

**JOÃO CÂNDIDO ARAÚJO**

**A PROTEÍNA DO GENE P53 E DO RECEPTOR DO FATOR DE  
CRESCIMENTO EPIDÉRMICO NA GÊNESE E PROGNÓSTICO DO  
GLIOBLASTOMA**

**Tese apresentada como requisito parcial à  
obtenção de grau de Doutor, Programa de  
Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica, Setor  
de Ciências da Saúde, Universidade Federal  
do Paraná.**

**Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Bleggi  
Torres**

**Coordenador: Prof. Dr. Antônio Carlos  
Ligocki Campos**

**CURITIBA  
2003**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
BIBLIOTECA CENTRAL. COORD. PROCESSOS TÉCNICOS  
Ficha catalográfica

---

Araújo, João Cândido, 1944 -  
A662 A proteína do gene P53 e do receptor do fator de crescimento  
epidérmico na gênese e prognóstico do glioblastoma / João  
Cândido Araújo .- 2003.  
116f. : il. color., graf., tabs.

Orientador: Luiz Fernando Bleggi Torres  
Tese(doutorado)- Universidade Federal do Paraná. Setor de  
Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Clínica Ci-  
rúrgica.  
Anexos

Inclui bibliografia

1. Sistema nervoso – Tumores. 2. Tumores. 3. Glioblastoma.
  4. Imunohistoquímica. I. Torres, Luiz Fernando Bleggi, 1956-.
- II. Título.

CDD 20.ed. 616..994  
CDU 1976 616 – 006



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA  
NÍVEL MESTRADO - DOUTORADO

**PARECER CONJUNTO DA COMISSÃO EXAMINADORA  
DA AVALIAÇÃO DE TESE DE DOUTORADO**

Aluno: **JOÃO CÂNDIDO DE ARAUJO**

Título da Tese: "A PROTEÍNA DO GENE P53 E DO RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO NA GÊNESE E PROGNÓSTICO DO GLIOBLASTOMA "

**CONCEITOS EMITIDOS:**

Prof. Dr. Luiz Roberto Aguiar	- Conceito emitido <i>A</i>	Equivalência	<i>10</i>
Prof. Dr. Antonio de Pádua G.da Silva	- Conceito emitido <i>A</i>	Equivalência	<i>10</i>
Prof. Dr. Luiz M. Collaço	- Conceito emitido <i>A</i>	Equivalência	<i>10,0</i>
Prof. Dr. Marlus S. Moro	<i>A</i> - Conceito emitido <i>A</i>	Equivalência	<i>10</i>
Prof. Dr. Affonso Antoniuk	<i>A</i> - Conceito emitido <i>A</i>	Equivalência	<i>- nota 10</i>

**Conceito Final de Avaliação:**

**CONCEITO A - NOTA 10**

Curitiba, 19 de dezembro de 2003

*Luiz Roberto Aguiar*  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Luiz Roberto Aguiar

*Antonio de Pádua Gomes da Silva*  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Antonio de Pádua Gomes da Silva

*Luiz M. Collaço*  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Luiz M. Collaço

*Marlus S. Moro*  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Marlus S. Moro

*Affonso Antoniuk*  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Affonso Antoniuk

À minha família,  
pelo estímulo constante.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr Affonso Antoniuk, líder, pioneiro, visionário e amigo, que lançou e consolidou as bases da neurocirurgia moderna em nosso meio.

Ao Prof. Dr. Luiz Fernando Bleggi Torres, pela sua orientação, dinamismo e conhecimento, verdadeiro agente propagador da pesquisa científica em ciências neurológicas.

Ao Prof. Collin S. MacCarty, neurocirurgião emérito da Mayo Clinic, modelo de profissional que norteou minha conduta neurocirúrgica para toda a vida.

Ao Prof. Frederick W. L. Kerr, da Mayo Clinic, (“in memoriam”), pela sua genialidade e rigor, cuja contribuição à neurofisiologia estabeleceu princípios que foram exemplos de como seguir uma reta intorcível em busca da verdade científica.

Ao Prof. Edward Laws Jr., neuro-oncologista, University of Virginia, pelo incentivo, suas sugestões e transmissão de sólida experiência em cirurgia oncológica.

Ao Prof. Antonio Carlos Ligocki Campos, Coordenador do curso de Pós-Graduação pela oportunidade e aconselhamentos.

Aos meus colegas neurocirurgiões, exemplos de competência e dignidade profissional, pelo apoio constante.

Aos meus residentes de antes e de agora, que com dedicação e brilho próprio constituem, para mim, fonte perene de estímulo e perseverança.

A Dra. Leonora Pope, patologista, pela sua imprescindível participação na elaboração dos estudos imunohistoquímicos no laboratório da Universidade Federal do Paraná.

Ao Prof. Ary Sabbag, da UFPR, pela inestimável orientação na área de estatística.

Aos pacientes portadores de glioblastoma e seus familiares, cujo sofrimento e angústia acalentam nossas forças em busca de novos horizontes.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES</b> .....	vii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	xi
<b>RESUMO</b> .....	xii
<b>ABSTRACT</b> .....	xiii
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 OBJETIVOS .....	4
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	5
2.1 EMBRIOLOGIA E FISILOGIA ASTROCITÁRIA NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL .....	5
2.2 TUMORES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL .....	6
2.3 TUMORES ASTROCITÁRIOS .....	6
2.4 GLIOBLASTOMA .....	9
2.4.1 Conceito .....	9
2.4.2 História .....	11
2.4.3 Epidemiologia .....	12
2.4.4- Manifestações Clínicas .....	14
2.4.5 Diagnóstico por Imagem .....	15
2.4.6 Patologia .....	19
2.4.7 Biologia Celular .....	23
2.4.8 Genética Molecular .....	25
2.4.9 Tratamento .....	32
2.4.9.1 Tratamento cirúrgico .....	32
2.4.9.2 Terapia por radiação .....	34
2.4.9.3 Quimioterapia .....	37

2.4.9.4 Alternativas terapêuticas .....	40
2.4.9.5 Recorrência e reoperação .....	45
2.4.10 Sobrevida e Qualidade de Vida .....	47
<b>3 PACIENTES E MÉTODOS .....</b>	<b>49</b>
3.1 POPULAÇÃO E SELEÇÃO .....	49
3.1.1 Análise Descritiva .....	50
3.1.1.1 Idade.....	50
3.1.1.2 Sexo.....	51
3.1.1.3 Variáveis na população geral.....	51
3.1.1.4 Intervalo entre início de sintomas e diagnóstico (ISD).....	52
3.2 HISTOLOGIA .....	52
3.2.1 Processamento Histológico .....	52
3.2.2 Avaliação Histológica .....	53
3.3 IMUNOHISTOQUÍMICA .....	53
3.3.1 Procedimento Imunohistoquímico .....	53
3.3.2 Critérios de Utilização de Anticorpos .....	54
3.3.3 Avaliação Imunohistoquímica .....	55
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	56
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>57</b>
4.1 RESULTADOS HISTOLÓGICOS .....	57
4.2 RESULTADOS IMUNOHISTOQUÍMICOS .....	57
4.2.1 Anticorpo para o Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico(EGFR).....	57
4.2.2 Anticorpo para o Marcador Proliferativo Ki67.....	60
4.2.3 Anticorpo para a Proteína Relacionada ao Gene Supressor Tumoral p53 .....	62
4.3 RESULTADO DA DISTRIBUIÇÃO GERAL DOS DADOS COMPUTADOS..	62
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	65

4.4.1 EGFR como variável .....	65
4.4.2 p53 como variável .....	66
4.4.3 Ki-67 como variável .....	68
4.4.4 Sobrevida como variável .....	69
4.4.5 Comparação entre p53 e EGFR .....	71
4.4.5.1 Grupo secundário .....	71
4.4.5.2 Grupo primário .....	72
4.4.6 Associação entre p53 e Tempo de Sobrevida .....	73
4.4.7 Associação entre EGFR e Tempo de Sobrevida .....	74
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>77</b>
5.1 OBSERVAÇÕES GERAIS .....	77
5.2. Ki-67 .....	79
5.3 EGFR .....	82
5.4 p53 .....	86
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>91</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>96</b>
<b>ANEXO 1 TERMO DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA MÉDICA DO HOSPITAL NOSSA SENHORA DAS GRAÇAS.....</b>	<b>92</b>
<b>ANEXO 2 MODELO DE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....</b>	<b>93</b>
<b>ANEXO 3 INSTRUMENTO UTILIZADO PARA COLETA DE DADOS DE REVISÃO DOS PRONTUÁRIOS MÉDICOS E DADOS DESEGUIMENTO.....</b>	<b>95</b>



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - ASPECTOS DE IMAGEM DO GLIOBLASTOMA NA RM.....	16
FIGURA 2 - ESPECTROSCOPIA POR RM DO GLIOBLASTOMA.....	18
FIGURA 3 - ASPECTO MACROSCÓPICO DO GLIOBLASTOMA.....	20
FIGURA 4 - ASPECTO MICROSCÓPICO DO ARRANJO EM “PSEUDOPALIÇADAS”.....	21
FIGURA 5 - ASPECTO MICROSCÓPICO DO CRESCIMENTO VASCULAR.....	22
FIGURA 6 - ASPECTOS TOMOGRÁFICOS EVOLUTIVOS DO GLIOBLASTOMA.....	24
FIGURA 7 - IMAGENS DE RM DEMONSTRANDO PROGRESSÃO DE ASTROCITOMA DE BAIXO GRAU PARA GLIOBLASTOMA SECUNDÁRIO.....	25
FIGURA 8 - ASPECTOS INICIAIS E RECIDIVA DO GLIOBLASTOMA.....	46
FIGURA 9 - IMUNOREATIVIDADE POSITIVA E NEGATIVA PARA O EGFR.....	59
FIGURA 10 - IMUNOREATIVIDADE POSITIVA E NEGATIVA PARA O Ki67.....	61
FIGURA 11 - IMUNOREATIVIDADE POSITIVA E NEGATIVA PARA p53.....	63
GRÁFICO 1 - EXPRESSÃO DE EGFR NA POPULAÇÃO ESTUDADA.....	58
GRÁFICO 2 - EXPRESSÃO DE Ki-67 NA POPULAÇÃO ESTUDADA.....	60
GRÁFICO 3 - EXPRESSÃO DE p53 NA POPULAÇÃO ESTUDADA.....	62
GRAFICO 4 - COMPARAÇÃO DA INCIDÊNCIA DO EGFR ENTRE GRUPOS PRIMÁRIO E SECUNDÁRIO .....	66
GRÁFICO 5 - COMPARAÇÃO DA INCIDÊNCIA DO P53 ENTRE GRUPO PRIMÁRIO E SECUNDÁRIO.....	67
GRÁFICO 6 - INCIDÊNCIA DE Ki-67 NOS GRUPOS PRIMÁRIO E SECUNDÁRIO.....	69

GRÁFICO 7 - DIFERENÇAS DE SOBREVIDA ENTRE OS GRUPOS PRIMÁRIO E SECUNDÁRIO.....	70
GRÁFICO 8 - PROPORÇÃO ACUMULADA DE SOBREVIDA NOS GRUPOS PRIMÁRIO E SECUNDÁRIO.....	71
GRÁFICO 9 - RELAÇÃO ENTRE p53 E SOBREVIDA.....	73
GRÁFICO 10 - RELAÇÃO ENTRE EGFR E SOBREVIDA.....	75
GRÁFICO 11 - RELAÇÃO ENTRE EGFR E SOBREVIDA EM 30 PACIENTES COM SOBREVIDA SUPERIOR A 8 MESES.....	75
GRÁFICO 12 - RELAÇÃO ENTRE EGFR E SOBREVIDA EM 21 PACIENTES COM p53 < 12%.....	76

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO DOS TUMORES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL SEGUNDO A ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE .....	7
TABELA 2 - INCIDÊNCIA DAS DIFERENTES CLASSES DE TUMORES SEGUNDO DIFERENTES AUTORES.....	8
TABELA 3 - COMPARAÇÃO ENTRE OS SISTEMAS DE GRADUAÇÃO DE ASTROCITOMAS DA ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE E ST. ANNE/MAYO.....	9
TABELA 4 - DADOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DOS TUMORES ASTROCÍTICOS COMPILADOS DO BANCO DE PATOLOGIA TUMORAL DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DA CIDADE DE CURITIBA - 1987 / 1998.....	10
TABELA 5 - DADOS REFERENTES À IDADE DA POPULAÇÃO ESTUDADA.....	50
TABELA 6 - DADOS REFERENTES AO SEXO DA POPULAÇÃO ESTUDADA.....	51
TABELA 7 - MÉDIAS DAS VARIÁVEIS NA POPULAÇÃO GERAL .....	51
TABELA 8 - DADOS REFERENTES AO INTERVALO ENTRE INÍCIO DOS SINTOMAS E DIAGNÓSTICO (ISD) NA POPULAÇÃO ESTUDADA.....	52
TABELA 9 - DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES DE ACORDO COM OS CRITÉRIOS CLÍNICOS E IMUNOHISTOQUÍMICOS ESTUDADOS.....	64
TABELA 10 - ÍNDICE PERCENTUAL DE POSITIVIDADE DE EGFR NOS GRUPOS PRIMÁRIO E SECUNDÁRIO.....	65
TABELA 11 - ÍNDICE PERCENTUAL DE POSITIVIDADE DE p53 NOS GRUPOS PRIMÁRIO E SECUNDÁRIO.....	67
TABELA 12 - INCIDÊNCIA DE Ki-67 POSITIVO NOS GRUPOS PRIMÁRIO E SECUNDÁRIO.....	68

TABELA 13 - SOBREVIDA EM MESES NOS GRUPOS PRIMÁRIO E SECUNDÁRIO.....	70
TABELA 14 - INCIDÊNCIA DE p53 E EGFR NO GRUPO SECUNDÁRIO.....	72
TABELA 15 - INCIDÊNCIA DE p53 E EGFR NO GRUPO PRIMÁRIO.....	72
TABELA 16 - CORRELAÇÃO PARCIAL ENTRE p53 E TEMPO DE SOBREVIDA.....	73
TABELA 17 - CORRELAÇÃO ENTRE EGFR E TEMPO DE SOBREVIDA.....	74

