

IMPACTO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS DA FAMÍLIA RSK SOBRE A PROGRESSÃO TUMORAL EM ASTROCITOMAS

LUIS EDUARDO SILVA MACHADO

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

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Dra. Glaucia Hajj

**São Paulo
2015**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Machado, Luis Eduardo Silva

Impacto da expressão das proteínas da família RSK sobre a progressão tumoral em astrocitomas / Luis Eduardo Silva Machado – São Paulo; 2015.

76p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientadora: Glaucia Hajj

Descritores: 1. ASTROCITOMA/metabolismo. 2. ASTROCITOMA/genética. 3. QUINASES DE PROTEÍNA QUINASE ATIVADAS POR MITÓGENO. 4. PROTEÍNAS QUINASES S6 RIBOSSÔMICAS 90-KDA. 5. PROGRESSÃO DA DOENÇA.

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos a todos pesquisadores, alunos, funcionários e colaboradores do CIPE e do AC Camargo Cancer Center que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste projeto desde o primeiro dia de estágio até o último dia de entrega desta dissertação. Foi um período de imensa valia no meu crescimento pessoal e profissional.

Meu agradecimento especial a minha orientadora Dr^a Gláucia Hajj, primeiramente pela oportunidade de estágio no laboratório seguida pela aceitação no curso de mestrado. A Dr^a Gláucia sempre presente e pronta para orientar e esclarecer, interessada em ajudar inclusive nos momentos mais complicados, sempre disposta a ouvir com muita paciência e imparcialidade.

RESUMO

Machado LES. **Impacto da expressão das proteínas da família RSK sobre a progressão tumoral em astrocitomas.** São Paulo; 2015. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

A via de sinalização de Ras/proteína quinase dependente de mitógenos (MAPK) é essencial na regulação da proliferação, sobrevivência, crescimento e diferenciação celular. Essa via tem sido objeto de intensa investigação devido a mutações ou superexpressão de muitos dos seus componentes no câncer humano. Um dos alvos diretos das MAPKs é a família de proteínas *90 kDa ribosomal S6 kinase* (p90RSK ou RSK) que tem sido implicada na regulação de diversos processos celulares. Apesar de sua relação com o processo tumoral, o papel de RSKs em astrocitomas nunca foi explorado. Astrocitomas são neoplasias primárias do Sistema Nervoso Central (SNC) com diferenciação astrocitária e que compreendem a maior parte dos tumores desta topografia. Estas neoplasias são graduadas de I a IV baseadas em critérios histológicos, relacionados com o prognóstico. O tratamento é primariamente cirúrgico, porém insatisfatório, pois os tumores recorrem com frequência e/ou evoluem para neoplasias de maior grau. Deste modo, compreender melhor o comportamento destes tipos tumorais pode ajudar a desenvolver novos tipos de tratamento para esta doença. Neste estudo, utilizamos uma série de tumores astrocíticos de Graus I a IV e analisamos a expressão e fosforilação de alguns componentes da via de MAPK através de reações de imuno-histoquímica. Proteínas da via MAPK foram analisadas e correlacionadas com a expressão e fosforilação de RSK, permitindo uma visão do padrão de funcionamento dos processos celulares nestes grupos tumorais. A expressão do supressor tumoral PTEN, assim como o grau de proliferação celular (Ki-67) também foi analisado frente a expressão e fosforilação de RSK. Embora não tenha sido identificada uma associação importante entre níveis de expressão ou fosforilação de RSK com o grau histológico ou proliferação celular, foi possível verificar correlação significativa entre expressão de PTEN e níveis de RSK. Verificamos também que RSK exerceu impacto na sobrevida de pacientes com astrocitoma Grau IV.

SUMMARY

Machado LES. **[Impact of the RSK protein family expression on tumoral progression in astrocytomas]**. São Paulo; 2015. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

The RAS/mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway plays a critical role in the control of cellular proliferation, survival, growth and differentiation. One of the direct targets of the MAPK pathway, the 90 kDa ribosomal S6 kinase (p90RSK or RSK) family of proteins has a direct involvement in the regulation of many cellular processes. Despite the connection between RSKs and tumoral processes, the role of RSKs in astrocytomas has never been explored. Astrocytomas are central nervous system neoplasms showing astrocytic differentiation and account for most of primary nervous system tumors. Treatment is mainly surgical however, once complete tumor resection cannot be achieved, relapse and progression to higher grade astrocytoma frequently occur. High grade astrocytomas are highly invasive and do not respond to any available chemotherapeutic agents, imposing to patients an average survival of months. Thus, the better understanding in the behavior of these tumor types may help the development of new therapies for this disease, so far incurable. In the present study a series of high and low-grade astrocytomas was analyzed through immunohistochemistry protocols to evaluate the role of the MAPK pathway expression and phosphorylation in these tumors. MAPK pathway components were correlated with both RSK expression and phosphorylation allowing for insight into the functionality of cellular processes in this population. Along with the expression of tumour suppressor PTEN, the index of cellular proliferation (Ki-67) was also assessed and correlated with RSK expression and phosphorylation. Although no significant findings were observed between RSK expression/phosphorylation, proliferation index or higher tumor grades, PTEN expression as well as RSK levels and overall survival were found to be associated.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Processo de diferenciação astrocitária e classificação tumoral.....	2
Figura 2	Sinalização intracelular das Vias MAPK / PI3K e processos de sinalização intracelular a partir da ativação de RSK.....	10
Figura 3	Padronização da IHQ contra pERK1/2.....	29
Figura 4	Padronização da IHQ contra RSK1.....	30
Figura 5	Padronização da IHQ contra pRSK1.....	31
Figura 6	Padronização da IHQ contra S6.....	32
Figura 7	Padronização da IHQ contra pS6(S235/236).....	33
Figura 8	Padronização da IHQ contra pS6(S240/244).....	34
Figura 9	Correlação entre duplicatas do TMA.....	36
Figura 10	Correlação entre duplicatas do TMA, fração nuclear.....	36
Figura 11	Expressão de RSK em astrocitomas.....	38
Figura 12	Fosforilação de RSK em astrocitomas.....	40
Figura 13	Análise da correlação da expressão de RSK1 total e expressão de PTEN em casos Grau IV.....	44

Figura 14	Análise da correlação da fosforilação de RSK1 total e expressão de PTEN em casos Grau IV.....	45
Figura 15	Fosforilação de ERK1/2 em astrocitomas.....	47
Figura 16	Reação de IHQ contra S6 em tecido cerebral normal	49
Figura 17	Expressão de S6 em astrocitomas.....	49
Figura 18	Reação de IHQ contra pS6(S240/244) em tecido cerebral normal	50
Figura 19	Fosforilação de S6 em astrocitomas.....	52
Figura 20	Curva de sobrevida em função da expressão de RSK1 em pacientes Grau IV.....	54
Figura 21	Curva de sobrevida em função da fosforilação de RSK1 em pacientes Grau IV.....	55
Figura 22	Curva de sobrevida em função da fosforilação de ERK1/2 em pacientes Grau IV.....	56
Figura 23	Curva de sobrevida em função da fosforilação de S6 (S235/236) em pacientes Grau IV.....	57
Figura 24	Curva de sobrevida em função da fosforilação de S6 (S240/244) em pacientes Grau IV.....	58
Figura 25	Curva de sobrevida em função da expressão de S6 em pacientes Grau IV.....	59

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1	Quantidade de amostras e tipos tumorais presentes nos TMAs utilizados.....	21
Tabela 2	Quantidade de amostras e tipos tumorais incluídos neste estudo.....	21
Tabela 3	Dados clínicos, patológicos e status dos pacientes.....	21
Tabela 4	Anticorpos utilizados nas reações de imuno-histoquímica....	24
Tabela 5	Correlação entre expressão e fosforilação de RSK total e nuclear nos diversos graus tumorais.....	41
Tabela 6	Correlação entre expressão de RSK total e nuclear nos diversos graus tumorais e índice de proliferação celular.....	42
Tabela 7	Correlação entre a fosforilação de RSK total e nuclear nos diversos graus tumorais e índice de proliferação celular.....	42
Tabela 8	Correlação entre a fosforilação de RSK e fosforilação de ERK1/2 nos diversos graus tumorais.....	48
Tabela 9	Correlação entre a fosforilação de RSK e fosforilação de S6 nos diversos graus tumorais.....	53
Quadro 1	Classificação histológica simplificada dos astrocitomas segundo a OMS.....	4

Quadro 2 A	Estudo comparativo entre os resultados de proliferação celular e sobrevida do presente trabalho e publicações pertinentes.....	64
Quadro 2 B	Estudo comparativo entre os resultados de fosforilação de S6 e sobrevida do presente trabalho e publicações pertinentes.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS

4E-BP	<i>4E binding protein</i>
4E (eIF4E)	<i>eukaryotic initiation factor</i>
5'TOP	<i>5'terminal oligopyrimidine tract</i>
AKT	proteína quinase B
ATP	adenosina trifosfato
BAD	<i>Bcl-2-associated death promoter</i>
CDKs	quinases dependentes de ciclina
CREB	proteína de ligação ao elemento de resposta do AMPc
DAPK	<i>death-associated protein kinase</i>
DEPTOR	<i>domain-containing mTOR-interacting protein</i>
EGF	fator de crescimento epidermal
EGFR	receptor do fator de crescimento epidermal
ERK	quinase regulada por sinal extracelular
FGFR1	receptor de fator de crescimento de fibroblasto 1
GSK3 β	<i>glycogen synthase kinase 3 beta</i>
GTPase	guanosina-trifosfatase
HER-2	receptor do fator de crescimento epitelial humano 2
IDH	isocitrato desidrogenase
LOH	perda de heterozigose
MAD1	<i>mitotic arrest deficient 1</i>
MAPK	Ras/proteína quinase dependente de mitógenos
MAP2K	<i>MAP-kinase kinase</i>
mLST8/GβL	<i>mammalian LST8/G-protein β-subunit like protein</i>
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro
miRNA	micro ácido ribonucleico
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
NF1	<i>Neurofibromin 1</i>
OMS	<i>Organização Mundial da Saúde</i>
p70S6K	<i>ribosomal S6 kinase</i>

p90RSK ou RSK	<i>90 kDa ribosomal S6 kinase</i>
PDGF	fator de crescimento derivado de plaquetas
PDGFR	receptor fator de crescimento derivado de plaquetas
PDK	<i>phosphoinositide-dependent kinase</i>
PI3K	fosfatidilinositol 3-quinase
PIP2	fosfatidilinositol 4,5 bifosfato
PIP3	fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato
PRAS40	<i>proline-rich Akt substrate of 40 kDa</i>
PTEN	fosfatase homóloga à tensina
Raptor	<i>regulatory- associated protein of mTOR</i>
RB	proteína do retinoblastoma
rpS6	proteína ribossomal S6
SNC	Sistema Nervoso Central
TERT	transcriptase reversa telomerase
TIF-1	<i>transcription initiation factor</i>
TMA	<i>tissue microarray</i>
TP53	supressor tumoral p53
TSC2	<i>tuberous sclerosis complex 2</i>
YB-1	<i>Y-box binding protein-1</i>

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Gliomas	1
1.2	Astrocitomas Grau I a IV.....	2
1.3	Alterações nas Vias de Transdução de Sinal em Gliomas	6
1.4	RSKs e o Desenvolvimento Tumoral	13
2	OBJETIVOS	19
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1	Casuística, critérios de inclusão e exclusão	20
3.2	Técnica de Tissue Microarray (TMA).....	22
3.3	Reação de Imuno-Histoquímica (IHQ).....	23
3.4	Forma de análise dos resultados.....	25
3.4.1	Determinação do valor de HSCORE	25
3.4.2	Análises Estatísticas.....	26
4	RESULTADOS	28
4.1	Imuno-Histoquímica.....	28
4.1.1	Padronização das Reações de Imuno-Histoquímica	28
4.2	Análise dos Spots em Duplicata nos TMAs	35
4.3	Imuno-histoquímica dos TMAs	37
4.4	Análises de Sobrevida	54
5	DISCUSSÃO	60
6	CONCLUSÃO	66
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	67

ANEXOS

Anexo 1 Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

Anexo 2 Mapa TMA Gliais

Anexo 3 Mapa TMA GBM

Anexo 4A Planilha de dados clínicos dos prontuários de pacientes Grau I

Anexo 4B Planilha de dados clínicos dos prontuários de pacientes Grau II

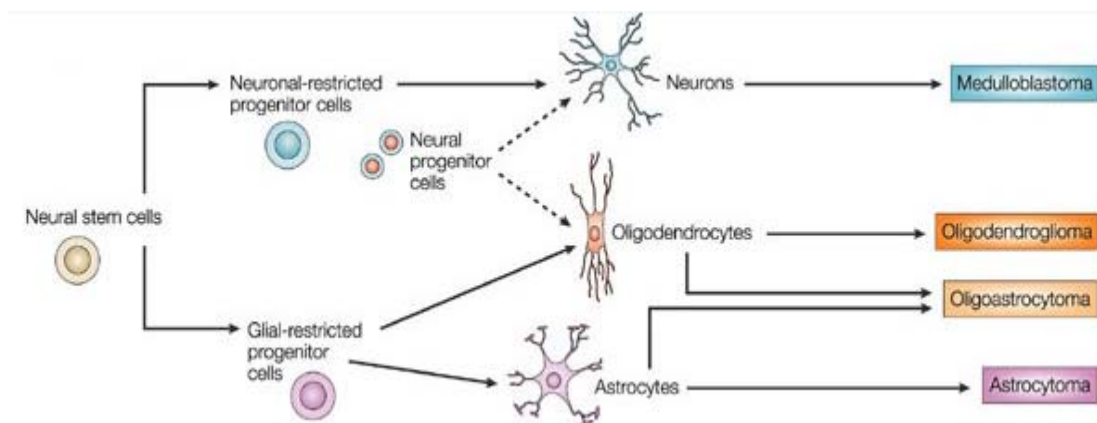
Anexo 4C Planilha de dados clínicos dos prontuários de pacientes Grau III

Anexo 4D Planilha de dados clínicos dos prontuários de pacientes Grau IV

1 INTRODUÇÃO

1.1 GLIOMAS

Caracterizados como tipo morfológico mais comum de neoplasia primária do SNC em adultos, o termo glioma engloba diversos tipos de lesões cerebrais de caráter heterogêneo, progressão e prognóstico diferenciado. Gliomas são classificados segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) de acordo com padrão histológico de diferenciação celular, sendo o mesmo fator preditivo de prognóstico. Variam de baixo a alto grau (Grau I a IV), correspondendo ao grau de malignidade neoplásica (HSU e YUNG 2006; DUBROW e DAREFSKY 2011). Acredita-se que um dos processos envolvidos no desenvolvimento de gliomas tenha início a partir da transformação de células neuronais progenitoras em astrócitos, um dos tipos celulares presentes no SNC (**Figura 1**).



Fonte: ZHU e PARADA (2002).

Figura 1 – Processo de diferenciação astrocitária e classificação tumoral.

Através de uma série de eventos distintos como ativação oncogênica e mutações em supressores tumorais, vias que normalmente regulariam renovação, proliferação e sobrevivência astrocitária passam a contribuir para o desenvolvimento tumoral e potencial aquisição de fenótipo maligno desta população celular (LLAGUNO et al. 2009). Acredita-se ainda que essas células tronco tumorais exibam potencial replicativo e migratório, conferindo invasividade, propriedades metastáticas além de resistência à terapia a esses tumores astrocitários (LLAGUNO et al. 2008).

1.2 ASTROCITOMAS GRAU I A IV

Consideradas neoplasias benignas, astrocitomas pilocíticos (Grau I) correspondem às lesões primárias cerebrais de maior incidência em pacientes pediátricos. O tumor é bastante circunscrito, e de crescimento lento (**Tabela 1**). O prognóstico é geralmente favorável uma vez que esse

tipo de lesão exibe tendência à estabilidade e até regressão em sua progressão. Nos casos de astrocitoma pilocitário do nervo óptico proveniente da perda da expressão do gene *Neurofibromin 1 (NF1)*, as lesões se mantêm estáveis ou apresentam crescimento lento (LOUIS 2007). Em pacientes com lesões supratentoriais, a ressecção completa pode resultar em 100% de sobrevida livre de doença em um período de 10 anos (MCKEEVER 2010). A intervenção cirúrgica pode ser associada com radioterapia em pacientes que apresentam recidiva, progressão tumoral ou impossibilidade de ressecção total da lesão (JOHNSON et al. 2012). O aumento do índice mitótico determina a transição de astrocitoma pilocítico para astrocitoma difuso de baixo grau (Grau II), de caráter mais agressivo (LOUIS 2007).

Astrocitomas difusos ocorrem preferencialmente nos lobos frontal e temporal em ambos crianças e adultos, com maior frequência em adultos de 30 a 40 anos de idade. Correspondem a ~15% de todas as neoplasias de caráter astrocitário e incidem em aproximadamente 1.4 pessoas por milhão/ano. Apresentam celularidade aumentada e alguma atipia nuclear com infiltração difusa no parênquima cerebral, porém exibem baixo índice mitótico e ausência de necrose ou proliferação vascular (REIFENBERGER e COLLINS 2004) (**Tabela 1**). Devido à invasão difusa de estruturas anatômicas periféricas à lesão, ressecção completa não é possível e lesões recorrem, progredindo espontaneamente para astrocitoma anaplásico de alto grau (Grau III) e glioblastoma secundário (Grau IV) (LOUIS 2007). Mutações no gene supressor tumoral p53 (*TP53*), consideradas o evento

mutacional mais precoce e frequente, são observadas em até 60% dos pacientes que apresentam gliomas Grau II (PERAUD et al. 2002; CAMELO-PIRAGUA et al. 2011). São relacionadas à maior incidência de transformação maligna, representando fator de risco desfavorável para sobrevida geral e livre de doença (STÄNDER et al. 2004).

Astrocitomas anaplásicos são microscopicamente caracterizados por infiltração astrocitária difusa com celularidade aumentada, atipia nuclear e células multinucleadas. Apresentam também alguma atividade mitótica, porém ausência de microvascularização ou necrose tecidual (**Quadro 1**).

Quadro 1 – Classificação histológica simplificada dos astrocitomas segundo a OMS

Grau I – Astrocitoma Pilocítico	- tumor delimitado - baixo potencial proliferativo
Grau II – Astrocitoma Difuso	- atipia citológica - infiltrativo
Grau III – Astrocitoma Anaplásico	- atipia nuclear - atividade mitótica
Grau IV – Glioblastoma	- proliferação microvascular - necrose

A sobrevida inicial de pacientes com gliomas Grau III, média 3 a 5 anos, pode ser aumentada quando ressecção é acompanhada de radio e quimioterapia (HSU e YUNG 2006). Correspondem a cerca de 4% de todos os gliomas com incidência de 0,5 a 0,7 novos casos em 100.000 pessoas/ano, ocorrendo com maior frequência na quarta e sexta décadas de

vida (STUPP et al. 2007). Seguem padrão de localização dos astrocitomas de infiltração difusa, surgindo preferencialmente nos hemisférios cerebrais. Podem originar-se *de novo* com ausência de lesão precursora ou a partir de transformação maligna de lesões Grau II, uma vez que astrocitomas anaplásicos exibem alta frequência de mutações no gene *TP53* (LOUIS 2007).

Astrocitomas Grau IV, também chamados glioblastomas, ocorrem preferencialmente na massa branca subcortical dos hemisférios cerebrais e apresentam infiltração difusa em regiões corticais adjacentes. Lesões multifocais apresentando caráter infra e intratentoriais podem ter origem policlonal (LOUIS 2007). A maior parte destas lesões (>90%) ocorrem *de novo* sem evidência clínica ou histopatológica de lesões de menor grau preexistentes e determinam prognóstico menos favorável uma vez que exibem desenvolvimento rápido (<3 meses). Afetam mais frequentemente pessoas com idade superior a 60 anos, resultando em baixo índice de sobrevivência (média de 4,7 meses) (OHGAKI e KLEIHUES 2007).

Glioblastomas provenientes de lesões Grau II ou III, denominados glioblastomas secundários, ocorrem com menor frequência (<10%), tipicamente na quarta década de vida. O intervalo de transformação entre lesões Grau II/III e achados histopatológicos Grau IV (média 4-5 anos) reflete no maior índice de sobrevida observado (LOUIS 2007). Histologicamente apresentam pleomorfismo celular acompanhado de hipercromasia e atipia nuclear, caracterizada por aumento na proporção núcleo-citoplasma (VOGEL 2009). Exibem atividade mitótica com pobre

diferenciação astrocitária, podendo ser ocasionalmente encontrados linfócitos perivasculares e metaplasia, exemplificada por achados de células epiteliais escamosas. Angiogênese, proliferação microvascular e necrose tecidual são critérios histopatológicos essenciais para determinação diagnóstica (HSU e YUNG 2006) (**Quadro 1**).

A proliferação microvascular decorre da eventual vaso-oclusão, trombose vascular e consequente isquemia tecidual, podendo ser observada através da presença de células endoteliais com atividade mitótica dispostas em multicamadas nas áreas de necrose. Estruturas celulares em forma de paliçada são frequentemente encontradas, delimitando regiões de necrose devido a processo de evasão e migração celular à periferia do foco necrótico (LOUIS 2007) (**Quadro 1**).

1.3 ALTERAÇÕES NAS VIAS DE TRANSDUÇÃO DE SINAL EM GLIOMAS

Avanços terapêuticos tem permitido melhor manejo de pacientes portadores de neoplasias tumorais, seja por intervenção cirúrgica com utilização de avançados recursos em neuroimagem, emprego de radioterapia ou administração de agentes quimioterápicos mais específicos. Todavia, pacientes diagnosticados com lesões de alto grau ainda apresentam baixos índices de sobrevida e nos casos de glioblastoma, a sobrevida média continua 14 meses após diagnóstico (ADAMSON et al. 2009). A falha na resposta às opções de terapia convencional tem

direcionado cada vez mais o foco de pesquisadores para o melhor entendimento das bases moleculares e vias de sinalização intracelular envolvidas diretamente nos processos de tumorigênese, em busca de opções terapêuticas mais efetivas (HSU e YUNG 2006).

A heterogeneidade histológica apresentada pelos padrões celulares de lesões neoplásicas cerebrais demonstra a complexidade genotípica envolvida nestes processos tumorais, resultando em fenótipos distintos. Em gliomas, vias de sinalização intracelulares são diretamente afetadas por mutações em genes responsáveis pela codificação de constituintes da cascata, resultando em amplificação da via de sinalização (HSU e YUNG 2006). Um exemplo é a ativação constitutiva da via Ras/proteína quinase dependente de mitógenos (MAPK) por superexpressão do fator de crescimento epidermal (EGF), promovendo contínua proliferação e sobrevivência à célula tumoral (ANJUM e BLENIS 2008).

