivos (23,8%). Desses 44 eram gliomas de alto grau (88%) e apenas 3 eram de baixo grau (12%). Não se observou positividade nos casos de tecido cerebral não neoplásico. Estes dados estão expostos na Tabela 20 e Figura 24.

Tabela 20 - Correlação entre a expressão de Topoisomerase II α e o grau de agressividade das neoplasias astrocitárias

Topoisomerase	Grau de agressividade das neoplasias			Total	Valor de p
	Não neoplásico	Baixo Grau	Alto Grau		
Negativo	30 (100%)	53 (94,6%)	68 (60,7%)	151 (76,2%)	<0.0001
Positivo	0	3 (5,4%)	44 (39,3%)	47 (23,8%)	
Total	30 (100%)	56 (100%)	112 (100%)	198 (100%)	



Legenda: 0= negativo; 1= positivo

Figura 24 - Gráfico referente à porcentagem de casos com expressão positiva para Topoisomerase II α em relação ao grau de agressividade das neoplasias astrocitárias

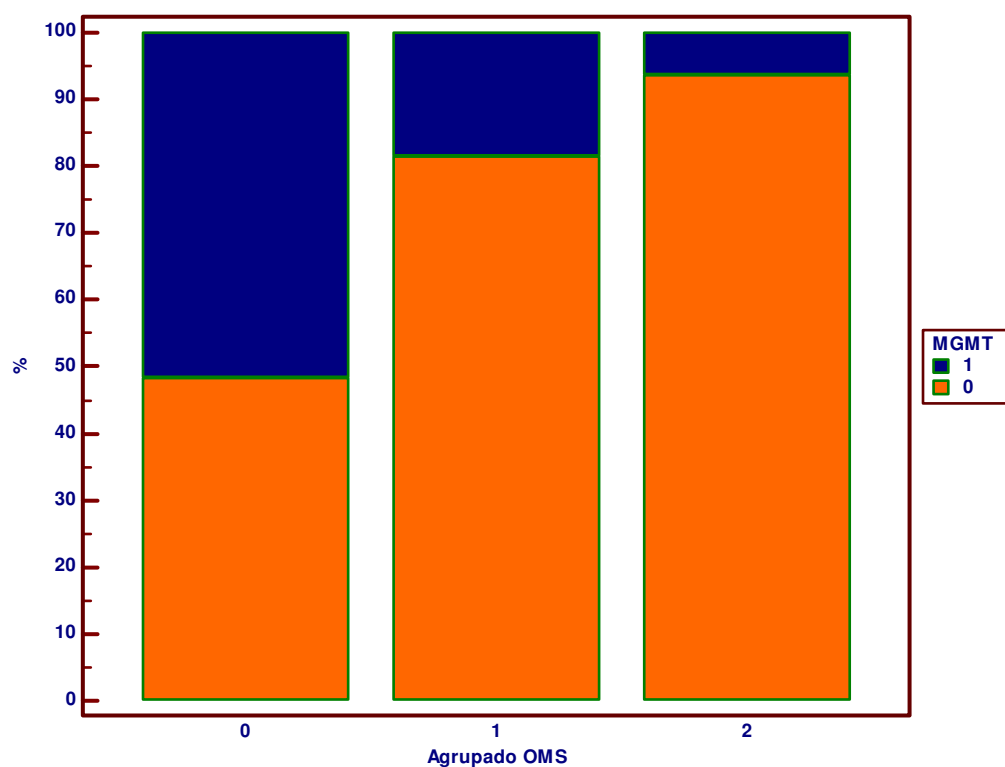
5.3.8 MGMT

A correlação entre os resultados de expressão imunoistoquímica demonstrou significância estatística em relação ao grau de agressividade das neoplasias gliais. ($p < 0.0001$). Assim como na análise entre a expressão de MGMT e tipos histológicos dos gliomas, observamos a perda da expressão proteica quanto maior o grau das neoplasias gliais. Dos casos não neoplásicos (n:29), 15 mantiveram a expressão de MGMT (51,7%), enquanto que nas neoplasias de baixo grau apenas 10 do total de 54 expressaram a proteína (18,5%) e nas neoplasias de alto grau apenas 7 de um total de 109 casos (6,4%). Isso demonstrou que os gliomas tendem a perder a

expressão de MGMT, e a perda é maior nos de alto grau em relação aos de baixo grau. Estes dados estão expostos na Tabela 21 e Figura 25.

Tabela 21 - Correlação entre a expressão de MGMT e o grau de agressividade das neoplasias astrocitárias.

MGMT	Grau de agressividade das neoplasias			Total	Valor de p
	Não neoplásico	Baixo Grau	Alto Grau		
Negativo	14 (48,3%)	44 (81,4%)	102 (93,6%)	160 (83,3%)	<0.0001
Positivo	15 (51,7%)	10 (18,6%)	7 (6,4%)	32 (16,7%)	
Total	29 (100%)	54 (100%)	109 (100%)	192 (100%)	



Legenda: 0= negativo; 1= positivo

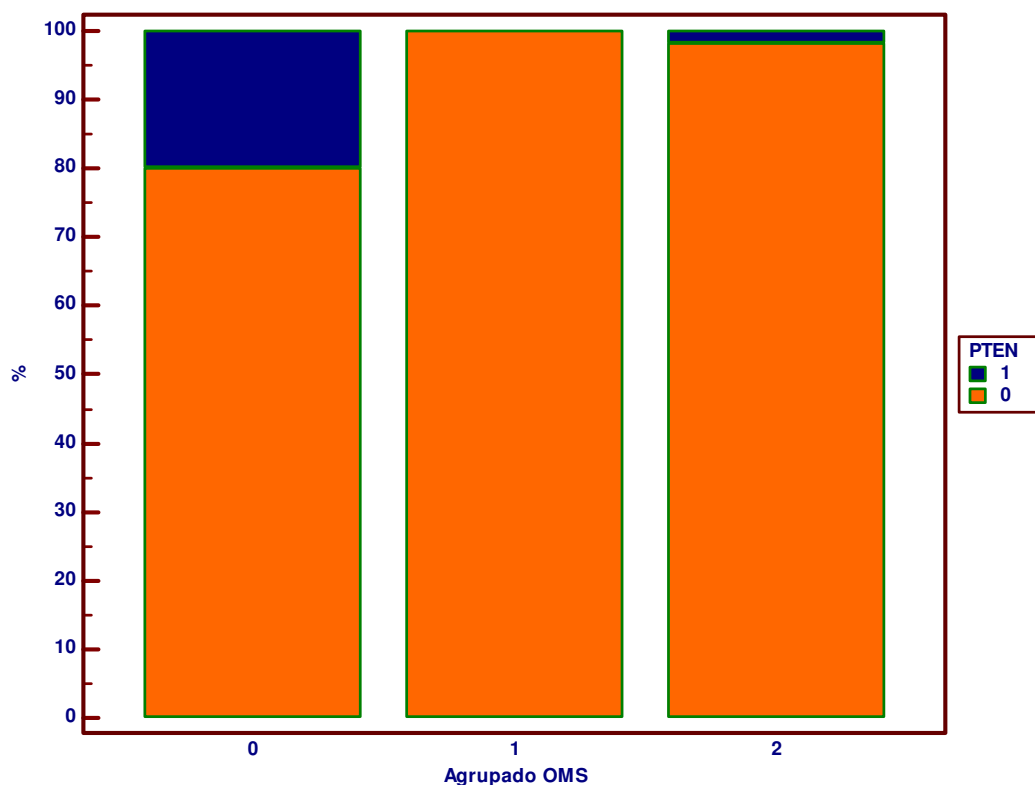
Figura 25 - Gráfico referente à porcentagem de casos com expressão positiva para p53 em relação ao grau de agressividade das neoplasias astrocitárias.

5.3.9 PTEN

Dos 251 casos estudados, 243 (96,8%) foram negativos para PTEN. Apenas 8 casos foram positivos, sendo 6 casos não tumorais e 2 casos de gliomas grau IV. A correlação entre os resultados da expressão imunoistoquímica demonstraram diferenças estatisticamente significantes em relação ao grau de agressividade dos gliomas ($p < 0.0001$). Estes dados estão expostos na Tabela 22 e Figura 26.

Tabela 22 - Correlação entre a expressão de PTEN e o grau de agressividade das neoplasias astrocitárias.