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BCNU	- 1,3-bis (2 chlorithyl)-1-Nitrosurea
CDK4	- Cyclin-dependent Kinase 4
Cho	- Colina
DNA	- Deoxiribonucleic Acid
EGFR	- Epidermal Growth Factor Receptor
GBM	- Glioblastoma
Gy	- Gray (unidade radiológica)
HIV	- Human Immunodeficiency Virus
IL	- Interleucina
MDM2	- Murine Double Minute 2
NAA	- N-acetil aspartato
OMS	- Organização Mundial da Saúde
PDGFR	- Platelet Derived Growth Factor Receptor
PET	- Positron Emission Tomography
PI3-K	- Phosphatidylinositol 3- Kinase
PKB/AKT	- Protein Kinase B
PTEN	- Phosphatase and Tension Homolog
PTK	- Protein Tyrosine Kinase
RM	- Ressonância Magnética
RNA	- Ribonucleic Acid
SPECT	- Single Photon Emission Computed Tomography
T1	- Constante de tempo para eletrons em movimento (spins) se realinharem em campo magnético
T2	- Velocidade de perda de magnetização, que determina o tempo de relaxamento em RM
TC	- Tomografia Computadorizada
TK/HSV	- Thymidine Kinase/ Herpes Simplex Virus
TNF	- Tumor Necrosis Factor
VEGFR	- Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
VPCs	- Virus Producing Cells

## RESUMO

### A PROTEÍNA DO GENE P53 E DO EGFR NA GÊNESE E PROGNÓSTICO DO GLIOBLASTOMA

O glioblastoma (GBM), apesar de ser o tumor primário mais freqüente do sistema nervoso central do adulto, é o que apresenta pior prognóstico. Os avanços tecnológicos ocorridos nas últimas décadas, em termos de diagnóstico e tratamento não impediram que a sobrevida média continue a girar em torno de um ano. Avanços nos conhecimentos da biologia molecular têm demonstrado diversas vias de sinalização intra-celulares envolvidas nos mecanismos mitogênicos. Com base nesses princípios, investigou-se num grupo de 45 pacientes portadores de GBM, a importância do oncogene EGFR e do gene supressor p53, através de técnicas de imunohistoquímica, como possíveis fatores de relevância na gênese e prognóstico do GBM, com aferição simultânea do índice proliferativo (Ki-67). Todos os pacientes, com média de idade de  $54.24 \pm 13.9$  anos, sendo 28 homens e 17 mulheres, tinham sido anteriormente submetidos a tratamento cirúrgico, complementado com radiação e eventualmente quimioterapia. Aqueles com história clínica igual ou menor que três meses integraram o grupo I ou primário (35) e os com história mais longa formaram o grupo II ou secundário (10). Foi demonstrado, com significância estatística, que o grupo I é integrado por pacientes com média de idade superior aos do grupo II, com predomínio de porcentagem de EGFR positivo em relação ao p53 e com tempo de sobrevida menor. Da mesma forma, os integrantes do grupo II são mais jovens, têm maior sobrevida e exibem predomínio de p53. Foi identificado um sub-grupo de pacientes do grupo I em que EGFR tem valor prognóstico e demonstrado o valor prognóstico de p53 no grupo II e na população geral, com significância estatística. Finalmente, a análise deu suporte à provável participação do EGFR na gênese do GBM do grupo I e do p53 como fator relevante na gênese do grupo II, configurando assim, dois grupos diferentes em termos de perfil genético, comportamento clínico e prognóstico. Não foi conferido valor prognóstico à determinação de Ki-67. A inclusão da determinação de EGFR e p53 nos processos rotineiros de diagnóstico bem como a possível utilização de ambos como futuros alvos terapêuticos é sugerida.

Palavras-chave: Glioblastoma, prognóstico, EGFR, p53, Ki-67.

## ABSTRACT

### **P53, EGFR AND THEIR ROLE IN ORIGIN AND PROGNOSIS OF GLIOBLASTOMA**

Glioblastoma (GBM) represents the most frequent, and yet, the tumor with the worst prognosis in human adult brain. In spite of recent technological advances, patients' median survival doesn't reach beyond one year. Mitogenic pathways are becoming increasingly well known due to advances in molecular biology. The present study, based on those principles, investigated 45 patients harboring GBMs, focusing on the immunohistochemical determination of EGFR (oncogene) and p53 (suppressor gene) and their possible role in tumor genesis and prognosis, as well as participation of Ki-67 as labeling index. All patients, 28 males and 17 females, averaging  $54.24 \pm 13.9$  years, had been previously submitted to surgical treatment, radiotherapy and eventually chemotherapy. Group I was formed by patients (35) with a clinical history of three months or less and group II harbored patients (10) with longer histories. It was shown that patients in group I, are in average, older than those in group II, have a much higher percentage of positive EGFR and exhibit a poorer survival (all data with statistical significance). On the other hand, group II patients are younger, live longer and have a much higher percentage of positive p53 (all data with statistical significance). A subgroup of patients in group I was identified in which EGFR poses as prognostic factor. Determination of p53 was of prognostic importance in group II as well as in the general population studied. Participation of the EGFR was inferred in the genesis of GBM in group I as well as that of p53 in group II. According to the results, two groups with different genetic, clinical, and prognostic profiles have been characterized. It was not possible to attribute prognostic value to the determination of Ki-67. Identification of EGFR and p53 as part of routine work-up in the diagnosis of GBM as well as their possible role as therapeutic targets in novel treatment strategies are suggested.

Key words: Glioblastoma, prognosis, EGFR, p53, Ki-67.

## 1 INTRODUÇÃO

O glioblastoma é o tumor primário mais comum e mais maligno do sistema nervoso central do adulto, perfazendo cerca de 3 casos para cada 100 mil habitantes/ano e incidindo predominantemente na faixa etária entre os 45 e 70 anos de idade (DAUMAS-DUPORT et al., 1988, p. 2152-2165; SALCMAN, 1993, p. 379-390; KLEIHUES et al., 1995, p. 211-221; LANTOS; VANDENBERG; KLEIHUES et al., 1997, p. 583-879).

Apesar de terem transcorrido mais de duas décadas de investigação e terem sido instituídos modelos terapêuticos inovativos e uniformes, o prognóstico clínico dos pacientes permanece inalterado, com a sobrevida média continuando a girar em torno de um ano, a partir do diagnóstico (ARAUJO, 1982, p. 145-176; SALCMAN et al., 1994, p. 213-219; SALCMAN, 1999, p. 25-35; SIMMONS et al., 2001, p. 1122-1128; BURTON et al., 2002, p.180-187).

Entre os fatores prognósticos descritos que parecem guardar maior relação com a sobrevida estão: idade, desempenho na escala de Karnofski, extensão da ressecção cirúrgica e achados histopatológicos (KARNOFSKI; ALBERMAN; CRAVER, 1948, p. 634-656; SALCMAN, 1980, p. 435-439; BURGER; GREEN, 1987, p. 1617-1625; CHANDLER et al., 1993, p. 716-720; SALCMAN, 1994, p. 213-219; SALVATI et al., 1998, p. 61-64; SCOTT et al., 1999, p. 183-188; LACROIX et al., 2001, p. 190-198; HANEL, 2002, p. 72).

O fato de pacientes portadores das mesmas características histopatológicas poderem diferir no tempo de sobrevida aponta para a possibilidade de eventuais diferenças genéticas, que formariam subgrupos de diferentes comportamentos biológicos (ADELMAN, 1994, p. 35-41; ARAUJO, 1999, p. 191-195; KLEIHUES; OHGAKI, 1999, p. 44-51).

Na última década, o progresso nos conhecimentos dos mecanismos que resultam na transformação maligna dos gliomas tem aumentado significativamente através das informações advindas da genética molecular (GANJU et al., 1994, p. 920-927;



WATANABE et al., 1996, p. 217-224; KLEIHUES; OHGAKI, 1999, p. 44-51; SIMMONS et al., 2001, p. 1122-1128; BURTON et al., 2002, p. 180-187).

As alterações moleculares mais freqüentemente descritas com provável participação na patogênese dos glioblastomas incluem mutações no gene p53, ampliações/hiperexpressão do receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR), ampliação do gene MDM2 contido no cromossoma 12q, além de alterações na expressão dos genes p16, p21 e p27, prováveis reguladores da proliferação celular (WATANABE et al., 1996, p. 217-224; BOUVIER-LABITT et al., 1998, p. 381-388; WANG et al., 2001, p. 173-180; BURTON et al., 2002, p. 180-187).

Sugere-se que essas alterações genéticas, com as alterações conseqüentes, algumas demonstráveis através de métodos de imunohistoquímica, possam ser testadas como marcadores nos glioblastomas, para a caracterização de subgrupos de tumores, além de potencialmente contribuir para a pesquisa de novas abordagens de investigação etiológica e terapêutica (JAROS et al., 1992, p. 373-385; HIESIGER et al., 1993, p. 93-104; SOINI et al., 1994, p. 786-792; KYRITSIS et al., 1995, p. 1617-1622; KORKOLOUPOULOU et al., 1997, p. 1269-1278; RAINOV et al., 1997, p. 13-28; WANG et al., 2001, p. 173-180; BURTON et al., 2002, p. 180-187).

O gene supressor p53 participaria de mecanismos reguladores da apoptose e proliferação celular e sua alteração resultaria em prejuízo de sua função reguladora (CROTEAU et al., 2001, p. 60-81; KRAUS et al., 2001, p. 263-272).

Assim, a imunopositividade da proteína resultante da mutação gênica de p53 poderia servir de marcador para estudo do comportamento biológico no glioblastoma, assim como eventualmente refletiria sua participação como elemento etiopatogênico (KLEIHUES; OHGAKI, 1999, p. 44-51; KRAUS et al., 2001, p. 263-272).

A proteína p53 participaria também dos mecanismos de proteção celular em resposta aos danos ao DNA (NUSSBAUM; MCINNES; WILLARD, 2002, p. 285).

Mutações de p53 estariam envolvidas na resistência ao tratamento radioterápico dos gliomas, cuja eficácia depende do dano ionizante ao DNA celular e à indução da apoptose (KIRLA et al., 2000, p. 71-80).

Sensibilidade reduzida a agentes quimioterápicos tem sido imputada, em parte, a fenômenos semelhantes (IWADATE et al., 1996, p. 236-240; DORIGO et al., 1998, p. 535-540).

Apesar de sua ação bem definida no ciclo proliferativo da célula glial, a importância prática de p53 na oncogênese e prognóstico do glioblastoma tem sido objeto de controvérsias na literatura, suscitando a necessidade de ensaios clínicos mais bem definidos (NEWCOMB et al., 1998, p.655-677; KRAUS et al., 2001, p. 263-272; SIMMONS et al., 2001, p. 1122-1128).

O gene do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) estaria envolvido no controle da proliferação celular e no desenvolvimento da cascata de eventos genéticos que resultaria na oncogênese do glioblastoma. Sua alteração mutacional, com conseqüente hiperexpressão do EGFR, pode também ser demonstrada por métodos imunohistoquímicos (KLEIHUES; OHGAKI, 1999, p. 44-51; KAPOOR; O'ROURKE, 2003, p. 1425-1435).

O uso potencial de sua hiperexpressão como marcador de alterações genéticas tem sido preconizado, bem como tem sido sugerido seu emprego como substrato potencial para a introdução de inovações terapêuticas em várias situações oncológicas (LIBERMAN et al, 1985, p. 144-147; JAROS et al., 1992, 373-385; NAGANE et al., 1996, p. 5079-5086; WAHA et al., 1996, p. 634-641; ZHU et al., 1996, p. 809-815; BOUVIER-LABIT et al., 1998, p. 381-388; ETIENNE et al., 1998, p. 2383-2390; SANO et al., 1999, p. 1820-1824).

De forma semelhante ao p53, não existe ainda consenso sobre a magnitude da importância clínica do EGFR como fator oncogênico no glioblastoma. As eventuais implicações prognósticas de sua hiperexpressão também suscitam controvérsias, implicando na necessidade de mais estudos clínicos que melhor definam sua participação nesses aspectos (WAHA et al., 1996, p. 634-641; RAINOV et al., 1997, p. 13-28; NEWCOMB et al., 1998, p. 655-677; HIESIGER et al., 1993, p. 93-104).

## 1.1 OBJETIVOS

Considerando as informações descritas, o presente estudo tem o objetivo de:

- a) extrair dos resultados informações que possam resultar em aplicações práticas futuras, como a possível identificação de subgrupos de comportamento clínico diverso que sirvam de substrato para novas opções terapêuticas.
- b) caracterizar numa população previamente estudada quanto a fatores de prognóstico clínico e histopatológicos (HANEL, 2002, p.63-72), a presença e participação da proteína p53, cuja imunopositividade serviria como marcador da anormalidade mutacional de seu gene codificador p53;
  - estudar a relevância de sua participação isolada e em correlação com outros fatores como elemento determinante de prognóstico, bem como possível fator desencadeante das alterações relacionadas com a origem do glioblastoma;
- c) caracterizar, por técnicas de imunohistoquímica, a hiperexpressão do receptor do fator de crescimento epidérmico, reflexo de sua mutação gênica, bem como avaliar sua importância como marcador relacionado com prognóstico e seu papel na gênese do glioblastoma;
- d) correlacionar e caracterizar a presença de ambos como fatores simultâneos ou mutuamente excludentes e relacioná-los com fatores de prognóstico previamente analisados, e com a quantificação do índice proliferativo mensurado por análise da imunopositividade do antígeno Ki-67, na população estudada;

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 EMBRIOLOGIA E FISILOGIA ASTROCITÁRIA NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

A notocorda, que representa o primeiro vestígio do sistema nervoso central humano, deriva da crista primitiva, que migra no sentido rostro caudal ao redor do 18º dia (LARSEN, 1997, p. 33-48).

Esta, por sua vez, se origina do nódulo primário, pela migração de células epiblasticas, fenômeno que ocorre no primeiro dia de gastrulação, ao redor da segunda semana de vida (O'RAHILLY; MULLER, 1994, p. 29-34; LARSEN, 1997, p. 33-48).

Nesta expansão progressiva ocorrem fenômenos embriológicos previamente definidos no tempo e espaço, que envolvem mecanismos de indução, proliferação, formação de conexões neurais e estabelecimento de substratos integrados para futuras funções neurais específicas (CARLSON, 1999).