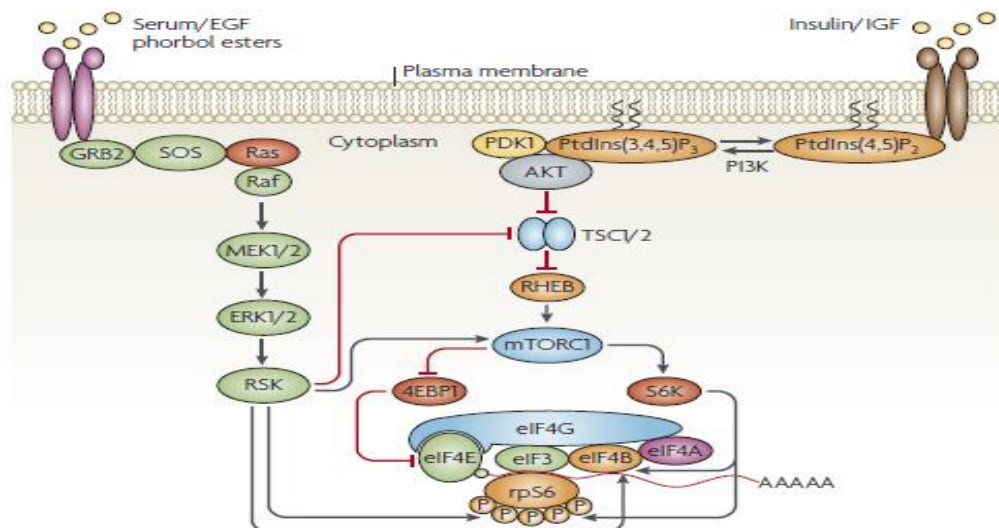
A ativação da via de MAPK por EGF inicia-se da ligação deste fator de crescimento aos receptores do fator de crescimento epidermal (EGFR) mediando uma vasta sequência de sinalização citoplasmática e nuclear essencial para funções celulares como proliferação, diferenciação e apoptose (MATTHEWS e GERRITSEN 2010a). Em glioblastomas, amplificações em EGFR são frequentes (>50%) e a presença da mutação EGFRvIII, caracterizada por perda de domínio extracelular via deleção dos exons 2 ao 7 e consequente ativação ligante-independente, resulta em proliferação celular por ativação constitutiva das vias de sinalização MAPK e fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) (LOUIS 2007).

O processo de tumorigênese envolve a participação de outros fatores de crescimento e seus respectivos receptores, como é o caso do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) que se encontra superexpresso em todos os graus de tumores astrocíticos (HAVRDA e ISRAEL 2008). Astrocitomas apresentam níveis aumentados de uma isoforma de PDGF (PDGFA) e seu respectivo receptor PDGFR α , glioblastomas apresentam níveis ainda mais elevados.

A proteína Ras constitui uma guanosina-trifosfatase (GTPase) associada à membrana celular, responsável por mediar a transdução de sinais extracelulares provenientes de receptores como EGFR e receptor fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR). Uma vez ativado, Ras interage com a proteína quinase Raf através de ligação à região N-terminal de Raf, formando o complexo Ras-Raf. A função serina/treonina quinase de Raf é então ativada e Raf atua como *MAP-kinase kinase* (MAP2K), ativando os substratos quinase regulada por sinal extracelular 1/2 (ERK1/ERK2) (**Figura 2**). A ativação de ERK1/ERK2 resulta em sua translocação para o núcleo celular (SANTARPIA et al. 2012). Uma vez no núcleo, ERK fosforila diversos fatores de transcrição. A ativação oncogênica de Ras contribui para o desenvolvimento e manutenção de fenótipos malignos e embora mutações em Ras não sejam prevalentes em gliomas, sua forma ativa Ras-GTP é encontrada de forma abundante nestes tumores (BLUM et al. 2005). Adicionalmente, *NF1* gene regulador do crescimento de astrócitos, age como supressor da função de Ras e é associado ao desenvolvimento de astrocitomas de baixo grau em indivíduos

que apresentam alterações genéticas como perda de heterozigose (LOH) na região deste gene (GUTMANN et al. 2000).

A via de PI3K representa outra cascata de transdução de sinal envolvida na regulação da progressão do ciclo celular. A ativação de PI3K ocorre em resposta à ligação de fatores de crescimento a seus receptores. PI3K catalisa a fosforilação do segundo mensageiro intracelular fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP₂) em fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PIP₃). Níveis aumentados de PIP₃ resultam no recrutamento à membrana e ativação das proteínas *phosphoinositide-dependent kinase* PDK1 e proteína quinase B (AKT), efectoras *downstream* da via (**Figura 2**). Ativação de AKT promove desregulação em processos celulares como morte, proliferação e crescimento celular através da fosforilação de diversos substratos desta via, como fosforilação da proteína proapoptótica *Bcl-2-associated death promoter* (BAD), fosforilação e inativação de p53 (MATTHEWS e GERRITSEN 2010b) e *glycogen synthase kinase 3 beta* (GSK-3 β) (SHIMURA et al. 2012), além da diminuição dos níveis de transcrição do inibidor de quinases dependentes de ciclina (CDKs) p27, (NARITA et al. 2002; MATTHEWS e GERRITSEN 2010b).



Fonte: ANJUM e BLENIS (2008).

Figura 2 - Sinalização intracelular das Vias MAPK / PI3K e processos de sinalização intracelular a partir da ativação de RSK.

A fosfatase homóloga à tensina (*PTEN*) inibe a ativação de AKT, convertendo PIP_3 em PIP_2 . A expressão de *PTEN* é silenciada através de alterações gênicas comuns em glioblastomas primários e secundários, ocorrendo aproximadamente em 70% e 63% dos casos respectivamente. O silenciamento deste supressor tumoral pode ocorrer através de LOH do cromossomo 10, evento caracterizado por perda da funcionalidade de ambos alelos no locus do gene *PTEN*, e consequente perda da expressão do mesmo (BLEEKER et al. 2012).

Outro alvo indireto de AKT é a proteína *mammalian target of rapamycin* (mTOR). A proteína mTOR forma dois complexos funcionais distintos (mTORC1 e mTORC2), que controlam vários processos celulares. Quando mTOR está associada à proteína *regulatory-associated protein of mTOR* (Raptor), *mammalian LST8/G-protein β -subunit like protein* (mLST8/G β L), *proline-rich Akt substrate of 40 kDa* (PRAS40) e *DEP domain-containing*

mTOR-interacting protein (DEPTOR), constitui-se o complexo mTORC1 (SARBASSOV et al. 2004). mTORC1 participa na resposta a vários sinais extracelulares e intracelulares. Na presença de aminoácidos e adenosina trifosfato (ATP), a ativação de mTORC1 aumenta a síntese geral de proteínas que são essenciais para o crescimento e proliferação celular.

As funções de mTORC1 são atingidas através da fosforilação de moléculas efetoras, dentre as mais estudadas estão *4E binding protein* (4E-BP) e *ribosomal S6 kinase* (p70S6K) (HAY et al. 2006). As proteínas 4E-BPs são capazes de interagir e controlar a ação de *eukaryotic initiation factor 4E* (eIF4E), um fator de início de tradução (MARCOTRIGIANO et al. 1999). Quando as 4E-BPs encontram-se hipofosforiladas possuem alta afinidade por eIF4E. A hiperfosforilação de 4E-BP, desencadeada por mTOR, resulta no rompimento da sua ligação com eIF4E, permitindo o início do processo de tradução (GINGRAS et al. 2001). A proteína p70S6K, por sua vez, quando fosforilada por mTOR na região Thr389, fosforila a proteína S6, um componente da sub-unidade ribossomal 40S. Alguns estudos mostram que a fosforilação de S6 pode aumentar a tradução de ácidos ribonucleicos mensageiros (mRNAs) denominados *5'terminal oligopyrimidine tract* (5'TOP) (MEYUHAS e HORNSTEIN 2000) que, por codificarem componentes da maquinaria traducional (como por exemplo proteínas ribossomais, fatores de alongamento e fatores de iniciação) são capazes de aumentar os níveis de tradução globais da célula (CASTEDO et al. 2002; HAY e SONENBERG 2004; MA e BLENIS 2009).

Uma vez que tumores Grau IV apresentam grande heterogeneidade genômica, a identificação de subclasses moleculares existentes neste tipo tumoral permite melhor análise dos mecanismos envolvidos na patogênese e progressão tumoral de tumores primários e secundários, respectivamente (The Cancer Genome Atlas Research Network 2008). Atualmente, o *Cancer Genome Atlas Research Network* (TCGA) emprega tecnologias de sequenciamento de larga escala para detalhamento das alterações moleculares envolvidas na rede de sinalização de tumores Grau IV. Análises genômicas, epigenômicas, transcriptômicas e proteômicas tem possibilitado ampliar a gama de alterações identificadas que tem envolvimento no desenvolvimento deste tumores, notadamente nas vias de p53, Rb e componentes da via PI3K. A classificação tumoral pode então ser realizada segundo o subtipo molecular identificado, sendo divididos em pro-neural, neural, clássico e mesenquimal de acordo com a expressão gênica e padrão de metilação de DNA encontrados. Tal entendimento da patobiologia tumoral permitiu evidenciar a redundância funcional envolvida no desenvolvimento desta classe tumoral assim como permite melhor predição prognóstica e de resposta a tratamento (The Cancer Genome Atlas Research Network 2013). Em contrapartida, a classificação genética de tumores de menor grau (II e III) possibilita predição prognóstica favorável para tumores com mutações no gene IDH e melhor resposta a radio-quimioterapia quando em conjunto com mutações IDH são encontradas deleções 1p/19q, sendo esse perfil gênico também associado a maior tempo de sobrevida. Através do sequenciamento do exoma, de mRNA, miRNA e TERT e análise do perfil do número de

cópias e metilação de DNA, o TCGA classificou pacientes com tumores de menor grau em gliomas com mutação IDH e codeleção 1p/19q, gliomas com mutação IDH sem codeleção e gliomas tipo selvagem para IDH. Mediante análise de dados clínicos, pacientes do grupo tipo selvagem para IDH, apresentaram menor tempo de sobrevida quando comparado aos dois primeiros grupos, sendo que o grupo com mutação IDH e codeleção 1p/19q apresentou o maior tempo de sobrevida global (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2015). Neste contexto, a classificação tumoral pode ser amplamente favorecida pela adição de testes moleculares à classificação histopatológica para manejo clínico e predição prognóstica.

1.4 RSKs E O DESENVOLVIMENTO TUMORAL

As RSKs são uma família de Serina/Treonina-quinases compostas por quatro isoformas que compartilham um alto grau de homologia (75-80% de identidade de aminoácidos) e são caracterizadas pela presença de dois domínios quinase funcionais. As RSKs são ativadas diretamente pelas ERKs em resposta a fatores de crescimento, hormônios, neurotransmissores, quimiocinas entre outros. As RSKs fosforilam muitos alvos citosólicos e nucleares e tem sido implicadas na regulação de diversos processos celulares como a proliferação, sobrevivência e motilidade celular, expressão gênica e síntese de proteínas. O mRNA das RSKs 1 a 3 é encontrado em todos os tecidos testados, o que apoia uma redundância funcional. No

entanto, variações específicas nos níveis de expressão sugerem que as RSKs também podem ter funções específicas (MA e BLENIS 2009).

Condizente com sua participação em diversos fenômenos, as RSKs se localizam tanto no citoplasma quanto no núcleo e sua ativação pode ocorrer em ambos locais. Após a ativação, uma fração das RSKs entra no núcleo, o que se correlaciona com a indução de *immediate early genes*. Dentre as 4 isoformas, RSK4 é predominantemente citoplasmática, constitutivamente ativa e exibe atividade quinase independente de fatores de crescimento (ANJUM e BLENIS 2008). A lista dos substratos de RSK tem crescido continuamente e inclui, entre outros, fatores de transcrição, proteínas anti-apoptóticas e reguladores do ciclo celular. RSK também fosforila receptores nucleares de hormônios, como o estrogênio e receptores de andrógenos, cooperando para promover a máxima ativação destes receptores (STRATFORD e DUNN 2011).

As RSKs podem promover a proliferação celular através de vários mecanismos diferentes. Por exemplo, RSKs fosforilam e inibem a atividade do inibidor de CDK2 p27KIP1 e aumentam a estabilidade de c-fos, um fator de transcrição que regula a expressão de ciclina D1. Além disso, as RSKs regulam negativamente GSK3, envolvida na degradação de c-Myc e ciclina D1. Mais recentemente, foi mostrado que RSK impede a inibição da atividade de c-Myc pela proteína *mitotic arrest deficient 1* (MAD1). Por outro lado, as RSKs também atuam na regulação da apoptose, inibindo a atividade pro-apoptótica da proteína BAD e da proteína *death-associated protein kinase* (DAPK). RSK estimula também o fator de transcrição

proteína de ligação ao elemento de resposta do AMPc (CREB), aumentando a expressão de genes de sobrevivência, tais como Bcl-2 (ROMEO e ROUX 2011).

As RSKs também promovem a síntese de proteínas, controlando a biogênese de ribossomos e a tradução de mRNAs. RSK fosforila o co-ativador transcricional *transcription initiation factor (TIF-1)*, aumentando produção de RNAs ribossomais. Além disso, RSK também modula vários componentes da cascata de mTOR. RSK fosforila diretamente e desativa *tuberous sclerosis complex 2 (TSC2)*, uma proteína supressora de tumor que inibe a atividade de mTOR, resultando em aumento de sinalização de mTOR. Além disso, foi recentemente demonstrado que RSK fosforila Raptor, uma proteína do complexo 1 de mTOR que desempenha importante papel na atividade do complexo. Por outro lado, RSK também estimula a tradução de mRNAs de maneira independente de mTOR. Estudos mostram que RSK se associa a polissomos, que são mRNAs associados a ribossomos ativamente envolvidos na tradução, o que é consistente com a atividade de RSK na fosforilação de proteína ribossomal S6 (rpS6). RSK também fosforila diretamente o fator de início de tradução eIF4B e estimula o seu recrutamento para o complexo de início da tradução. eIF4B promove a tradução de mRNAs que codificam proteínas envolvidas no crescimento e sobrevivência celulares, sugerindo que RSK pode alterar estes processos biológicos mudando o padrão de tradução de mRNAs (ROMEO e ROUX 2011).

RSK1 e RSK2 são expressos numa vasta variedade de tipos tumorais, incluindo mama SMITH et al. (2005), próstata CLARK et al. (2005), mielomas múltiplos KANG et al. (2007), linfoma de células T KANG et al. (2009) e melanoma MIRMOHAMMADSADEGH et al. (2007), assim como tumores de cabeça e pescoço (KANG et al. 2010). Várias linhas de evidência realçam o papel de RSK na transformação celular e na tumorigênese. Em particular, RSK2 é essencial para a transformação celular induzida por Ras constitutivamente ativado estimulando a proliferação celular e o crescimento independente de ancoragem CHO et al. (2007) ou pelo receptor de fator de crescimento de fibroblasto 1 (FGFR1) (XIAN et al. 2009). A expressão de RSK1 e RSK2 mostrou-se elevada em amostras de tumores de mama e de próstata e a inibição da atividade de RSK reduz a proliferação de linhagens celulares destes tipos tumorais, sugerindo que RSK regula positivamente a proliferação dessas populações celulares (CLARK et al. 2005; SMITH et al. 2005). Outro substrato de RSK é o fator de transcrição/tradução *Y-box binding protein-1* (YB-1), um gene de desenvolvimento silenciado em tecidos adultos, mas expresso preferencialmente em tumores. No câncer de mama, RSK e YB-1 se associam para promover o crescimento de células tumorais (STRATFORD et al. 2008) e resistência à drogas. Como RSK está altamente ativado em células de câncer de mama que adquiriram resistência a trastuzumabe, poderia ser utilizado como alvo terapêutico importante em tumores positivos para o receptor do fator de crescimento epitelial humano 2 (HER-2). De fato,

o inibidor de RSK BI-D1870 inibiu o crescimento de linhagens de câncer de mama trastuzumabe-resistentes (DHILLON et al. 2010).

RSK também participa na proliferação celular e crescimento independente de ancoragem de células de melanoma (ZHENG et al. 2009). RSK2 também foi envolvida na invasão e potencial metastático de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (CECP) (KANG et al. 2010). Da mesma forma, RSK1 e RSK2 foram recentemente identificadas como principais agentes de transição epitélio-mesênquima induzida por Ras/ERK1/2 (DOEHN et al. 2009). Além disso, RSK2 promove a transformação hematopoiética induzida por FGFR3 em modelos de leucemia murina (KANG et al. 2009). RSK2 também foi descrita com um papel chave na formação de osteosarcomas c-Fos-dependentes (DAVID et al. 2005).

Em contraste com o padrão de RSK vista como um oncogene, RSK3 foi mostrada como potencial supressor de tumor no câncer de ovário, já que a superexpressão de RSK3 em linhagens celulares de câncer de ovário diminui as taxas de proliferação e os níveis de expressão dessa proteína estão reduzidos em muitos tumores de ovário esporádicos (BIGNONE et al. 2007). RSK4 também se comporta como um potencial supressor de tumor, participando na parada de crescimento dependente de p53 (BERNS et al. 2004) e na senescência celular induzida por oncogenes (LÓPEZ-VICENTE et al. 2009). A superexpressão de RSK4 diminui a proliferação de células de câncer de mama aumentando o número de células na fase G0/G1 do ciclo celular (THAKUR et al. 2008). RSK4 também exhibe elevada atividade basal

independente da via de Ras/ERK1/2, indicando um modo diferente de ativação desta isoforma (DÜMMLER et al. 2005).

Ao contrário do que se poderia esperar, considerando que as RSKs já foram envolvidas em muitos aspectos da tumorigênese, o papel destas proteínas em tumores cerebrais nunca foi explorado. Particularmente os astrocitomas de alto grau, são tumores que não respondem a nenhuma terapia atual e um melhor entendimento da biologia deste tipo de tumor poderia levar ao desenvolvimento de novas terapias.

2 OBJETIVOS

- ✓ Analisar a expressão e fosforilação da proteína RSK1 em astrocitomas de Graus I a IV;
- ✓ Correlacionar a expressão e fosforilação de RSK1 com a atividade de componentes da via de MAPK;
- ✓ Correlacionar a expressão e fosforilação de RSK1 com o marcador de proliferação celular Ki-67;
- ✓ Analisar a associação entre expressão e fosforilação de RSK1 e PTEN;
- ✓ Analisar a influencia da expressão de RSK1 e componentem da via de MAPK com o índice de sobrevida global em pacientes Grau IV.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA, CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foi utilizado um conjunto de 2 TMAs (**Anexos 2 e 3**) para cada marcador utilizado nas reações de imuno-histoquímica (IHQ). Ambos TMAs foram também utilizados na dissertação de mestrado de título “O controle da tradução pela via de mTOR nos mecanismos de tumorigênese em glioblastomas” do aluno Arthur W Alvarenga. Os TMAs totalizavam 287 amostras parafinadas, incluindo alguns tipos tumorais que não foram objetivo deste estudo (**Tabela 1**). Deste modo, na análise, foram incluídos somente os casos que apresentassem tipos tumorais pertinentes a este trabalho (**Tabela 2**). No caso de ambas lâminas conterem o mesmo número de registro de paciente, foi utilizado a média dos valores obtidos na análise histológica (HSCORE) para composição do gráfico e análise estatística.

Os TMAs foram obtidos do acervo do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A. C. Camargo. Dados clínicos e patológicos foram obtidos a partir de prontuários médicos da instituição (**Anexo 4**). As informações utilizadas para este estudo constam na **Tabela 3**. Todo material desta pesquisa, representado pelo bloco de parafina e suas respectivas lâminas estão arquivados no Departamento de Anatomia Patológica do Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer A C Camargo. Foram

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

Tabela 1 – Quantidade de amostras e tipos tumorais presentes nos TMAs utilizados

	NB*	<i>Gliose</i>	<i>Grau I</i>	<i>Grau II</i>	<i>Grau III</i>	<i>Grau IV</i>	GA**	OL***
TMA Gliais	14	16	39	46	15	9	7	13
TMA GBM	15	-	-	4	2	90	4	13

*NB – tecido normal, **GA – astrocitoma gemistocítico, ***OL – oligodendroglioma

Tabela 2 - Quantidade de amostras e tipos tumorais incluídos neste estudo

	NB*	<i>Gliose</i>	<i>Grau I</i>	<i>Grau II</i>	<i>Grau III</i>	<i>Grau IV</i>
n	20	16	39	50	16	90

*NB – tecido normal

Tabela 3 - Dados clínicos, patológicos e status dos pacientes

Grau Histológico	I	II	III	IV
Gênero (n)	Masc. – 22	Masc. – 23	Masc. – 9	Masc. – 53
	Fem. - 17	Fem. - 25	Fem. - 7	Fem. - 36
Idade mediana (anos)	6	33,5	35	54
Sobrevida mediana (meses)	101,7	69,66	33,26	10,25

3.2 TÉCNICA DE *TISSUE MICROARRAY* (TMA)

A utilização de TMAs possibilita o estudo da expressão protéica de tumores em larga escala através de ensaios de IHQ, com uma acurácia comprovada. Seu emprego é justificado uma vez que oferece vantagens de custo e tempo para pesquisas em grandes centros com grandes bancos de dados (MILANES-YEARSLEY et al. 2002; GULMANN et al. 2003).

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

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

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

3.3 REAÇÃO DE IMUNO-HISTOQUÍMICA

Os cortes provenientes dos TMAs foram desparafinizados pela incubação a 60°C por 24 horas, seguido de banhos sucessivos em três soluções de xilol por 10 minutos cada, posteriormente hidratados em soluções com concentrações decrescentes de etanol (100%, 95%, 80%, 70%) e lavadas em água corrente e destilada. Para a recuperação antigênica as lâminas foram incubadas em solução tampão de citrato 10mM pH 6.0 em câmara de pressão (DAKO S2801, USA) por 15 minutos até elevação de temperatura a 125°C, 18-24 psi e posterior resfriamento. Para o bloqueio da peroxidase endógena as lâminas foram imersas em H₂O₂ 10% (3 lavagens de 10 minutos cada) (Merck, Germany). Após etapa adicional de lavagem em água corrente (5 minutos), foi realizado bloqueio de interações inespecíficas com Dako Protein Block (Dako, USA) por 1 hora em cuba escura. A seguir, todas as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário (**Tabela 4**) diluído em título a ser estabelecido, em solução de bloqueio por 18 horas a 4°C em câmara úmida.

Após este período foi realizada lavagem com PBS (2 lavagens de 5 minutos cada) e posterior incubação de todas as lâminas com polímero *HRP link* (DAKO, USA) por 30 minutos em cuba escura. Após as lavagens, as lâminas foram incubadas com *HRP enzyme* (DAKO, USA) por 30 minutos em cuba escura. Após lavagem, a revelação foi feita utilizando cromógeno *3,3'-Diaminobenzidine* (DAB) (Biocare Medical, USA), diluído em DAB

Substrate Buffer (1:50). As lâminas foram contra-coradas com hematoxilina e montadas em Tissue-Tek® Prisma®/Film (Sakura, USA).