PTEN	Grau de agressividade das neoplasias			Total	Valor de p
	Não neoplásico	Baixo Grau	Alto Grau		
Negativo	24 (80%)	56 (100%)	111 (98,2%)	191 (96%)	<0.0001
Positivo	6 (20%)	0	2 (1,8%)	8 (4%)	
Total	30 (100%)	56 (100%)	113 (100%)	199 (100%)	



Legenda: 0= negativo; 1= positivo

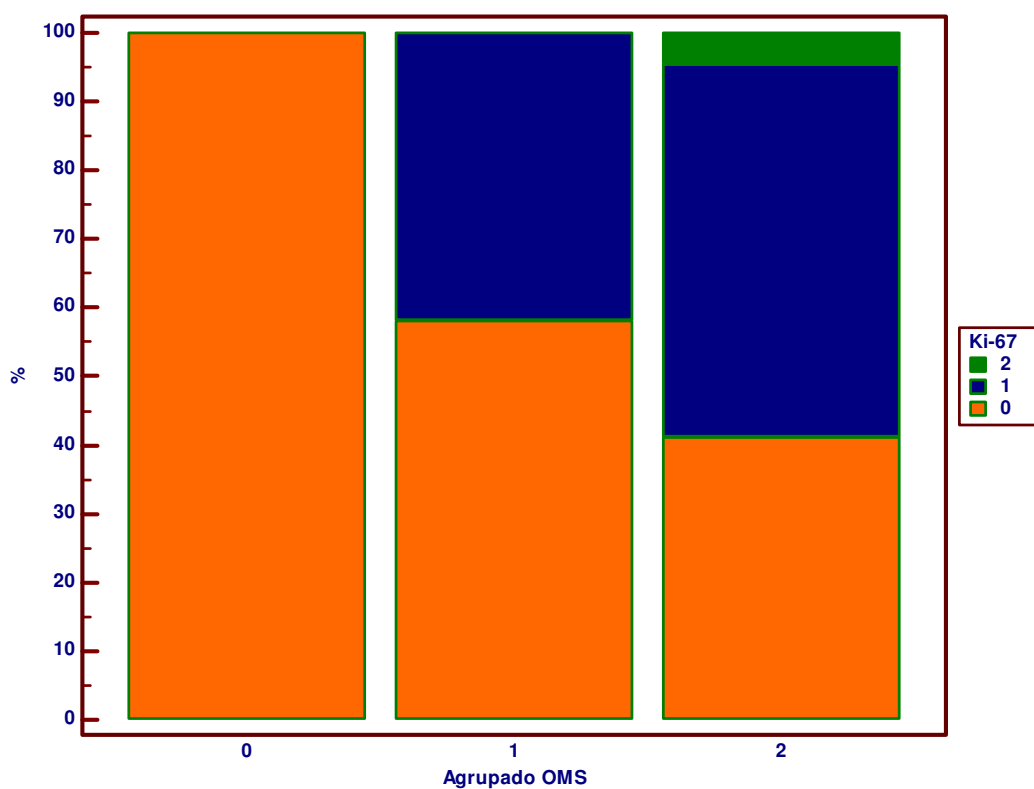
Figura 26 - Gráfico referente à porcentagem de casos com expressão positiva para PTEN em relação ao grau de agressividade das neoplasias astrocitárias

5.3.10 Ki-67

A associação entre os resultados da expressão imunoistoquímica demonstraram diferenças estatisticamente significantes em relação ao grau de agressividade das neoplasias gliais ($p < 0.0001$). Todos os casos de tecido cerebral ou com gliose foram negativos. Já os gliomas de baixo grau exibiram score 1 de Ki-67 em 21 dos 50 (42%) casos, enquanto o score 2 não foi observado. Apenas 5 casos apresentaram score 2 de marcação, todos eles correspondentes a gliomas de alto grau. Estes dados estão expostos na Tabela 23 e Figura 27.

Tabela 23 - Correlação entre a expressão de Ki-67 e o grau de agressividade das neoplasias astrocitárias

Ki-67	Grau de agressividade das neoplasias			Total	Valor de p
	Não neoplásico	Baixo grau	Alto grau		
0	30 (100%)	29 (58%)	44 (41,1%)	103 (55%)	<0.0001
1	0	21 (42%)	58 (54,2%)	79 (42,2%)	
2	0	0	5 (4,7%)	5 (2,6%)	
Total	30 (100%)	50 (100%)	107 (100%)	187	



Legenda: 0= negativo; 1= positivo em até 10% das células neoplásicas, 2= positivo entre 10 a 20% das células neoplásicas.

Figura 27 - Gráfico referente à porcentagem de casos com expressão positiva para Ki-67 em relação ao grau de agressividade das neoplasias glias

5.4 CORRELAÇÕES ENTRE OS MARCADORES DE IMUNOISTOQUÍMICA NAS NEOPLASIAS GLIAIS

Muitos marcadores imunoistoquímicos apresentaram correlação entre suas expressões proteicas, ora diretamente, ora inversamente significativa. Enquanto que outros não apresentaram correlação significativa entre eles, especialmente com as expressões de PTEN e o Ki-67. Estes dados estão expostos na Tabela 25.

Observamos que existe associação diretamente significativa entre a expressão de p53 com quase todos os marcadores imunoistoquímicos, com exceção do PTEN, cuja associação não apresentou significância, e do MGMT, cuja correlação foi inversamente significativa ($p < 0.03$).

Observamos que existe correlação diretamente significativa entre as expressões de EGFR e WT-1 ($p < 0.0001$), Nestina ($p = 0.04$), Topoisomerase II α ($p = 0.02$). Enquanto que a associação entre as expressões de EGFR e MGMT foi inversamente significativa ($p = 0.0007$). Não observamos correlação significativa entre as expressões de EGFR e de ATM, PTEN e Ki-67.

No marcador p16 podemos observar a correlação direta e significativa entre a sua expressão e a dos marcadores WT-1 ($p = 0.03$), ATM ($p < 0.0001$), Topoisomerase II α ($p < 0.0001$) e Nestina ($p = 0.008$). A associação entre as expressões de p16 e de MGMT, PTEN e Ki-67 não foi significativa.

A correlação existente entre as expressões de WT-1 e de ATM ($p = 0.0003$), Nestina ($p < 0.0001$), Topoisomerase II α ($p < 0.0001$) e Ki-67 ($p = 0.001$) foram diretamente significativas. Enquanto que a correlação entre as expressões de WT-1 e MGMT foi inversamente significativa ($p = 0.0004$). Assim como os outros marcadores

acima descritos não houve correlação significativa entre as expressões de WT-1 e de PTEN.

A expressão de ATM foi diretamente significativa com a de Nestina ($p=0.001$) e de Topoisomerase II α ($p<0.0001$). A associação entre as expressões de ATM e de MGMT, PTEN e Ki-67 não foi significativa.

Podemos observar que a associação entre a expressão de Nestina foi diretamente significativa em relação a expressão de Topoisomerase II α ($p=0,002$) e de Ki-67 ($p<0.0003$). Já a correlação entre a expressão de Nestina e de MGMT foi inversamente significativa ($p<0,0003$). Novamente, não observamos correlação significativa entre as expressões do marcador em questão e de PTEN.

Existe uma correlação diretamente significativa entre a expressão de Topoisomerase II α e de Ki-67 ($p=0.0001$). Não houve correlação significativa entre a expressão de Topoisomerase II α e a de PTEN, assim como a de MGMT.

Não houve correlação significativa entre a expressão de MGMT e as de PTEN e de Ki-67, assim como a correlação entre as expressões proteicas de PTEN e Ki-67.

Tabela 24 - Correlação entre a expressão de cada proteína estudada nas neoplasias gliais

p53	p53									
EGFR	0,005	EGFR								
p16	0,0001	NS	p16							
WT1	0,001	<0,0001	0,03	WT1						
ATM	0,02	NS	<0,0001	0,0003	ATM					
Nestina	0,01	0,04	0,008	<0,0001	0,001	Nestina				
Topoisomerase	0,0001	0,02	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,002	Topoisomerase			
MGMT	0,03	0,0007	NS	0,0004	NS	0,0003	NS	MGMT		
PTEN	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	PTEN	
Ki-67	0,02	NS	NS	0,001	NS	0,0003	0,0001	NS	NS	Ki-67

Legenda: NS= não significativo; correlação diretamente significativa em **preto**; correlação inversamente significativa em **vermelho**

6 DISCUSSÃO

Nos últimos anos muitos pesquisadores têm estudado a relação de marcadores relacionados ao ciclo celular em neoplasias gliais, com a finalidade de se determinar o comportamento biológico do tumor. Os mais utilizados são Ki-67, p53, p16 (YUE et al. 2009; OHGAKI e KLEIHUES 2009; ARSHAD et al. 2010). Outros marcadores estão relacionados aos receptores celulares da família Tirosino-quinase, como o EGFR (GRZMIL e HEMMINGS 2010). O MGMT é um gene de reparo do DNA que em lesões tratadas com o uso de agentes alquilantes, restabelece o estado intacto do DNA. Muitos estudos procuram avaliar o estado de metilação do promotor do gene MGMT (CHRISTMANN et al. 2010; BALAÑA et al. 2011). Genes supressores tumorais como o WT-1 e o PTEN também apresentam um papel na tumorigênese dos Gliomas (SCHITTENHELM et al. 2008; GRZMIL e HEMMINGS 2010). A Nestina é uma proteína do grupo dos filamentos intermediários do citoesqueleto que têm sido descrita em tumores do Sistema nervoso central (ALMQVIST et al. 2002). A Topoisomerase II α tem sido considerada um marcador de proliferação celular, em várias neoplasias humanas, inclusive neoplasias gliais (HOLDEN e TOWNSEND 1999; FARIA et al. 2006; ARAI et al. 2012). A proteína ATM está relacionada ao reparo do DNA, sendo ativada após algum dano em vários tumores, na tentativa de se interromper o ciclo celular (BARTKOVA et al. 2005).