Através de um fenômeno de indução primária, originado da notocorda, ocorre o espessamento do tecido neuroepitelial, resultando na placa neural, de onde surgem células multipotenciais, que por divisões sucessivas finalmente produzem as duas linhagens primordiais do sistema nervoso central: a neuronal e a glial. Com exceção da micróglia, de origem mesenquimal, todas as células nervosas se originam do neuroepitélio (LARSEN, 1997, p. 33-48).

Desde o início, os astrócitos se diferenciam das células neuroectodérmicas. Da glia radial primária, seus processos se expandem no sentido ventricular e pial, servindo de substrato básico para a migração neuronal, com a junção dos prolongamentos astrocitários com a lâmina basal dos capilares constituindo a base anatomo-fisiológica da barreira hemato-encefálica (BERRY; BUTT, 1997, p. 63-85).

As funções básicas dos astrócitos envolvem também participações no suporte estrutural do sistema nervoso, facilitação na transmissão de estímulos e a de agentes reacionais a estímulos patológicos (BERRY; BUTT, 1997, p. 63-85).

Os astrócitos também secretam citocinas, que participam como reguladoras e indutoras de processos imunológicos do cérebro, além de fatores neurotróficos, que influenciam na sobrevivência neuronal (BERRY; BUTT, 1997, p. 63-85).

## 2.2 TUMORES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

A heterogenicidade dos tumores do sistema nervoso central está bem estratificada na tabela 1, preconizada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), em que o glioblastoma foi incluído na categoria dos tumores astrocíticos, considerando informações mais recentes advindas da genética celular (KLEIHUES; BURGER; SCHEITHAUER, 1993, p. 255-268).

Os tumores primários perfazem cerca de 9% dos tumores do adulto, ocorrendo com maior frequência na infância, onde podem representar até 20% de todas as neoplasias (BRONSTEIN, 1995, p. 79-89; PRESTON-MARTIN, 1996, p. 273-290).

A tabela 2 reflete a predominância dos tumores de origem neuroepitelial sobre os outros tipos histológicos, segundo os vários autores (TORRES et al., 1990, p. 279-285).

## 2.3 TUMORES ASTROCITÁRIOS

Cerca de 60% das neoplasias cerebrais primárias estão representadas pelos tumores astrocíticos, de origem neuroepitelial (KLEIHUES; BURGER; SCHEITHAUER, 1993, p. 255-268; LANTOS; VANDERBERG; KLEIHUES, 1997, p. 583-879; KLEIHUES et al., 2000, p. 29-40).

TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO DOS TUMORES DO SISTEMA NERVOSO SEGUNDO A ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE

<b>Tumores do tecido neuroepitelial</b>	<b>Tumores do parênquima pineal</b>
Tumores astrocitários	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pineocitoma</li> <li>• Pineoblastoma</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Astrocitoma difuso</li> <li>• Astrocitoma fibrilar</li> <li>• Astrocitoma protoplasmático</li> <li>• Astrocitoma gemistocítico</li> <li>• Astrocitoma anaplásico</li> <li>• Glioblastoma</li> <li>• Glioblastoma de células gigantes</li> <li>• Gliossarcoma</li> <li>• Astrocitoma pilocítico</li> <li>• Xantastrocitoma pleomórfico</li> <li>• Astrocitoma subependimário de células gigantes</li> </ul>	<b>Tumores embrionários</b>
Tumores oligodendrogliais	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Meduloblastoma</li> <li>• Tumor neuroectodérmico primitivo</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Oligodendroglioma</li> <li>• Oligodendroglioma anaplásico</li> <li>• Gliomas mistos</li> <li>• Oligoastrocitoma</li> <li>• Oligoastrocitoma anaplásico</li> </ul>	<b>Tumores dos nervos periféricos</b>
Tumores ependimários	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Schwannoma</li> <li>• Neurofibroma</li> <li>• Tumor maligno da bainha no nervo periférico</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ependimoma</li> <li>• Ependimoma anaplásico</li> <li>• Ependimoma mixopapilar</li> <li>• Subependimoma</li> </ul>	<b>Tumores das meninges</b>
Tumores do plexo coróide	<b>Tumores das células meningoteliais</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Papiloma do plexo coróide</li> <li>• Carcinoma do plexo coróide</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Meningeoma</li> </ul>
Tumores de origem incerta	<b>Tumores não meningoteliais</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Astroblastoma</li> <li>• Gliomatose cerebral</li> <li>• Glioma coróide do 3º ventrículo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lipoma</li> <li>• Fibrossarcoma</li> <li>• Condroma</li> </ul>
Tumores neuronais e mistos neuronal-gliol	<b>Lesões melanocíticas primárias</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gangliocitoma</li> <li>• Tumor neuroepitelial disembrionário</li> <li>• Ganglioglioma</li> <li>• Ganglioglioma anaplásico</li> <li>• Neurocitoma central</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Melanocitoma</li> </ul>
Tumores neuroblásticos	<b>Tumores de histogênese incerta</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Neuroblastoma olfatório</li> <li>• Neuroblastoma da adrenal</li> <li>• Neuroblastoma do sistema nervoso simpático</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hemangioblastoma</li> <li>• Linfomas e neoplasia hematopoiéticas</li> <li>• Linfomas malignos</li> <li>• Plasmocitoma</li> </ul>
	<b>Tumores de células germinativas</b>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Germinoma</li> <li>• Carcinoma embrionário</li> <li>• Tumores do seio endodérmico</li> <li>• Coriocarcinoma</li> <li>• Teratoma</li> <li>• Tumores mistos</li> </ul>
	<b>Tumores da região selar</b>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Craniofaringeomas</li> <li>• Tumor de células granulares</li> </ul>
	<b>Tumores metastáticos</b>

FONTE: KLEIHUES, P.; BURGER, P.C.; SCHEITHAUER, B.W. The new WHO classification of brain tumors. Brain Pathol., v.3, p.255-268, 1993.

TABELA 2 - INCIDÊNCIA DAS DIFERENTES CLASSES DE TUMORES SEGUNDO DIFERENTES AUTORES.

GRUPO DE TUMORES	INCIDÊNCIA (%)		
	Cushing	Lopez-Gonzalez et al.	Torres et al.
Tumores do tecido neuroepitelial	43,2	33	49,5
Meningeomas	13,4	22	16,9
Schwannomas	8,7	6	9,8
Adenomas de hipófise	17,8	24	3,0
Teratomas	5,6	-	3,9
Tumores vasculares	2,0	-	2,0

FONTE: TORRES et al. Brain tumors in South Brazil: a retrospective study of 438 cases. Arq. Neuropsiquiatr., v.48, p. 279-285, 1990.

A maioria das classificações dos tumores astrocitários tem procurado associar as características morfológicas e topográficas dos tumores a prognóstico baseado em sistema de graduação progressiva (ADELMAN, 1994, p. 35-41).

Em 1949, KERNOHAN et al.(p. 71-75), da Mayo Clinic, publicaram a primeira classificação ordenada de astrocitomas, de acordo com os graus de anaplasia, necrose e vascularização, reconhecendo desde então que gliomas de baixo grau podem evoluir para lesões malignas.

Posteriormente, em 1988, com critérios semelhantes, surgiu a classificação de DAUMAS-DUPORT et al. (p. 2152-2165), logo depois redefinida e ampliada para a atual classificação de StAnne/Mayo, que guarda algumas características primordiais dos conceitos de KERNOHAN, apesar de introduzir mais elementos morfológicos (KIM et al., 1991, p. 27-37).

A tabela 3 correlaciona sua nomenclatura e critérios com o sistema mais difundido da OMS.

Finalmente, a tabela 4 resume dados clínicos e epidemiológicos de coleção de tumores de linha astrocitária, contidos no Banco de Dados de Patologia Tumoral do Sistema Nervoso Central da Cidade de Curitiba, que tem servido de substrato para linhas de pesquisa incluindo o estudo atual.

TABELA 3 - COMPARAÇÃO ENTRE OS SISTEMAS DE GRADUAÇÃO DE ASTROCITOMAS DA ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE E ST. ANNE/MAYO.

GRAU - OMS	DESIGNAÇÃO - OMS	ST ANNE/MAYO	
		Designação	Critério histológico
I	Astrocitoma pilocítico		Ausência dos referidos critérios
II	Astrocitoma difuso	Astrocitoma grau 2	Um critério, usualmente atipia nuclear
III	Astrocitoma anaplásico	Astrocitoma grau 3	Dois critérios, usualmente atipia nuclear e mitoses
IV	Glioblastoma	Astrocitoma grau 4	Três critérios: atipia nuclear, mitoses, proliferação vascular e/ou necrose

FONTE: KIM et al. Correlates of survival and the Daumas-Duport grading system for astrocytomas. *J Neurosurg*, v. 74, p. 27-37, 1991.; KLEIHUES, P.; BURGER, P.C.; SCHEITHAUER, B.W. The new WHO classification of brain tumors. *Brain Pathol*, v.3, p. 255-268, 1993.

## 2.4 GLIOBLASTOMA

### 2.4.1 Conceito

O glioblastoma, tumor mais freqüente e mais maligno do adulto, representa o processo máximo de indiferenciação da linha astrocitária, reunindo todos os critérios histopatológicos que o posicionam como astrocitoma grau IV da classificação da OMS e StAnne/Mayo (KIM et al., 1991, p. 27-37; KLEIHUES; BURGER; SCHEITHAUER, 1993, p. 255-268).

Desde há 3 anos, o termo “multiforme” que qualificava classicamente a designação do tumor, foi suprimida, sendo o mesmo referido atualmente pela terminologia isolada de “glioblastoma” (KLEIHUES et al., 2000, p.29-40).



TABELA 4 - DADOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS DOS TUMORES ASTROCÍTICOS COMPILADOS DO BANCO DE PATOLOGIA TUMORAL DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DA CIDADE DE CURITIBA - 1987 / 1998.

ENTIDADE	FAIXA ETÁRIA	SEXO	CLÍNICA	TOPOGRAFIA
Astrocitoma pilocítico (Grau I da OMS)	Nas primeiras duas décadas	Sem predominância	Relacionada à localização	Nervo e quiasma ópticos, hipotálamo, gânglios da base, tálamo e cerebelo.
Astrocitoma difuso (Grau II da OMS)	Moda situada entre 20 e 45 anos, com uma média de 34 anos.	1,18 M : 1 F	Crises convulsivas, alterações do comportamento e distúrbios sensoriais.	Qualquer região do SNC
Astrocitoma anaplásico (Grau III da OMS)	A moda situa-se entre a 4 e 6 décadas, com uma média de 41 anos	1,87 M : 1 F	Similar à dos astrocitomas difusos, menor tempo de evolução	Qualquer região do SNC, preferencialmente nos hemisférios.
Glioblastoma (Grau IV da OMS)	Pico de incidência situado entre os 45 e 70 anos, com uma média de 53 anos	1,50 M : 1 F	Curta evolução (menor que 3 meses em 50% dos casos), crescimento rápido e localização.	Hemisférios cerebrais, predominantemente e fronto-parietais e temporais
Glioblastoma de células gigantes	Média de 42 anos, sem preferência quanto à faixa etária.	Mais freqüente em homens	Similares aos dos glioblastomas	Subcortical, nos lobos temporal e parietal
Gliosarcoma	Moda entre os 40 e 60 anos, com uma média de 53 anos.	Mais freqüente em homens	Crises convulsivas e parestias de curta evolução	Lobos temporal, frontal, parietal e occipital (ordem decrescente de freqüência).
Astrocitoma xantopleomórfico	Predominantemente e em crianças e adultos jovens	Sem predominância	Crises convulsivas	Superficialmente nos hemisférios cerebrais, predominante no lobo temporal.
Astrocitoma subependimário de células gigantes	Primeiras duas décadas de vida	Sem predominância	Esclerose tuberosa	Paredes dos ventrículos laterais

FONTE: TORRES et al.. Brain tumors in South Brazil: a retrospective study of 438 cases. Arq. Neuropsiquiatr., v.48, p. 279-285, 1990.

## 2.4.2 História

VIRCHOW<sup>1</sup>, em 1864, citado por KLEIHUES et al. (2000, p. 29), tipificou o glioblastoma como sendo de origem glial, embora haja controvérsia sobre a quem coube designá-lo com a terminologia apropriada.

O termo “espongioblastoma multiforme” proposto por GLOBUS e STRAUSS<sup>2</sup>, em 1925, citados por SCHOLD (1997, p. 1-11), cedeu à designação “glioblastoma multiforme”, tornada clássica, pela correlação prognóstica, por BAILEY e CUSHING<sup>3</sup> citados por ZÜLCH (1986, p. 3-15) e SCHOLD (1997, p. 1-11).

HARVEY CUSHING<sup>4</sup>, citado por BLACK e BLACK (2001, p. 1-9), considerado o pioneiro da Neurocirurgia Moderna na América, publicou, em 1932, sua grande série de 2023 tumores, dos quais 862 eram gliomas.

No campo da neuropatologia, KERNOHAN, em 1949 (p.71-75), graduou pela primeira vez os gliomas de acordo com suas alterações histopatológicas progressivas, confrontando-as com o prognóstico, o que foi aprimorado em classificações mais recentes (DAUMAS-DUPORT et al., 1988, p. 2152-2165).

A localização de massas no sistema nervoso central deixou de ser apenas empírica ou clínica, depois da introdução da pneumo-encefalografia por WALTER E. DANDY<sup>5</sup>, em 1918, seguido pelo desenvolvimento da angiografia cerebral pelo português EGAS MONIZ<sup>6</sup>, em 1926 (citados por BLACK e BLACK 2001, p.1-9 e SCHOLD 1997, p.1-11).

<sup>1</sup>VIRCHOW, R. Die kram kaften geschwulste, v.2, Berlim, Hirschwald, p. 343-378, 1864.

<sup>2</sup> GLOBUS, J.H.; STRAUSS, I. Spongioblastoma multiforme, primary malignant form of neoplasm. Arch neurol. Psychiatr, Chicago, v. 14, p. 139, 1925.

<sup>3</sup> BAILEY, P.; CUSHING H.W.. A classification of tumors of glioma group on a histogenesis basis with a correlated study of prognosis. Philadelphia: JB Lippincott, 1926.

<sup>4</sup> CUSHING, H.W.. Intracranial tumors: notes upon a series of two-thousand verified cases with surgical mortality percentages pertaining thereto. Springfield: C.C. Thomas, 1932.

<sup>5</sup> DANDY, W. Ventriculography following the injections of air into the cerebral ventricles. Ann Surg, v.68, p. 5-11, 1918.