Tabela 4 – Anticorpos utilizados nas reações de IHQ

<i>Anticorpo</i>	<i>Clone</i>	<i>Recuperação Antigênica</i>	<i>Bloqueio Proteico</i>	<i>Tempo de Incubação</i>	<i>Título</i>	<i>Fabricante</i>
pERK1/2	Policlonal coelho (Thr202/Tyr204) (#9101L)	Tampão Citrato 10 mM pH 6,0	Dako Protein Block	2h TA*	1:200	Cell Signaling
RSK1	Policlonal coelho (C-21) (#sc-231)	Tampão Citrato 10 mM pH 6,0	Dako Protein Block	ON** 4°C	1:200	Santa Cruz
pRSK1	Monoclonal coelho (S380) (#9335S)	Tampão Citrato 10 mM pH 6,0	Dako Protein Block	ON** 4°C	1:25	Cell Signaling
S6	Monoclonal coelho (5G10) (#2217)	Tampão Citrato 10 mM pH 6,0	Dako Protein Block	ON** 4°C	1:100	Cell Signaling
pS6	Monoclonal coelho (S235/236) (#4857S)	Tampão Citrato 10 mM pH 6,0	Dako Protein Block	ON** 4°C	1:200	Cell Signaling
pS6	Policlonal coelho (S240/244) (#2215S)	Tampão Citrato 10 mM pH 6,0	Dako Protein Block	1h TA*	1:200	Cell Signaling

*TA = temperatura ambiente, **ON = *overnight*

3.4 FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

3.4.1 Determinação do valor de HSCORE

As lâminas foram examinadas por patologista que avaliou a presença de tecido da histologia correta e a qualidade da marcação. Todos spots que não mais representassem area tumoral original devido a perda de tecido durante a reação de IHQ, que apresentassem areas de necrose ou qualquer padrão tecidual não condizente com o objetivo deste estudo foram excluídos da análise.

As lâminas foram digitalizadas no aparelho ScanScope XT (Aperio). A intensidade de marcação de cada anticorpo foi avaliada na célula total e núcleo celular através do software ImageScope (Aperio), que verifica intensidade e porcentagem de pixels marcados. O ScanScope classificou cada pixel como 0 (negativo, intensidade variando entre 0-100), 1 (fracamente positivo, intensidade variando de 100-175), 2 (positivo, intensidade variando de 175-220) ou 3 (fortemente positivo, intensidade variando de 220-256) e quantificou o número de pixels em cada categoria. A partir destes dados, o HSCORE foi calculado de acordo com a fórmula:

$$\text{HSCORE} = \sum(i \times P_i),$$

onde P_i = porcentagem de pixels positivos, com variação de 0% a 100% e intensidade de marcação do pixel $i = 0, 1, 2$ ou 3 . Desta forma, a variação do HSCORE é de 0 a 300. A utilização do ScanScope XT (Aperio) leva em consideração a validação deste equipamento realizada por ALVARENGA (2013).

Como foram construídos dois TMAs em lâminas independentes para abrigar todos os casos disponíveis, realizamos uma normalização adicional para contemplar possíveis diferenças entre as lâminas que poderiam ser geradas durante o procedimento experimental. Para esta normalização, foi realizada uma média dos HSCOREs de todos os spots das duas lâminas e o HSCORE de cada ponto foi dividido pela média:

$$\text{HSCORE}_{\text{normalizado}} = \text{HSCORE} / \bar{X}_{(\text{HSCORE})}$$

Os resultados foram analisados através do software Graphpad e os níveis quantitativos de expressão e fosforilação das proteínas foram correlacionados com os diferentes graus tumorais encontrados e mortalidade, permitindo gerar conclusões a respeito da participação das proteínas da família RSK na evolução da doença.

3.4.2 Análises Estatísticas

A Análise de Medianas

As análises de medianas foram realizadas através da utilização do teste de Kruskal Wallis seguido do pós-teste de Dunn para comparações múltiplas. O nível de significância foi determinado em 5%, logo, valores de $p < 0.05$ foram considerados significativos estatisticamente.

B Análise de Correlação

As análises de correlação foram realizadas através da utilização do teste de coeficiente de correlação de Spearman, o qual é um método não-paramétrico que utiliza variáveis quantitativas de distribuição não-normal

para determinação de coeficiente de correlação. Este coeficiente varia de 0, valor que representa não correlação entre os dados analisados, a 1, valor que representa correlação perfeita entre os mesmos. O nível de significância foi determinado em 5%, logo, valores de $p < 0.05$ foram considerados significativos estatisticamente

C Análises de Sobrevida

As análises de sobrevida foram realizadas através da utilização do teste de Log Rank. Foi calculado o primeiro quartil dos níveis de expressão ou fosforilação das proteínas analisadas e a partir deste limiar, os casos foram divididos em dois grupos, low e high, sendo este primeiro grupo representativo da população que demonstrasse valores de até 25% de expressão ou fosforilação encontrados para cada proteína na análise histológica. Para análises de sobrevida global foram utilizados somente pacientes Grau IV uma vez que o número de amostras de Grau III era baixo. Os Graus I e II apresentam baixas taxas de óbito, não sendo viável a construção de curvas de sobrevida. O tempo de sobrevida foi calculado a partir da data da ressecção cirúrgica até o evento de óbito ou data de último contato com o paciente. Foram excluídos pacientes com idade menor de 21 anos ou pacientes com tumores em outras localidades, sugestivo de possível síndrome genética. O nível de significância foi determinado em 5%, logo, valores de $p < 0.05$ foram considerados significativos estatisticamente.

4 RESULTADOS

4.1 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Com o intuito de obter-se melhor entendimento da interação das diversas proteínas da via de MAPK/RSK e seus papéis na patogênese dos astrocitomas, analisamos a expressão e fosforilação das proteínas da via em uma série de astrocitomas de diversos graus. Particularmente, foram analisados a expressão e fosforilação de ERK1/2, RSK1 e a proteína ribossomal S6.

4.1.1 Padronização das reações de Imuno-histoquímica

Inicialmente foram realizadas reações teste, utilizando-se de controles sabidamente negativos e positivos, com o intuito de estabelecer quais seriam as condições de reação mais adequadas para cada anticorpo. Os controles utilizados foram gliomas aos quais tivemos acesso a tecido fresco e parafinado. O tecido fresco foi utilizado em ensaios de *western blotting* (WB), onde foi observada a presença de banda única na altura esperada e foram selecionadas amostras com maior e menor expressão do antígeno. As mesmas amostras foram então selecionadas para a padronização da reação de IHQ, que levou em conta também a expressão esperada de cada proteína de interesse.

A partir do estabelecimento de condições ideais de reação, as

mesmas foram então reproduzidas no conjunto de lâminas TMA. Durante este estudo, a modificação de etapas de processamento, a exemplo de recuperação antigênica, tempo e temperatura de incubação de anticorpos, se mostrou igualmente importante e fundamental para a obtenção de resultados satisfatórios.

A reação contra pERK1/2 utilizou-se da diluição 1/200 por 2h em temperatura ambiente. Uma vez que as metodologias validadas para utilização deste anticorpo não incluem IHQ, estabelecemos os controles positivos e negativos obtidos via WB como referência, obtendo negatividade para tecido considerado como controle negativo e forte marcação citoplasmática e nuclear no tecido considerado controle positivo (**Figura 3**).

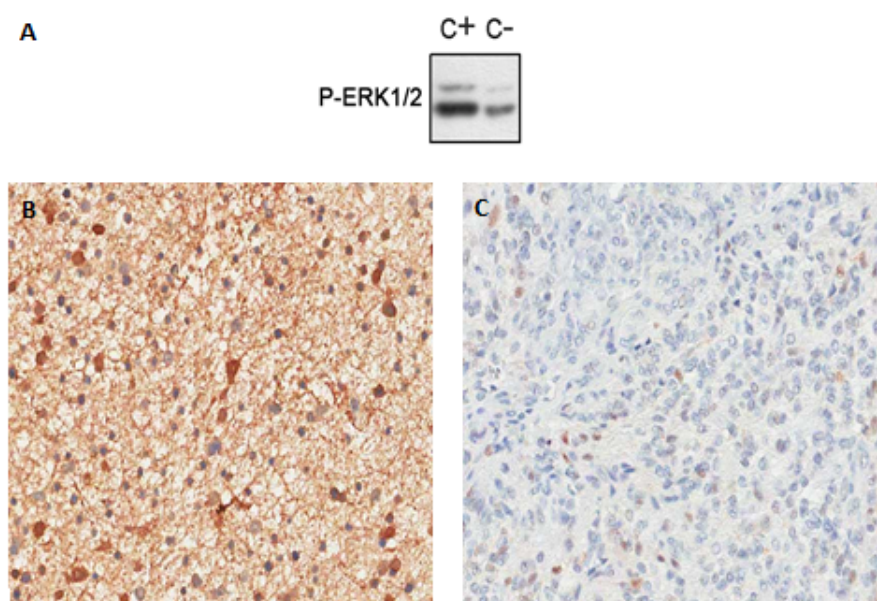


Figura 3 – Padronização da IHQ contra pERK1/2. (A) Tecido tumoral a fresco foi submetido a ensaio de western blotting contra a forma fosforilada de ERK1/2. Foram escolhidos tecidos com maior e menor expressão da proteína alvo para a padronização da IHQ. (B e C) Os mesmos tecidos parafinados foram utilizados para a padronização da reação de IHQ. (B) Tecido tumoral utilizado como controle positivo, apresentando alta positividade citoplasmática e nuclear. (C) Tecido tumoral utilizado como controle negativo, exibindo praticamente nenhuma marcação.

Para a reação contra RSK1 foi necessária a modificação do tempo de incubação, apresentando melhor resultado na diluição 1/200 e incubação *overnight* (ON). Embora esse anticorpo seja descrito como validado para utilização em IHQ, o fabricante descreve sítios esperados de marcação somente em tecido gástrico, citando marcação específica citoplasmática e nuclear em tecido glandular. Contudo, obtivemos resultado semelhante ao descrito, em tecido cerebral (**Figura 4**).

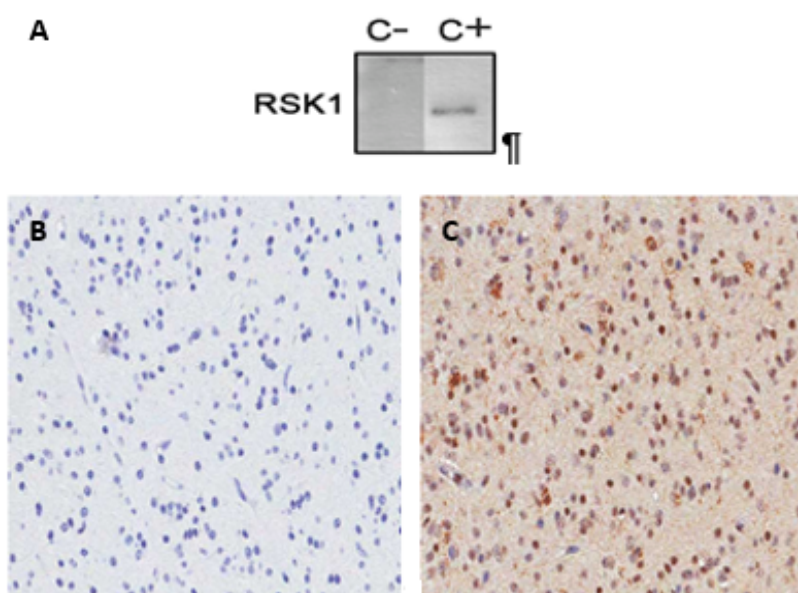


Figura 4 - Padronização da IHQ contra RSK1. (A) Tecido tumoral a fresco foi submetido a ensaio de western blotting contra a forma total de RSK1. Foram escolhidos tecidos com maior e menor expressão da proteína alvo para a padronização da IHQ. (B e C) Os mesmos tecidos parafinados foram utilizados para a padronização da reação de IHQ. (B) Tecido tumoral utilizado como controle negativo. (C) Tecido tumoral utilizado como controle positivo, apresentando alta positividade citoplasmática e nuclear.

A reação contra pRSK1 exibiu melhores resultados quando tecidos foram incubados ON a 4°C e anticorpo diluído na proporção 1/25. Assim como pERK1/2, o fabricante do anticorpo anti-pRSK1 não apresenta informação a respeito de validação deste produto para IHQ. Desta forma baseamos a acurácia dos nossos resultados no perfil proteico das amostras obtido via WB (**Figura 5**).

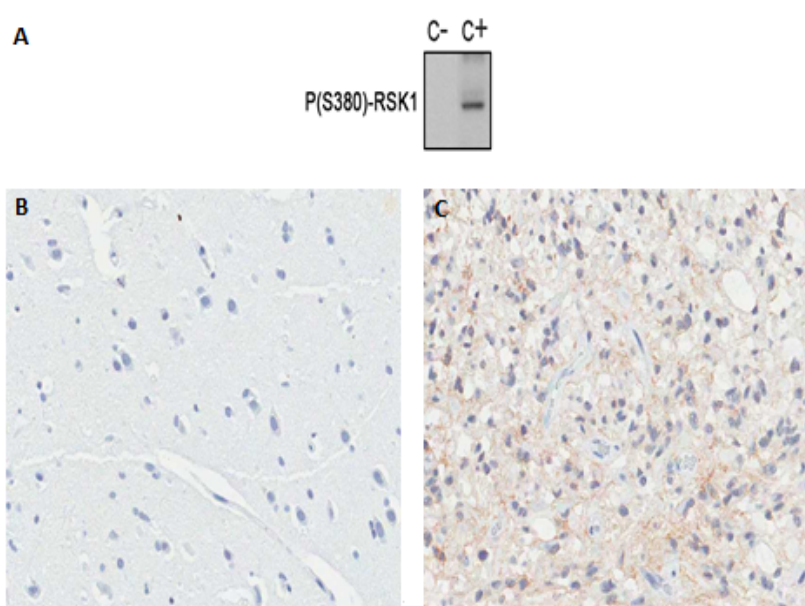


Figura 5 - Padronização da IHQ contra pRSK1. (A) Tecido tumoral a fresco foi submetido a ensaio de western blotting contra a forma fosforilada de RSK1. Foram escolhidos tecidos com maior e menor expressão da proteína alvo para a padronização da IHQ. (B e C). Os mesmos tecidos parafinados foram utilizados para a padronização da reação de IHQ. (B) Tecido tumoral utilizado como controle negativo. (C) Tecido tumoral utilizado como controle positivo, apresentando certa positividade citoplasmática.

Para a padronização da reação contra S6 (**Figura 6**), a diluição do anticorpo na proporção 1/100 e incubação ON a 4°C mostrou melhores resultados. O fabricante apresenta a informação de validação deste anticorpo em IHQ e embora não ofereça a informação de localização de marcação, propõe o título utilizado neste trabalho.

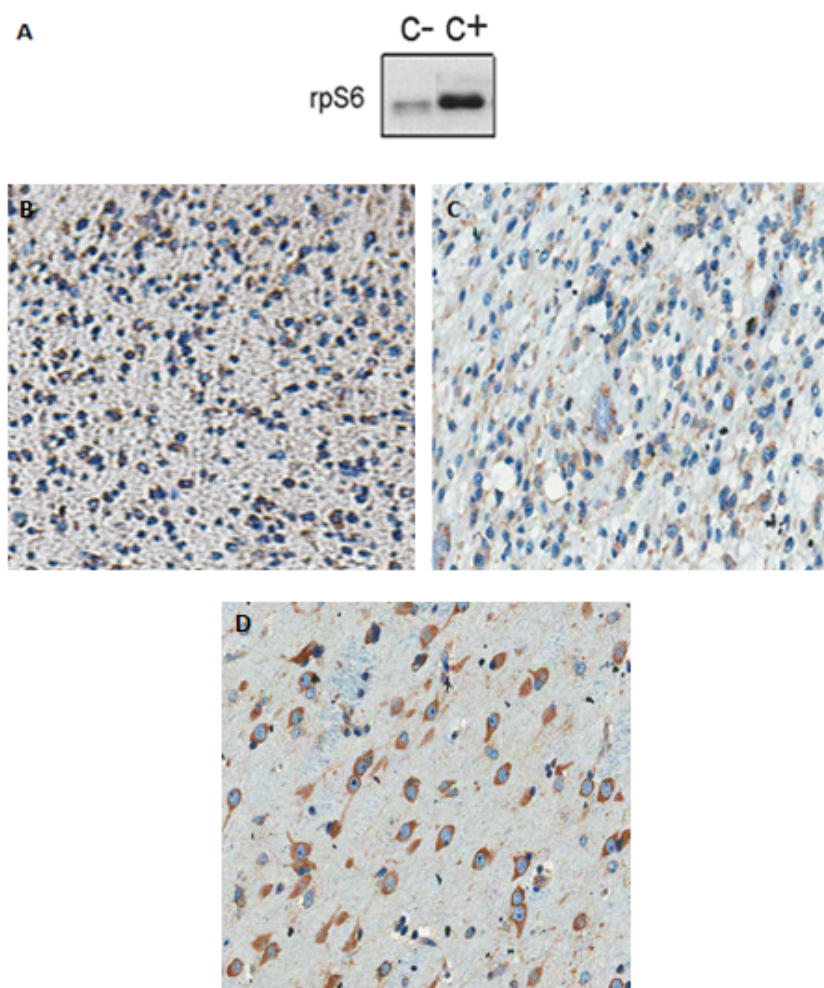


Figura 6 - Padronização da IHQ contra S6. (A) Tecido tumoral a fresco foi submetido a ensaio de western blotting contra a forma total de S6. Foram escolhidos tecidos com maior e menor expressão da proteína alvo para a padronização da IHQ (B e C). Os mesmos tecidos parafinados foram utilizados para a padronização da reação de IHQ. (B) Tecido tumoral utilizado como controle negativo. (C) Tecido tumoral utilizado como controle positivo, apresentando certa positividade citoplasmática. (D) Tecido normal exibindo marcação neuronal.

Para a reação anti-pS6(S235/236), a melhor condição de reação mostrou-se diluição de anticorpo na proporção 1/200 e incubação ON a 4°C. Embora o fabricante indique o título 1/75 como validado para IHQ, obtivemos melhor resultado com o anticorpo mais diluído (**Figura 7**).

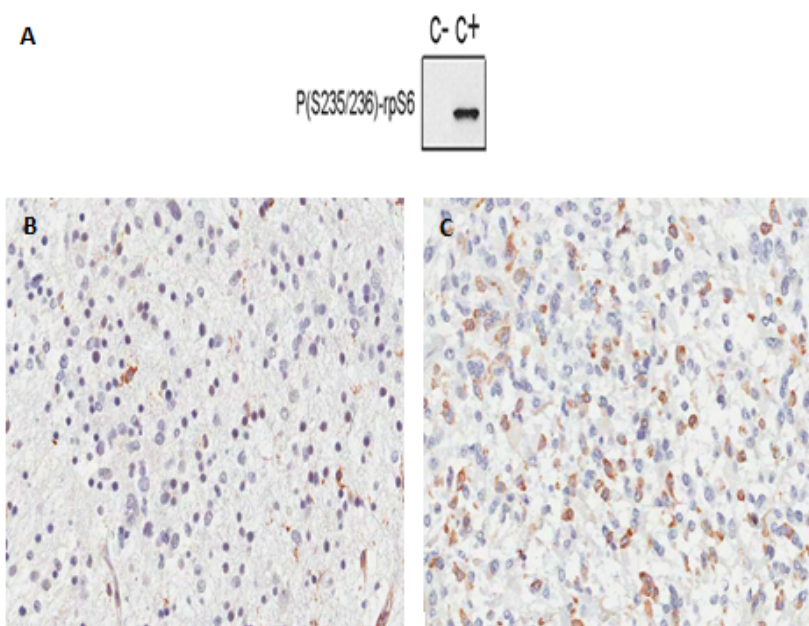


Figura 7 - Padronização da IHQ contra pS6(S235/236). (A) Tecido tumoral a fresco foi submetido a ensaio de western blotting contra a forma fosforilada de S6. Foram escolhidos tecidos com maior e menor expressão da proteína alvo para a padronização da IHQ (B e C). Os mesmos tecidos parafinados foram utilizados para a padronização da reação de IHQ. (B) Tecido tumoral utilizado como controle negativo. (C) Tecido tumoral utilizado como controle positivo, apresentando certa positividade nuclear.

Finalmente, a reação anti-pS6(S240/244) (**Figura 8**), exibiu melhores resultados quando anticorpo foi diluído em 1/200 e tecido incubado por 2h em temperatura ambiente. Embora não validado para IHQ, a especificidade de marcação nos resíduos em questão é descrita na especificação técnica do anticorpo, disponibilizada na página do fabricante.

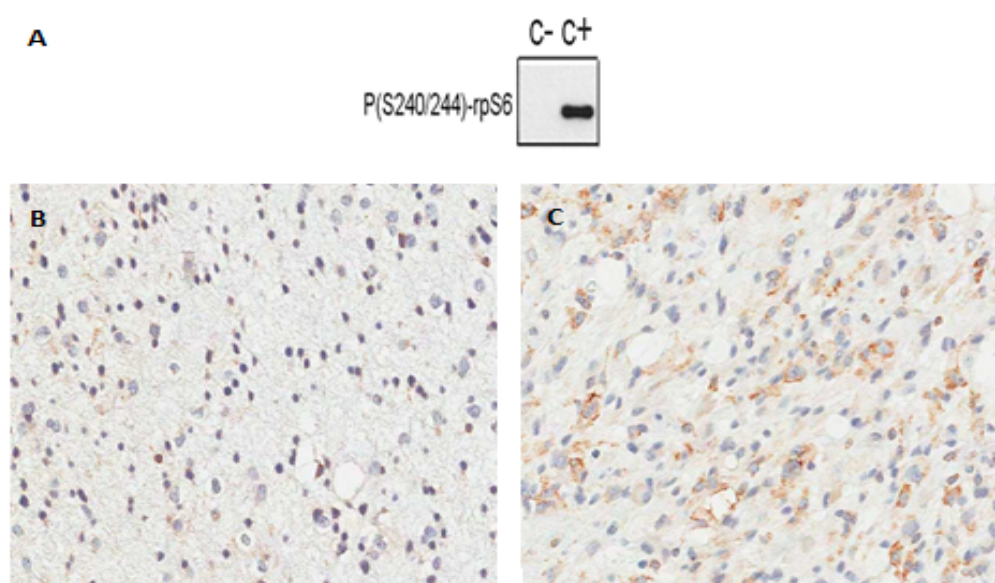


Figura 8 - Padronização da IHQ contra pS6(S240/244). (A) Tecido tumoral a fresco foi submetido a ensaio de western blotting contra a forma fosforilada de S6. Foram escolhidos tecidos com maior e menor expressão da proteína alvo para a padronização da IHQ (B e C). Os mesmos tecidos parafinados foram utilizados para a padronização da reação de IHQ. (B) Tecido tumoral utilizado como controle negativo. (C) Tecido tumoral utilizado como controle positivo, apresentando certa positividade citoplasmática.