6.1 p53

Essa proteína regula a progressão do ciclo celular e a apoptose em resposta a uma variedade de danos ao DNA. A mutação de seu gene TP53 está relacionada principalmente a evolução de gliomas de baixo grau, ou Astrocitomas anaplásicos para Glioblastomas secundários (WATANABE et al. 1996; FULLER e PERRY 2005). A concordância entre as mutações de TP53 e a expressão proteica de p53 apresenta uma sensibilidade e especificidade de 90 e 100%, respectivamente (PERAUD et al. 2002).

O nosso estudo apresentou maior expressão de p53 nos gliomas de alto grau, 41,1% de Glioblastomas e 43,8% de Astrocitomas Anaplásicos, enquanto que 27,7% de Astrocitomas difusos foram positivos para p53. Esses achados corroboram com outros estudos que apresentaram maior expressão de p53 em Glioblastomas multiformes (ARSHAD et al. 2010), embora tenhamos observado uma porcentagem um pouco maior de casos de Astrocitomas anaplásicos positivos. Isso provavelmente se deve a nossa amostra de tumores ser bastante heterogênea, sendo composta por um grande número de Gliomas grau IV e poucos casos de Gliomas grau III. Deve-se levar em consideração o tipo de Glioblastoma, secundário ou *de novo*, visto que apenas os secundários tendem a apresentar aumento da expressão de p53 (GRZMIL e HEMMINGS 2010). Nós não tínhamos esses dados referentes ao subtipo histológico. Uma amostra composta por grande quantidade de Glioblastomas *de novo*, poderia interferir nos resultados. Outro fator que pode ter interferido para termos uma maior porcentagem de Astrocitomas anaplásicos positivos é a idade do paciente. Alguns estudos inferem que a mutação do p53 não está relacionada a gliomagenese em

pacientes pediátricos, notando-se a imunoreatividade de p53 em apenas 16% dos casos de gliomas de alto grau deste grupo de pacientes (LITOFISKY et al. 1994; RASHEED et al. 1994). No nosso estudo não tínhamos informações clínicas quanto a idade dos pacientes, não podendo afastar a possibilidade de pacientes pediátricos na amostra.

Nossos resultados mostraram que p53 é um marcador de progressão tumoral ($p < 0.0001$). Esses dados mostram-se de acordo com alguns estudos, os quais encontraram associação entre a presença de TP53 e progressão tumoral (ISHII et al. 1999). SARKAR et al. (2002) observaram maior expressão de p53 nos Astrocitomas difusos que posteriormente progrediriam para Glioblastomas multiformes ou Astrocitomas Anaplásicos, do que nas neoplasias gliais que não progrediriam para graus histológicos mais altos, sugerindo um possível papel da mutação de TP53 na progressão tumoral.

Assim como outros estudos não observamos positividade de p53 em Astrocitomas pilocíticos. BELIRGEN et al. (2012) alem uma amostra de 52 casos encontrou positividade somente em um caso e não encontraram relação entre a expressão de p53 e taxas de sobrevidas dos pacientes. No nosso estudo, não analisamos a sobrevida dos pacientes. Para estas análises, novos estudos seriam necessários.

Observamos que existe associação diretamente significativa entre as expressões de p53 e de Ki-67 em toda a amostra. Esses dados corroboram com USHIO et al (2003) e SENGUPTA et al. (2012) que também encontraram essa correlação, embora fossem compostos por uma amostra mais homogênea, pacientes de uma mesma faixa etária ou envolvendo somente um grau histológico.

6.2 EGFR

As principais alterações encontradas em neoplasias gliais relacionadas a via do EGFR são a superexpressão proteica e a amplificação do gene EGFR. Nos Glioblastomas, a amplificação do gene pode ser encontrada em até 60% dos casos, especialmente nos primários (TORP et al. 1991; TORP et al. 1991). Alguns autores afirmam existir uma boa correlação entre a amplificação do gene e a expressão de EGFR, enquanto outros registraram correlação apenas entre uma forte marcação imunoistoquímica e a amplificação gênica, não havendo correlação nos casos fracamente positivos (EKSTRAND et al. 1991; FIGARELLA et al. 2011). No nosso estudo utilizamos apenas imunoistoquímica. Dos 95 casos, apenas 36 (37,9%) foram positivos (score 2 ou 3). Uma possível explicação para esse achado, diz respeito aos subtipos de Glioblastoma, primário ou secundário, e a idade dos pacientes, visto que a amplificação de EGFR está relacionada aos primários e a pacientes mais velhos (idade > 60 anos) (GLADSON et al. 2010). Os Glioblastomas pediátricos não apresentam amplificação de EGFR, ou se encontrada, envolve poucos casos (SURI et al. 2009). No nosso estudo, não levamos em consideração esses dados, logo existe a possibilidade de termos grande número de pacientes mais jovens e com neoplasias secundárias, o que explicaria a menor a porcentagem de casos positivos para EGFR em relação a outros estudos.

A expressão de EGFR parece manter uma relação com os graus histológicos das neoplasias glias, sendo maior no Gliomas de alto grau. Nosso estudo, esses achados foram significativos. Nenhum caso de tecido não neoplásico, assim como os Astrocitomas pilocíticos foram positivos. Apenas 11 (16,7%) dos de 66 casos de

Gliomas grau II foram positivos, enquanto que 4 casos (25%) dos 16 de Astrocitomas anaplásicos foram positivos. Nos Gliomas grau IV, 36 (37,9%) apresentaram imunopositividade. Esses dados são concordantes com outros estudos que exibiram positividade em 75% do Glioblastomas, 50% dos Astrocitomas anaplásicos e 25% dos Gliomas grau II (GUILLAUDEAU et al. 2009). Já AMBROISE et al. (2010) demonstrou maior positividade de EGFR nos Astrocitomas Anaplásicos (40%) do que nos Glioblastomas (36,1%). No entanto apenas 20% dos Astrocitomas difusos foram positivos, corroborando com a hipótese de aumento da expressão de EGFR paralelamente aos graus histológicos, com altos níveis de expressão proteica em Gliomas de alto grau e baixos níveis de expressão proteica em baixo grau.

6.3 p16

A análise imunoistoquímica de proteínas reguladoras do ciclo celular tem sido amplamente estudada. Como consequência de alterações no gene p16, sinais que habitualmente regulam negativamente a progressão do ciclo celular são perdidos, resultando na proliferação descontrolada das células. As principais alterações gênicas são a deleção do gene p16 que pode ser encontrada em 30-60% dos casos de Glioblastoma e mutações de p16, embora essa seja muito menos frequente (BIERNAT et al. 1997; GLADSON et al. 2010). O padrão genotípico frequentemente corresponde aos achados imunoistoquímicos (PIVA et al. 1998).

No nosso estudo, percebemos que 72,6% dos casos de Glioblastomas foram negativos para p16, enquanto que 62,5% dos casos de Astrocitomas anaplásicos e

69,5% dos casos de Gliomas grau 2 foram negativos. Essa perda de expressão entre os graus histológicos foi estatisticamente significativa ($p < 0.0001$). Esses casos corroboram com a literatura, que demonstra perda da expressão de p16 conforme o aumento do grau da neoplasia (RANUNCOLO et al. 2004). KIRLA et al. (2000) realizou um estudo para avaliação imunoistoquímica de p16 em Gliomas de alto grau e detectou que 16% dos Astrocitomas anaplásicos e 42% do Glioblastomas perderam suas expressões.