<sup>6</sup> MONIZ, E. L'encephalographie arterielle: son importance dans la localisation des tumeurs cerebrales. Rev Neurol, v.2, p. 72, 1927.

Depois disso, apenas nas décadas iniciadas em 1970 e 1980 respectivamente, foram introduzidas as técnicas de Tomografia Computadorizada (TC) e Ressonância Magnética (RM), refinando extraordinariamente a capacidade de diagnóstico por imagem dos gliomas (SCHOLD, 1997, p. 1-11; BLACK; BLACK, 2001, p. 1-9).

Do ponto de vista cirúrgico, foram BENNET e GODLEE<sup>7</sup>, citados por ARAUJO (1982, p.145), em 1884, os primeiros a descrever a abordagem cirúrgica a um tumor glial.

É atribuído a CUSHING<sup>8</sup>, citado por BLACK e BLACK (2001, p. 1-9), o pioneirismo na adoção de medidas apropriadas para a manipulação dos tecidos cerebrais, aprimoradas hoje com a introdução de técnicas microcirúrgicas que reduziram significativamente a morbidade e mortalidade na neurocirurgia (ARAUJO, 1982, p. 145-176; SALCMAN 1993, p. 379-390).

#### 2.4.3 Epidemiologia

Cerca de 60% dos tumores astrocitários são representados pelo glioblastoma, que corresponde de 12% a 15% das neoplasias intracranianas, o que o torna o tumor primário mais freqüente do sistema nervoso central do adulto, predominando no sexo masculino numa relação de 1.3 a 1.5:1 (KLEIHUES et al., 1995, p. 211-221; PRESTON-MARTIN, 1996, p. 273-290). Ao contrário dos adultos, apenas 20% dos tumores gliais hemisféricos são malignos na criança, representando 6,5% do total das neoplasias intracranianas da infância (TAMBER; RUTKA, 2003, p.1-8).

Estima-se que 3 casos por 100mil habitantes ocorrem por ano, afetando predominantemente a faixa etária entre 45 e 70 anos (LANTOS; VANDERBERG; KLEIHUES, 1997, p. 583-879).

<sup>7</sup> BENNET, H. GODLEE, R.T. Excision of a tumor from the brain. *Lancet*, v.2, 1884, p. 1091.

<sup>8</sup> Loc. cit., p. 11.

O pico de incidência varia entre o início da quinta e sexta décadas de vida, tendo sido diagnosticados, excepcionalmente, casos em vida intra-uterina, por métodos de ultra-sonografia fetal (MAHALEY et al., 1989, p. 826-836; KLEIHUES et al., 1995, p. 211-221; LEE et al., 1999, p. 197-201).

O aumento da incidência dos tumores cerebrais malignos na América do Norte, nas três últimas décadas, é creditado ao aperfeiçoamento dos métodos de diagnóstico por imagem (GREIG et al., 1990, p. 1621-1624; DESMEULES; MIKRELSSEN; MAO, 1992, p. 442-445).

A localização cerebral do glioblastoma é predominantemente supratentorial, sendo rara a ocorrência na fossa posterior (DOHRMAN; DUNSMORE, 1975, p. 219-233; ARAUJO, 1982, p. 145-176).

Tumores da série glial tendem, no entanto, a predominar na fossa posterior na infância até a faixa etária dos 25 anos (SALCMAN, 1999, p. 25-35).

As localizações hemisféricas mais comuns são a frontal (23% a 40%), temporal (25% a 31%), parietal (25%) e occipital (16%) (MAHALEY et al., 1989, p. 826-836; McLENDON et al., 1988, p. 305-572).

O aspecto infiltrativo da lesão, no entanto, faz com ela ocupe freqüentemente o espaço de mais de um lobo cerebral e atinja estruturas profundas subcorticais (KLEIHUES et al., 1995, p. 211-221).

A imunossupressão parece desempenhar, em alguns casos recentes, papel desencadeante em alterações de fatores oncogênicos que resultariam em formação de glioblastoma, como em situação de transplante de órgãos e síndrome da imunodeficiência adquirida por vírus (HIV) (JONAS et al, 1996, p. 426-429; VANNEMREDDY et al., 2000, p 161-164; SCHIFF et al, 2001, p. 1486-1488).

Metástases extraneurais de glioblastoma são raras, merecendo relatos anedóticos na literatura (WALLACE et al., 1996, p. 1929-1931).

Além das síndromes genéticas que eventualmente predispoem ao aparecimento de gliomas, outras causas sugeridas envolvem exposição a agentes ionizantes, campos eletromagnéticos, traumatismo cranioencefálico e drogas nitrosuradas (SIMMONS;

LAWS, 1988, p. 172-178; PRESTON-MARTIN, 1996, p. 273-290; SABEL et al., 1999, p. 1041-1044; SHAMISA et al., 2001, p. 816-821).

#### 2.4.4 Manifestações Clínicas

Não existem aspectos clínicos característicos do glioblastoma. A rapidez na evolução dos tumores malignos constitui um dado importante no diagnóstico diferencial, mas esse detalhe também não pode ser considerado de forma absoluta (ARAUJO, 1982, p. 145-176).

Como em outras neoplasias, os sinais e sintomas costumam se dividir entre os que refletem hipertensão intracraniana, como cefaléia, náuseas, vômitos, e alterações de comportamento, e os sinais focais, dependentes da área cerebral em que reside o tumor, mais contundentes na sua forma inicial se a lesão se origina em uma área eloqüente do cérebro (ARAUJO, 1982, p. 145-176; BERGER et al., 1996, p. 57-126; SALCMAN, 1999, p. 196-212).

SALCMAN (1999, p. 196-212) descreveu a cefaléia como o sintoma geral mais freqüente, sendo que a hemiparesia, disfasia e convulsões predominam como sintomatologia focal.

Segundo ARAUJO (1982, p.145-176) a cefaléia é geralmente conseqüente à rápida proliferação celular, edema e efeito de massa do tumor, mas a ausência desta não deve, no entanto, ser fator excludente do diagnóstico.

Algumas vezes o glioblastoma se manifesta inicialmente através de uma sintomatologia aguda, simulando acidente vascular cerebral. Isso ocorre na maioria das vezes por hemorragia intratumoral numa lesão até então assintomática. Cerca de 3% dos pacientes internados com diagnóstico de acidente vascular cerebral tem seu diagnóstico inicial reformulado para tumor cerebral, na maioria das vezes em decorrência da hemorragia inicial (ARAUJO, 1982, p. 145-176; BERGER et al., 1996, p. 57-126).

As convulsões ocorrem em cerca de 29% dos glioblastomas. Uma história de convulsão de longa data sugere a presença de um astrocitoma de baixo grau nas fases

iniciais da doença com posterior malignização, condicionando eventualmente o paciente a um melhor prognóstico. Ao contrário, uma evolução clínica rápida, de cerca de três meses, favoreceria o diagnóstico de glioblastoma primário, com implicações prognósticas (SALCMAN, 1993, p. 379-390; SALCMAN, 1999, p. 196-212).

A condição funcional do paciente portador de glioblastoma costuma ser graduada pela escala de Karnofski, que varia de 0 a 100 (KARNOFSKI; ABELMAN; CRAVER, 1948, p. 634-656).

A manutenção de um valor constante em torno de 70 (em que o paciente cuida de si próprio, mas é incapaz para atividades rotineiras) ou maior, constituiria um parâmetro de avaliação de melhor prognóstico para os portadores de glioblastoma (SALCMAN, 1980, p. 435-439; SALCMAN, 1994, p. 213-219; HANEL, 2002, p. 52).

#### 2.4.5 Diagnóstico por Imagem

A pneumoencefalografia ,diagnosticando indiretamente efeitos de massa, por desvios de estruturas, permanece como valor histórico (SCHOLD, 1997, p. 1-11).

Da mesma forma, a angiografia cerebral, elemento indispensável para o diagnóstico até o início da década de 1970, não mais pertence ao arsenal diagnóstico atual, apesar de ser capaz de realçar características importantes da lesão, principalmente relacionadas com distúrbios de fluxo sanguíneo e neo-proliferação vascular (OSBORN, 1994, p. 529-578).

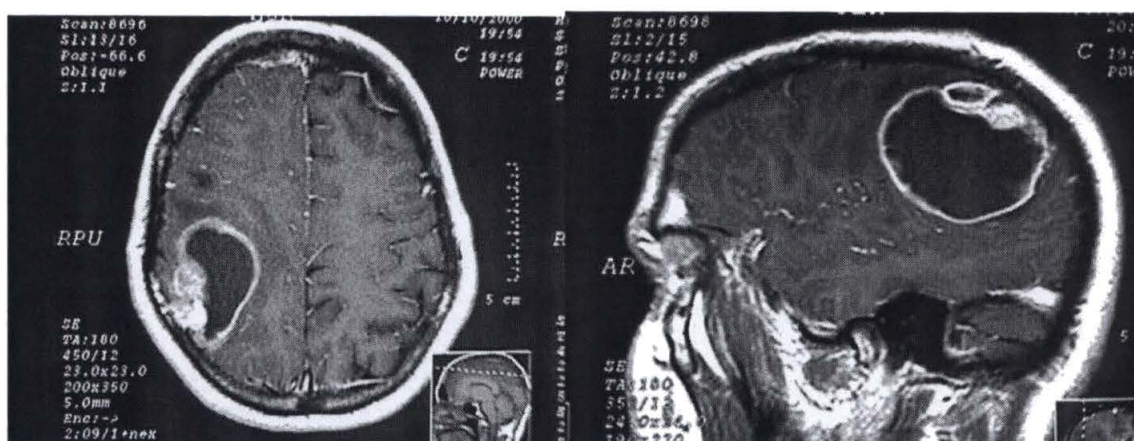
Somente a partir da introdução da tomografia computadorizada no cenário clínico, uma representação anatômica e espacial do tumor passou a ser melhor demonstrada (SCOTT et al., 1999, p. 183-188). A introdução da ressonância magnética em nosso meio, a partir de 1990, acrescentou maior refinamento e riqueza de detalhes aos métodos interpretativos (SCHOLD, 1997, p. 1-11; SALCMAN, 1994, p. 213-219).

Habitualmente o glioblastoma é visto como uma massa heterogênea, de conteúdo central hipointenso na RM e hipodenso na TC. Essas características podem refletir o conteúdo central cístico ou necrótico da lesão. A necrose intratumoral tem

sido usada como fator prognóstico, cuja presença seria inversamente proporcional à sobrevida (LACROIX et al., 2001, p. 190-198; RAZA et al., 2002, p. 2-12).

A população celular neoplásica é habitualmente demonstrada em áreas de hiperdensidade (TC), hiperintensidade (RM) em T1 e iso-hiperintensidade em T2 (RM), costumando absorver contraste, configurando assim anéis de espessura irregular que circundam um centro necrótico (HOLT; MARAVILLA, 1996, p. 753-774) (figura 1).

FIGURA 1 – ASPECTOS DE IMAGEM DO GLIOBLASTOMA NA RM



FONTE: Dados do autor

NOTA: Ressonância magnética após o uso de contraste, em cortes axial (esquerda) e sagital (direita), em T1. Tumor com centro necrótico, na região parietal direita, com anel periférico irregular na periferia, configurando aspecto característico do glioblastoma.

A cronologia de depósitos hemorrágicos intratumorais é melhor apreciada pela RM, capaz de diferenciar diferentes idades dos focos pela degradação progressiva da hemoglobina (EARNEST et al., 1988, p. 823-827; OSBORN, 1994, p. 529-578; HOLT; MARAVILLA, 1996, p. 753-774).

Em contrapartida, a TC demonstra melhor focos de calcificação, raros nos glioblastomas, mas que, quando presentes, podem denunciar uma progressão tumoral a partir de um astrocitoma de baixo grau histológico (OSBORN et al., 1994, p. 529-578).

O edema cerebral peri-lesional, que contribui para o efeito de massa e desvios de estruturas, inicialmente creditado apenas à quebra fisiológica da barreira hemato-encefálica, na realidade pode refletir, nas imagens ponderadas em T2 na RM, a

extensão real da lesão, pelo já demonstrado encontro de células tumorais nestas regiões, auxiliando dessa forma o planejamento terapêutico (BERGER et al., 1996, p. 57-126; EARNEST et al., 1998, p. 823-827).

As técnicas de perfusão, difusão e espectroscopia por prótons na RM têm contribuído para o fornecimento de informações adicionais na imagem do glioblastoma. Os valores regionais de aumento de fluxo sanguíneo, demonstrado pelas técnicas de perfusão, demonstram quebra de barreira hematoencefálica no glioblastoma e são indicadores de grau histológico elevado e recidiva tumoral (OSBORN et al., 1994, p. 529-578; SUGAHARA et al., 1998, p. 1479-1486).