4.2 ANÁLISE DOS SPOTS EM DUPLICATA NOS TMAs

Uma vez que os TMAs GBM, fornecidos para a execução deste trabalho, disponibilizavam dois *spots* do mesmo tecido doador (duplicata) e considerando que existe heterogeneidade intratumoral nesta classe neoplásica (VARTANIAN et al. 2014), a análise de regiões distintas do mesmo segmento tumoral poderia, em teoria, resultar em melhor representação do perfil tumoral. Decidimos então correlacionar a quantificação padrão (spot I), realizada em todas as proteínas neste trabalho, com sua duplicata (spot II) afim de verificar se a utilização de uma segunda quantificação auxiliaria na obtenção de uma melhor representatividade tumoral. O estudo de VAN ZWIETEN (2013) demonstrou 98% de correlação entre spots originais e duplicatas em reação de IHQ diagnóstica, utilizando 57 anticorpos primários. No presente estudo foi observado, tanto na fração total quanto nuclear, que existe correlação significativa entre as duas variáveis, indicando que a análise de somente uma delas mostra-se suficiente para a representação do perfil da expressão desta proteína (**Figura 9 e 10**).

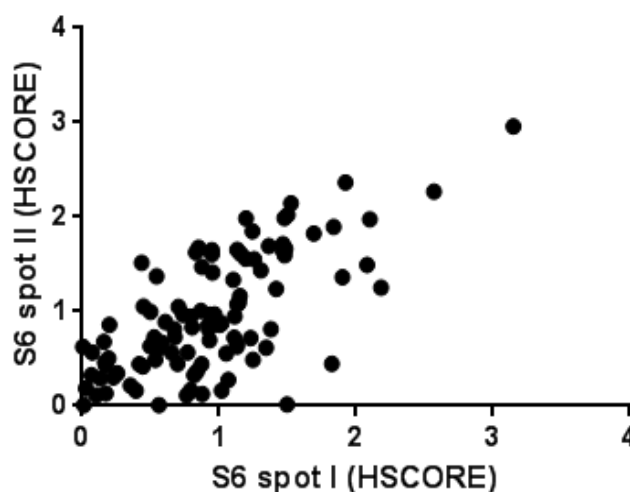


Figura 9 - Correlação entre duplicatas do TMA. TMA contendo amostras de gliomas de diversos graus foi submetido a reação de IHQ para a proteína rpS6. A presença da proteína total foi quantificada tendo sido gerado um HSCORE. Os dados das duas duplicatas (S6 spot I e S6 spot II) foram plotados em um gráfico de pontos e foi calculado o coeficiente de correlação entre as duas. Spearman $p < 0,05$, $r = 0,6414$.

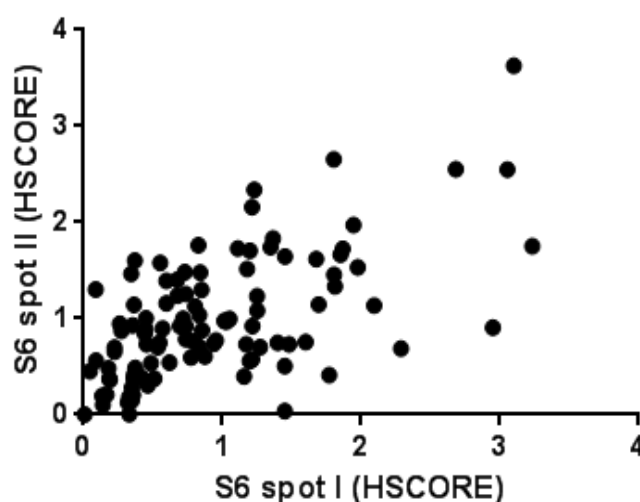


Figura 10 - Correlação entre duplicatas do TMA, fração nuclear. TMA contendo amostras de gliomas de diversos graus foi submetido a reação de IHQ para a proteína rpS6. A presença da proteína no núcleo foi quantificada tendo sido gerado um HSCORE. Os dados das duas duplicatas (S6 spot I e S6 spot II) foram plotados em um gráfico de pontos e foi calculado o coeficiente de correlação entre as duas. Spearman $p < 0,05$, $r = 0,5758$.

4.3 IMUNO-HISTOQUÍMICA DOS TMAs

A análise da expressão de RSK1 total não revelou alteração significativa entre os diversos graus tumorais. Como mencionado anteriormente a ativação de RSK pode resultar em sua translocação para o núcleo celular (ANJUM e BLENIS 2008), levando à ativação de diversos substratos, associados à regulação da atividade apoptótica e do ciclo celular (STRATFORD e DUNN 2011). Deste modo, quantificamos também a presença de RSK1 no núcleo. Foi observado maior expressão de RSK1 nuclear em tumores Grau II, Grau III e Grau IV quando comparado a cérebro normal. Em tumores de Grau IV foi observado uma grande variação na expressão e fosforilação de RSK1 (**Figuras 11 e 12**), sugerindo que possam haver tumores com características distintas dentro desta população.

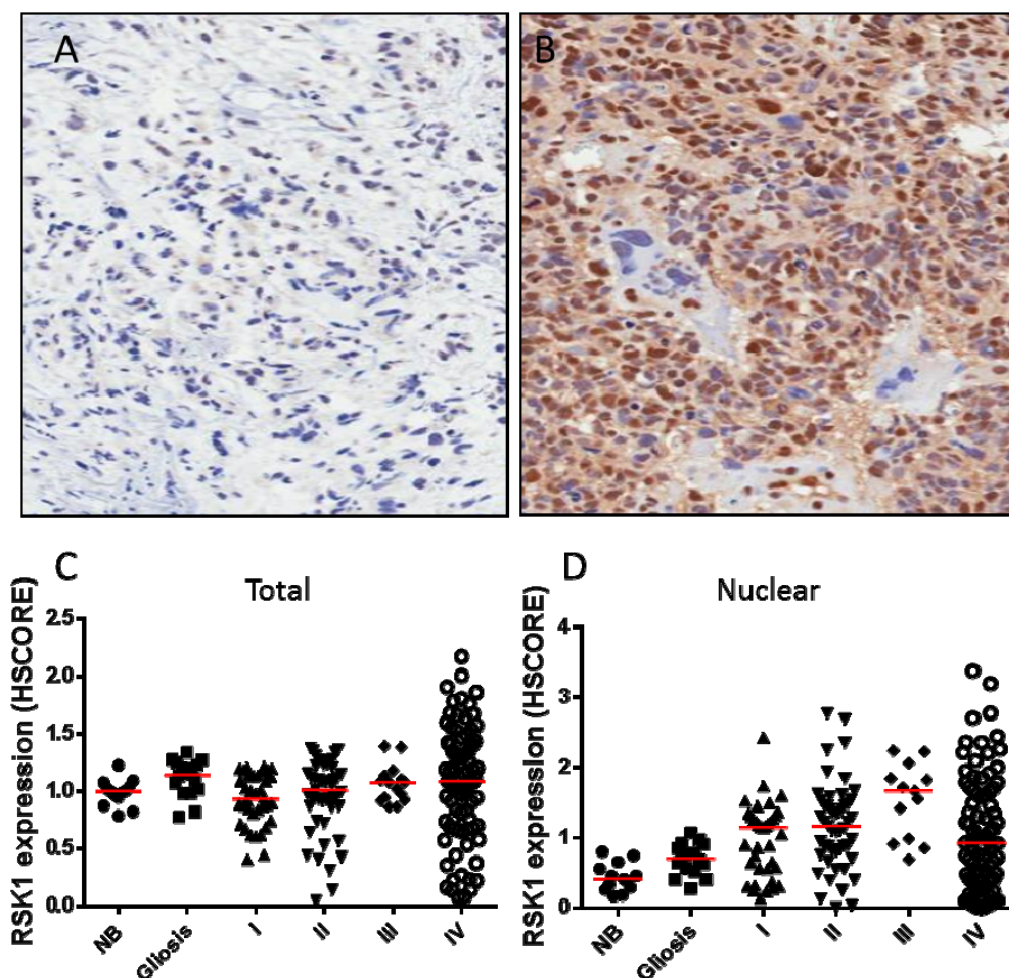


Figura 11 - Expressão de RSK1 em astrocitomas. TMAs contendo amostras de astrocitomas de diversos graus foram submetidos a reações de IHQ contra RSK1. (A) Imagem representativa de glioblastoma negativo para a proteína analisada, tanto em sua expressão citoplasmática como nuclear. (B) Imagem representativa de tecido com expressão positiva de RSK1. HSCORES totais de 10 e 161 respectivamente. **(C e D)** Após a reação de IHQ, a quantificação foi realizada automaticamente pelo software ScanScope e o HSCORE normalizado foi calculado tanto para a expressão total (C) quanto para a expressão nuclear (D). Cada caso foi marcado com um ponto e em vermelho está indicada a mediana. A diferença entre os diversos graus tumorais foi calculada através do teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn para comparações múltiplas. Expressão de RSK1 total $p=0,1184$. NB $n=13$, Gliosis $n=16$, Grau I $n=37$, Grau II $n=49$, Grau III $n=15$, Grau IV $n=86$. Expressão de RSK1 nuclear NB versus II, III e IV, Gliosis versus III, $p<0,0001$. NB $n=13$, Gliosis $n=16$, Grau I $n=37$, Grau II $n=50$, Grau III $n=13$, Grau IV $n=86$. NB - tecido normal, Gliosis - Gliose.

RSK é diretamente fosforilada pelas ERK1/2, o que leva a sua ativação. Uma vez ativada, RSK pode promover sobrevivência celular por inativação de efetores apoptóticos assim como mediar substratos envolvidos no crescimento e proliferação celular (CARRIERE et al. 2008). Desta maneira, analisamos também o estado de fosforilação de RSK nos diferentes casos. Observamos que embora não haja diferenças significativas da fosforilação de RSK1 total e nuclear na comparação dos tumores com o tecido normal, é possível notar uma grande variação de fosforilação nos glioblastomas o que não é visto no tecido normal ou em tumores de menor grau (**Figura 12**).

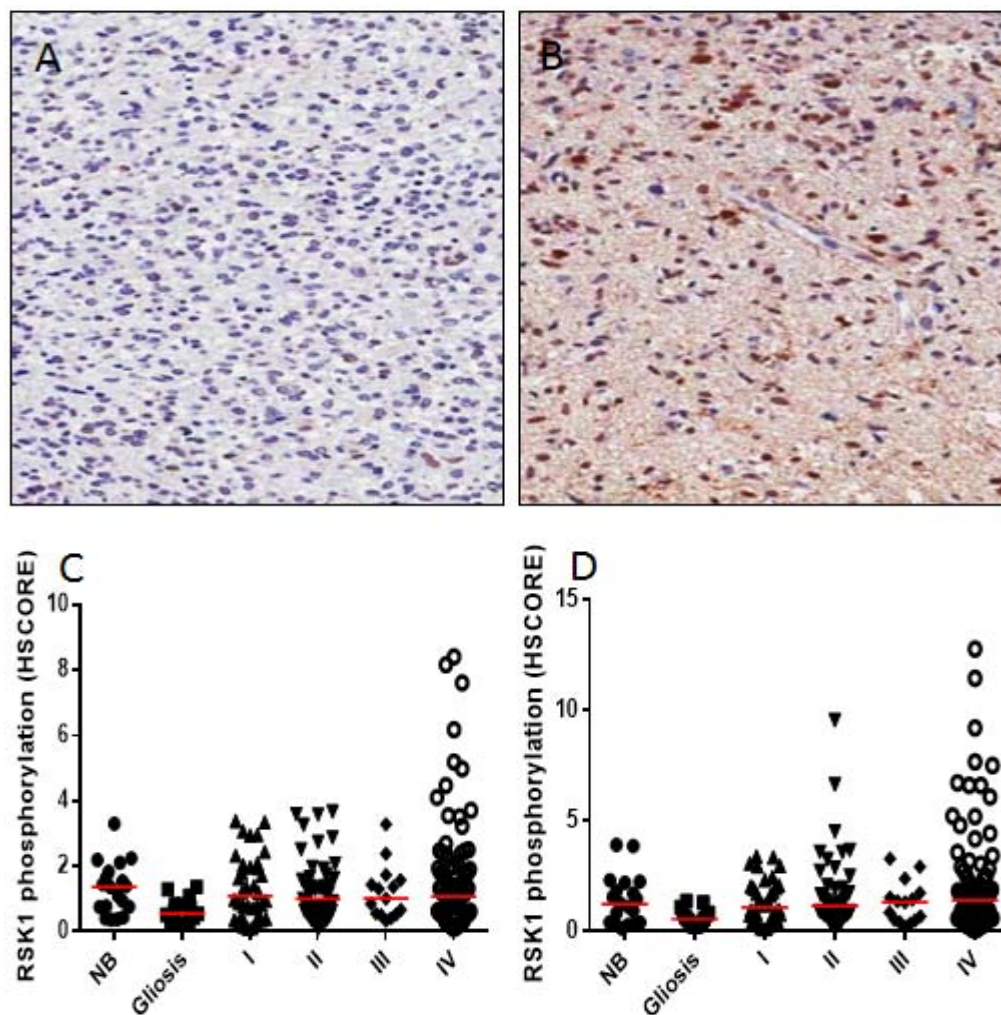


Figura 12 - Fosforilação de RSK1 em astrocitomas. TMAs contendo amostras de astrocitomas de diversos graus foram submetidos a reações de IHQ contra pRSK1. (A) Imagem representativa de glioblastoma negativo para a proteína analisada, tanto em sua expressão citoplasmática como nuclear. (B) Imagem representativa de tecido reativo frente anti-pRSK1. HSCORES totais de 7 e 60 respectivamente. **(C e D)** Após a reação de IHQ, a quantificação foi realizada automaticamente pelo software ScanScope e o HSCORE normalizado foi calculado tanto para a fosforilação total (C) quanto para a fosforilação nuclear (D). Cada caso foi marcado com um ponto e em vermelho está indicada a mediana. A diferença entre os diversos graus tumorais foi calculada através do teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn para comparações múltiplas. Fosforilação de RSK1 total $p=0,1736$. NB $n=19$, Gliosis $n=15$, Grau I $n=36$, Grau II $n=49$, Grau III $n=15$, Grau IV $n=90$. Fosforilação de RSK1 nuclear $p=0,0643$. NB $n=19$, Gliosis $n=15$, Grau I $n=36$, Grau II $n=49$, Grau III $n=15$, Grau IV $n=90$. NB - tecido normal, Gliosis - Gliose.

A análise de correlação entre a expressão e fosforilação de RSK1 nos diversos graus tumorais foi baixa (**Tabela 5**), principalmente porque os níveis de fosforilação de RSK1 são baixos nestas amostras. Por outro lado, quando comparamos os valores de HSCORE de RSK1 total e fosforilada, observamos apenas um caso dentre as 195 amostras onde havia marcação para pRSK1 na presença de valores muito baixos para RSK1 total. Este dado é mais um argumento em favor da especificidade da marcação.

Tabela 5 – Correlação entre expressão e fosforilação de RSK1 total e nuclear nos diversos graus tumorais

<i>RSK1 vs pRSK1</i>	<i>total</i>	<i>núcleo</i>
<i>Grau I</i>	p=0,0508 r=0,3328	p=0,0865 r=0,2984
<i>Grau II</i>	p=0,0098 r=0,3810	p=0,1785 r=0,1975
<i>Grau III</i>	p=0,0106 r=0,7203	p=0,5321 r=0,1824
<i>Grau IV</i>	p=0,0049 r=0,3062	p=0,0105 r=0,2829
<i>Todos os graus</i>	p< 0,0001 r=0,3367	p=0,0009 r=0,2478

Devido ao seu papel na transcrição e tradução, as RSKs estão intimamente ligadas ao controle da proliferação. Por exemplo, a inibição de RSK por SL0101 resulta em inibição do crescimento da linhagem celular tumoral MCF-7 (SMITH et al. 2005). Deste modo, comparamos a expressão de RSK e de sua forma fosforilada com a expressão do marcador de proliferação Ki-67. Os dados de expressão de Ki-67 nos mesmos TMAs foram obtidos da dissertação de mestrado do aluno Arthur William Alvarenga (ALVARENGA 2012).

Tabela 6 – Correlação entre a expressão de RSK1 total e nuclear nos diversos graus tumorais e índice de proliferação celular

<i>RSK1 vs Ki-67</i>	<i>total</i>	<i>núcleo</i>
<i>Grau I</i>	p=0,800 r=0,045	p=0,002 r=0,500
<i>Grau II</i>	p=0,796 r=0,043	p<0,0001 r=0,636
<i>Grau III</i>	p=0,115 r=0,482	p=0,366 r=0,286
<i>Grau IV</i>	p=0,894 r=-0,014	p=0,201 r=0,154
<i>Todos os graus</i>	p=0,536 r=0,048	p=0,0005 r=0,276

Em astrocitomas de baixo grau, podemos observar uma correlação importante entre a presença de RSK1 e sua forma fosforilada no núcleo e a proliferação celular. Por outro lado, em astrocitomas de alto grau, esta correlação é perdida (**Tabelas 6 e 7**), provavelmente devido a um acúmulo de alterações genéticas que também influenciam no comportamento proliferativo.

Tabela 7 - Correlação entre a fosforilação de RSK1 total e nuclear nos diversos graus tumorais e índice de proliferação celular

<i>RSK vs Ki-67</i>	<i>total</i>	<i>núcleo</i>
<i>Grau I</i>	p=0,084 r=0,300	p=0,001 r=0,518
<i>Grau II</i>	p=0,707 r=0,063	p=0,002 r=0,485
<i>Grau III</i>	p>0,999 r=-0,006	p=0,386 r=0,309
<i>Grau IV</i>	p=0,715 r=-0,040	p=0,284 r=-0,117
<i>Todos os graus</i>	p=0,500 r=0,052	p=0,052 r=0,150

Como a variação na expressão de RSKs não parece relacionada ao grau tumoral, decidimos verificar se poderia estar relacionada a outras alterações gênicas frequentemente encontradas em gliomas. A perda de PTEN através de mutações e deleções no gene é frequentemente observada em gliomas, contribuindo para o processo tumorigênico (BLEEKER et al. 2012). Desta maneira, avaliamos também a relação entre a expressão de RSK1 e PTEN em tumores Grau IV. A expressão de PTEN foi avaliada através de IHQ sendo atribuído um *score* de 0 a 2 em função da marcação tecidual, comparada à marcação do tecido endotelial adjacente. Expressão equivalente ao endotélio foi classificada como 2, expressão inferior à do endotélio 1 e ausência de expressão foi classificada como 0. Todo tecido normal utilizado apresentou classificação 2. Os dados de expressão de PTEN nos mesmos TMAs foram obtidos da dissertação de mestrado do aluno Arthur William Alvarenga (ALVARENGA 2012). Pudemos observar que nos glioblastomas, a presença de PTEN se correlaciona com maiores níveis de expressão de RSK1 (**Figura 13**).

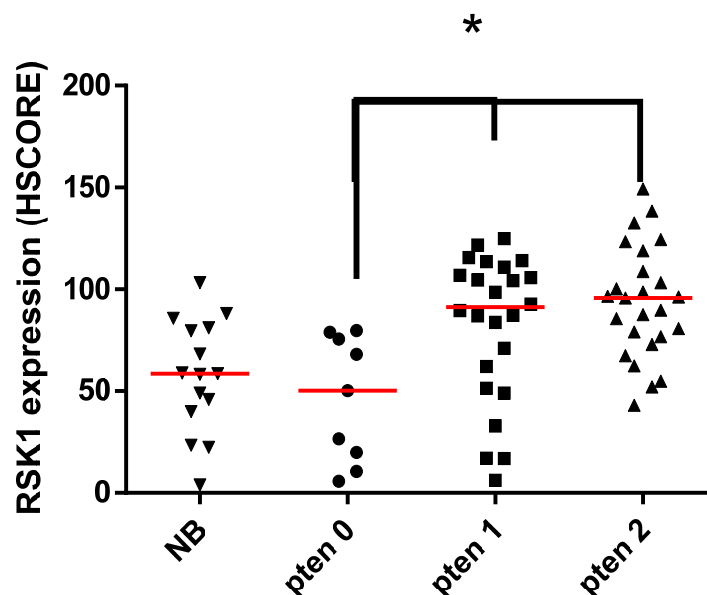


Figura 13 - Análise da correlação da expressão de RSK1 total e expressão de PTEN em casos Grau IV. Após a reação de IHQ, a quantificação foi realizada automaticamente pelo software ScanScope e o HSCORE normalizado foi calculado. Cada caso foi marcado com um ponto e vermelho está indicada a mediana. A diferença entre os diversos graus tumorais foi calculada através do teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn para comparações múltiplas. NB versus PTEN 2, PTEN 0 versus PTEN 1, PTEN 0 versus PTEN 2, $p=0,0004$. NB – tecido normal. PTEN 0 $n=9$, PTEN 1 $n=24$, PTEN 2 $n=25$, NB $n=15$.

Do mesmo modo, observamos que a forma fosforilada de RSK1 também se correlaciona com a presença de PTEN (**Figura 14**). Embora a perda de PTEN seja observada também em gliomas de graus menores, este tipo de análise não pode ser realizada nos outros graus devido ao baixo número de casos disponíveis.

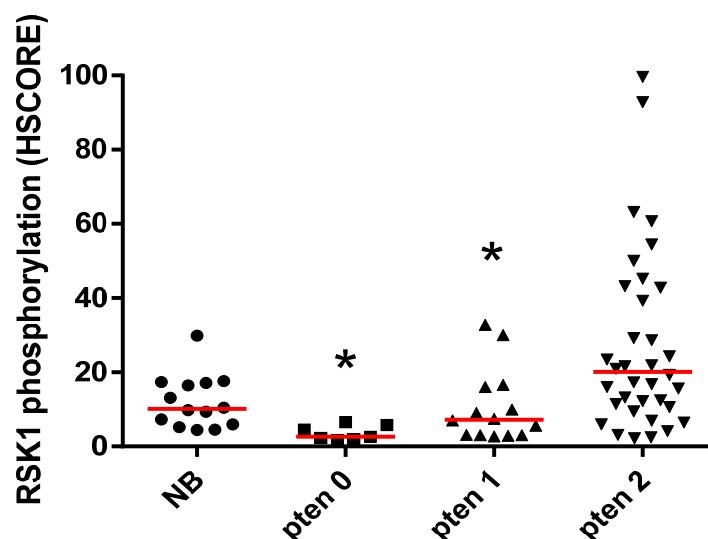


Figura 14 - Análise da correlação da fosforilação de RSK1 total e expressão de PTEN em casos Grau IV. Após a reação de IHQ, a quantificação foi realizada automaticamente pelo software ScanScope e o HSCORE normalizado foi calculado. Cada caso foi marcado com um ponto e vermelho está indicada a mediana. A diferença entre os diversos graus tumorais foi calculada através do teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn para comparações múltiplas. NB versus PTEN 2, PTEN 0 versus PTEN 2, PTEN 1 versus PTEN 2, $p=0,0016$. NB – tecido normal. PTEN 0 $n=7$, PTEN 1 $n=14$, PTEN 2 $n=36$, NB $n=14$.