Quanto aos Gliomas de baixo grau, existem poucos estudos com relação a expressão de p16. Alguns deles demonstraram grande perda de expressão em até 66,7% dos Astrocitomas pilocíticos (BELIRGEN et al. 2012). HILTON et al. (2002) demonstraram uma perda de expressão de p16 em apenas 5% dos casos. Em ambos os estudos, a associação entre a perda de expressão e a sobrevida do paciente não foi estatisticamente significativa, sugerindo que alterações no gene 16 estão relacionadas apenas aos Astrocitomas de alto grau. No nosso estudo, não tínhamos dados de sobrevida do paciente e seriam necessários novos estudos para a elucidação. Essa discrepância entre os trabalhos diz respeito às metodologias empregadas. Enquanto HILTON et al. (2002) determinaram o índice de expressão de p16, obtido através da contagem do número de células positivas em 1000 células contadas, BELIRGEN et al. (2012) estudaram apenas a expressão de p16, sendo considerados negativos, os casos sem marcação imunoistoquímica ou com pequenos focos de positividade. Portanto, um caso com pequeno foco de marcação seria considerado negativo pelo segundo autor e positivo, mas com baixo o índice de expressão, pelo primeiro autor. Provavelmente esse foi um dos motivos responsáveis pela imunonegatividade de todos os casos de tecidos não neoplásicos no nosso estudo. Muitos deles, embora

com marcação, esta se demonstrava fraca e focal (menos de 5%), sendo considerados negativos pela nossa metodologia. Além disso, acreditamos que as células gliais apresentem baixa atividade proliferativa, conseqüentemente grande parte das proteínas relacionadas ao ciclo celular estariam inativas. Já em um processo neoplásico, muitas delas se ativariam, como o p16, e os gliomas com perda de p16 tenderiam a ter uma maior agressividade.

No nosso estudo não houve correlação entre o índice de proliferação Ki-67 e a imunoexpressão de p16, corroborando com outros estudos (PIVA et al. 1998; KIRLA et al. 2000). Já ONO et al. (1996) observaram correlação entre os marcadores. Nos Astrocitomas com deleção de p16 observou-se maior índice proliferativo de Ki-67. O autor sugere que ou a deleção de p16 induz maior proliferação celular, ou esse maior índice proliferativo é reflexo de um Glioblastoma, p16 negativo, um subtipo de neoplasia caracterizada por um rápido crescimento e pior prognóstico.

6.4 MGMT

Na última década, o silenciamento epigenético de MGMT através da metilação de seu promotor tem apresentado uma forte relação com a resposta quimioterápica em Gliomas. Alguns agentes alquilantes promovem a morte celular, formando grandes quantidades de O⁶-metilguanina que por exceder a capacidade dos sistemas de reparo do DNA, induz a apoptose celular (HEGI et al. 2005). Essa possibilidade ficou mais evidente quando se demonstrou que o aumento do conteúdo tecidual da proteína *MGMT*, rapidamente corrige esses danos causados pela

quimioterapia e como consequência, aumenta a resistência a essas drogas (HEGI et al. 2005).

A maioria dos estudos envolvendo MGMT e Gliomas diz respeito as metodologias empregadas para se detectar o status de metilação de MGMT, enquanto que outros correlacionam o status com a sobrevida dos pacientes (BRELL et al. 2005; RODRIGUEZ et al. 2008; CHRISTMANN et al. 2010, BALAÑA et al. 2011). O método de escolha para a avaliação do status de metilação de MGMT é através da Reação em Cadeia da Polimerase Metilação-específica (MS-PCR) (HEGI et al. 2005), entretanto métodos alternativos, mais fáceis e de menor custo como a imunohistoquímica, têm sido empregados com a finalidade de se determinar a expressão proteica de MGMT (MCLENDON et al. 1998).

Muitos estudos concluíram não haver correlação significativa entre a determinação da expressão de MGMT e o status de metilação de MGMT (RODRIGUEZ et al. 2008, BRELL et al. 2005), visto que a sua expressão sofre influências de outros fatores, como o status de p53 e a dificuldade em se analisar a expressão de MGMT, especialmente na distinção entre células neoplásicas e não neoplásicas como células gliais, microgliais, endoteliais e linfócitos. Tumores sem mutações de p53 tendem a apresentar baixos níveis proteicos de MGMT independentemente do status de metilação do promotor de MGMT (LOTFI et al. 2011). Nós utilizamos apenas a imunohistoquímica na avaliação dos casos, portanto seriam necessárias novas investigações, para determinação da correlação entre os diferentes métodos de avaliação de MGMT em gliomas.

No nosso estudo observamos a perda progressiva da expressão de MGMT conforme o grau histológico. Dos 29 casos não neoplásicos, 15 (51,7%) foram

positivos. Nos casos de Astrocitomas pilocíticos 5 de 32 (13,5%) foram positivos. Nos Gliomas grau 2 a expressão deste marcador foi observada em apenas 11 casos dos 55 (16,6%) casos estudados. Em relação aos Gliomas grau 3, apenas 2 casos do total de 17 (11,7%) foram positivos e somente 5 casos do total de 92 (5,4%) dos Glioblastomas expressaram MGMT.

GROENENDIJK et al. (2011) demonstraram que a metilação do gene promotor de MGMT não está restrita aos Gliomas de alto grau, e deveria ser considerada como um evento inicial durante a progressão tumoral. Eles encontraram hipermetilação de MGMT em 58% dos casos Astrocitomas grau 2, semelhantes a outros estudos que demonstraram ou hipermetilação ou imunonegatividade de MGMT em 48, 63 e 68% dos casos. Contudo os autores chamam novamente a atenção quanto a avaliação de MGMT através de imunoistoquímica pelos motivos acima citados. No nosso estudo observamos uma baixa expressão (16,6%) comparada a esses trabalhos, mas devemos levar em consideração que todos apresentavam uma amostra composta exclusivamente por Astrocitomas grau II, enquanto que a nossa amostra era composta por Astrocitomas difusos, Astrocitomas gemistocíticos e Oligodendrogliomas, portanto, uma amostra mais heterogênea que pode ter interferido nos resultados. Além disso, os estudos utilizaram dois métodos para definição do status de MGMT, enquanto nós avaliamos somente por imunoistoquímica.

BRELL et al. (2005) realizou um estudo para a avaliação do prognóstico dos pacientes com ou sem metilação de MGMT, determinada ou por PCR ou por imunoistoquímica. Nos seus resultados, 54,8% dos casos exibiram imunopositividade acima do valor por nós encontrado, 11,7%. Novamente os autores alertam para os

problemas que envolvem a interpretação imunoistoquímica de MGMT. Outro fator que pode ter interferido nos diferentes resultados encontrados é a amostra de cada trabalho. Enquanto a nossa era composta por apenas 16 casos, todos Astrocitomas Anaplásicos, a deles era composta por 93 casos, representada por Astrocitomas Anaplásicos, Oligodendrogliomas Anaplásicos e Oligoastrocitomas anaplásicos.

A nossa amostra de Glioblastomas era composta por 92 casos e apenas 5 (5,4%) expressaram MGMT. Esse achado é corroborado com valores descritos na literatura, que variam entre 56-70% (RODRIGUEZ et al. 2008; UNO et al. 2011).

A correlação entre as expressões de p53 e MGMT foi inversamente significativa ($p < 0.003$) na amostra total. Os casos de gliomas, p53 positivos, tendem a ser MGMT negativos. LOTFI et al. (2011) estudou a relação entre as expressões de MGMT e p53 em Glioblastomas e seus possíveis mecanismos regulatórios e também encontrou significância nos seus resultados. Nos casos com mutação de p53, a expressão de MGMT é menor ou ausente. Para os autores, o possível mecanismo envolve inicialmente um aumento da regulação de p53 que leva a uma diminuição da regulação de MGMT. A expressão de MGMT é diminuída ainda mais pela hipermetilação do gene promotor de MGMT durante a progressão dos Glioblastomas. Isso leva gradualmente a mutação de p53 nas células.

6.5 WT-1

Estudos têm demonstrado que a proteína WT-1 é super expressa em gliomas e mostra-se ausente em células gliais reativas ou normais (CLARK et al. 2007). Além disso, observa-se um aumento da expressão de WT-1 conforme o grau de

malignidade da neoplasia (OKA et al. 2008). Outros estudos demonstram correlação entre as expressões de WT-1 e índice Ki-67 (HASHIBA et al. 2007).

A expressão do WT1 foi observada no citoplasma das células neoplásicas, sendo 134 (54,7%) casos classificados como positivos e 111 (45,3%) como negativos. A marcação citoplasmática de WT-1, e não nuclear, corresponde aos achados da literatura, que inclusive já detectaram a presença de WT-1 no citoplasma por PCR (NAKATSUKA et al. 2006; SCHITTENHELM et al. 2008). A expressão imunohistoquímica deste marcador demonstrou diferenças estatisticamente significantes em relação aos subtipos e graus histológicos das neoplasias estudadas ($p < 0,0001$). A expressão de WT-1 foi frequentemente encontrada nos Glioblastomas, sendo considerados positivos 83 casos de 96 (86,45%) estudados. Nos Astrocitomas graus I e II, a expressão foi de 13,1% e 23,1%, respectivamente. Todos os casos normais ou de gliose foram negativos para este marcador. No grupo dos Astrocitomas Anaplásicos 7 (43,8%) casos foram positivos para WT1. Esses achados estão estritamente de acordo com SCHITTENHELM et al. (2008). Nesse estudo, cuja amostra era composta de casos neoplásicos e não neoplásicos, não observou-se expressão nas células gliais normais ou reativas, sendo visualizada marcação apenas nas paredes dos vasos sanguíneos. Já a expressão de WT-1 em Astrocitomas foi positiva em 185 casos (84,5%). Houve diferenças estatisticamente significantes entre a positividade encontrada no grupo dos Astrocitomas em relação ao grupo não tumoral. RUSHING et al. (2010) mostraram que os Glioblastomas e os Astrocitomas anaplásicos apresentaram altos níveis de WT-1 e aumento marcante da expressão em relação aos Gliomas de baixo grau. Esses dados tiveram significância estatística. Assim como o nosso estudo que demonstrou imunopositividade em 90 dos 112 casos

(80,4%) de Gliomas de alto grau. No entanto, os gliomas de baixo grau apresentaram apenas 21 casos positivos do total de 103 (20,4%). Esses dados tiveram significância estatística ($p < 0.0001$).