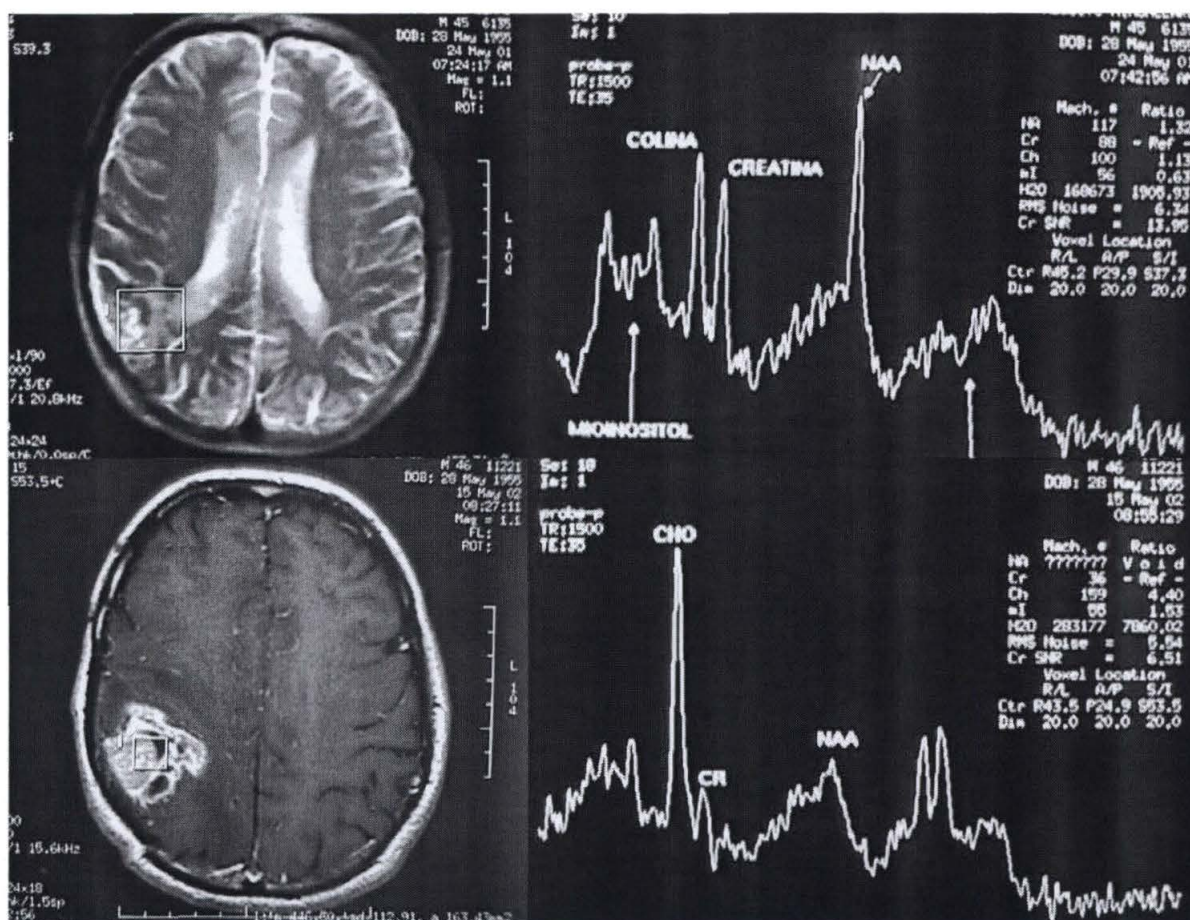
As técnicas de difusão refletem de forma inversamente proporcional a celularidade da lesão. Assim uma diminuição no coeficiente de difusão aparente da lesão na RM tem valor proporcional ao grau histológico (SUGAHARA et al., 1999, p. 53-60; KONO et al., 2001, p. 1081-1088).

A espectroscopia de prótons tem sido largamente utilizada na complementação da análise de gliomas cerebrais, refletindo a presença de metabólitos cerebrais e suas populações celulares correspondentes. A população neuronal está representada por picos espectrométricos de N-acetil aspartato (NAA), a população glial por picos de colina (Cho), normalmente mais baixos que o NAA, e picos de creatina refletiriam o conteúdo energético celular. A inversão do pico de colina em relação ao de NAA seria característica nos tumores gliais, acompanhada de diminuição do pico de creatina (NEGENDANK et al., 1996, p. 449-458; CASTILLO et al., 1998, p. 1-20) (Figura 2).

O emprego das informações fornecidas pela análise espectroscópica dos gliomas tem possibilitado correlacionar as características da imagem com o grau histológico das lesões com chance de acerto de até 95% dos casos analisados, corroborando a utilidade do método como fator não só de diagnóstico como também de prognóstico (HERMINGHAUS et al., 2003, p. 74-81).



FIGURA 2 – ESPECTROSCOPIA POR RM DO GLIOBLASTOMA



FONTE: Dados do autor.

NOTA: Nas figuras superiores, imagem de RM em T2 com voxel sobre área parieto-occipital direita na fase de remissão, demonstrando pico de NAA (marcador neuronal) superior ao pico de CHO (marcador de membranas celulares). Nas imagens inferiores, em T1 representando a recidiva tumoral, o pico de CHO é superior a NAA, acompanhado da redução do pico de creatina.

A análise espectroscópica do conteúdo da lesão pode também auxiliar no diagnóstico diferencial entre glioblastoma e abscesso cerebral, cujas características podem ser semelhantes nos exames de imagem convencionais. Assim, a presença acentuada de picos de lactato, acetato e aminoácidos, junto à diminuição do NAA, sugerem fortemente a presença de abscesso cerebral (NAKAISO et al., 2002, p. 346-348).

A análise espectral dos tumores gliais após o tratamento pode também eventualmente servir para avaliação prognóstica: assim TARNAWSKI et al. (2002, p.1271-1276), demonstraram que pacientes tratados com cirurgia e radioterapia e que apresentavam a relação lactato/NAA maior que 2.0 (alto índice de lactato) tinham

sobrevida de um ano em torno de 20%, ao contrário da melhor sobrevida de 80% para os que apresentavam índices inferiores a 2.0.

A tomografia por emissão de fóton único (SPECT), que mostra distúrbios de fluxo sanguíneo cerebral, bem como a tomografia por emissão de pósitrons (PET), que reflete e quantifica o metabolismo regional e global, pelo consumo de glicose, têm sido eventualmente usadas no auxílio da caracterização de lesões expansivas, no diagnóstico diferencial entre necrose e recidiva tumoral e na complementação de pesquisas terapêuticas inovativas, como a terapia gênica( SCHWARTZ et al., 1991, p. 1187-1192; HERHOLZ et al., 1993, p. 853-858; PATRONAS et al., 1995, p. 816-822; SCHWARTZ et al., 1998, p. 60-68; FLOETH et al., 2001, p. 1517-1527; JACOBS et al., 2001, p. 727-729).

#### 2.4.6 Patologia

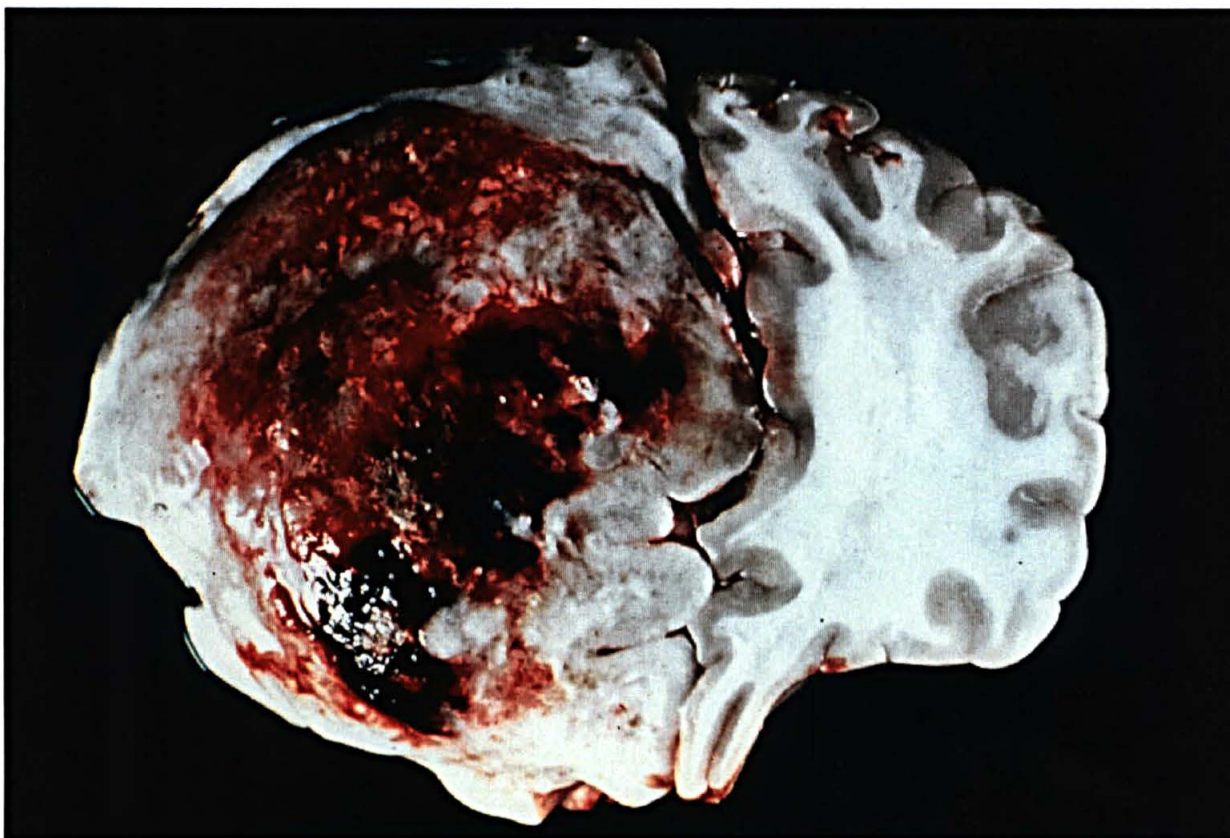
O aspecto macroscópico do tumor deriva de sua grande capacidade destrutiva e infiltrativa, sem limites definidos, nem formação capsular, embora por vezes a lesão aparente ter bordos definidos. No seu interior áreas focais de hemorragia se alternam com áreas de necrose, cuja liquefação podem dar origem a formações císticas (ZULCH, 1986, p. 83; LANTOS; VANDERBERG; KLEIHUES, 1997, p. 583-879; McLENDON et al., 1998, p. 307-572) (Figura 3).

A grande capacidade infiltrativa do tumor produz extensões para lobos cerebrais contíguos, estruturas profundas e até para o hemisfério oposto através de fibras de conexão, como o corpo caloso (ZULCH, 1986, p. 151).

A presença de gliomas multifocais é rara, tendo sido estimada em torno de 2,3% e 2,4% por diferentes autores (BATZDORF; MALAMUD, 1963, p. 122-126; McLENDON et al., 1998, p. 307-572).

Segundo KLEIHUES et al. (2000, p. 31), gliomas múltiplos independentes só podem ser autenticados por marcadores moleculares que os diferenciem, devido à origem policlonal.

FIGURA 3 – ASPECTO MACROSCÓPICO DO GLIOBLASTOMA.



FONTE: Dados do autor

NOTA: Em corte macroscópico coronal, o glioblastoma é visto destruindo o lobo occipital esquerdo, com áreas de necrose e hemorragia no seu interior.

Estudos de biópsia e autópsia têm demonstrado infiltração neoplásica à distância em tecido supostamente normal à macroscopia, inviabilizando na prática a possibilidade de ressecção cirúrgica completa (WILSON, 1992, p. 32-48; CHANDLER et al., 1993, p. 716-720; SILBERGELD; CHICOINE, 1997, p. 525-531).

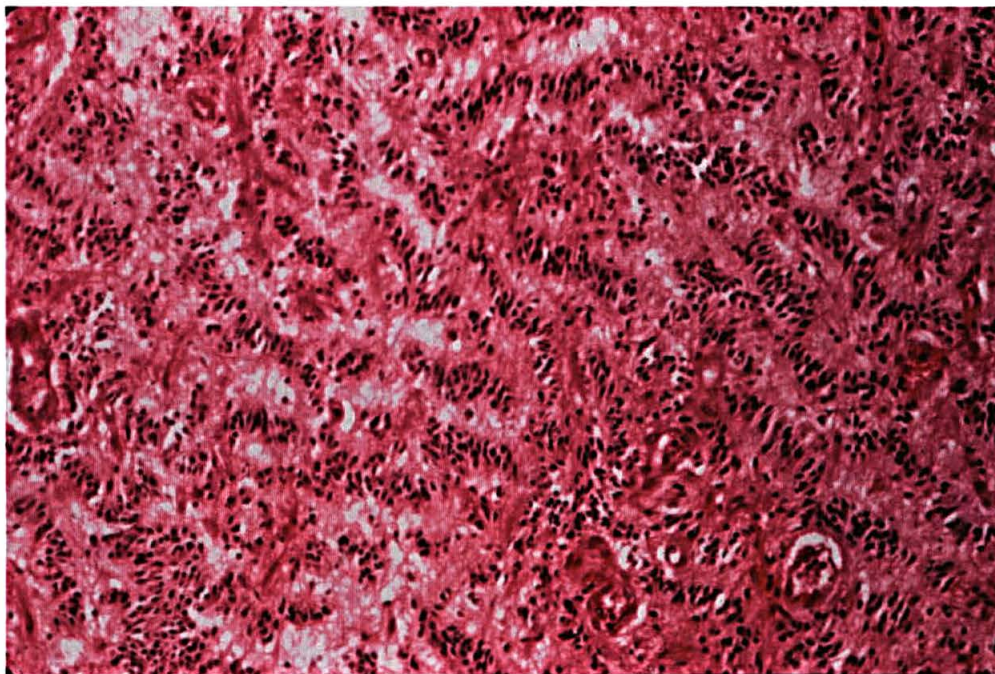
Metástases extraneurais de glioblastoma são extremamente raras. O fenômeno é imputado à incapacidade da célula neoplásica ultrapassar a membrana vascular basal (BERNSTEIN; WOODWARD, 1995, p. 124-132). Cerca de 250 casos foram descritos, envolvendo pulmão, linfonodos, fígado, vasos e medula óssea, sendo muitos atribuídos à manipulação cirúrgica (CHESTNUT et al., 1993, p. 135-140; MALCA; ROCHE; PELLET, 1993, p. 315-321).

Os elementos microscópicos característicos do glioblastoma incluem necrose, proliferação vascular, mitose, anaplasia e alta celularidade (LANTOS;

VANDENBERG; KLEIHUES, 1997, p. 583-879; McLENDON et al., 1998, p. 307-572).

Dois tipos de necrose podem ser encontrados: a primeira, mais volumosa, detectável por métodos de imagem, é isquêmica em origem e associada a um pior prognóstico (BARKER et al., 1996, p. 1161-1166; LACROIX et al., 2001, p. 190-198; NELSON et al, 1983, p. 550-554; RAZA et al., 2002, p. 2-12). O segundo tipo de necrose está ligado ao fenômeno de apoptose, representando uma área circundada por células fusiformes, em arranjo típico denominado “pseudopaliçadas” (Figura 4). As células circundantes induzem à proliferação microvascular, por expressarem fortemente a presença do receptor para o fator de crescimento vascular endotelial (VEGFR), sensível a estímulo hipóxico. Essas alterações representariam o marco histológico inicial no desenvolvimento celular do glioblastoma (SHWEIKI et al., 1992, p. 843-845; KLEIHUES et al., 2000, p. 36).