Como já mencionado anteriormente, RSKs são ativadas diretamente pelas ERKs (MA e BLENIS 2009), onde ERK1/2 é necessária para fosforilação e subsequente ativação de RSK (CARRIERE et al. 2008). KIM et al. 2006 também demonstraram que RSK regula negativamente a atividade de ERK através de bloqueio de sua localização nuclear. Uma vez que a forma fosforilada de ERK está associada ao desenvolvimento de astrocitomas e transformação para fenótipo de maior malignidade (SAETTA et al. 2011), decidimos analisar a atividade desta proteína e sua correlação com a fosforilação de RSK. Como observado na **Figuras 15 A e B**, pERK1/2

exibe forte atividade tanto em tecido cerebral normal como em tecido tumoral.

Considerando que vários substratos de ERK1/2 são proteínas nucleares, notadamente fatores de transcrição, e que ERK1/2 é encontrado constitutivamente ativado em diversos tipos de tumores, além de terem seus níveis de expressão, tanto citoplasmáticos como nucleares, positivamente correlacionados com progressão tumoral (SAETTA et al. 2011), decidimos analisar a atividade nuclear da forma fosforilada de ERK1/2. A análise da forma fosforilada de ERK1/2 total não revelou diferença entre os tumores de diversos graus e tecido normal, porém tecidos provenientes de gliose reativa apresentaram uma redução dos níveis de pERK1/2 quando comparado a tumores Grau II, III e IV. Contudo, os níveis de ERK1/2 fosforilada, em sua fração nuclear, apresentaram variação significativa quando tecido normal foi comparado a tumores Grau III e IV. Da mesma forma, gliose apresentou redução dos níveis de ERK1/2 fosforilado quando comparado aos diversos graus tumorais (**Figuras 15 C e D**).

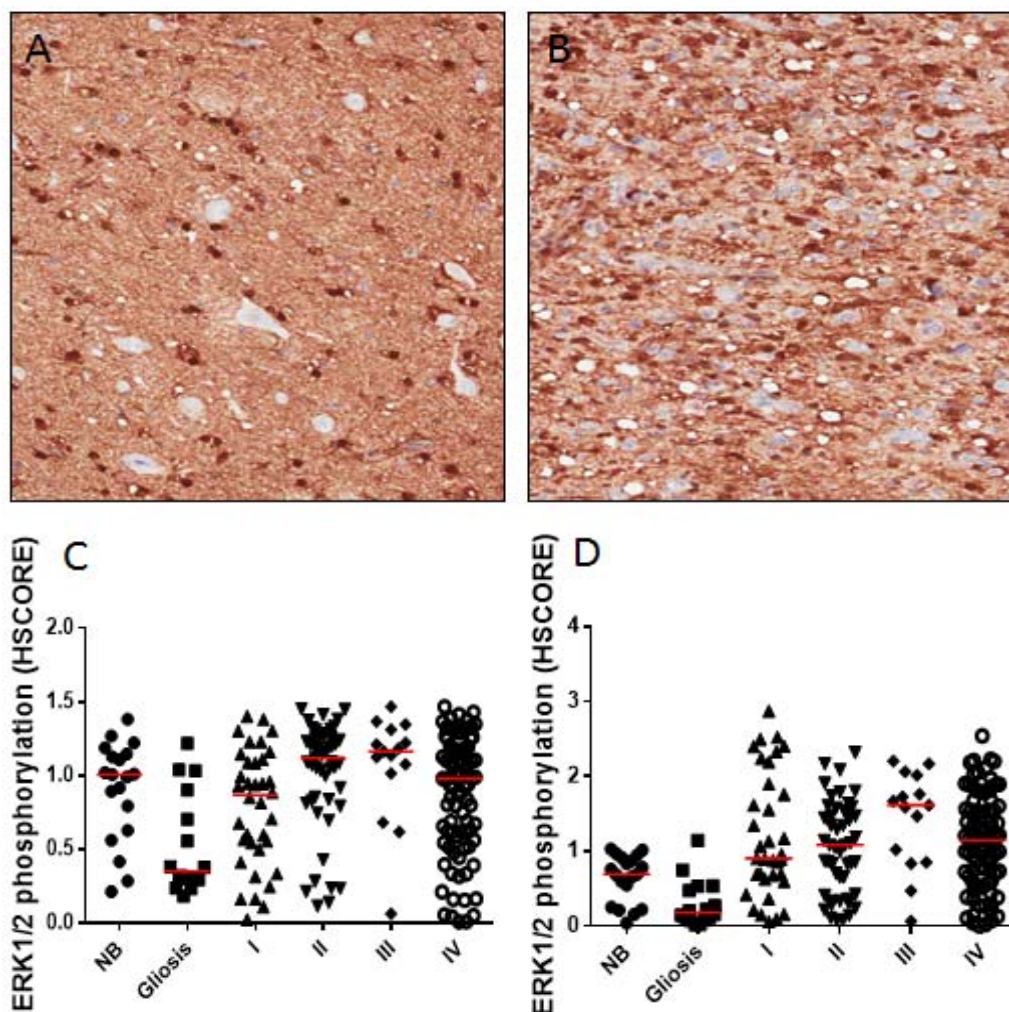


Figura 15 - Fosforilação de ERK1/2 em astrocitomas. TMAs contendo amostras de astrocitomas de diversos graus foram submetidos a reações de IHQ contra pERK1/2. (A) Imagem representativa de tecido normal, reativo contra a proteína analisada, tanto em sua expressão citoplasmática como nuclear. (B) Imagem representativa de tecido tumoral reativo frente anti-pERK1/2. HSCORES totais de 209 e 196 respectivamente. (C e D) Após a reação de IHQ, a quantificação foi realizada automaticamente pelo software ScanScope e o HSCORE normalizado foi calculado tanto para a fosforilação total (C) quanto para a fosforilação nuclear (D). Cada caso foi marcado com um ponto e em vermelho está indicada a mediana. A diferença entre os diversos graus tumorais foi calculada através do teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn para comparações múltiplas. Fosforilação de ERK1/2 total, Gliosis versus II, Gliosis versus III, Gliosis versus IV, $p=0,0002$. NB $n=19$, Gliosis $n=16$, Grau I $n=36$, Grau II $n=49$, Grau III $n=15$, Grau IV $n=89$. Fosforilação de ERK1/2 nuclear, NB vs. III, NB versus IV, Gliosis vs I, II, III e IV $p=0,0001$. NB $n=19$, Gliosis $n=16$, Grau I $n=35$, Grau II $n=49$, Grau III $n=15$, Grau IV $n=89$. NB - tecido normal, Gliosis - Gliose.

Para melhor entendermos a relação entre a ativação de ERK e como isso influencia na atividade de RSK durante o processo de tumorigênese, a correlação entre as formas fosforiladas destas duas proteínas também foi feita. Quando correlacionados à pERK1/2, pRSK1 apresentou correlação significativa em todos os graus tumorais (**Tabela 8**)

Tabela 8 - Correlação entre a fosforilação de RSK1 e fosforilação de ERK1/2 nos diversos graus tumorais

<i>pRSK1 vs pERK1/2</i>	
<i>Grau I</i>	<i>p=0,013</i> <i>r=0,468</i>
<i>Grau II</i>	<i>p=0,013</i> <i>r=0,363</i>
<i>Grau III</i>	<i>p=0,048</i> <i>r=0,521</i>
<i>Grau IV</i>	<i>p<0,0001</i> <i>r=0,559</i>

Considerando que a proteína S6 é alvo direto de RSK e tem participação importante na tradução de mRNAs associados à codificação de proteínas envolvidas na progressão do ciclo celular (CASTEDO et al. 2002), decidimos também analisar sua atividade. Interessantemente, a atividade desta proteína ribossomal em tecido cerebral parece ser predominante em populações neuronais (**Figura 16**). A expressão de S6 nos diversos graus tumorais não demonstrou alteração significativa em relação ao tecido normal (**Figura 17**).

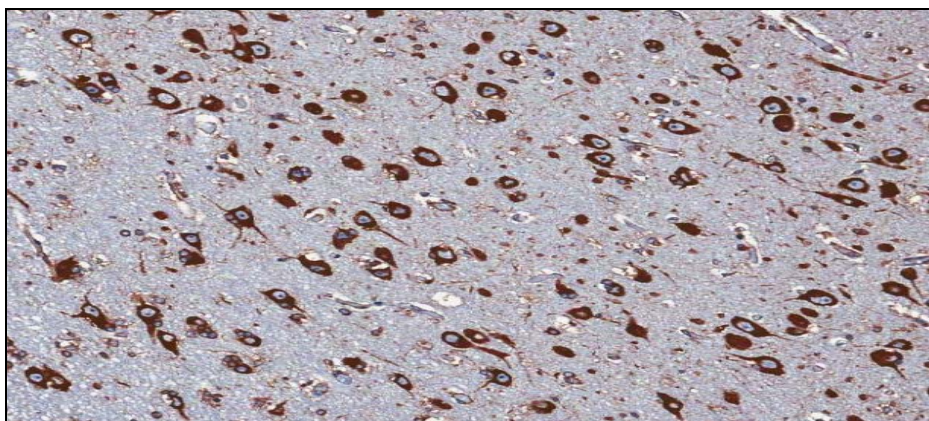


Figura 16 - Reação de IHQ contra S6 em tecido cerebral normal. Tecido normal exibindo alta especificidade para conteúdo neuronal. HSCORE nuclear 106.

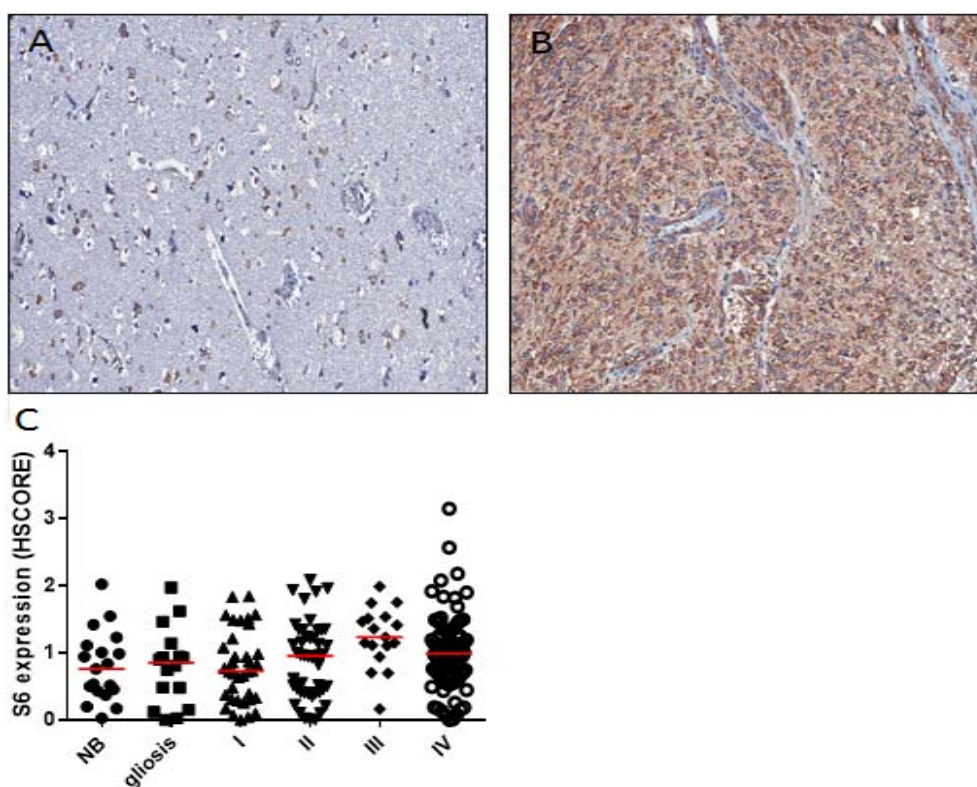


Figura 17 - Expressão de S6 em astrocitomas. TMAs contendo amostras de astrocitomas de diversos graus foram submetidos a reações de IHQ contra S6. (A) Imagem representativa de tecido tumoral, exibindo certa reatividade contra a proteína analisada em sua expressão nuclear. (B) Imagem representativa de tecido tumoral reativo frente anti-S6. HSCORES totais de 4 e 152 respectivamente. (C) Após a reação de IHQ, a quantificação foi realizada automaticamente pelo software ScanScope e o HSCORE normalizado foi calculado para a expressão total de S6. Cada caso foi marcado com um ponto e em vermelho está indicada a mediana. A diferença entre os diversos graus tumorais foi calculada através do teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn para comparações múltiplas. Expressão total de S6 $p=0,0207$. NB $n=19$, Gliosis $n=16$, Grau I $n=36$, Grau II $n=48$, Grau III $n=16$, Grau IV $n=88$. NB - tecido normal, Gliosis - Gliose.

Mesmo que a expressão de S6 não sofra alteração nos diversos graus tumorais analisados, seus níveis de fosforilação podem ser alterados devido a atividade das RSKs, sendo a fosforilação de S6 uma medida da atividade de RSKs. Para tanto, foram analisados os resíduos Ser235/236 e Ser240/244. Os resíduos 235/236 podem ser fosforilados tanto por p70S6K quanto por RSKs. Já os resíduos 240/244 são fosforilados somente por p70S6K (HUTCHINSON et al. 2011). A forma fosforilada de S6(S240/244) é muito observada em neurônios, de modo que no tecido normal se observa uma grande prevalência desta proteína fosforilada (**Figura 18**). Observa-se também ausência ou baixa atividade desta proteína em tecidos tumorais (**Figura 19**).

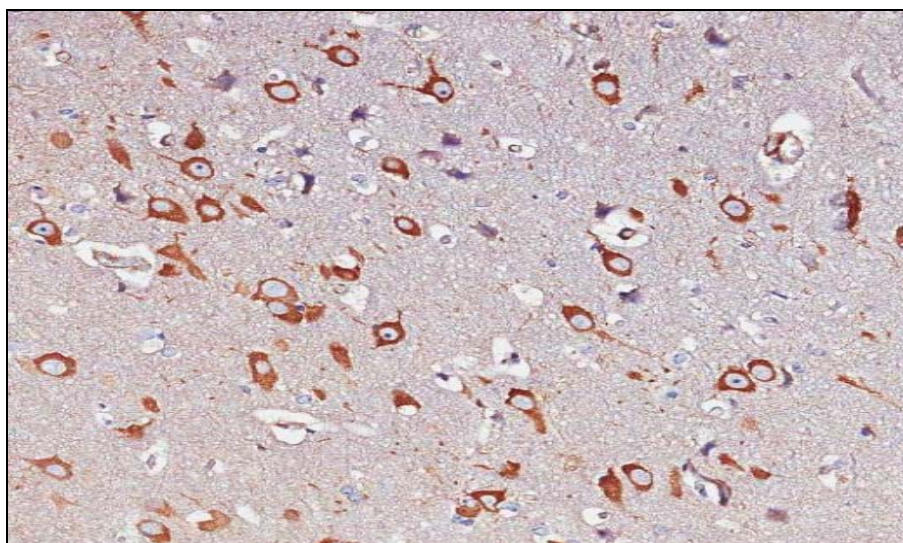


Figura 18 - Reação de IHQ contra pS6(S240/244) em tecido normal mostrando especificidade para conteúdo neuronal.

Uma vez que a ativação de S6 pode exercer influência no aumento nos níveis de tradução celular (CASTEDO et al. 2002), seu grau de fosforilação nos diferentes graus tumorais também foi analisado. Foi observado aumento na atividade de pS6(235/236) em tumores Grau III quando comparado a tecido reativo (**Figura 19 E**). Contudo, observamos uma redução significativa na marcação com pS6(S240/244) no cérebro normal versus gliomas Grau IV (**Figura 19 F**), o que provavelmente reflete a ausência dos neurônios altamente marcados neste tipo tumoral.

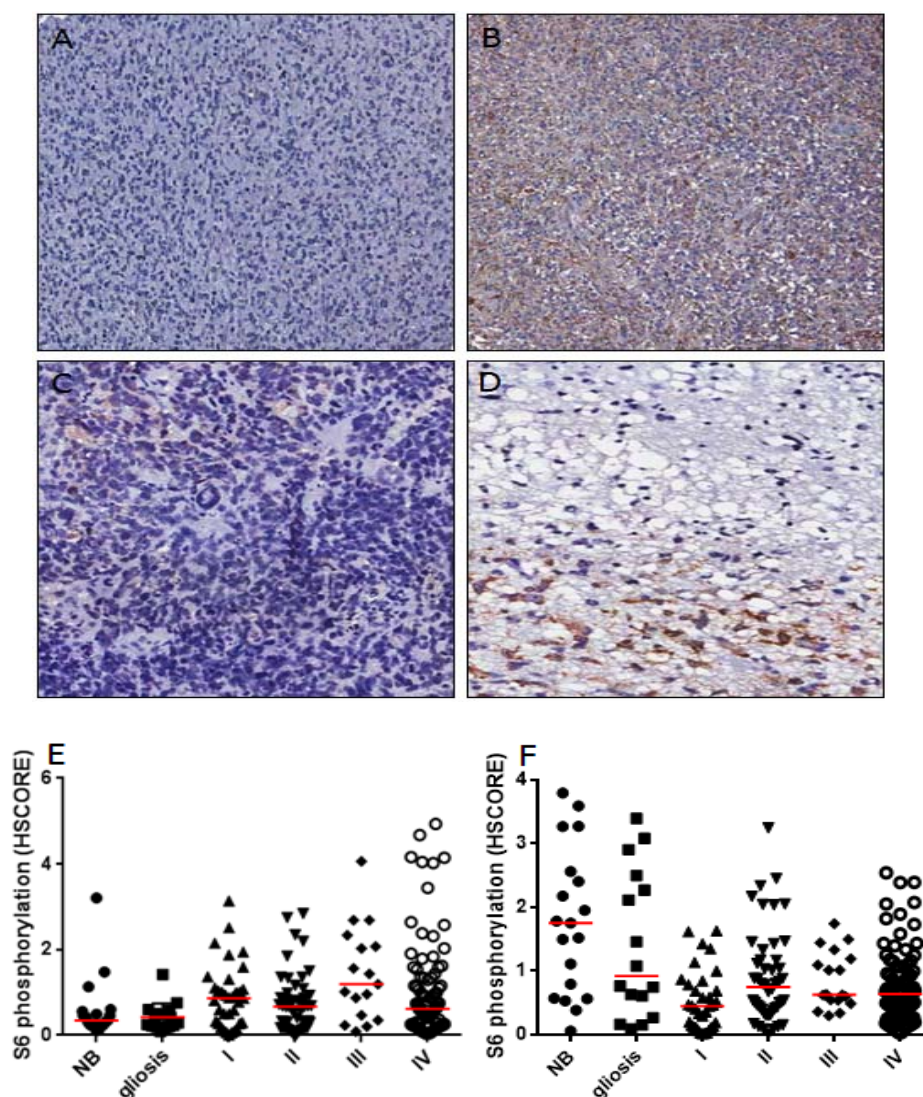


Figura 19 – Fosforilação de S6 em astrocitomas. TMAs contendo amostras de astrocitomas de diversos graus foram submetidos a reações de IHQ contra pS6 resíduos S235/236 e S240/244. (A) Imagem representativa de tecido tumoral, negativo frente a fosforilação de S6(S235/236). (B) Imagem representativa de tecido tumoral exibindo reatividade frente anti-pS6(S235/236). HSCORES totais de 0,2 e 71 respectivamente. (C) Imagem representativa de tecido tumoral, negativo frente a fosforilação de S6(S240/244). (D) Imagem representativa de tecido tumoral exibindo reatividade frente anti-pS6(S240/244). HSCORES totais de 14 e 58 respectivamente. (E e F) Após a reação de IHQ, a quantificação foi realizada automaticamente pelo software ScanScope e o HSCORE normalizado foi calculado para a fosforilação total de S6(S235/236) e S6(S240/244). Cada caso foi marcado com um ponto e em vermelho está indicada a mediana. A diferença entre os diversos graus tumorais foi calculada através do teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn para comparações múltiplas. (E) Fosforilação total de S6 resíduos S235/236, Gliose vs III $p=0,0100$. NB $n=19$, Gliosis $n=16$, Grau I $n=35$, Grau II $n=48$, Grau III $n=16$, Grau IV $n=90$. (F) Fosforilação total de S6 resíduos S240/244, NB versus I, NB versus IV, Gliose vs I $p<0,0001$. NB $n=19$, Gliosis $n=16$, Grau I $n=35$, Grau II $n=48$, Grau III $n=16$, Grau IV $n=87$. NB - tecido normal, Gliosis - Gliose.

Foram encontradas correlações significativas entre pRSK1 e pS6 nos Graus I a III, indicando que a fosforilação de RSK1 está sendo seguida pela fosforilação de seu substrato nos tumores de graus menores. Interessantemente, a fosforilação dos resíduos S6(S240/244), realizada por p70S6K, também seguiu o padrão de fosforilação de RSK1, indicando que provavelmente a via de PI3K-mTOR esteja concomitantemente ativada com a via de ERK1/2-RSK, nos tumores de Graus I a III. Já nos tumores de Grau IV, podemos observar que esta regulação é perdida, não havendo mais correlação entre a fosforilação de RSK1 e de S6 (**Tabela 9**).

Tabela 9 - Correlação entre a fosforilação de RSK1 e fosforilação de S6 nos diversos graus tumorais

<i>pRSK1 vs pS6</i>	<i>pS6 235/236</i>	<i>pS6 240/244</i>
<i>Grau I</i>	<i>p=0,002</i> <i>r=0,494</i>	<i>p=0,0008</i> <i>r=0,539</i>
<i>Grau II</i>	<i>p=0,025</i> <i>r=0,333</i>	<i>p<0,0001</i> <i>r=0,570</i>
<i>Grau III</i>	<i>p<0,0001</i> <i>r=0,876</i>	<i>p=0,002</i> <i>r=0,743</i>
<i>Grau IV</i>	<i>p=0,074</i> <i>r=0,192</i>	<i>p=0,074</i> <i>r=0,192</i>
<i>Todos os graus</i>	<i>p<0,0001</i> <i>r=0,327</i>	<i>p=0,0001</i> <i>r=0,351</i>

4.4 ANÁLISES DE SOBREVIDA

O estudo de sobrevida dos pacientes Grau IV revelou variações significativas quando a expressão de RSK1 total foi levada em consideração (**Figura 20**), onde indivíduos com maior expressão desta proteína apresentaram sobrevida mediana de 15,4 meses quando comparado a 8,6 meses daqueles com menor expressão.