Outra questão debatida em trabalhos recentes diz respeito à associação de WT-1 com outros marcadores, especialmente Ki-67 e Nestina. No nosso estudo observamos que existe correlação diretamente significativa entre a marcação de WT-1 e de Nestina em toda amostra. Esses dados corroboram com o único estudo encontrado na literatura (RUSHING et al. 2010), entretanto novas investigações seriam necessárias para esclarecer os mecanismos associados a esta correlação.

Houve associação diretamente significativa entre as expressões de WT-1 e Ki-67, de acordo com dados de outros trabalhos (HASHIBA et al. 2007; RUSHING et al. 2010). A possível explicação para esse achado diz respeito ao grau histológico das neoplasias. Os gliomas de alto grau apresentam maiores índices mitóticos, consequentemente, maior índice Ki-67, e demonstram maior expressão e com maior intensidade de WT-1 em relação ao Gliomas de baixo grau.

6.6 Ki-67

A análise da atividade proliferativa é uma forma de termos uma idéia da biologia tumoral. O método mais utilizado é através do estudo do anticorpo Ki-67/MIB-1, que demonstra um poder prognóstico e diagnóstico em neoplasias gliais. Contudo, o uso desse marcador é dificultado por falta de padronização de interpretação e dos procedimentos imunoistoquímicos, com grande variação entre os

diferentes laboratórios e sobreposição entre os diferentes graus histológicos (PRAYSON 2005; JOHANNESSEN e TORP 2006).

No nosso estudo as diferenças de expressão foram estatisticamente significantes entre os grupos em estudo. A expressão de Ki-67 foi encontrada somente nos tecidos neoplásicos, nenhum caso de tecido cerebral ou de gliose foi positivo para Ki-67. O índice de Ki-67 foi determinado de acordo com a porcentagem de células positivas. Houve um aumento significativo do índice Ki-67 de acordo com o grau histológico, corroborando com outros estudos (ENESTRÖM et al. 1998; GIANNINI et al. 1999; FARIA et al. 2006; JOHANNESSEN e TORP 2006). JOHANNESSEN e TORP (2006) realizou um estudo de revisão de 16 trabalhos envolvendo Ki-67 e gliomas, e constatou uma média de valores em Astrocitomas grau 2, Astrocitomas grau 3 e Glioblastomas multiformes de 3% , 11,8% e 16%, respectivamente. No nosso estudo não tivemos nenhum casos de Astrocitomas pilocíticos, assim como de Gliomas grau 2 com marcação para Ki-67 entre 10-20% das células. Os Astrocitomas pilocíticos apresentaram marcação de Ki-67 em até 10% das células em 9 dos 37 casos (24,3%), nos Gliomas grau 2, esta positividade foi encontrada em 23 dos 62 (37,1%). Positividade para Ki-67 entre 10 a 20% das células foi encontrada somente nos Gliomas grau 3 e 4, 12,5% e 3% respectivamente. Quanto a marcação em até 10% das células, nos Gliomas grau 3 esta marcação foi observada em 9 de 16 (56,25%) casos e nos grau 4 esta marcação foi encontrada em 49 de 91 (53,84%) casos. Para se fazer a média dos valores obtidos, precisaríamos de novos estudos, mas conseguimos observar um nítido aumento do índice Ki-67 de acordo com o grau de agressividade das neoplasias. O motivo para uma maior porcentagem de casos graduados como Gliomas grau III em

relação aos Glioblastomas multiformes, possivelmente diz respeito a diferenças do n das amostras, $n=16$ em Gliomas grau 3 e $n= 91$ em Glioblastomas. Para a confirmação dessa hipótese novos estudos seriam necessários. Outra hipótese a ser levantada é o fato de este estudo ter sido realizado em amostras tumorais dispostas em TMA, nesse tipo de estudo nós avaliamos apenas uma área focal do tumor, que histologicamente apresentava os critérios de malignidade, mas pode ter prejudicado na avaliação do índice Ki-67, por não representar a área de “hot-spot”. KROS et al. (2011) alerta para o uso do índice Ki-67, demonstrando casos de Astrocitomas difusos com índice Ki-67 de 20%, e Gliomas de alto grau, com atipias nucleares marcantes sem expressão de Ki-67.

Quando agrupamos os tipos histológicos quanto ao grau de agressividade dos gliomas observamos associações estatisticamente significativas entre os resultados da expressão imunoistoquímica ($p<0.0001$). Os Gliomas de baixo grau exibiram escore 1 de Ki-67 em 32 dos 99 (32,3%) casos, enquanto o escore 2 não foi observado. Apenas 5 casos apresentaram escore 2 de marcação, todos eles correspondentes a Gliomas de alto grau. Esses achados corroboram com outros estudos (JOHANNESSEN e TORP 2006; ARSHAD et al. 2010, SENGUPTA et al. 2012). JOHANNESSEN e TORP (2006), nessa mesma revisão, também observaram diferenças estatisticamente significantes entre os índices encontrados nos Gliomas de baixo e Alto grau, apesar de se observar sobreposição entre os valores de Ki-67 entre os diferentes graus histológicos. Os autores deste artigo de revisão compararam estudos e encontraram média de índice de Ki-67 variando entre 9,12% a 24,3%. Determinados valores referentes ao grupo dos Glioblastomas em alguns estudos eram tão baixo como os valores de Astrocitomas grau II em outros estudos, indicando que

o valor de Ki-67 não pode ser usado sozinho como ferramenta diagnóstica (HSU et al. 1997; ENESTRÖM et al. 1998). Essa variabilidade entre os índices, os *cut-offs*, os limites de Ki-67 dos diferentes trabalhos, indica a necessidade de cautela ao se utilizar esse marcador como ferramenta diagnóstica ou prognóstica (PRAYSON 2005). Por essa razão a OMS não incluiu o índice Ki-67 como critério para graduação dos Gliomas. Quando nos depararmos com um tumor histologicamente classificado como um Astrocitoma difuso, mas que apresenta um alto índice Ki-67, sugere-se a inclusão de uma nota relatando esse alto índice proliferativo, mas de forma alguma alterar o grau da neoplasia (TREMBATH et al. 2008).

6.7 NESTINA

Os estudos encontrados na literatura demonstram a expressão de Nestina em neoplasias cerebrais, e o aumento da expressão conforme os graus histológicos, especialmente nos Gliomas de alto grau (ALMQVIST et al. 2002; CHINNAIYAN et al. 2008; RUSHING et al. 2010; KITAI et al. 2010; ARAI et al. 2012).

As correlação entre os resultados da expressão imunoistoquímica da Nestina demonstraram diferenças estatisticamente significantes entre os subtipos histológicos ($p < 0.0001$). As porcentagens de casos positivos e negativos foram equivalentes, 55,3% e 44,7 %, respectivamente. A expressão de Nestina apresentou um aumento gradativo em relação aos graus histológicos, sendo positivos 23,68 % dos Gliomas grau 1, 58,82% dos Gliomas grau 2, 76,47% dos Gliomas grau 3 e 80,21% dos Gliomas grau 4. Além disso, os escores obtidos nos Gliomas de baixo grau foram escores baixos em relação aos encontrados nos Gliomas de alto grau, geralmente

escores 4 a 6. Esses achados correlacionam com os dados de estudos prévios. KITAI et al. (2010) observaram maior positividade de Nestina em Glioblastomas e Astrocitomas Anaplásicos, e a intensidade da marcação se correlacionou com o grau histológico. Os gliomas de baixo grau apresentaram imunopositividade, entretanto, representada por uma marcação focal e fraca. CHINNAIYAN et al. (2008) realizaram um estudo somente com Glioblastomas e encontraram padrões diferentes de marcação quanto a intensidade e a porcentagem de células positivas, mas não acharam diferenças estatisticamente significativas quanto a sobrevida dos pacientes. Além disso, acreditam que novos estudos com Gliomas de baixo grau poderiam determinar o possível papel da Nestina como marcador prognóstico.