FIGURA 4 - ASPECTO MICROSCÓPICO DO ARRANJO EM  
“PSEUDOPALIÇADAS”



FONTE: Dados do autor

NOTA: Fotomicrografia demonstrando aspecto histológico característico do glioblastoma: área de necrose central, circundada por células compactadas ao redor, configurando o arranjo em “pseudopaliçadas”. (H.E. 100x)

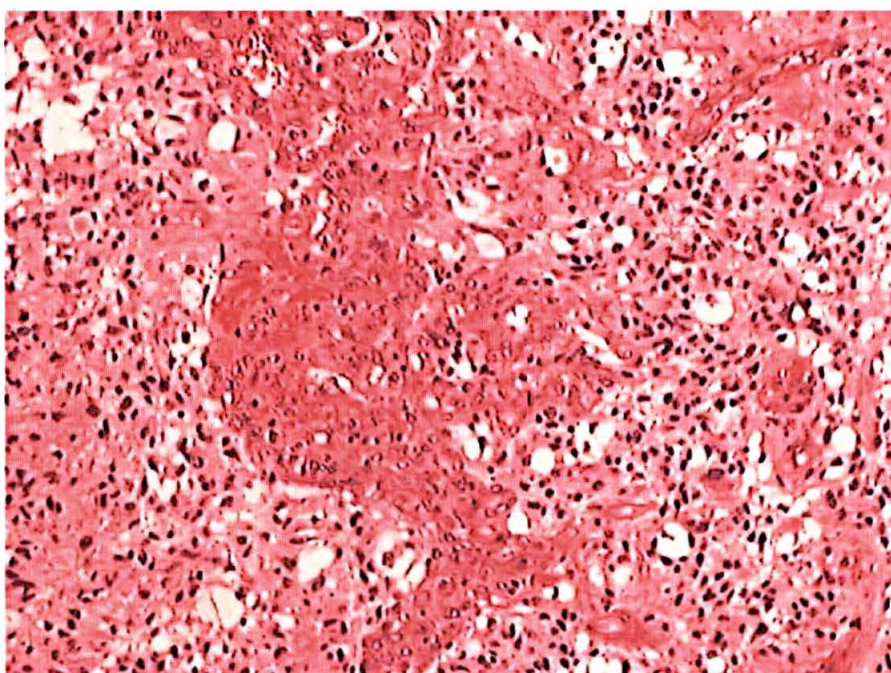
Segundo RAZA et al.(2002, p. 2-12), outro mecanismo envolvido na gênese da necrose estaria relacionado com a ativação do gene Ras, que levaria ao aumento do fator de necrose tumoral (TNF). Este fator agravaria os níveis de perfusão e hipóxia através do “canal de pró-coagulação”, e implicaria na transformação do mecanismo de apoptose em necrose.

Várias configurações histológicas são imputadas à proliferação microvascular, que se dispõe em múltiplos arranjos periféricos em relação às áreas de necrose (McLENDON et al., 1998, p. 307-572).

A angiogênese dessas estruturas está regulada por vários receptores para fatores de crescimento vascular (VEGFR1, VEGFR2, PDGFR- $\beta$ , PDGFR-C, PDGFR-D), que assumem hiperexpressão no glioblastoma, participando assim das causas de crescimento tumoral (KLEIHUES et al., 2000, p. 35-38; LOKKER et al., 2002, p. 3729-3735) (Figura 5).

Esses receptores também tem sido eventualmente usados como marcadores em pesquisa de fatores de prognóstico (OEHRING et al., 1999, p. 117-125).

#### FIGURA 5 - ASPECTO MICROSCÓPICO DO CRESCIMENTO VASCULAR



FONTE: Dados do autor

NOTA: Fotomicrografia demonstrando aspecto histológico característico do glioblastoma: vasos glomerulóides proliferados. (H.E. 200x)

Infiltrados linfocitários perivasculares, identificados como CD8, exerceriam uma resposta imunológica protetora no local, com relevância prognóstica (PALMA; DI LORENZO; GUIDETI, 1978, p. 854-861; KIDA et al., 1995, p. 121-129;), fato contestado por outros autores (BURGER; VOLMER, 1980, p. 1179-1186).

#### 2.4.7 Biologia Celular

As fases do ciclo celular se iniciam na fase G<sub>1</sub>, pré-sintética, em que as células elaboram RNA, enzimas e proteínas, após o que ingressam na fase S, de síntese ativa, com estruturação do DNA e duplicação cromossômica. O ingresso na fase G<sub>2</sub>, pré-mitótica, precede a fase M, de mitose celular. O tempo do ciclo celular (T<sub>c</sub>) representa a duração de G<sub>1</sub> a M (HOSHINO et al., 1972, p. 15-26).

Um grupo celular pode se tornar temporariamente inativo (G<sub>0</sub>), mantendo a capacidade de retornar ao grupo de proliferação ativa. Os outros componentes do tumor são formados por células maduras e estáveis e por células mortas (HOSHINO et al., 1972, p. 15-26).

A fração de crescimento (F<sub>c</sub>) representa a proporção da massa celular total que se divide ativamente. O tempo de duplicação da massa reflete o período levado para que a população celular dobre em número (“doubling time”), estimado em cerca de 48 dias no glioblastoma. De início, a forma utilizada para avaliar a fração de crescimento envolvia a injeção pré-operatória de bromodexoxiuridina (BrDU), análogo da timidina, que reagia contra um anticorpo monoclonal anti BrDU, na fase S do ciclo (“labeling index”). Desta forma a atividade proliferativa média do GBM foi calculada em torno de 7-8%, ao contrário do índice menor que 1% dos astrocitomas (HOSHINO; WILSON, 1979, p. 956-962).

Atualmente, com o uso do anticorpo MIB-1 contra o antígeno Ki-67, contido no núcleo, expresso nas fases G, S, G<sub>2</sub> e M do ciclo celular, é possível determinar índice proliferativo maior do tumor, com valores médios ficando entre 15 e 20% (KLEIHUES et al., 2000, p. 29-40). Para BURTON et al. (2002, p. 180-187) os valores médios foram de 15,7% para os pacientes com longa sobrevida e 28,1% para

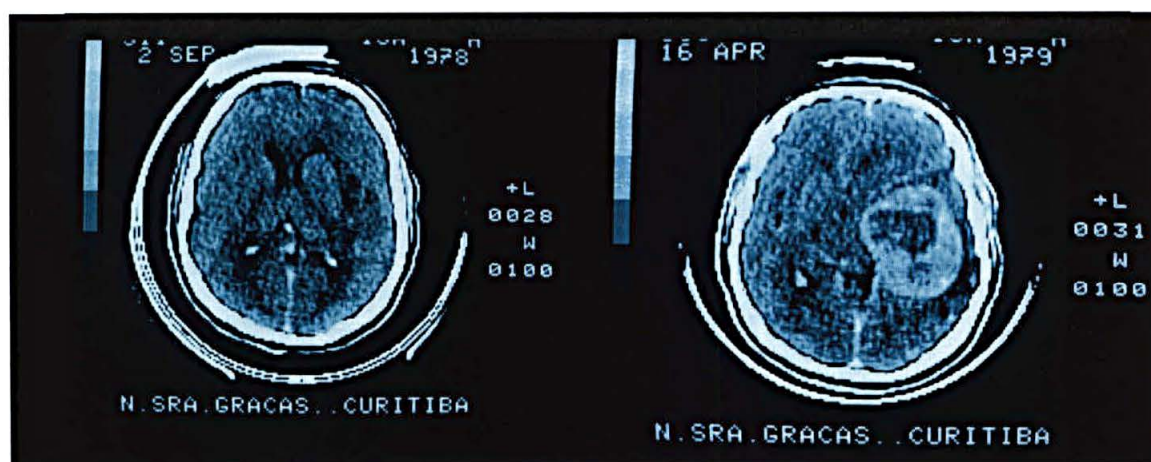
os de curta sobrevida. O índice proliferativo fornecido pelo Ki-67 prediz prognóstico em astrocitomas de baixo grau (“labeling index” < 1%), mas o seu papel no glioblastoma é controverso (SIMMONS et al., 2001, p. 1122-1128).

A determinação, por análise imunohistoquímica, da expressão da topoisomerase II-alpha no DNA, é capaz de identificar a porcentagem de células ativas no ciclo celular, com possível valor prognóstico (BREDEL et al., 2002, p. 1343-1347).

Enquanto o tempo da fase S (síntese de DNA) no glioblastoma, varia de 4 a 13 horas, o tempo do ciclo celular varia entre 36 e 152 horas (HOSHINO; WILSON; MURAOKA, 1979, p. 21-25).

Quando o tumor se torna clinicamente sintomático, se não ocupar uma área eloqüente, o glioblastoma terá uma população de  $10^{11}$  células, com 4 a 5 cm de diâmetro e peso de 40 a 100 g, tendo já completado cerca de 90% do seu ciclo de vida, através de mais de 30 duplicações. Uma nova duplicação será incompatível com sobrevida (SALCMAN, 1999, p. 25-35) (Figura 6).

FIGURA 6 – ASPECTOS TOMOGRÁFICOS EVOLUTIVOS DO GLIOBLASTOMA



FONTE: Dados do autor

NOTA: Tomografia computadorizada contrastada em cortes axiais, mostrando à esquerda, hipodensidade inespecífica em lobo temporal esquerdo. Exame de seguimento, 3 meses após, à direita, mostra grande tumor, com características de glioblastoma, demonstrando a grande capacidade proliferativa devida à cinética celular do glioblastoma.

Nas ressecções totais ou subtotais de um glioblastoma há uma acentuada transferência de células do compartimento G0, de volta ao ciclo ativo, determinando

um aumento na fração de crescimento do tumor, mas propiciando eventualmente uma nova ofensiva terapêutica adjuvante com o objetivo de atingir células recém ativadas e até então refratárias (HOSHINO et al., 1975, p. 127-135; HOSHINO; WILSON; MURAOKA, 1979, p. 21-25).

#### 2.4.8 Genética Molecular

A evolução dos conceitos de genética molecular no glioblastoma determinou novas informações sobre sua origem, ocasionando um novo posicionamento do tumor na classificação da OMS (KLEIHUES; BURGER; SCHEITHAUER, 1993, p. 255-268).

O glioblastoma poderia se originar, pela modificação estrutural dos genes supressores, a partir de células diferenciadas, que com uma série subsequente de alterações genéticas evoluiria para sua expressão fenotípica final. O tumor poderia também se originar diretamente da célula precursora por mutações genéticas iniciadas diretamente por ativação de oncogenes. (KLEIHUES; OHGAKI, 1999, p. 44-51) (Figura 7).

FIGURA 7 – IMAGENS DE RM DEMONSTRANDO PROGRESSÃO DE ASTROCITOMA DE BAIXO GRAU PARA GLIOBLASTOMA SECUNDÁRIO.



FONTE: Dados do autor.

NOTA: Cortes axiais de RM à esquerda, em T1, demonstrando lesão hipointensa em pólo frontal esquerdo, compatível com astrocitoma de baixo grau. Na imagem central, controle pós-operatório um ano depois da cirurgia, sem evidência de recidiva. À direita, imagem obtida aos 18 meses da cirurgia inicial, demonstrando recidiva tumoral, cujo laudo histopatológico revelou tratar-se de glioblastoma.



A participação de oncogenes e genes supressores, cujas alterações influenciariam na tumorigênese, está sendo investigada, com possibilidades promissoras (RUTKA et al., 2000, p. 1034-1051).

Algumas modificações genéticas em mecanismos de apoptose e regulação de proliferação celular estão sendo desvendadas (CROTEAU et al., 2001, p. 60-81; NUSSBAUM; MCINNES; WILLARD, 2002, p. 274-293).

A interação entre fatores de crescimento e seus receptores geraria ativação de mecanismos de transdução de sinais para o interior do núcleo da célula, onde a divisão celular seria regulada por fatores desencadeantes do ciclo celular (proteínas CDK4, ciclinas, MDM2) e por inibidores do ciclo celular como as proteínas P15, p16, p21, p27, p53 e Rb (CROTEAU et al., 2001, p. 60-81).

A hiperexpressão da mutação do EGFR é capaz de desenvolver glioblastoma em animais de laboratório (KAPOOR; O'ROURKE, 2003, p. 1425-1435).

Na mesma linha de pesquisa, foi demonstrada a capacidade do EGFR de promover crescimento, migração e invasão de células gliais "in vitro" (LUND-JOHANSEN et al., 1990, 6039-6044).

Inibição do crescimento glial em laboratório também foi conseguido através de técnicas de neutralização do RNA mensageiro do EGFR (PU et al., 2000, p. 132-139).

O EGFR é uma proteína transmembranar, com 53 aminoácidos, que transmite para moléculas intracelulares a codificação proliferativa acusada pelo seu receptor. O EGFR pertence à família ErbB, também chamado de ErbB<sub>1</sub>/EGFR<sub>1</sub>. Uma outra proteína da mesma família, o EGFRvIII está hiperexpressa em linhas de GBM em laboratório, sugerindo uma interação entre moléculas da mesma família, na gênese dos gliomas (KAPOOR; O'ROURKE; 2003, p. 1425-1435).

Nos tumores, os receptores dos fatores de crescimento têm sua expressão magnificada, ou por secreção autócrina, ou por degradação da matriz extracelular.

A amplificação do gene EGFR, que resulta na presença de cópias extras de oncogene na região cromossômica, com a hiperexpressão conseqüente, tem também, freqüentemente sua mutação representada por deleção nos exons 2-7, no cromossomo 7p, o que resultaria em alteração na transcrição do RNA mensageiro e conseqüente

mudança na codificação proteica nas vias sinalizadoras do ciclo celular (WATANABE et al., 1996, p. 217-235).

Essas alterações, que na seqüência desencadeiam a ativação, no citoplasma, dos receptores das enzimas PTKs, seguem duas vias. A primeira envolve a ativação do complexo proteico intranuclear CDK4/ciclinas, que por fosforilação desacopla o complexo Rb/E2F, marco da progressão, no ciclo celular, da fase G1 para a fase S. A segunda via de ativação pelas PTKs seria através da proteína Ras, que atua como substrato inicial do desencadeamento de uma cadeia de reações proliferativas complexas, ativadas em cascata também por reações fosforilativas (FULTS, 1996, p. 162-178; CROTEAU et al., 2001, p. 60-81; LAL et al., 2002, p. 3335-3339; LOKKER et al., 2002, p. 3729-3735; NARITA et al., 2002, p. 6764-6769; KAPOOR O'ROURKE; 2003, p. 1425-1435; YAO et al., 2003, p. 378-384).