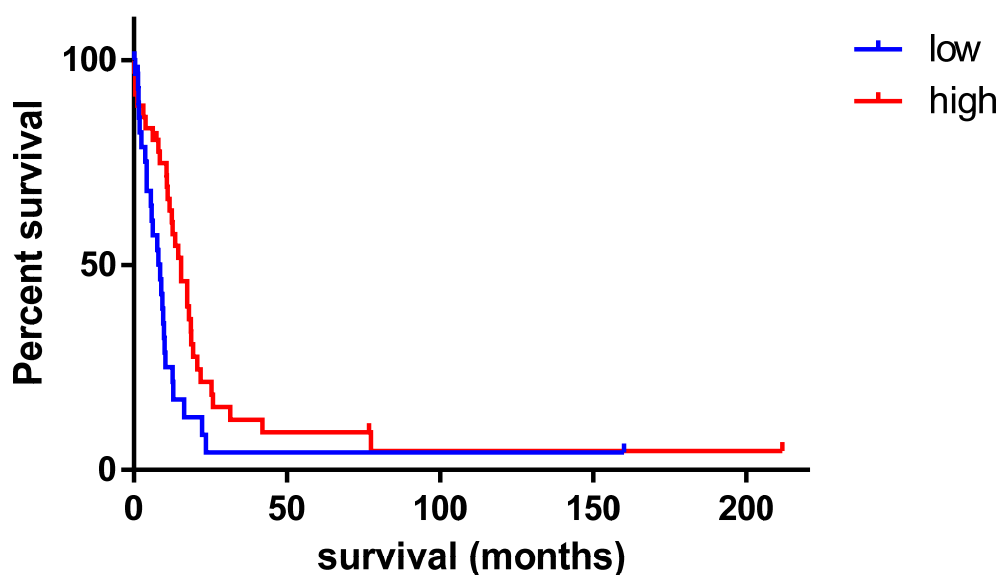


Figura 20 - Curva de sobrevida em função da expressão de RSK1 em pacientes Grau IV segundo teste de Log-rank. $p=0,0116$. $n=67$.

A curva de sobrevida para fosforilação de RSK1 em pacientes Grau IV (**Figura 21**), não demonstrou variação significativa entre baixa e alta expressão desta proteína, exibindo sobrevida mediana de 9,8 e 12,7 meses para indivíduos com baixa e alta expressão respectivamente.

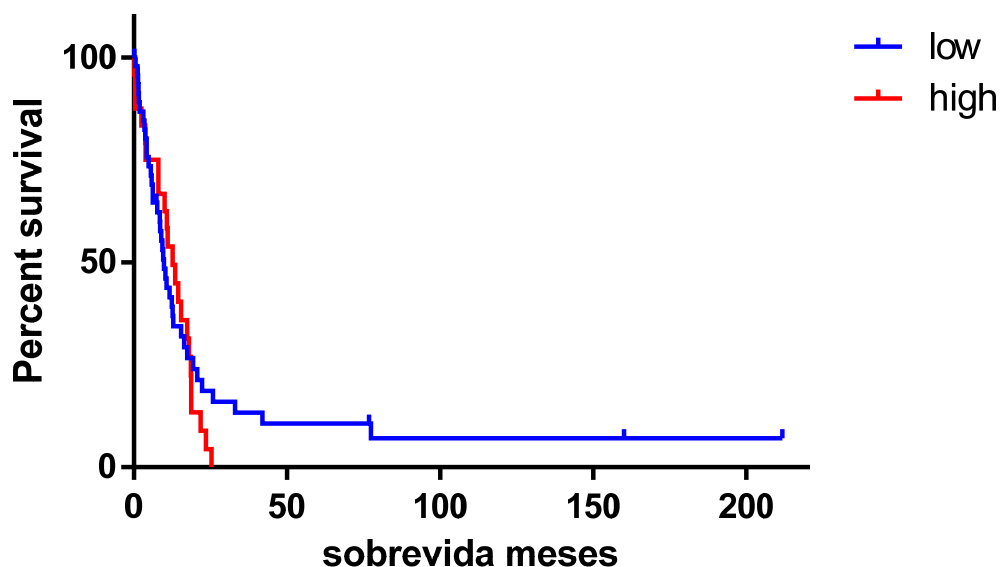


Figura 21 - Curva de sobrevida em função da fosforilação de RSK1 em pacientes Grau IV segundo teste de Log-rank. $p=0,5418$. $n=72$.

A curva de sobrevida para fosforilação de ERK1/2 em pacientes Grau IV (**Figura 22**), da mesma forma, não demonstrou variação significativa entre baixa e alta expressão desta proteína, exibindo sobrevida mediana de 13,5 e 9,8 meses para indivíduos com baixa e alta expressão respectivamente.

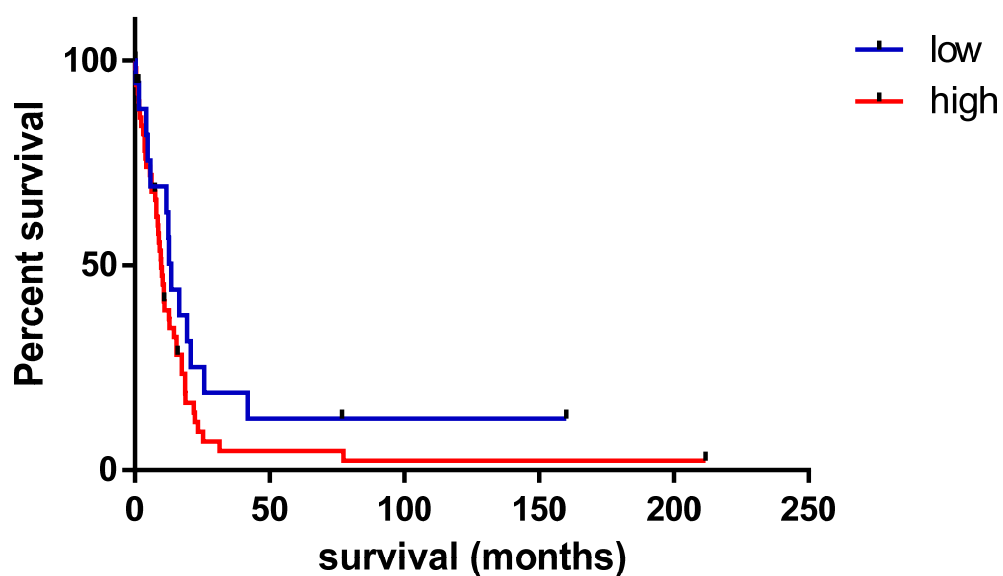


Figura 22 - Curva de sobrevida em função da fosforilação de ERK1/2 em pacientes Grau IV segundo teste de Log-rank. $p=0,1344$. $n=69$.

A curva de sobrevida para fosforilação de S6(S235/236) em pacientes Grau IV (**Figura 23**), também não demonstrou variação significativa entre baixa e alta expressão desta proteína, exibindo sobrevida mediana de 9,3 e 12,4 meses para indivíduos com baixa e alta expressão respectivamente.

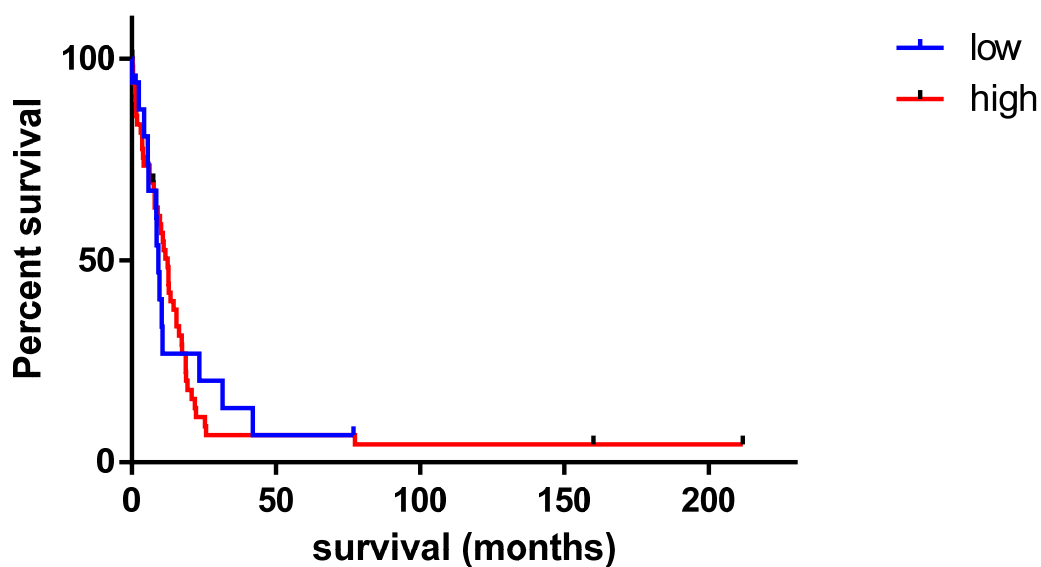


Figura 23 - Curva de sobrevida em função da fosforilação de S6(S235/236) em pacientes Grau IV segundo teste de Log-rank. $p=0,9624$. $n=67$.

A curva de sobrevida para fosforilação de S6(S240/244) em pacientes Grau IV (**Figura 24**), também não demonstrou variação significativa entre baixa e alta expressão desta proteína, exibindo sobrevida mediana de 16,4 e 10,7 meses para indivíduos com baixa e alta expressão respectivamente.

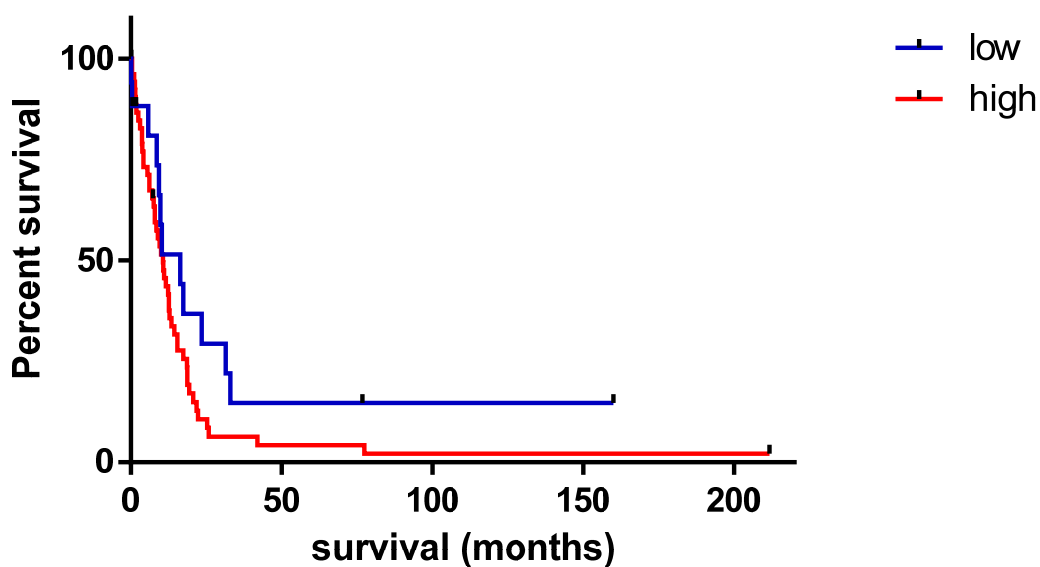


Figura 24 - Curva de sobrevida em função da fosforilação de S6(S240/244) em pacientes Grau IV segundo teste de Log-rank. $p=0,1174$. $n=67$.

A curva de sobrevida para expressão de S6 em pacientes Grau IV (**Figura 25**), assim como as anteriores, não demonstrou variação significativa entre baixa e alta expressão desta proteína, exibindo sobrevida mediana de 10,1 e 10,8 meses para indivíduos com baixa e alta expressão respectivamente.

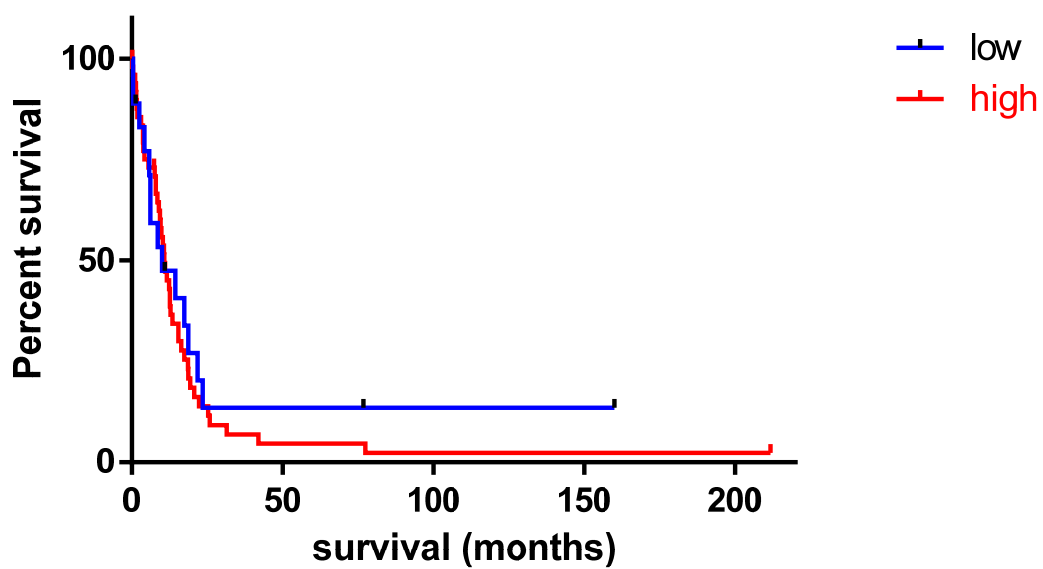


Figura 25 - Curva de sobrevida em função da expressão de S6 em pacientes Grau IV segundo teste de Log-rank. $p=0,5093$. $n=68$.

5 DISCUSSÃO

Este estudo teve por objetivo investigar a expressão e fosforilação de RSK1 em tecidos parafinados provenientes de pacientes diagnosticados com astrocitoma Graus I a IV, através da realização de protocolos de IHQ. Um estudo comparativo entre os resultados obtidos neste trabalho e publicações anteriores pode ser visualizado nos **Quadros 2 A e B**.

Foi determinado inicialmente o status da via de sinalização de ERK1/2 nesta população. Não foi observado aumento de fosforilação de ERK1/2 durante a progressão tumoral, bem como tampouco observamos sua relação com a sobrevida nos pacientes com astrocitomas Grau IV. Estes dados contrastam com dados da literatura que sugerem uma importância de ERK1/2 na sobrevida destes pacientes (MAWRIN et al. 2003; PELLOSKI et al. 2006; SAETTA et al. 2011).

O estudo de PELLOSKI et al. (2006) utiliza 268 pacientes, uma casuística bem ampla. Este mesmo estudo foi capaz de ver um valor prognóstico favorável para ausência de expressão de pERK1/2. Como o estudo não apresentou tecido não tumoral para comparação e tampouco controles biológicos positivos e negativos, torna-se difícil comparar os resultados obtidos nestes trabalhos com os nossos. Como sabemos que a intensidade da reação IHQ pode ser influenciada por diversos fatores inclusive o tempo de exposição ao cromógeno (DAB), é necessário que a marcação em tecidos tumorais seja acompanhada por um padrão, como o

tecido normal, para que comparações possam ser realizadas por outros pesquisadores. O estudo de MAWRIN et al. (2003) também vê valor prognóstico de pERK1/2 em glioblastomas, no entanto seu grupo de estudo é constituído de apenas 26 pacientes.

Já no estudo de SAETTA et al. (2011) a expressão de pERK e pAKT foram consideradas preditivas de melhor prognóstico, o que contraria o que se presume de acordo com a função destas proteínas. Este estudo também ressalta que não houve marcação de pERK1/2 em tecido normal, o que é completamente distinto ao observado em nossas reações de IHQ e incompatível com dados de WB de células (neurônios primários, linhagens neuronais e astrócitos), tecidos normais (dados do laboratório) e com a função primordial desta proteína na célula. Considerando a casuística, nosso estudo é superior ao de SAETTA et al. (2011) (195 amostras vs 82 amostras).

Por outro lado, a fosforilação de ERK1/2 foi correlacionada com a fosforilação e translocação nuclear de RSK1. ERK1/2 foi demonstrada como enzima ativadora de RSK1 nos modelos celulares COS-7 (ZHAO et al. 1996) e HEK293 (ROUX et al. 2003).

A expressão e fosforilação de RSK1 também não apresentou diferença entre os graus. No entanto, sua ampla variação de expressão nos tecidos de Grau IV nos levou a buscar por outros fatores que pudessem levar a uma diferença na expressão desta proteína. Interessantemente, pudemos observar relação entre a presença de PTEN e a presença e fosforilação de RSK1. Esta correlação também é observada em linhagens

celulares de glioblastomas, modelos de estudo para a doença (dados não publicados do laboratório). Ainda serão necessários mais estudos para observar qual função fisiológica depende a expressão combinada de PTEN e RSK1.

A proliferação celular também foi relacionada com a presença de RSK1 do núcleo, o que indica sua ativação. Interessantemente, esta relação pode ser observada somente em tumores de baixo grau (I e II), o que pode indicar que nos tumores de alto grau outras alterações sejam fundamentais para o controle da proliferação.

A expressão e fosforilação do alvo de RSK1, a proteína ribossomal S6 também foi avaliada. Não foram observadas alterações de expressão em nenhum grau e tampouco houve relação com a sobrevida dos pacientes Grau IV. Este dado também é contrastante com a literatura, que indica que a presença de S6 aumenta com o grau tumoral, sem, no entanto influenciar na sobrevida geral (ANNOVAZZI et al. 2009). A fosforilação de S6 e sua relação com o grau histológico e sobrevida também é controversa. A fosforilação de S6 não pode ser relacionada com o grau tumoral em alguns trabalhos (ERMOIAN et al. 2009), enquanto outros indicam esta proteína como aumentada de acordo com o grau histológico e relacionada a uma pior sobrevida (MCBRIDE et al. 2010; YANG et al. 2011; ISMAIL et al. 2012). Todos os estudos citados possuem casuística menor do que a apresentada neste estudo.

A correlação entre a fosforilação de RSK1 e de S6 foi observada nos Graus I a III, para ambos os resíduos de S6 fosforilados. Este fato é

interessante porque sugere que a quinase p70S6K, que fosforila o resíduo S240/244, deve também estar ativa no mesmo padrão de RSK1. Já nos tumores Grau IV, podemos presumir que a principal fonte de fosforilação de S6 seja p70S6K, já que a correlação entre a fosforilação de S6 e RSK1 é baixa.

Ao analisar-se curvas de sobrevida da expressão e fosforilação das diversas proteínas estudadas, não foi identificada influência significativa das mesmas na sobrevida em pacientes com tumores Grau IV, exceto onde a expressão de RSK foi analisada. Interessantemente, a expressão de RSK foi relacionada ao surgimento de metástases ósseas em câncer de próstata, resultando em um pior prognóstico (YU et al. 2014). Por outro lado, em tumores de mama, a presença de RSK levou a melhores níveis de resposta a quimioterapia em pacientes ER+ (MOON et al. 2012).

Assim, nossos dados demonstram que não há aumento de expressão de RSK1 e sua forma fosforilada, ERK1/2 fosforilada ou S6 fosforilada nos diversos graus tumorais analisados. Interessantemente, as formas fosforiladas de ERK1/2, RSK1 e S6 estão associadas a tumores de menor grau, o que é perdido em glioblastomas. A presença de RSK1 no núcleo, o que indica sua ativação, apresenta associação com a proliferação celular em astrocitomas de baixo grau. Em glioblastomas esta relação pode ter sido perdida devido ao acúmulo de alterações que podem afetar a proliferação. Além disso, maiores níveis de RSK1 foram associados a maior tempo de sobrevida em pacientes Grau IV, possivelmente indicando RSK1 como fator prognóstico em astrocitomas de alto grau.

Quadro 2 A - Estudo comparativo entre os resultados de proliferação celular e sobrevida do presente trabalho e publicações pertinentes

<i>Título da publicação</i>	<i>casuística</i>	<i>proliferação celular</i>	<i>sobrevida</i>
<i>Presente trabalho</i>	39 Grau I 50 Grau II 16 Grau III 90 Grau IV	<i>Correlação com fração nuclear RSK em tumores Grau I e II</i>	↑ RSK ↑ OS
<i>Prognostic relevance of MAPK expression in glioblastoma multiforme (Mawrin et al. 2003)</i>	26 Grau IV (13 long, 13 short survival)	<i>Correlação com pMAPK</i>	↑ pMAPK ↓ OS
<i>High levels of phosphorylated MAP kinase are associated with poor survival among patients with glioblastoma during the temozolomide era (Patil et al. 2013)</i>	108 Grau IV		↑ pMAPK ↓ OS
<i>Prognostic associations of activated mitogen-activated protein kinase and Akt pathways in glioblastoma (Pellowski et al. 2006)</i>	268 Grau IV		↑ pp70S6k e pMAPK ↓ OS
<i>Activation of STAT3, MAPK, and AKT in malignant astrocytic gliomas: Correlation with EGFR status, tumor grade, and survival (Mizoguchi et al. 2006)</i>	27 Grau III 55 Grau IV		↑ pERK associado pior prognóstico

Quadro 2 B - Estudo comparativo entre os resultados de fosforilação de S6 e sobrevida do presente trabalho e publicações pertinentes

Título da publicação	casuística	pS6(S235/236)	pS6(S240/244)	sobrevida
Presente trabalho	39 Grau I 50 Grau II 16 Grau III 90 Grau IV	sem associação com grau tumoral	sem associação com grau tumoral	↑ RSK ↑ OS
PTEN promoter methylation and activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway in pediatric gliomas and influence on clinical outcome (Mueller et al. 2012)	25 Grau I 7 Grau II 7 Grau III 9 Grau IV	positividade ↑ com grau tumoral	positividade ↑ com grau tumoral	pS6 sem correlação com PFS
mTOR, S6 and AKT expression in relation to proliferation and apoptosis/autophagy in glioma (Annovazzi et al. 2009)	10 Grau II 10 Grau III 34 Grau IV	-	positividade ↑ com grau histológico	pS6 sem correlação com OS
Activation of mTORC1/mTORC2 signaling in pediatric low-grade glioma and pilocytic astrocytoma reveals mTOR as a therapeutic target (Hutt-Cabezas et al. 2013)	63 baixo grau pediátricos	sem associação com grau tumoral	-	Componentes via mTOR sem correlação com OS
Mammalian target of rapamycin signaling pathway contributes to glioma progression and patients' prognosis (Yang et al. 2011)	16 Grau II 35 Grau III 45 Grau IV	positividade ↑ com grau tumoral	-	↑ pS6 associado pior prognóstico

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que RSK1 não está diferencialmente expressa em astrocitomas de distintos graus. No entanto, em glioblastomas, a expressão de RSK1 está condicionada a presença de PTEN e, neste grau tumoral, RSK1 influencia a sobrevida global.