A correlação entre os resultados da expressão imunoistoquímica de Nestina e o grau de agressividade dos gliomas demonstraram diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.0001$). A maioria dos casos de gliomas de alto grau foram positivos para Nestina. A expressão deste marcador foi observada em 86 dos 112 casos (80,4%). Já dos 106 casos de gliomas de baixo grau, apenas 49 foram positivos (46,2%). RUSHING et al. (2010) demonstraram forte expressão de Nestina em gliomas de alto grau, enquanto que nos gliomas de baixo grau a marcação foi mais delicada. ARAI et al. (2010) encontraram uma forte imunopositividade em Gliomas de alto grau, 61 dos 64 casos, e a expressão de Nestina foi significativamente maior em Glioblastomas em relação aos outros 3 graus histológicos. Eles concluem que a Nestina é um ótimo marcador para auxiliar no diagnóstico de Gliomas de alto grau.

6.8 TOPOISOMERASE II α

Geralmente a progressão, o grau de malignidade de uma neoplasia se correlaciona com o seu índice de proliferação. Nos últimos anos, a necessidade de se descobrir novos marcadores com essa finalidade tem sido o motivo de vários estudos. A Topoisomerase II α tem se tornado uma alternativa para a determinação da atividade proliferativa nos Astrocitomas (BREDEL et al. 2002). Os estudos recentes afirmam que a sua expressão tende a se correlacionar com o índice Ki-67 e a aumentar conforme o grau histológico da neoplasia (HOLDEN e TOWNSEND 1999; BREDEL et al. 2002).

No nosso estudo a expressão de Topoisomerase II α apresentou diferenças estatisticamente significantes entre os subtipos histológicos. Cerca de 79,9% dos casos foram negativos para este marcador e somente 50 casos foram positivos (20,1%). Dentre os casos positivos, 38 (76%) correspondiam aos Glioblastomas multiformes. Apenas 6 casos de Gliomas grau 2 e de Gliomas grau 3 foram positivos para Topoisomerase II α . Esses achados correlacionam-se com Holden e Townsend (1999), que encontraram aumento da expressão de acordo com o grau histológico dos gliomas e discordam de TANIGUCHI et al. (1999) e de KORKOLOPOULOU et al. (2001), esses só obtiveram uma correlação significativa após agrupar os Gliomas grau 2 e grau 3, nesse caso a expressão proteica foi maior nos Glioblastomas do que nos Gliomas grau 2 e grau 3 agrupados. Deve-se levar em consideração que embora esse estudo tenha alcançado uma correlação estatisticamente significativas entre as variáveis, isso só foi possível após o agrupamento de Gliomas de baixo grau, grau 2 histológico e de Alto grau, grau 3 histológico.

TANIGUCHI et al. (1999), embora não tenham observado aumento da imunopositividade de Topoisomerase II α de acordo com os graus histológicos, encontraram diferenças significativas entre os Gliomas de baixo e alto grau. Esses achados corroboram com o nosso estudo, no qual, dos 50 casos positivos, 44 eram Gliomas de alto grau e somente 6 eram Gliomas de baixo grau.

Em estudos prévios a correlação entre as expressões de Ki-67 e de Topoisomerase II α foi significativa e positiva. O índice proliferativo Ki-67 foi maior que o índice proliferativo Topoisomerase II α (HOLDEN e TOWNSEND 1999; KORKOLOPOULOU et al. 2001; BREDEL et al. 2002). Enquanto a expressão de Ki-67 é encontrada nas fases G₁, S, G₂, e M do ciclo celular, a Topoisomerase II α é encontrada nas fases S, G₂, M. Talvez esse seja o motivo pelo qual o índice proliferativo Ki-67 ser maior que o índice proliferativo Topoisomerase II α . No nosso estudo obtivemos apenas o índice proliferativo de Ki-67, enquanto que a expressão de Topoisomerase II α foi baseada apenas na imunopositividade do marcador, tendo como *cut-off*, um valor de 5% das células. Novos estudos seriam necessários para investigarmos a relação entre os índices proliferativos.

6.9 PTEN

Receptores Tirosina-quinases hiperativos e alterações nas suas vias de regulação como a PI3K/AKT não só estimulam o crescimento como criam mecanismos anti-apoptóticos nas células tumorais gliais (GRZMIL et al. 2010) PTEN é um gene supressor tumoral que antagoniza diretamente a atividade de PI3K, diminuindo esses efeitos. Contudo PTEN mostra-se inativo em uma variedade de

tumores. Ele mostra inativo em cerca de 50% dos tumores cerebrais de alto grau em virtude de mutações, deleções ou mecanismos epigenéticos. Já em gliomas de baixo grau, alterações em PTEN são mais raras, sugerindo ter um papel relevante na progressão tumoral e não no início do processo neoplásico (OHGAKI et al. 2004; KOUL 2008). Outros artigos inferem que a via PTEN-AKT íntegra seria necessária para uma boa resposta clínica ao uso terapêutico de inibidores de receptores Tirosina-quinases (YIP et al. 2008).

Na literatura existem muitos trabalhos que estudam o perfil de PTEN em gliomas, através de estudos moleculares como FISH ou PCR (SURI et al. 2009; GRZMIL et al. 2010), ou então através de estudo imunoistoquímico (BELIRGEN et al. 2012). Já outros estudos utilizam os dois métodos, obtendo-se uma boa correlação entre eles (SANO et al. 1999). BAEZA et al. (2003) observaram que as mutações de PTEN, perda de PTEN e metilação do seu promotor, não correspondem a expressão protéica de PTEN obtida através de imunoistoquímica.

No nosso estudo utilizamos apenas a imunoistoquímica. A marcação de PTEN foi rara e fraca em toda a amostra, sendo que apenas 8 casos foram positivos, 6 deles em tecidos cerebrais normais e 2 em Glioblastomas. Observamos a perda da expressão de PTEN em todos os casos de Gliomas grau 1, grau 2 e grau 3. Estas diferenças de expressão foram estatisticamente significantes ($p < 0.0001$), provavelmente em virtude das diferenças de expressões entre o tecido normal e os Glioblastomas multiformes. As perdas de expressão de PTEN observada nas neoplasias gliais corroboram com dados prévios da literatura. BELIRGEN et al. (2012) observaram perda de expressão de PTEN em 66,7% dos casos de Astrocitomas pilocíticos. Já MCBRIDE et al. (2010), em um trabalho sobre Gliomas

grau 2, observaram a perda de PTEN em 70% da amostra. Em gliomas de alto grau a perda é maior do que nos de baixo grau e a perda tende a ser maior nos Glioblastomas. IDOATE et al. (2003) detectaram a perda de expressão de PTEN em 50% e 70% dos casos de Astrocitomas Anaplásicos e Glioblastomas multiformes, respectivamente. No nosso trabalho, todos os casos de Astrocitomas anaplásicos foram negativos (100%), enquanto que 2 casos de Glioblastomas multiformes foram positivos (97,9%). Provavelmente essa maior imunonegatividade em Gliomas grau 3 se deve ao tamanho da amostra, apenas 17 casos, já a amostra dos Glioblastomas era composta por 96 casos.

6.10 ATM

A proteína ATM responde ao dano do DNA, fosforilando substratos chaves envolvidos no mecanismo de reparo do DNA e/ou controle do ciclo celular. Em um estudo com câncer de bexiga, KASTAN e BARTEK (2004) observaram o aumento da expressão de Chk2, proteína regulada por ATM, de forma heterogênea e difusa em neoplasias iniciais, não invasivas, assim como em neoplasias mais avançadas, em estadios T2-T4, sugerindo que ATM possa estar ativado em tumores.

No nosso estudo observamos um aumento de casos positivos para ATM de acordo com o grau histológico. Os Glioblastomas multiformes e Astrocitomas anaplásicos mostraram grande frequência de casos positivos para este marcador, 35 em 96 (36,4%) e 5 em 16 (31,3%), respectivamente. A correlação entre os resultados de expressão imunoistoquímica em relação aos subtipos histológicos e aos graus histológicos demonstrou significância estatística ($p=0.0005$). SEOL et al. (2011)

apresentaram positividade para ATM em 50,9% dos casos de Glioblastomas multiformes, sendo que estes casos exibiram maior sobrevida.

A proteína ATM regula uma ampla variedade de proteínas, tais como, proteínas supressoras tumoral, entre elas a p53. No nosso estudo observamos que expressão de ATM foi diretamente significativa com a de p53 ($p=0,02$), assim como SEOL et al. (2011) que notaram a correlação de ATM com outras proteínas reguladoras do ciclo celular, p21, p27 e p53. Como ATM induz a parada do ciclo celular ou a apoptose em resposta aos agentes genotóxicos como a irradiação, esses resultados indicam que a manutenção da sinalização entre ATM e suas proteínas inibidoras melhoraria a resposta terapêutica aos agentes genotóxicos.