O mecanismo de apoptose obedece a duas seqüências básicas: a primeira, através de um mecanismo extrínseco, transmembrana, através de receptores específicos e a segunda que envolve ações de proteínas reguladoras pró-apoptóticas e anti-apoptóticas (Bax e Bcl-2). A proteína p53 desempenharia, através de um mecanismo também intrínseco, uma reação reguladora positiva sobre os fenômenos de apoptose, que nas células gliais estaria perdida pela mutação de genes supressores de tumor, como p53 e PTEN (SANO et al., 1999, p. 1820-1824; CROTEAU et al., 2001, p. 60-81; SIMMONS et al., 2001, p. 1122-1128; BURTON et al, 2002, p. 180-187; ERMOIAN et al, 2002, p. 1100-1106).

O poder infiltrativo do glioblastoma, bem demonstrado nas imagens de RM pela hiperintensidade em T2, é um dos fatores que impedem a ressecção cirúrgica radical desse tumor, além de ocasionar recidiva precoce (KELLY et al, 1987, p. 450-459).

A capacidade infiltrativa das células gliais deriva, em grande parte, da dissolução da matriz extracelular, determinada pelas proteases (CROTEAU et al., 2001, p. 60-81).

Várias dessas proteases, como plasmina, fator ativador do plasminogênio, uroquinase, catapsina B e as chamadas metaloproteinases da matriz extracelular, estariam envolvidas no processo (CHOE et al., 2002, p. 2894-2901).

Outro mecanismo facilitador da invasão tumoral estaria relacionado com a perda da adesividade celular, determinada pelas integrinas, que ao agirem, alteradas, sobre receptores de membrana e também ao interagirem com as proteases, facilitariam a migração celular e estimulariam a angiogênese (BELLO, 2003, p. 177-185).

A dissolução da matriz extracelular também poderia liberar fatores de crescimento angiogênicos (EGFR, VEGFRs, PDGFRs), que desencadeariam, em cascata, eventos que resultariam na neoformação vascular característica do glioblastoma, desprovida de barreira hematoencefálica, e demonstrável por captação de contraste nos métodos de imagem (SHWEIKI et al., 1992, p. 843-845; OEHRING et al., 1999, p. 117-125; LAL et al., 2002, p. 3335-3339; LOKKER et al., 2002, p. 3729-3735).

Os fatores p15, p16 e p 21 são genes controladores da proliferação celular, agindo por inibição da mitose, no ciclo celular (CROTEAU et al., 2001, p. 60-81; WANG et al., 2001, p. 173-180).

As proteínas p15 e p16 agiriam por inibição direta do mecanismo excitatório promovido pelo complexo CDK4/ciclina, cuja expressão final seria a passagem da fase G1 para a fase S do ciclo proliferativo. Alterações mutacionais desses fatores poderiam potencialmente participar do descontrole mitótico observado nos gliomas (CROTEAU et al., 2001, p. 60-81).

A deleção de p16, localizada no cromossomo 9p, vem sendo demonstrada com frequência no glioblastoma primário, assim como baixos níveis de p27, outro gene inibidor do complexo CDK4/ciclina (FUSE et al., 2000, p. 1393-1399; KAMIRO et al., 2002, p. 815-822; NARITA et al., 2002, p. 6764-6769).

A proteína MDM2, contida no cromossomo 12q, forma um complexo com p53, inibindo sua atividade supressora. Ampliação nessa região de 12q resultaria na hiperexpressão de MDM2, com bloqueio funcional de p53 (BURTON et al., 2002, p. 180-187). A imunopositividade de MDM2, resultante de sua alta expressão, estaria associada a pior prognóstico no glioblastoma (KLEIHUES; OHGAKI, 1999, p. 44-51). Em células gliomatosas, "in vitro", a adição do oligonucleotídeo anti- MDM2 resultou em redução de sua expressão, assim como elevação de p53 e p21 e aumento da

apoptose, sugerindo uma avenida terapêutica futura (PRASAD et al., 2002, p. 107-116).

O gene PTEN, contido no cromossomo 10q, é agente pró apoptótico, funcionando como regulador negativo da via PI3-K e PKB/AKT, que são oncogenes celulares desencadeantes da proliferação celular, a partir da proteína Ras (CROTEAU et al., 2001, p. 60-81; KAPOOR; O'ROURKE; 2003, p. 1425-1435).

Entre os mecanismos de proteção, o gene PTEN impediria a entrada de MDM2 no núcleo celular, resguardando desta forma a função supressora de p 53 (MAYO et al., 2002, p. 5484-5489).

O gene PTEN, bem demonstrado no cérebro normal, está reduzido em glioblastomas, sugerindo que sua ausência incrementaria a ação oncogênica do complexo PKB/AKT (ERMOIAN et al., 2002, p. 1100-1106).

Agentes inibidores, "in vitro", específicos contra esses oncogenes, como o L4294002, têm mostrado efeito supressor sobre a proliferação celular glial (SHINGU et al., 2003, p. 154-161).

A apoptose celular estaria também regulada intrinsecamente pelas proteínas pró-apoptóticas (Bax) e anti-apoptóticas (Bcl2), as quais, através de interações em cadeia, ativariam as caspases, responsáveis pela indução da morte celular (CARTRON, 2002, p. 675-687).

A hiperexpressão das proteínas Bax e suas variantes, no glioblastoma, tem sido associada a maior sobrevida, além de representarem alvos terapêuticos potenciais em decorrência do seu efeito pró-apoptótico (CARTRON, 2002, p. 675-687).

O gene supressor p53, contido no cromossomo 17p (banda p13-1), participa dos mecanismos de apoptose e proliferação celular (JAROS et al., 1992, p.373-385; IWADATE et al., 1996, p. 236-240; KIRLA et al, 2000, p. 71-80; KRAUS et al., 2001, p. 263-272; BURTON et al, 2002, p. 180-187).

No ciclo celular, p53 regularia de forma inibitória o crescimento tumoral pela sua ação direta, por transcrição sobre o gene p 21, responsável pela permanência das células na fase G1 ao inibir o complexo CDK4/ciclina. A mutação de p53 quebraria

esta seqüência inibitória (IKEDA et al., 2001, p. 35-43; SHIRAISHI et al., 2002, p. 249-257).

A proteína p53 exerceria também papel protetor em relação aos danos causados ao DNA, pela indução à apoptose. Dessa forma, sua mutação tornaria o tumor menos sensível à lesão exógena induzida, como a radioterapia e quimioterapia (MAYO et al., 2002, p. 5484-5489; NUSSBAUM; MCINNES; WILLARD, 2002, p. 285).

Do ponto de vista genético, a forma mais freqüente de mutação de p53 seria a de mutação de ponto, em que ocorreria, geralmente entre os exons de 5 a 8 do gene, que é parte codificante do mesmo, uma única substituição de base (como a citosina por timina). Em conseqüência haveria a substituição de um aminoácido (arginina por triptofano), determinando assim o substrato para mudança de codificação e alteração estrutural da proteína a ser formada, bem como de sua função reguladora específica. Esse tipo de mutação pode ser demonstrado por método de análise de PCR, associado à análise chamada SSCP (“single strand conformational analysis”), em que as alterações moleculares das fitas de DNA são demonstradas por motilidade alterada nas bandas de eletroforese em gel (MCDONALD, 1996, p. 13-31). A alteração estrutural da proteína p53 resultante é demonstrável por métodos de imunohistoquímica (BURTON et al., 2002, p. 180-187).

Tentativas de correlacionar mutações de p53 com sobrevida em glioblastoma tem sido conflitantes, na pesquisa de características genóticas de subgrupos de pacientes (JAROS et al., 1992, p. 373-385; KYRITSIS et al., 1995, p. 1617-1622).

Nos estudos de BURTON et al. (2002, p. 180-187), as mutações de Tp53, seja pela demonstração imunohistoquímica de sua expressão alterada, seja pela análise seqüencial de DNA, estariam associadas ao grupo de melhor sobrevida em glioblastoma. Em crianças, ao contrário, mutações de p53 têm sido associadas a pior prognóstico (TAMBER; RUTKA, 2003, p. 1-8).

No entanto, para NEWCOMB et al. (1998, p. 655-667) e KRAUS et al. (2001, p. 263-272), não haveria associação entre alterações de p53 e prognóstico.

As relações entre hiperexpressão de EGFR e mutações em p53 parecem também guardar uma relação de exclusão mútua, na análise de fatores de prognóstico (WATANABE et al., 1996, p. 217-224; SIMMONS et al., 2001, p. 1122-1128).

Considerando os possíveis efeitos supressores de p53 sobre a proliferação celular, uma das futuras possibilidades terapêuticas a ser desenvolvida se daria no sentido de restaurar sua função perdida por mutação dessa proteína, devolvendo à mesma a capacidade apoptótica e inibidora do ciclo celular, como proposto por IKEDA et al. (2001, p. 35-43), reforçando dessa forma, a eficácia de métodos terapêuticos adjuvantes, como a radiação, que é indutora da apoptose, e de agentes quimioterápicos como a etoposida e cisplatina (DORIGO et al., 1998, p. 535-540; GUTIN; POSNER, 2000, p. 1-8; MAYO et al., 2002, p. 5484-5489).

A ampliação e hiperexpressão do gene EGFR estariam relacionadas aos eventos desreguladores da proliferação celular (KLEIHUES; OHGAKI, 1999, p. 44-51; SIMMONS et al., 2001, 1122-1128; LAL et al., 2002, p. 3335-3339).

A hiperexpressão de EGFR, demonstrável por métodos imunohistoquímicos, poderia também servir de substrato para a caracterização de subtipos de glioblastoma e eventualmente fornecer subsídios com implicações prognósticas da doença (LIBERMAN et al., 1985, p. 144-147; JAROS et al., 1992, p. 373-385; NAGANE et al., 1996, p. 5079-5086; WAHA et al., 1996, p. 634-641; KORKOLOPOULOU et al., 1997, p. 1269-1278; RAINOV et al., 1997, p. 13-28; BOUVIER-LABBIT et al., 1998, p. 381-388; ETIENNE et al., 1998, p. 2383-2389; NEWCOMB et al., 1998, p. 655-667; SIMMONS et al., 2001, p. 1122-1128).

O EGFR atuaria também como fator de resistência aos métodos terapêuticos de radiação e quimioterapia (ZHU et al., 1996, p. 809-815; BARKER et al., 2001, p. 1288-1297; CHAKRAWARTI, 2002, p. 4307-4315).

A imunoreatividade para EGFR estaria presente em mais de 60% dos casos de glioblastoma primário e em menos de 10% dos glioblastomas secundários (KLEIHUES; OHGAKI, 1999, p. 44-51).

As maiorias dos pacientes imunoreativos para EGFR não o seriam para p53, tornando esses genes mutuamente excludentes (WATANABE et al., 1996, p. 217-224).

Para SIMMONS et al. (2001, p. 1122-1128), a hiperexpressão de EGFR teria indicação de pior prognóstico apenas nos pacientes mais jovens e p53 negativos, mas não em p53 positivos.

Outras alterações genéticas demonstráveis com frequência em glioblastoma primário, além da hiperexpressão de EGFR, no cromossomo 7, seriam a perda da heterozigose no cromossomo 10, deleção de p16, e mutação do gene supressor PTEN (KLEIHUES; OHGAKI, 1999, p. 55-51; ERMOIAN et al., 2002, p. 1100-1106; KAMIRO et al, 2002, p. 815-822).

Em estudos de hibridização genômica, a presença de perda cromossômica em 19q foi mais frequentemente associada à longa sobrevida, ao passo que perdas em 6q e 10 q, além de ganho em 19q estariam correlacionadas com pior prognóstico (BURTON et al., 2002, p. 6205-6210).

#### 2.4.9 Tratamento

Apesar dos avanços tecnológicos que ocorreram nas últimas décadas, o manejo do glioblastoma, que envolve basicamente as técnicas de cirurgia, radioterapia e quimioterapia, não tem conseguido suplantar o mau prognóstico para os pacientes, cuja sobrevida média permanece em torno de 1 ano (SALCMAN, 1980, p. 435-439; SHAPIRO, 1998, p. 4-32; BURTON et al., 2002, p. 180-187).

##### 2.4.9.1 Tratamento cirúrgico

O manejo cirúrgico do glioblastoma permanece, em alguns aspectos, controverso em termos de benefício, em razão de uma série de fatores: falta de estudos prospectivos randomizados, grau de ressecção dependente da subjetividade do cirurgião em relação à extensão, falha de metodologia de análise estatística, achados

patológicos sem critérios uniformes e métodos comparativos de imagem inadequados (BECKER et al., 1999, p. 469-477; SAWAYA, 2001, p. 10-19).

Os benefícios, no entanto, da cirurgia radical, que são apontados em estudos retrospectivos, indicam uma maior e melhor qualidade de sobrevida, quando comparados às técnicas de biópsia e ressecção parcial, especialmente quando a ressecção atinge 98% do total do volume tumoral (SALCMAN, 1980, p. 435-439; NITTA; SATO, 1995, p. 2727-2731; LACROIX et al., 2001, p. 190-198; SAWAYA, 2001, p. 10-19).

A evolução nas técnicas cirúrgicas permite atualmente a obtenção de baixo índice de complicações, com a morbidade e mortalidade ficando ao redor de 8 e 2,5%, respectivamente (SALCMAN, 1999, p. 196-212).

O desenvolvimento de técnicas de ressecção sobre áreas eloqüentes, com o auxílio de RM funcional em correlação com exploração eletrofisiológica transoperatória, tem contribuído para o emprego de maior agressividade cirúrgica, com bons resultados (BERGER et al., 1990, p. 383-387; BERGER, 1994, p. 172-185; ARAUJO, 2002, CD-ROM; RUSSEL; KELLY, 2003, p. 506-513).

O uso de estereotaxia e neuronavegação, baseados em dados informatizados, serve tanto para a obtenção de material para diagnóstico, em casos inoperáveis, quanto para guiar o cirurgião no sentido de alcançar lesões mais profundas com dano cortical mínimo (MOORE et al., 1989, p. 572-577; ROTTA, 1999, CD-ROM).