A ativação de RSK1 foi ligada a via de ERK1/2 em todos os graus tumorais. A ativação de RSK1 se correlaciona também com a ativação da proteína ribossomal S6 e com o grau de proliferação celular em astrocitomas de menor grau. Em astrocitomas Grau IV esta relação é perdida, provavelmente devido a influência de alterações adicionais acumuladas neste tipo tumoral, como por exemplo, uma super ativação da via de mTOR.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adamson C, Kanu OO, Mehta AI, et al. Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going. **Expert Opin Investig Drugs** 2009; 18:1061-83.

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

Anjum R, Blenis J. The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signaling. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2008; 9:747-58.

Annovazzi L, Mellai M, Caldera V, Valente G, Tessitore L, Schiffer D. mTOR, S6 and AKT expression in relation to proliferation and apoptosis/autophagy in glioma. **Anticancer Res** 2009; 29:3087-94.

Berns K, Hijmans EM, Mullenders J, et al. A large-scale RNAi screen in human cells identifies new components of the p53 pathway. **Nature** 2004; 428: 431-7.

Bignone PA, Lee KY, Liu Y, et al. RPS6KA2, a putative tumour suppressor gene at 6q27 in sporadic epithelial ovarian cancer. **Oncogene** 2007; 26:683-700.

Bleeker FE, Molenaar RJ, Leenstra S. Recent advances in the molecular understanding of glioblastoma. **J Neurooncol** 2012; 108:11-27.

Blum R, Jacob-Hirsch J, Amariglio N, Rechavi G, Kloog Y. Ras inhibition in glioblastoma down-regulates hypoxia-inducible factor-1a, causing glycolysis shutdown and cell death. **Cancer Res** 2005; 65:999-1006.

Camelo-Piragua S, Jansen M, Ganguly A, et al. A Sensitive and specific diagnostic panel to distinguish diffuse Astrocytoma from Astrocytosis: Chromosome 7 gain with Mutant Isocitrate Dehydrogenase 1 and p53. **J Neuropathol Exp Neurol** 2011; 70:110-5.

Carriere A, Ray H, Blenis J, Roux PP. The RSK factors of activating the Ras/MAPK signaling cascade. **Front Biosci** 2008; 13:4258-75.

Castedo M, Ferri KF, Kroemer G. Mammalian Target of Rapamycin (mTOR): Pro- and Anti-Apoptotic. **Cell Death Differ** 2002; 9:99-100.

Cho YY, Yao K, Kim HG, et al. Ribosomal S6 Kinase 2 is a key regulator in tumor promoter–induced cell transformation. **Cancer Res** 2007; 67:8104-12.

Clark DE, Errington TM, Smith JA, Frierson HF Jr, Weber MJ, Lannigan DA. The serine/threonine protein kinase, p90 ribosomal S6 kinase, is an important regulator of prostate cancer cell proliferation. **Cancer Res** 2005; 65:3108-16.

David JP, Mehic D, Bakiri L, et al. Essential role of RSK2 in c-Fos-dependent osteosarcoma development. **J Clin Invest** 2005; 115:664-72.

Dhillon J, Astanehe A, Lee C, Fotovati A, Hu K, Dunn SE. The expression of activated Y-box binding protein-1 serine 102 mediates trastuzumab resistance in breast cancer cells by increasing CD44p cells. **Oncogene** 2010; 29:6294-300.

Doehn U, Hauge C, Frank SR, et al. RSK is a principal effector of the RAS-ERK pathway for eliciting a coordinate promotile/invasive gene program and phenotype in epithelial cells. **Mol Cell** 2009; 35: 511-22.

Dubrow R, Darefsky AS. Demographic variation in incidence of adult glioma by subtype, United States, 1992-2007. **BMC Cancer** 2011; 11:325.

Dümmeler BA, Hauge C, Silber J, et al. Functional characterization of human RSK4, a new 90-kDa ribosomal S6 kinase, reveals constitutive activation in most cell types. **J Biol Chem** 2005; 280:13304-14.

Ermoian RP, Kaprealian T, Lamborn KR, et al. Signal transduction molecules in gliomas of all grades. **J Neurooncol** 2009; 91:19-26.

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

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

Gutmann DH, Donahoe J, Brown T, James CD, Perry A. Loss of neurofibromatosis 1 (NF1) gene expression in NF1-associated pilocytic astrocytomas. **Neuropathol Appl Neurobiol** 2000; 26:361-7.

Havrda MC, Israel MA. Primary brain tumors. In: Mendelson J, Howley PM, Israel MA, Gray JW, Thompson CB, editors. **The molecular basis of cancer**. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2008. p.487-93.

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

Hsu S, Yung WKA. Tumors of the central nervous system. In: Kantarjian H, Wolff R, Koller C, editors. **The MD Anderson manual of medical oncology**. Texas: The McGraw-Hill Companies; 2006. p.787-812.

Hutchinson JA, Shanware NP, Chang H, Tibbetts RS. Regulation of ribosomal protein S6 phosphorylation by casein kinase 1 and protein phosphatase . **J Biol Chem** 2011; 286:8688-96.

Ismail HM. Overexpression of s6 kinase 1 in brain tumours is associated with induction of hypoxia-responsive genes and predicts patients' survival. **J Oncol** 2012; 2012:416927.

Ji H, Wang J, Fang B, Fang X, Lu Z. α -Catenin inhibits glioma cell migration, invasion, and proliferation by suppression of b-catenin transactivation. **J Neurooncol** 2011; 103:445-51.

Johnson DR, Brown PD, Galanis E, Hammack JE. Pilocytic astrocytoma survival in adults: analysis of the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program of the National Cancer Institute. **J Neurooncol** 2012; 108:187-93.

Kang S, Dong S, Gu TL, et al. FGFR3 Activates RSK2 to Mediate Hematopoietic Transformation through Tyrosine Phosphorylation of RSK2 and Activation of the MEK/ERK Pathway. **Cancer Cell** 2007; 12:201-14.

Kang S, Elf S, Dong S, et al. Fibroblast Growth Factor Receptor 3 Associates with and Tyrosine Phosphorylates p90 RSK2, Leading to RSK2 activation that mediates hematopoietic transformation. **Mol Cel Biol** 2009; 29:2105-17.

Kang S, Elf S, Lythgoe K, et al. p90 ribosomal S6 kinase 2 promotes invasion and metastasis of human head and neck squamous cell carcinoma cells. **J Clin Invest** 2010; 120:1165-77.

Kim M, Lee JH, Koh H, et al. Inhibition of ERK-MAP kinase signaling by RSK during Drosophila development. **EMBO J** 2006; 25:3056-67.

López-Vicente L, Armengol G, Pons B, et al. Regulation of replicative and stress-induced senescence by RSK4, which is down-regulated in human tumors. **Clin Cancer Res** 2009; 15:4546-53.

Llaguno SRA, et al. Neural and Cancer Stem Cells in Tumor Suppressor Mouse Models of Malignant Astrocytoma. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol** 2008; 73: 421-426.

Llaguno SRA, Chen J, Parada LF. Signaling in Malignant Astrocytomas: Role of Neural Stem Cells and its Therapeutic Implications. **Clin Cancer Res.** 2009; 15(23): 7124–7129.

Louis DN, Ohgaki H, Wistler OD, Cavenee WK. **WHO Classification of tumours of the central nervous system.** 4th ed. Lyon: IARC, 2007. Astrocytic tumours; p.1-21. (WHO Classification of Tumours, v. 1, IARC WHO Classification of Tumours, nº 1).

Ma XM, Blenis J. Molecular mechanisms of m-Tor mediated translational control. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2009; 10:307-18.

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

Matthews DJ, Gerritsen ME. **Targeting protein kinases for cancer therapy.** New Jersey: Wiley; 2010a. Receptor tyrosine kinases; p.119-213.

Matthews DJ, Gerritsen ME. **Targeting protein kinases for cancer therapy.** New Jersey: Wiley; 2010b. Intracellular signal transduction cascades; p.265-325.

Mawrin C, Diete S, Treuheit T, et al. Prognostic relevance of MAPK expression in glioblastoma multiforme. **Int J Oncol** 2003; 23:641-8.

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.

McKeever PE. Immunohistology of the nervous system. In: Dabbs DJ, editor. **Diagnostic immunohistochemistry: theranostic and genomic applications**. 3rd ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2010. p.820-89.

Meng H, Jin Y, Liu H, et al. SNS-032 inhibits mTORC1/mTORC2 activity in acute myeloid leukemia cells and has synergistic activity with perifosine against Akt. **J Hematol Oncol** 2013; 6:18.

Meyuhas O, Hornstein E. Translational control of TOP mRNAs. In: Sonenberg N, Hershey JWB, editors. **Translational control of gene expression**. Mathews MB. NY: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor; 2000. p.671-93.

Milanes-Yearsley M, Meh H, Pajak TF, et al. Tissue micro-array: a cost and time-effective method for correlative studies by Regional and National Cancer Study Groups. **Mod Pathol** 2002; 15:1366-73.

Mirmohammadsadegh A, Mota R, Gustrau A, et al. ERK1/2 Is highly phosphorylated in melanoma metastases and protects melanoma cells from cisplatin-mediated apoptosis. **J Invest Dermatol** 2007; 127:2207-15.

Moon H, Yi JK, Kim HS, et al. Phosphorylation of p90RSK is associated with increased response to neoadjuvant chemotherapy in ER-positive breast cancer. **BMC Cancer** 2012; 12:585.

Narita Y, Nagane M, Mishima K, Huang HJ, Furnari FB, Cavenee WK. Mutant epidermal growth factor receptor signaling down-regulates p27 through activation of the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt pathway in glioblastomas. **Cancer Res** 2002; 62:6764-9.

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

Pelloski CE, Lin E, Zhang L, et al. Prognostic associations of activated mitogen-activated protein kinase and Akt pathways in glioblastoma. **Clin Cancer Res** 2006; 12:12:3935-41.

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.

Reifenberger G, Collins VP. Pathology and molecular genetics of astrocytic gliomas. **J Mol Med** 2004; 82:656-70.

Romeo Y, Roux PP. Paving the way for targeting RSK in cancer. **Expert Opin Ther Targets** 2011; 15:5-9.

Roux PP, Richards SA, Blenis J. Phosphorylation of p90 ribosomal S6 kinase (rsk) regulates extracellular signal-regulated kinase docking and RSK activity. **Mol Cell Biol** 2003; 23:4796-804.

Saetta AA, Levidou G, El-Habr EA, et al. Expression of pERK and pAKT in human astrocytomas: correlation with IDH1-R132H presence, vascular endothelial growth factor, microvascular characteristics and clinical outcome. **Virchows Arch** 2011; 458:749-59.

Santarpia L, Lippman SL, El-Naggar AK. Targeting the mitogen-activated protein kinase ras-raf signaling pathway in cancer therapy. **Expert Opin Ther Targets** 2012; 16:103-19.

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

Shimura T, Noma N, Oikawa T, et al. Activation of the AKT/cyclin D1/Cdk4 survival signaling pathway in radioresistant cancer stem cells. **Oncogenesis** 2012; 1:1-9.

Smith JA, Poteet-Smith CE, Xu Y, Errington TM, Hecht SM, Lannigan DA. Identification of the first specific inhibitor of p90 ribosomal S6 kinase (RSK) reveals an unexpected role for rsk in cancer cell proliferation. **Cancer Res** 2005; 65:1027-34.

Ständer M, Peraud A, Leroch B, Kreth FW. Prognostic impact of *TP53* mutation status for adult patients with supratentorial world health organization grade ii astrocytoma or oligoastrocytoma: a long-term analysis. **Cancer** 2004; 101:1028-35.

Stratford AL, Fry CJ, Desilets C, et al. Y-box binding protein-1 serine 102 is a downstream target of p90 ribosomal S6 kinase in basal-like breast cancer cells. **Breast Cancer Res** 2008; 10:1-12.

Stratford AL, Dunn SE. The promise and challenges of targeting RSK for the treatment of cancer. **Expert Opin Ther Targets** 2011; 15:1-4.

Stupp R, Reni M, Gatta G, Mazza E, Vecht C. Anaplastic astrocytoma in adults. **Crit Rev Oncol Hematol** 2007; 63:72-80.

Thakur A, Sun Y, Bollig A, et al. Anti-invasive and antimetastatic activities of ribosomal protein. **Clin Cancer Res** 2008; 14:4427-36.

The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. **Nature** 2008; 455:1061-68.

The Cancer Genome Atlas Research Network. The Somatic Genomic Landscape of Glioblastoma. **Cell** 2013; 155(2): 462-77.

The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas. **N Engl J Med** 2015; 372:2481-98.

van Zwieten A. Tissue microarray technology and findings for diagnostic immunohistochemistry. **Pathology** 2013; 45:71-9.

Vartanian A, Singh SK, Agnihotri S, et al. GBM's multifaceted landscape: highlighting regional and microenvironmental heterogeneity. **Neuro Oncol** 2014; 16:1167-75.

Vogel H. **Nervous system (Cambridge illustrated surgical pathology)**. New York: Cambridge University Press; 2009. Brain tumors: neuroepithelial; p.37-69.

Xian W, Pappas L, Pandya D, et al. Fibroblast growth factor receptor 1-transformed mammary epithelial cells are dependent on rsk activity for growth and Survival. **Cancer Res** 2009; 69:2244-51.

Yang J, Liao D, Wang Z, Liu F, Wu G. Mammalian target of rapamycin signaling pathway contributes to glioma progression and patients' prognosis. **J Surg Res** 2011; 168:97-102.

Yu G, Lee YC, Cheng CJ, et al. RSK promotes prostate cancer progression in bone through ING3, CKAP2 and PTK6-mediated cell survival. **Mol Cancer Res** 2015; 13:348-57.

Zhao Y, Bjørnbæk C, Møller DE. Regulation and Interaction of pp90rsk Isoforms with Mitogen-activated Protein Kinases. **J Biol Chem** 1996; 271:29773-9.

Zheng B, Jeong JH, Asara JM, et al. Oncogenic B-RAF negatively regulates the tumor suppressor LKB1 to promote melanoma cell proliferation. **Mol Cell** 2009; 33:237-47.

Anexo 1 - Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

A.C. Camargo
Cancer Center

São Paulo, 28 de outubro de 2013.

A
Dra. Glaucia Hajj.

Aluno: Luis Eduardo Silva Machado (Mestrado).

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1485/10B

“Impacto da expressão das proteínas da família RSK sobre a progressão tumoral em astrocitomas”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 22/10/2013, **tomaram conhecimento e aprovaram** os seguintes documentos:

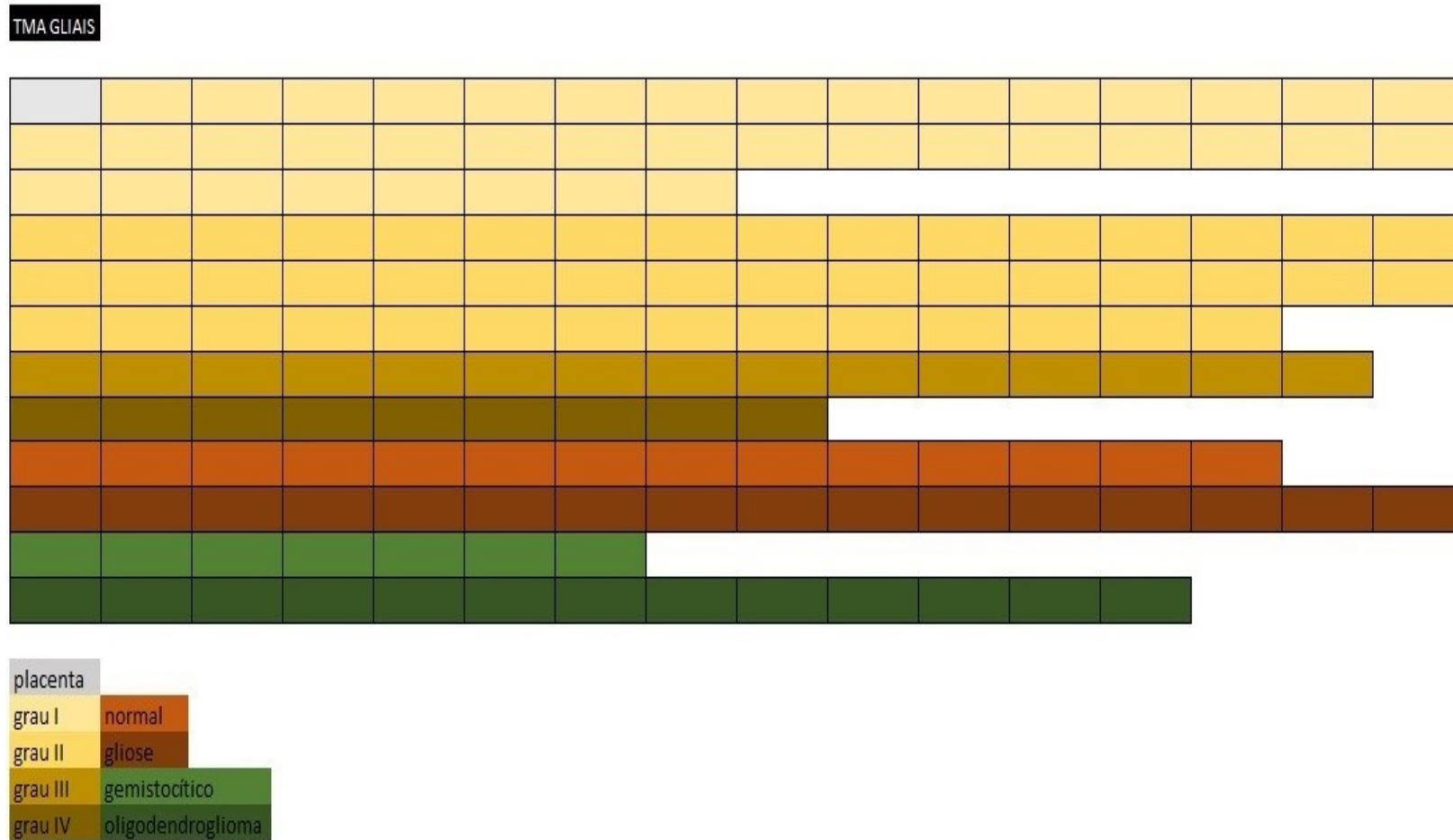
- Solicitação de dispensa da submissão da documentação obrigatória e análise ética do projeto acima mencionado por se tratar de um projeto afiliado ao temático intitulado “O controle da tradução pela via mTOR nos mecanismos de tumorigênese em gliomas”, registrado neste CEP sob nº 1485/10. O projeto afiliado em referência será a dissertação de Mestrado do aluno *Luis Eduardo Silva Machado*.
- Projeto de Mestrado, datado de Agosto de 2013.

Atenciosamente,



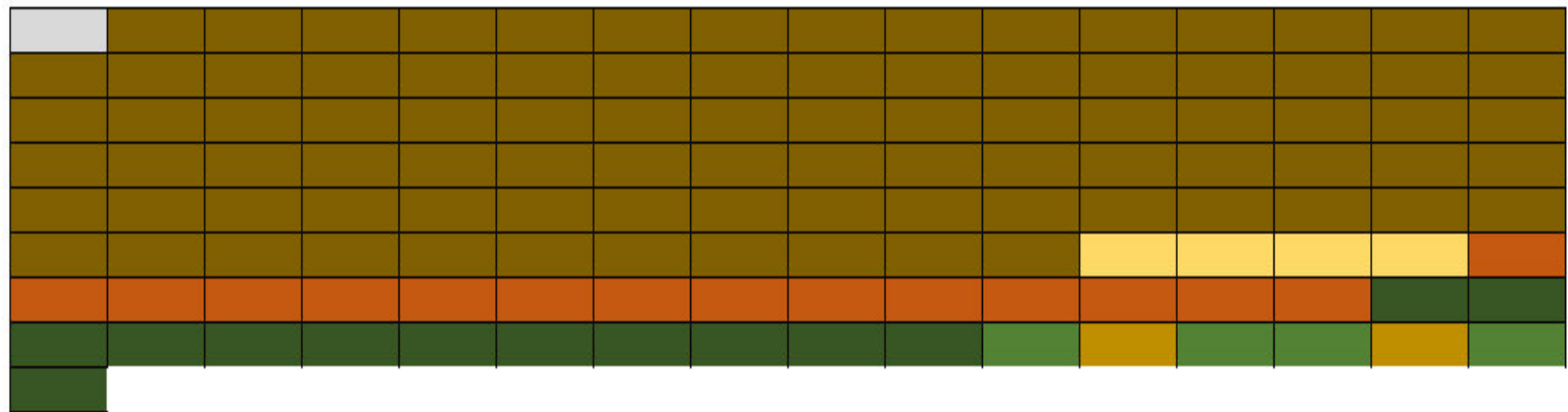
Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