7 CONCLUSÕES

Os achados de nosso estudo permitem afirmar:

- 1- A expressão protéica de Nestina e WT-1 é mais frequentemente encontrada nos Glioblastomas multiformes em relação aos outros subtipos histológicos.
- 2- A perda da expressão de MGMT é mais comumente encontrada em Glioblastomas multiformes. Essa perda de expressão também é frequente nos astrocitomas de alto grau quando comparamos com os de baixo grau.
- 3- Os Astrocitomas de alto grau frequentemente expressam p53, EGFR, WT-1, Nestina, ATM e Topoisomerase em comparação aos de baixo grau e tecido não neoplásico. Essas diferenças são mais marcantes com WT-1 e Nestina.
- 4- O índice Ki-67 é maior nos Astrocitomas de alto grau quando comparados aos de baixo grau.
- 5- Há correlação positiva entre as expressões protéicas de p53, EGFR, WT-1, Topoisomerase II α e Nestina, e perda da expressão de MGMT nas amostras estudadas. O índice de Ki-67 se correlaciona com as expressões de p53, WT-1 e Nestina, enquanto que não se observa associação com a expressão de p16.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almqvist PM, Mah R, Lendahl U, Jacobsson B, Hendson G. Immunohistochemical detection of nestin in pediatric brain tumors. **J Histochem Cytochem** 2002; 50:147-58.

Ambroise MM, Khosla C, Ghosh M, Mallikarjuna VS, Annapurneswari S. The role of immunohistochemistry in predicting behavior of astrocytic tumors. **Asian Pac J Cancer Prev** 2010; 11:1079-84.

Arai H, Ikota H, Sugawara K, Nobusawa S, Hirato J, Nakazato Y. Nestin expression in brain tumors: its utility for pathological diagnosis and correlation with the prognosis of high-grade gliomas. **Brain Tumor Pathol** 2012; 29:160-7.

Argyriou AA, Kalofonos HP. Molecularly targeted therapies for malignant gliomas. **Mol Med** 2009; 15:115-22.

Arshad H, Ahmad Z, Hasan SH. Gliomas: correlation of histologic grade, Ki67 and p53 expression with patient survival. **Asian Pac J Cancer Prev** 2010; 11:1637-40.

Baeza N, Weller M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. PTEN methylation and expression in glioblastomas. **Acta Neuropathol** 2003; 106:479-85.

Balaña C, Carrato C, Ramírez JL, et al. Tumour and serum MGMT promoter methylation and protein expression in glioblastoma patients. **Clin Transl Oncol** 2011; 13:677-85.

Bartkova J, Horejsí Z, Koed K, et al DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. **Nature** 2005; 434:864-70.

Belirgen M, Berrak SG, Ozdag H, et al. Biologic tumor behavior in pilocytic astrocytomas. **Childs Nerv Syst** 2012; 28:375-89.

Biernat W, Tohma Y, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Alterations of cell cycle regulatory genes in primary (de novo) and secondary glioblastomas. **Acta Neuropathol** 1997; 94:303-9.

Bredel M, Piribauer M, Marosi C, et al High expression of DNA topoisomerase IIalpha and Ki-67 antigen is associated with prolonged survival in glioblastoma patients. **Eur J Cancer** 2002; 38:1343-7.

Brell M, Tortosa A, Verger E, et al. Prognostic significance of O6-methylguanine-DNA methyltransferase determined by promoter hypermethylation and immunohistochemical expression in anaplastic gliomas. **Clin Cancer Res** 2005; 11:5167-74.

Chinnaiyan P, Wang M, Rojiani AM, et al. The prognostic value of nestin expression in newly diagnosed glioblastoma: report from the Radiation Therapy Oncology Group. **Radiat Oncol** 2008; 3:32.

Christmann M, Nagel G, Horn S, et al. MGMT activity, promoter methylation and immunohistochemistry of pretreatment and recurrent malignant gliomas: a comparative study on astrocytoma and glioblastoma. **Int J Cancer** 2010; 127:2106-18.

Clark AJ, Dos Santos WG, McCready J, et al. Wilms tumor 1 expression in malignant gliomas and correlation of +KTS isoforms with p53 status. **J Neurosurg** 2007; 107:586-92.

Ekstrand AJ, James CD, Cavenee WK, Seliger B, Pettersson RF, Collins VP. Genes for epidermal growth factor receptor, transforming growth factor alpha, and epidermal growth factor and their expression in human gliomas in vivo. **Cancer Res** 1991; 51:2164-72.

Eneström S, Vavruch L, Frånlund B, Nordenskjöld B. Ki-67 antigen expression as a prognostic factor in primary and recurrent astrocytomas. **Neurochirurgie** 1998; 44:25-30.

Faria MH, Gonçalves BP, do Patrocínio RM, de Moraes-Filho MO, Rabenhorst SH. Expression of Ki-67, topoisomerase IIalpha and c-MYC in astrocytic tumors: correlation with the histopathological grade and proliferative status. **Neuropathology** 2006; 26:519-27.

Figarella-Branger D, Maues de Paula A, Colin C, Bouvier C. Histomolecular classification of adult diffuse gliomas: the diagnostic value of immunohistochemical markers. **Rev Neurol (Paris)** 2011; 167:683-90.

Fuller CE, Perry A. Molecular diagnostics in central nervous system tumors. **Adv Anat Pathol** 2005; 12:180-194.

Giannini C, Scheithauer BW, Burger PC, et al. Cellular proliferation in pilocytic and diffuse astrocytomas. **J Neuropathol Exp Neurol** 1999; 58:46-53.

Gladson CL, Prayson RA, Liu W. The pathobiology of glioma tumors. **Annu Rev Pathol** 2010; 5:33-50.

Groenendijk FH, Taal W, Dubbink HJ, et al. MGMT promoter hypermethylation is a frequent, early, and consistent event in astrocytoma progression, and not correlated with TP53 mutation. **J Neurooncol** 2011; 101:405-17.

Grzmil M, Hemmings BA. Deregulated signalling networks in human brain tumors. **Biochim Biophys Acta** 2010; 1804:476-83.

Guillaudeau A, Durand K, Pommepuy I, et al. Determination of EGFR status in gliomas: usefulness of immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization. **Appl Immunohistochem Mol Morphol** 2009; 17:220-6.

Habberstad AH, Gulati S, Torp SH. Evaluation of the proliferation markers Ki-67/MIB-1, mitotin, survivin, pHH3, and DNA topoisomerase II α in human anaplastic astrocytomas--an immunohistochemical study. **Diagn Pathol** 2011;6:43.

Hashiba T, Izumoto S, Kagawa N, et al. Expression of WT1 protein and correlation with cellular proliferation in glial tumors. **Neurol Med Chir (Tokyo)** 2007; 47:165-70.

Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. **N Engl J Med** 2005; 352:997-1003.

Hilton DA, Penney M, Evans B, Sanders H, Love S. Evaluation of molecular markers in low-grade diffuse astrocytomas: loss of p16 and retinoblastoma protein expression is associated with short survival. **Am J Surg Pathol** 2002; 26:472-8.

Holden JA, Townsend JJ. DNA topoisomerase II-alpha as a proliferation marker in astrocytic neoplasms of the central nervous system: correlation with MIB1 expression and patient survival. **Mod Pathol** 1999; 12:1094-100.

Hsu DW, Louis DN, Efird JT, Hedley-Whyte ET. Use of MIB-1 (Ki-67) immunoreactivity in differentiating grade II and grade III gliomas. **J Neuropathol Exp Neurol** 1997; 56:857-65.

Idoate MA, Soria E, Lozano MD, et al. PTEN protein expression correlates with PTEN gene molecular changes but not with VEGF expression in astrocytomas. **Diagn Mol Pathol** 2003; 12:160-5.

Ishii N, Tada M, Hamou MF, et al. Cells with TP53 mutations in low grade astrocytic tumors evolve clonally to malignancy and are an unfavorable prognostic factor. **Oncogene** 1999; 18:5870-8.

Ishkanian A, Laperriere NJ, Xu W, Millar BA, Payne D, Mason W, Sahgal A. Upfront observation versus radiation for adult pilocytic astrocytoma. **Cancer** 2011; 117:4070-9.

Johannessen AL, Torp SH. The clinical value of Ki-67/MIB-1 labeling index in human astrocytomas. **Pathol Oncol Res** 2006; 12:143-7.

Kaina B, Christmann M, Naumann S, Roos WP. MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. **DNA Repair (Amst)** 2007; 6:1079-99.

Karamitopoulou E, Perentes E, Diamantis I, Maraziotis T. Ki-67 immunoreactivity in human central nervous system tumors: a study with MIB 1 monoclonal antibody on archival material. **Acta Neuropathol** 1994; 87:47-54.

Kastan MB, Bartek J. Cell-cycle checkpoints and cancer. **Nature** 2004; 432:316-23.

Kirla R, Salminen E, Huhtala S, et al. Prognostic value of the expression of tumor suppressor genes p53, p21, p16 and p130, and Ki-67 labelling in high grade astrocytomas treated with radiotherapy. **J Neurooncol** 2000; 46:71-80.

Kitai R, Horita R, Sato K, et al. Nestin expression in astrocytic tumors delineates tumor infiltration. **Brain Tumor Pathol** 2010; 27:17-21.

Korkolopoulou P, Patsouris E, Konstantinidou AE, et al. Mitosin and DNA topoisomerase II α : two novel proliferation markers in the prognostication of diffuse astrocytoma patient survival. **Appl Immunohistochem Mol Morphol** 2001; 9:207-14.

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

Kros JM. Grading of gliomas: the road from eminence to evidence. **J Neuropathol Exp Neurol** 2011; 70:101-9.

Lewis RA, Gerson LP, Axelson KA, Riccardi VM, Whitford RP. Von Recklinghausen neurofibromatosis. II. Incidence of optic gliomata. **Ophthalmology** 1984; 91:929-35.

Litofsky NS, Hinton D, Raffel C. The lack of a role for p53 in astrocytomas in pediatric patients. **Neurosurgery** 1994; 34:967-72.

Lotfi M, Afsharnezhad S, Raziee HR, et al. Immunohistochemical assessment of MGMT expression and p53 mutation in glioblastoma multiforme. **Tumori** 2011; 97:104-8.

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.

McBride SM, Perez DA, Polley MY, et al. Activation of PI3K/mTOR pathway occurs in most adult low-grade gliomas and predicts patient survival. **J Neurooncol** 2010; 97:33-40.

McLendon RE, Cleveland L, Pegram C, Bigner SH, Bigner DD, Friedman HS. Immunohistochemical detection of the DNA repair enzyme O6-methylguanine-DNA methyltransferase in formalin-fixed, paraffin-embedded astrocytomas. **Lab Invest** 1998; 78:643-4.

Nakatsuka S, Oji Y, Horiuchi T, Kanda T, et al Immunohistochemical detection of WT1 protein in a variety of cancer cells. **Mod Pathol** 2006; 19:804-14.

Ohgaki H, Eibl, RH, Schwab M, et al. Mutations of p53 tumor suppressor gene in neoplasms of the human nervous system. **Mol Carcinog** 1993; 8:74-80.

Ohgaki H, Watanabe K, Peraud A, et al. A case history of glioma progression. **Acta Neuropathol** 1999; 97:525-32.

Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, et al. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. **Cancer Res** 2004; 64:6892-9.

Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. **Am J Pathol** 2007; 170:1445-53.

Ohgaki H, Kleihues P. Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. **Cancer Sci** 2009; 100:2235-41.

Oka Y, Tsuboi A, Oji Y, Kawase I, Sugiyama H. WT1 peptide vaccine for the treatment of cancer. **Curr Opin Immunol** 2008; 20:211-20.

Ono Y, Tamiya T, Ichikawa T, et al. Malignant astrocytomas with homozygous CDKN2/p16 gene deletions have higher Ki-67 proliferation indices. **J Neuropathol Exp Neurol** 1996; 55:1026-31.

Parsa CF, Givrad S. Juvenile pilocyticastrocytomas do not undergo spontaneous malignant transformation: grounds for designation as hamartomas. **Br J Ophthalmol** 2008; 92:40-6.

Peraud A, Ansari H, Bise K, Reulen HJ. Clinical outcome of supra tentorial astrocytoma WHO grade II. **Acta Neurochir** 1998; 140:1213-22.

Peraud A, Kreth FW, Wiestler OD, Kleihues P, Reulen HJ. Prognostic impact of TP53 mutations and P53 protein overexpression in supratentorial WHO grade II astrocytomas and oligoastrocytomas. **Clin Cancer Res** 2002; 8:1117-24.

Piva R, Cavalla P, Bortolotto S, et al. CDKN2/p16 inactivation and p16 immunohistochemistry in astrocytic gliomas. **Int J Oncol** 1998; 12:55-8.

Prayson RA. The utility of MIB-1/Ki-67 immunostaining in the evaluation of central nervous system neoplasms. **Adv Anat Pathol** 2005; 12:144-8.

Qaddoumi I, Sultan I, Broniscer A. Pediatric low-grade gliomas and the need for new options for therapy: Why and how? **Cancer Biol Ther** 2009; 8:4-10.

Ranuncolo SM, Varela M, Morandi A, et al. Prognostic value of Mdm2, p53 and p16 in patients with astrocytomas. **J Neurooncol** 2004; 68:113-21.

Rasheed BK, McLendon RE, Herndon JE, et al. Alterations of the TP53 gene in human gliomas. **Cancer Res** 1994; 54:1324-30.

Rodriguez FJ, Thibodeau SN, Jenkins RB, et al. MGMT immunohistochemical expression and promoter methylation in human glioblastoma. **Appl Immunohistochem Mol Morphol** 2008; 16:59-65. Erratum in: **Appl Immunohistochem Mol Morphol** 2008; 16:307.

Ruiz J, Lesser GJ. Low-grade gliomas. **Curr Treat Opt Oncol** 2009; 10:231-242.

Rushing EJ, Sandberg GD, Horkayne-Szakaly I. High-grade astrocytomas show increased Nestin and Wilms's tumor gene (WT1) protein expression. **Int J Surg Pathol** 2010; 18:255-9.

Rushing EJ, Sandberg GD, Horkayne-Szakaly I. High-grade astrocytomas show increased Nestin and Wilms's tumor gene (WT1) protein expression. **Int J Surg Pathol** 2010; 18:255-9.

Sano T, Lin H, Chen X, et al. Differential expression of MMAC/PTEN in glioblastoma multiforme: relationship to localization and prognosis. **Cancer Res** 1999; 59:1820-4.

Sarkar C, Ralte AM, Sharma MC, Mehta VS. Recurrent astrocytic tumours--a study of p53 immunoreactivity and malignant progression. **Br J Neurosurg** 2002; 16:335-42.

Schittenhelm J, Mittelbronn M, Nguyen TD, Meyermann R, Beschorner R. WT1 expression distinguishes astrocytic tumor cells from normal and reactive astrocytes. **Brain Pathol** 2008; 18:344-53.

Sengupta S, Chatterjee U, Banerjee U, Ghosh S, Chatterjee S, Ghosh AK. A study of histopathological spectrum and expression of Ki-67, TP53 in primary brain tumors of pediatric age group. **Indian J Med Paediatr Oncol** 2012; 33:25-31.

Seol HJ, Yoo HY, Jin J, et al. Prognostic implications of the DNA damage response pathway in glioblastoma. **Oncol Rep** 2011; 26:423-30.

Squatrino M, Brennan CW, Helmy K, Huse JT, Petrin JH, Holland EC. Loss of ATM/Chk2/p53 pathway components accelerates tumor development and contributes to radiation resistance in gliomas. **Cancer Cell** 2010; 18:619-29.

Suri V, Das P, Pathak P, et al. Pediatric glioblastomas: a histopathological and molecular genetic study. **Neuro Oncol** 2009; 11:274-80. Erratum in: **Neuro Oncol** 2009; 11(6):972.

Taniguchi K, Wakabayashi T, Yoshida T, et al. Immunohistochemical staining of DNA topoisomerase IIalpha in human gliomas. **J Neurosurg** 1999; 91:477-82.

Tibbetts KM, Emnett RJ, Gao F, Perry A, Gutmann DH, Leonard JR. Histopathologic predictors of pilocytic astrocytoma event-free survival. **Acta Neuropathol** 2009; 117:657-65.

Torp SH, Helseth E, Dalen A, Unsgaard G. Epidermal growth factor receptor expression in human gliomas. **Cancer Immunol Immunother** 1991a; 33:61-4.

Torp SH, Helseth E, Ryan L, Stølan S, Dalen A, Unsgaard G. Amplification of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. **Anticancer Res** 1991b; 11:2095-8.

Trembath D, Miller CR, Perry A. Gray zones in brain tumor classification: evolving concepts. **Adv Anat Pathol** 2008; 15:287-97.

Uno M, Oba-Shinjo SM, Camargo AA, et al. Correlation of MGMT promoter methylation status with gene and protein expression levels in glioblastoma. **Clinics (Sao Paulo)** 2011; 66:1747-55.

Ushio Y, Tada K, Shiraishi S, Kamiryo T, Shinojima N, Kochi M, Saya H. Correlation of molecular genetic analysis of p53, MDM2, p16, PTEN and EGFR and survival of patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma. **Front Biosci** 2003; 8:e281-8.

Watanabe K, Tachibana O, Sata K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. **Brain Pathol** 1996; 6:217-23.

Yip S, Iafrate AJ, Louis DN. Molecular diagnostic testing in malignant gliomas: a practical update on predictive markers. **J Neuropathol Exp Neurol** 2008; 67:1-15.

Yue WY, Yu SH, Zhao SG, Chen ZP. Molecular markers relating to malignant progression in Grade II astrocytoma. **J Neurosurg** 2009; 110:709-14.