Anexo 2 - Mapa TMA Gliais



Anexo 3 - Mapa TMA GBM

TMA GBM



placenta
normal grau IV
grau II gemistocítico
grau III oligodendroglioma

Anexo 4 A - Planilha de dados clínicos dos prontuários de pacientes Grau I

# Registro	Grau	Sexo	Idade	Localização	Radio antes da cirurgia	Cirurgia	Ressecção	Óbito	Ultimo Contato	Sobrevida (dias)	Sobrevida (meses)
262551	I	Masc.	8	Vias ópticas	Não	01/10/1989	Subtotal		03/03/2011	7712	257.0666667
282072	I	Femin.	7	Cerebelar	Não	05/06/1991	Radical		18/04/2008	6073	202.4333333
296295	I	Femin.	6	Cerebelar	Não	01/10/1992	Radical	01/10/1992		0	
306160	I	Masc.	12	Cerebelar	Não	01/10/1993	Total	n/d	n/d	n/d	n/d
316815A	I	Femin.	4	Cerebelar	Não	10/10/1994	Radical		19/10/1995	99	3.3
324340	I	Masc.	17	Cerebelar	Não	07/06/1995	Radical		16/06/2011	5769	192.3
329039	I	Masc.	5	Cerebelar	Não	21/10/1995	Radical		07/12/2006	4006	133.5333333
331047A	I	Masc.	1	Temporal	Não	26/12/1995	Parcial		23/11/2009	5007	166.9
336552	I	Masc.	5	Cerebelar	Não	21/06/1996	Total		12/12/2004	3051	101.7
340993A	I	Masc.	13	Cerebelar	Não	04/12/1991	Subtotal		15/06/2011	7031	234.3666667
B97-0101A	I	Femin.	35	Cerebelar	Não	06/02/1997	Radical		07/02/2011	5041	168.0333333
B97-02108	I	Masc.	4	Hipotálamo quiasmática	n/d	17/04/1997	Parcial		01/08/2013	5864	195
B98-2154	I	Masc.	4	Cerebelar	Não	15/04/1998	Radical	02/08/1998		107	3.566666667
B98-2777A	I	Masc.	4	Cerebelar	Não	15/04/1998	Radical	02/08/1998		107	3.566666667
B98-6370	I	Masc.	13	Cerebelar	Não	27/08/1998	Total		01/08/2002	1414	47.13333333
B99-1581	I	Femin.	14	Temporal	Não	02/03/1999	Radical		21/09/2009	3799	126.6333333
B99-3544A	I	Femin.	7	Talomo	Não	01/05/1999	Parcial		21/10/2010	4130	137.6666667
B99-5037	I	Femin.	2	Fronto / Parietal	Não	21/06/1999	Parcial	04/08/2000		403	13.43333333
BA0-1934B	I	Femin.	3	Cerebelar	Não	09/03/2000	Total		29/11/2004	1700	56.66666667
BA0-6300A	I	Femin.	5	Cerebelar	Não	02/08/2000	Radical		02/03/2006	2010	67
BA0-7714	I	Masc.	3	IV Ventriculo	Não	31/05/2000	Subtotal		10/11/2006	2320	77.33333333
BA0-10636	I	Masc.	4	Temporal	n/d	19/04/2002	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
BA1-4279	I	Femin.	20	Parietal	Não	25/09/1991	Radical		02/08/2001	3547	118.2333333
BA1-6116B	I	Femin.	4	Cerebelar	Não	03/07/2001	Radical		03/09/2008	2580	86
BA1-6484	I	Masc.	0	n/d	n/d	14/07/2001	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
BA1-8290A	I	Femin.	16	Vias ópticas	Não	01/12/1997	Parcial		14/06/2011	4873	162.4333333
BA2-1235	I	Masc.	6	Fossa posterior	n/d	14/02/2002	Parcial		23/01/2014	4612	154
BA2-3663	I	Femin.	7	Cerebelar	Não	01/06/2002	Parcial		05/01/2011	3094	103.1333333
BA2-3673A	I	Masc.	19	Parietal	n/d	19/04/2002	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
BA2-6406A	I	Femin.	3	Selar / Supraselar	Não	01/09/2002	Radical		29/08/2007	1798	59.93333333
BA2-9022B	I	Masc.	10	Vias ópticas	Não	01/09/2002	Parcial	18/04/2005		947	31.56666667
BA2-10962	I	Masc.	8	Cerebelar	Não	01/11/2002	Subtotal		21/09/2007	1760	58.66666667
BA2-10980B	I	Masc.	4	Cerebelar	Não	19/11/2002	Radical		21/09/2009	2462	82.06666667
BA3-4255B	I	Femin.	10	IV Ventriculo	Não	20/11/2002	Parcial		08/06/2011	3078	102.6
BA3-4619C	I	Masc.	10	Vias ópticas	Não	01/09/2002	Parcial		07/12/2011	3336	111.2
BA3-12144C	I	Femin.	4	IV Ventriculo	Não	10/12/2003	Radical		16/04/2008	1566	52.2
BA4-1460	I	Femin.	26	Temporal	Não	12/01/2004	Radical		07/03/2007	1135	37.83333333
BA4-3163	I	Masc.	6	n/d	n/d	02/04/2004	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
BA4-3343B	I	Masc.	2	Vias ópticas / Supraselar	Não	01/08/2005	Parcial		09/05/2011	2078	69.26666667

Anexo 4 B - Planilha de dados clínicos dos prontuários de pacientes Grau II

# Registro	Grau	Sexo	Idade	Localização	Radio antes da cirurgia	Cirurgia	Ressecção	Óbito	Ultimo Contato	Sobrevida (dias)	Sobrevida (meses)
237659	II	Masc.	32	Temporal	Sim	07/07/1988	Subtotal	19/01/89		192	6.4
248051	II	Masc.	48	Frontal	Não	25/07/1988	Parcial		17/11/1988	112	3.733333333
252347	II	Femin.	11	Frontal	Não	30/11/1988	Subtotal	26/05/89		176	5.866666667
258175	II	Femin.	33	Temporal	Sim	25/05/1989	Parcial	30/12/89		215	7.166666667
273689	II	Femin.	38	Frontal / Temporal	Não	03/03/1990	Total		28/01/1991	145	4.833333333
308604	II	Femin.	63	Temporal	Não	11/01/1994	Subtotal		08/04/1999	1887	62.9
308617	II	Femin.	63	Temporal	Não	11/01/1994	Subtotal		08/04/1999	1887	62.9
310069	II	Masc.	54	Frontal	Não	06/04/1994	Subtotal	29/04/00		2183	72.76666667
314851	II	Femin.	55	Frontal	Não	09/08/1994	Subtotal	04/04/04		3475	115.8333333
315816	II	Masc.	41	Frontal	Não	01/09/1994	Parcial	06/11/97		1145	38.16666667
320652B	II	Masc.	10	Temporal	Não	01/02/1995	Subtotal		18/02/2010	5417	180.5666667
321435	II	Femin.	53	Parietal	Não	15/03/1995	Radical		24/06/2008	4779	159.3
321901	II	Femin.	54	Temporal	Não	01/03/1995	Radical		21/06/2011	5870	195.6666667
323019	II	Masc.	44	Fronto-parietal	Não	01/05/1995	Subtotal		02/06/2005	3631	121.0333333
323266	II	Masc.	51	n/d	n/d	23/06/1995	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
326355	II	Femin.	27	Frontal / Temporal	Não	02/08/1995	Subtotal	14/08/95		12	0.4
326371	II	Femin.	27	Frontal / Temporal	Não	02/08/1995	Subtotal	14/08/95		12	0.4
327084	II	Masc.	45	Vias ópticas	Não	21/08/1995	Parcial	06/02/96		165	5.5
327144	II	Femin.	10	Frontal	Não	01/05/1989	Outro Serviço		13/09/2010	7692	256.4
332216B	II	Masc.	28	Temporal	Não	01/02/1996	Subtotal	27/12/99		1406	46.86666667
332495	II	Femin.	7	Temporal	Não	15/02/1996	Parcial	13/08/96		178	5.933333333
B37-4884	II	Femin.	14	Cerebelar	Não	09/05/1997	Outro Serviço		17/09/2001	1568	52.26666667
B97-7856	II	Masc.	36	Fronto-parietal	Não	05/07/1991	Total		17/05/1998	2472	82.4
B98-2195	II	Masc.	42	Temporal	Não	24/05/1998	Subtotal		15/05/2008	3591	119.7
B98-7762A	II	Masc.	28	Temporal	Não	15/10/1998	Radical		21/06/2011	4566	152.2

# Registro	Grau	Sexo	Idade	Localização	Radio antes da cirurgia	Cirurgia	Ressecção	Óbito	Ultimo Contato	Sobrevida (dias)	Sobrevida (meses)
B99-1581	II	Femin.	14	Temporal	Não	02/03/1999	Radical		2/09/2009	3799	126.6333333
BA0-1830	II	Femin.	29	Frontal	Não	02/03/2000	Subtotal	19/09/05		1997	66.5666667
BA0-9019	II	Femin.	34	n/d	n/d	01/11/2000	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
BA0-9230	II	Masc.	10	Bulbo cervical	Não	01/10/2000	Parcial		06/09/2003	1055	35.1666667
BA0-10223	II	Masc.	29	Temporal / Parietal	Sim	29/08/1994	Outro Serviço		29/06/2011	6060	202
BA1-1356A	II	Masc.	46	Frontal	Não	12/02/2001	Parcial		30/06/2004	1218	40.6
BA1-5041A2	II	Masc.	27	Frontal	Não	01/04/1999	Outro Serviço	26/06/02		1165	38.83333333
BA1-5452	II	Femin.	31	Frontal	Não	04/06/2001	Radical		24/10/2002	500	16.6666667
BA1-7225	II	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
BA1-7794B	II	Femin.	63	Temporal	Não	21/08/2001	Radical	28/08/01		7	0.233333333
BA1-9675C	II	Masc.	39	IV Ventriculo	Não	16/10/2001	Radical		18/01/2010	2372	99.0666667
BA1-10659C	II	Masc.	32	Temporal	Não	27/11/1990	Parcial		25/01/2004	4738	157.9333333
BA2-9306	II	Femin.	35	Frontal	Não	02/10/2002	Subtotal	22/08/04		680	22.6666667
BA3-1499A	II	Masc.	31	Frontal	Não	16/12/2002	Parcial		04/10/2011	3168	105.6
BA3-2587A	II	Femin.	49	Frontal	Não	25/03/2003	Radical		04/04/2011	2889	96.3
BA3-7421C	II	Masc.	40	Frontal	Não	12/05/1995	Total		16/01/2006	3844	128.1333333
BA3-8646C	II	Masc.	30	Frontal	Não	04/06/1996	Subtotal		04/03/2009	4590	153
BA3-9977C	II	Femin.	55	Frontal	Não	09/08/1994	Subtotal	04/04/04		3475	115.8333333
BA4-4392	II	Femin.	37	Fronto / Parietal	n/d	14/05/2004	Total		24/10/2011	2680	89
BA4-5243	II	Masc.	33	Frontal	Não	10/08/2000	Subtotal		18/03/2011	3818	127.2666667
BA4-9839	II	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
288815	II	Femin.	59	Frontal	Não	15/01/1992	Subtotal	21/01/92		6	
302163	II	Masc.	15	Temporal / Parietal	Não	10/05/1992	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
314187	II	Femin.	13	Temporal	n/d	19/07/1994	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
BA1-5652-C	II	Femin.	16	Temporal	n/d	19/06/2001	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d

Anexo 4 C - Planilha de dados clínicos dos prontuários de pacientes Grau III

# Registro	Grau	Sexo	Idade	Localização	Radio antes da cirurgia	Cirurgia	Ressecção	Óbito	Ultimo Contato	Sobrevida (dias)	Sobrevida (meses)
219940	III	Femin.	36	n/d	n/d	19/03/1986	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
226033	III	Femin.	15	Frontal	Sim	04/09/1986	Subtotal		06/11/2000	5102	170.0666667
251045	III	Masc.	24	Cerebelar	Não	24/10/1988	Parcial		15/02/1991	831	27.7
341797	III	Femin.	17	Cerebelar	Não	21/01/1997	Parcial	26/01/97		5	0.166666667
B97-3965A	III	Masc.	39	Frontal / Temporal	Não	25/06/1997	Subtotal		09/02/1998	224	7.466666667
B98-3707A	III	Masc.	40	Temporal	Não	01/01/1998	Parcial	17/12/99		706	23.53333333
BA1-0448	III	Masc.	53	Temporal	Não	17/06/1905	Outro Serviço		31/01/2006	36224	1207.466667
BA1-5041A2	III	Masc.	27	Frontal	Não	01/04/1999	Outro Serviço	26/06/02		1165	38.83333333
BA1-9343	III	Femin.	11	Frontal	Não	01/09/2001	Outro Serviço	19/10/01		48	1.6
BA2-9306	III	Femin.	35	Frontal	Não	02/10/2002	Subtotal	22/08/04		680	22.66666667
BA4-1126	III	Femin.	35	Frontal	Não	01/07/1997	Outro Serviço		25/11/2011	5184	172.8
BA3-2356	III	Masc.	22	Talamo	Não	13/03/2003	esterotaxica	11/04/04		388	12.93333333
BA3-7421C	III	Masc.	40	Frontal	Não	12/05/1995	Total		16/01/2006	3944	128.1333333
BA3-8122	III	Masc.	53	Temporal	Não	01/11/2001	Outro Serviço		25/04/2005	1254	41.8
BA4-2516	III	Femin.	34	Frontal	Não	10/02/2004	Outro Serviço		04/10/2010	2394	79.8
248051	III	Masc.	48	n/d	n/d	25/07/1988	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d

Anexo 4 D - Planilha de dados clínicos dos prontuários de pacientes Grau IV

# Registro	Grau	Sexo	Idade	Localização	Radio antes da cirurgia	Cirurgia	Ressecção	Óbito	Ultimo Contato	Sobrevida (dias)	Sobrevida (meses)
256263	IV	Femin.	62	Temporal	Não	21/03/1989	Subtotal	07/04/89		16	0.533333333
269395	IV	Masc.	24	Cerebelar	Não	24/10/1988	Parcial		15/02/1991	831	27.7
265550	IV	Masc.	65	Frontal	Não	18/03/1990	Total		19/04/1990	31	1.033333333
283046	IV	Masc.	36	Fronto / Parietal	Não	05/07/1991	Total		17/05/1998	2472	82.4
315584	IV	Femin.	72	Frontal	Não	31/08/1994	Parcial	25/07/95		325	10.83333333
B97-7856	IV	Masc.	36	Fronto / Parietal	Não	05/07/1991	Total		17/05/1998	2472	82.4
BA2-9306	IV	Femin.	35	Frontal	Não	02/10/2002	Subtotal	22/08/04		680	22.66666667
BA4-10301	IV	Masc.	30	Frontal	Não	27/03/2004	Parcial	30/11/04		243	8.1
BA4-10346D	IV	Masc.	30	Frontal	Não	27/03/2004	Parcial	30/11/04		243	8.1
158561	IV	Femin.	47	Temporal	Não	05/05/1980	Subtotal	25/08/80		110	3.666666667
159421	IV	Masc.	39	Temporal	Não	06/06/1980	Subtotal	30/03/81		294	9.8
174263	IV	Femin.	58	Temporal	n/d	09/12/1981	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
176895	IV	Masc.	50	Frontal / Temporal	Sim	17/03/1982	Radical		10/05/1982	53	1.766666667
184868	IV	Masc.	59	Frontal	Não	22/12/1982	Radical	04/02/83		42	1.4
185013	IV	Masc.	40	Frontal	Não	29/12/1982	Radical	17/02/83		48	1.6
186766	IV	Femin.	85	Frontal / Temporal	n/d	02/03/1983	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
223620	IV	Masc.	41	Frontal	Não	10/01/1987	Radical		03/09/2004	6353	211.7666667
226925	IV	Femin.	73	Frontal / Temporal	Não	02/10/1986	Radical	13/10/86		11	0.366666667
236627	IV	Femin.	12	Frontal / Temporal	Sim	19/03/1986	Radical	22/12/88		993	33.1
249096	IV	Masc.	62	Frontal / Temporal	Não	24/08/1988	Subtotal	20/10/88		56	1.866666667
263062*	IV	Masc.	33	Temporal	Não	19/12/1988	Radical	09/09/89		260	8.666666667
258176	IV	Femin.	13	n/d	Não	15/05/1989	Radical		16/09/2002	4801	160.0333333
258244	IV	Femin.	38	Temporal	Não	29/05/1989	Subtotal	10/04/90		311	10.36666667
261870	IV	Femin.	53	Temporal	Não	13/09/1989	Radical	04/10/90		381	12.7
263417	IV	Femin.	33	Temporal	Sim	25/05/1989	Parcial	30/12/89		215	7.166666667
267621	IV	Femin.	59	Temporal	n/d	14/03/1990	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
273859	IV	Masc.	53	Temporal	Não	01/09/1990	Total	16/10/91		405	13.5
274824	IV	Masc.	56	Frontal	Não	28/09/1990	Subtotal	11/10/90		13	0.433333333
281033	IV	Femin.	59	Frontal	Não	29/04/1991	Subtotal	03/03/92		304	10.13333333
284094	IV	Masc.	44	Parietal	n/d	05/08/1991	Total	25/08/1991		20	0.666666667

# Registro	Grau	Sexo	Idade	Localização	Radio antes da cirurgia	Cirurgia	Ressecação	Óbito	Ultimo Contato	Sobrevida (dias)	Sobrevida (meses)
284877	IV	Masc.	60	Frontal	Não	27/08/1991	Subtotal	24/12/91		117	3.9
285072	IV	Masc.	54	Frontal / Temporal	Não	02/09/1991	Subtotal	28/06/93		656	21.86666667
299532	IV	Masc.	59	Frontal / Temporal	Não	08/02/1993	Subtotal	29/08/94		561	18.7
301859	IV	Femin.	62	Frontal / Temporal	Não	28/04/1993	Subtotal	11/05/93		13	0.4333333333
315590	IV	Femin.	72	Frontal	Não	31/08/1994	Parcial	25/07/95		325	10.83333333
317337	IV	Masc.	71	Temporal	Não	27/10/1994	Total	29/09/95		332	11.06666667
317836	IV	Masc.	49	Temporal	Não	16/11/1994	Subtotal		21/11/1994	5	0.166666667
320992	IV	Femin.	66	Temporal	Não	27/02/1995	Radical	11/05/96		434	14.46666667
322619	IV	Masc.	62	Frontal / Temporal	Não	19/04/1995	Total	02/08/95		103	3.433333333
323284	IV	Masc.	44	Occipital	n/d	10/05/1995	n/d	13/10/97		873	29.1
325356	IV	Masc.	64	Frontal	Não	05/07/1995	Total	02/06/96		327	10.9
332629	IV	Femin.	65	Temporal	Não	18/01/1996	Total	28/02/96		40	1.333333333
338397	IV	Femin.	67	Frontal	Não	28/08/1996	Total	20/09/97		382	12.73333333
B97-692	IV	Masc.	50	Temporal	Não	15/01/1997	Total		20/04/1997	95	3.166666667
B97-789	IV	Femin.	49	Frontal / Temporal	Não	03/03/1997	Total	16/10/97		223	7.433333333
B97-838	IV	Femin.	54	Frontal	Não	12/09/1996	Parcial	08/01/98		476	15.86666667
B97-3171	IV	n/d		n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
B97-4409	IV	Femin.	68	Fronto / Parietal	Não	17/07/1997	Total	29/07/98		372	12.4
B97-4780	IV	Femin.	72	Fronto / Parietal	Não	30/07/1997	Total	11/01/99		521	17.36666667
B97-7969	IV	Masc.	0.5	Cerebelar	Não	21/11/1997	Parcial	05/02/98		74	2.466666667
B97-4412	IV	Masc.	63	Fronto / Parietal	Não	17/06/1998	Total	16/02/99		239	7.966666667
B98-7122	IV	Femin.	68	Temporal	Não	22/09/1998	Total	01/07/99		279	9.3
B98-7360	IV	Masc.	34	Fronto / Parietal	Não	30/09/1998	Total	24/11/00		774	25.8
B98-7501	IV	Femin.	59	Temporal	Não	20/10/1998	Total	20/06/99		240	8
B98-7645	IV	Masc.	46	Temporal	Não	03/12/1997	Subtotal	15/04/99		492	16.4
B98-9057	IV	Masc.	52	Frontal / Temporal	Não	01/12/1998	Total	28/12/99		387	12.9
B99-501	IV	Femin.	10	Frontal	Não	12/01/1999	Radical	17/02/99		35	1.166666667
B99-526	IV	Masc.	68	Fronto / Parietal	Não	20/01/1999	Total	08/09/99		228	7.6
B99-891	IV	Masc.	62	Fronto / Parietal	Não	02/02/1999	Radical	24/12/99		322	10.73333333
B99-4045	IV	Masc.	76	Temporal	Não	26/05/1999	Total	07/01/01		581	19.36666667

# Registro	Grau	Sexo	Idade	Localização	Radio antes da cirurgia	Cirurgia	Ressecção	Óbito	Ultimo Contato	Sobrevida (dias)	Sobrevida (meses)
B99-9756	IV	Femin.	64	Frontal / Temporal	Não	15/12/1999	Total		10/05/2006	2305	76.83333333
B99-9856	IV	Masc.	52	Frontal	Não	18/12/1999	Radical	01/06/01		523	17.43333333
BA0-1252	IV	Masc.	46	Frontal	Não	16/02/2000	Radical	24/12/01		668	22.26666667
BA0-1433	IV	Femin.	4	Frontal / Temporal	Não	06/07/1994	Outro Serviço	18/12/00		2322	77.4
BA0-4222	IV	Masc.	40	Frontal	Não	24/05/2000	Radical	06/07/02		762	25.4
BA0-4249	IV	Masc.	81	Temporal	Não	24/04/2000	Outro Serviço	01/11/00		187	6.23333333
BA0-4689	IV	Masc.	59	Frontal	Não	01/07/1998	Outro Serviço	16/02/01		945	31.5
BA0-6206	IV	Masc.	57	Fronto-parietal	Não	29/07/2000	Radical	19/02/02		560	18.66666667
BA0-8051	IV	Femin.	7	IV Ventriculo	Não	22/08/2000	Parcial	11/06/01		289	9.63333333
BA0-9318	IV	Masc.	42	Frontal	Não	09/11/2000	Radical	07/05/04		1258	41.93333333
BA0-9531	IV	Femin.	11	Fronto / Parietal	Não	17/11/2000	Radical	10/05/01		173	5.76666667
BA0-9925	IV	Masc.	66	Fronto / Parietal	Não	28/11/2000	Subtotal	22/04/01		144	4.8
BA1-1868	IV	Masc.	59	Occipital	Não	01/03/2001	Subtotal	19/08/01		168	5.6
BA1-5920	IV	Masc.	37	Temporal	Não	27/06/2001	Radical	11/06/03		704	23.46666667
BA1-8075	IV	Femin.	60	Frontal	Não	28/08/2001	Subtotal	13/05/02		255	8.5
BA1-9008	IV	Masc.	50	Temporal	Não	25/09/2001	Subtotal	02/10/01		7	0.23333333
BA1-9441	IV	Masc.	78	Frontal	Não	28/08/2001	Radical	21/05/03		623	20.76666667
BA1-10599	IV	Masc.	44	Frontal	Não	13/11/2001	Subtotal	27/02/03		464	15.46666667
BA2-1077	IV	Femin.	63	Temporal	Não	06/02/2002	Subtotal	27/01/03		351	11.7
BA2-5585	IV	Femin.	53	Temporal	Não	12/06/2002	Radical	11/12/03		539	17.96666667
BA2-5775	IV	Masc.	68	Frontal	Não	18/06/2002	Subtotal	09/07/03		381	12.7
BA2-5814	IV	Masc.	70	Parietal	Não	19/06/2002	Subtotal	13/01/04		564	18.8
BA2-6062	IV	Masc.	21	Fronto / Parietal	Não	26/06/2002	Radical	03/01/03		187	6.23333333
BA2-6632	IV	Masc.	69	Fronto / Parietal	Não	17/07/2002	Subtotal	02/11/03		465	15.5
BA2-7631	IV	Masc.	36	Temporal	Não	14/08/2002	Subtotal		02/09/2002	18	0.6
BA3-592	IV	Femin.	49	Parietal	Não	22/01/2003	Subtotal	13/05/03		111	3.7
BA3-1768	IV	Masc.	57	Occipital	Não	25/02/2003	Radical	02/07/03		127	4.23333333
BA3-3015	IV	Femin.	66	Temporal	Não	04/04/2003	Radical	04/01/04		270	9
BA3-4277	IV	Femin.	52	Frontal	Não	13/05/2003	Subtotal	19/09/03		126	4.2
BA3-9653	IV	Masc.	44	Parietal	Não	05/10/2003	Radical	21/11/03		46	1.53333333