O princípio da citorredução radical é baseado nas informações fornecidas pela cinética celular: a cirurgia, ao reduzir ou eliminar o efeito de massa, controlar a hipertensão intracraniana e reverter déficits neurológicos propicia também que células, até então inativas no compartimento G<sub>0</sub>, ingressem no ciclo proliferativo e aumentem sua sensibilidade às técnicas de radioterapia e quimioterapia (HOSHINO et al., 1972, p. 15-26; ARAUJO, 1982, p. 145-176; SALCMAN, 1999, p. 196-212; LACROIX et al., 2001, p. 190-198).

A introdução do controle de ressecção tumoral em tempo real, no período transoperatório, pelo emprego de RM no centro cirúrgico, embora acessível a poucos centros devido ao seu alto custo, tem demonstrado diminuição significativa da



porcentagem de tumor residual pós-ressecção, caindo de 62% para 33%, com consequente aumento na sobrevida (WIRTZ et al., 2000, p. 1112-1122; HALL et al., 2002, p. 632-642).

Num futuro próximo, em casos específicos, a robótica poderá substituir as técnicas convencionais. As técnicas cirúrgicas poderão ser aprimoradas com a ressecção orientada para células tumorais previamente marcadas, que seriam alvos simultâneos de introdução de vetores virais com moléculas geneticamente modificadas, seguidas da injeção de células tronco neuronais e gliais para a reformatação cerebral (GUTIN; POSNER, 2000, p. 1-8; AMAR; ZLOKOVIC; APUZZO, 2003, p. 402-412).

#### 2.4.9.2 Terapia por radiação

A radioterapia é considerada isoladamente o método terapêutico mais efetivo para o glioblastoma (LARSON; WARA, 1998, p. 34-42; SHAPIRO, 1998, p. 4-32; SALCMAN, 1999, p. 196-212).

A idade avançada estaria correlacionada desfavoravelmente na sobrevida relacionada com a radioterapia (BARKER et al., 2001, p. 1288-1297).

A ação ionizante incide sobre a molécula de DNA da célula tumoral, interferindo em um radical oxigênio dependente; em consequência, sua efetividade é menor no centro necrótico, no compartimento G<sub>0</sub> hipóxico do tumor e maior nas células periféricas (LARSON; WARA, 1998, p. 34-42).

A presença do gen supressor p53 alterado determinaria maior radioresistência à lesão (KYRITISIS et al., 1995, p. 1617-1622).

Métodos para aumentar a sensibilidade das células hipóxicas à radiação, como uso de compostos imidazólicos, que se incorporam à molécula de DNA por sua afinidade com eletrons, não se revelaram superiores, em estudos randomizados (SALCMAN, 1999, p. 196-212).

O limite convencional da dose de radiação é 60 Gy e tentativas de aumento da dose para 70 Gy, em estudos randomizados do “Radiation Oncology Group”, não trouxe maiores benefícios (CHANG et al., 1983, p. 997-1007).

Os efeitos adversos da radioterapia incluem edema reacional, a síndrome pós-irradiação, após duas a quatro semanas, com eventual exacerbação do quadro clínico inicial, e a necrose tardia. O uso de glicocorticóides durante a irradiação é imprescindível pelo seu efeito regulador sobre a remielinização, edema intersticial, e equilíbrio na regulação da barreira hemato-encefálica (ARAUJO, 1982, p. 145-176; SALCMAN 1999, p. 196-212).

A mudança tática introduzida pela radioterapia conformacional, que restringe a radiação até margens peri-lesionais pré-determinadas, ao contrario de radiação cerebral total, inicialmente empregada, mostrou melhora na qualidade de vida (LEIBEL, 1990, p. 1159-172).

O emprego de tomografia por emissão pósitrons (PET) pode servir para melhor programação de cálculo e volume do alvo a ser irradiado, com provável superioridade em relação às informações fornecidas pela RM (TRALINS et al., 2002, p. 1667-1673).

Entre os fatores prognósticos evolutivos relacionados com a radioterapia, o tamanho do tumor nos controles de imagem parece ter importância. Pacientes que tiveram sua lesão aumentada no curso da radioterapia tiveram pior prognóstico, sendo também menos responsivos à quimioterapia (SALCMAN, 1999, p. 196-212).

A participação preponderante da radioterapia pós-operatória foi bem definida pelo estudo cooperativo multicêntrico do “Brain Tumor Study Group”. Os pacientes submetidos apenas à cirurgia sobreviveram em média 17 semanas, ao contrário das 37 semanas dos que foram submetidos a ambos os métodos de tratamento (WALKER et al., 1978, P. 333-343).

O emprego recente da radiocirurgia como reforço à radiação convencional, ou na recorrência, vem sendo preconizado, com resultados favoráveis e possibilidades de aumento na sobrevida (ALEXANDRE; LOEFFLER, 1998, p. 43-52; SHRIEVE et al., 1999, p. 72-77; NWOKEDI et al., 2002, p. 41-46).

A braquiterapia intersticial pode também ser empregada como reforço à radiação externa ou na recidiva, com doses suplementares localizadas de 50 a 75 Gy, com relativa preservação do cérebro adjacente. No entanto apenas cerca de 30% dos pacientes são candidatos a seu uso, por limitações topográficas do tumor, com o inconveniente de que alguns pacientes necessitam de nova cirurgia para remoção do material necrótico produzido (SHRIEVE et al., 1995, p. 275-282; McDERMOTT; SNEED; GUTIN, 1998, p. 79-87; CORREA, 2002, p. 8-40).

Maior efetividade da radioterapia poderá advir através do emprego de compostos químicos e moléculas que efetivamente aumentem a sensibilidade à radiação, associados a mecanismos neuroprotetores (GUTIN; POSNER, 2000, p. 1-8).

O emprego simultâneo da terapia gênica, quando aprimorada, incrementando a apoptose e determinando menor resistência à radiação, potencializaria a ação citotóxica da mesma (HOROWITZ, 1999, p. 500-509).

Estudos em laboratório realizados em células humanas de glioblastoma mostraram que a radiação, além de promover a apoptose, influi no mecanismo CDK4/ciclinas do ciclo celular, através do aumento na expressão dos genes inibidores p21 e p27. A transitoriedade deste efeito poderia, no entanto, ser prolongada, com a adição através de vetores gênicos dos fatores supressores p21 e p27 à população irradiada (YAO et al., 2003, p. 378-384).

Uma associação entre resistência à radioterapia e a hiperexpressão de EGFR no glioblastoma têm sido sugerida (BARKER et al, 2001, p. 410-418; CHAKRWARTI et al., 2002, p. 4307-4315).

Assim, agentes neutralizadores específicos desse oncogene poderiam contribuir para a eficácia da radiação (ELLER et al., 2002, p. 1005-1013).

O desenvolvimento do uso de compostos à base de boro se encontra em fase I e II de ensaios clínicos. Quando o boro é irradiado com neutrons, o neutron é capturado e partículas alfa são liberadas, as quais seletivamente, atingem apenas as células tumorais previamente ocupadas em seus receptores específicos pelo boro, aumentando assim a efetividade da técnica (CHANANA et al., 1999, p. 1182-1192; NICHOLS et al., 2002, p. 2351-2358).

### 2.4.9.3 Quimioterapia

Apesar do sucesso alcançado com o emprego da quimioterapia em doenças hematológicas, as mesmas expectativas em relação a tumores gliais permanecem frustrantes (DE ANGELIS et al., 1998, p. 691-695).

Em cerca de trinta anos, vários estudos randomizados de quimioterapia como tratamento adjuvante, a maioria baseada no emprego das nitrosuréias, foram realizados, com resultados conflitantes e inconclusivos na maioria (GLIOMA META-ANALYSIS TRIALISTIS GROUP, 2002, p. 1011-1018).

De todos os agentes disponíveis, a carmustina (BCNU), do grupo das nitrosuréias, é ainda o quimioterápico mais eficaz e mais largamente empregado, apesar de modestos acréscimos de algumas semanas à sobrevida (WALKER et al., 1978, p. 333-343; SALCMAN, 1999, p. 196-212).

Segundo critérios clínicos, a carmustina e a lomustina (nitrosuréias), que são agentes alquilantes lipossolúveis, induzem uma resposta favorável em cerca de 30% dos casos tratados (BRANDES et al., 2002, p. 1759-1763).

O BCNU age por citotoxicidade, determinando alterações na relação citosina-guanina no núcleo celular, provocando morte celular ao interferir no processo de duplicação do DNA (BRANDES et al., 2002, p. 1759-1763).

A maior eficácia do BCNU é demonstrável em pacientes jovens e naqueles em que a resposta radioterápica é melhor, e suas maiores limitações de uso envolvem mielotoxicidade, lesão pulmonar e renal, além da formação de tumores secundários (SALCMAN, 1993, p. 379-390; SALCMAN, 1999, p. 196-212).

Ensaio de fase II mostram tentativas de associação de outras drogas ao regime convencional, buscando melhor resposta. Assim, a adição de talidomida, como agente anti-angiogênico, tem sido testada, com resultados limitados (FINE et al., 2002, p. 708-715).

A resistência que habitualmente se desenvolve ao uso sequencial de BCNU foi confrontada com o uso de procarbazina, outro agente alquilante, que ao ser administrada previamente, bloquearia a resistência à carmustina, contida nos

mecanismos de reparo do DNA. As respostas clínicas, embora favoráveis, não se revelaram significativas (BRANDES et al., 2002, p. 1759-1763).

A quimioterapia isolada, de acordo com os estudos randomizados do “Brain Tumor Study Group”, produziu uma sobrevida de 15% no primeiro ano, ao contrário de 34,6% da radioterapia. O uso de ambas após a ressecção cirúrgica pode elevar até 50% a sobrevida de um ano (WALKER; GREEN; BYAR, 1980, p. 1323-1339).

Um estudo de meta análise que envolveu 12 grupos num total de 3004 pacientes randomizados, comparando radioterapia com radiação e quimioterapia, demonstrou benefícios modestos no grupo com tratamento conjunto, ao evidenciar um acréscimo de 6% de sobrevida no primeiro ano, e um incremento de dois meses no tempo de sobrevida média. Ainda, o mesmo estudo não demonstrou superioridade dos grupos tratados com uma ou várias drogas, embora suas conclusões encorajem a pesquisa em torno do desenvolvimento de novas drogas (GLIOMA META-ANALYSIS TRIALISTIS GROUP, 2002, p. 1011-1018).

A temozolamida, inicialmente usada em astrocitomas anaplásicos e mais recentemente em glioblastomas, têm seu uso facilitado pela possibilidade de administração oral e pela baixa toxicidade, aguardando os resultados de estudos mais conclusivos em diversas situações de recidiva (YUNG et al., 1999, p. 2762-2771; MACDONALD, 2001, p. 3-12).

Nestas, combinações terapêuticas aguardam prosseguimento em diversas fases, envolvendo uso de temozolamida antes de radioterapia (GILBERT et al., 2002, p. 261-267), em recidiva após falha de combinação de nitrosuréia e procarbazina (BRANDES et al., 2002, p. 1759-1763; BRANDES et al., 2002, p. 38-41), em associação com Marismastat, agente inibidor das metaloproteinases (GROVES et al., 2002, p. 1383-1388), em uso concomitante de radioterapia e temozolamida seguida apenas da mesma droga (STUPP et al., 2002, p. 1375-1382), em combinação com o implante local de pastilhas de carmustina (GURUKANGAN et al., 2001, p. 246-250). A maioria dos estudos se encontra em fase II e aguarda prosseguimento para melhores conclusões.

A preconização do implante no leito cirúrgico do tumor, após a ressecção, de pastilhas de carmustina, encontra resistência pelo elevado custo, resultados não

encorajadores a médio prazo, com acréscimos modestos de sobrevida, e maior índice de complicações de ferida (VALTONEN et al., 1997, p. 44-48; SUBACH et al., 1999, p. 17-22).

A existência de sub-tipos de glioblastomas, com suas variáveis genéticas e etárias, provavelmente explicaria em parte a quimioresistência em pacientes mais idosos (IWADATE et al., 1996, p. 236-240).

O aprofundamento na pesquisa de oncogenes e genes supressores, que participariam dos mecanismos de proliferação celular e que condicionariam maior resistência às drogas e radiação, é promissor (DORIGO et al., 1998, p. 535-540; MAYO et al., 2002, p. 5484-5489).

Dessa forma, foi determinado que pacientes portadores de oligodendrogliomas anaplásicos, com perda dos braços cromossômicos 1p/19q, apresentam melhor resposta à quimioterapia e maior sobrevida (CAIRNCROSS et al. 1998, p. 1473-1479).

A eventual presença da hiperexpressão do EGFR tem sido relacionada à resistência ao emprego de cisplatina e de BCNU (NAGANE et al., 2001, p. 472-479; CHAKRWARTI et al., 2002, p. 4307-4315).

Mutações do gene p53 têm sido também associadas à diminuição de sensibilidade à resposta quimioterápica das células de glioblastoma (MAYO et al., 2002, p. 5484-5489).

Métodos de neutralização da hiperexpressão do EGFR com emprego de agentes específicos (ELLER et al., 2002, p. 1005-1013), ou de retificação funcional do gene p53, com restauração de sua função protetora, através da terapia gênica, poderão servir no futuro, de mecanismos auxiliares na implantação de regimes quimioterápicos mais efetivos (GOMEZ-MANZANO et al., 1996, p. 694-699; DORIGO et al., 1998, p. 535-540; IKEDA et al., 2001, p. 35-43; MAYO et al., 2002, p. 5484-5489).

#### 2.4.9.4 Alternativas terapêuticas

A hipertermia alcança níveis de aplicação clínica em alguns serviços, agindo sobre tecidos mal oxigenados e em células fora do ciclo proliferativo (SNEED et al., 1991, p. 206-215).

De acordo com esse princípio, ela complementaria a terapia por radiação, principalmente a braquiterapia, quando as antenas de microondas, que podem gerar temperaturas de até 45°C, são veiculadas ao tumor pelos mesmos catéteres usados para a implantação dos radioisótopos. A associação de hipertermia e radiação seria, dessa forma, superior em resultados à associação com quimioterapia (SALCMAN; EBERT, 1991, p. 526-531; SNEED et al., 1991, p. 206-215).

Grande volume de pesquisa vem sendo acumulado em relação a alternativas terapêuticas futuras do GBM, principalmente calcadas nas informações mais recentes advindas de imunologia e genética molecular (PIEPMEIER, 2001, p. 3-9).

Está bem estabelecido que os gliomas malignos resistem a uma resposta imunológica do hospedeiro, por mecanismos de proteção impostos pela barreira hemato-encefálica e pela produção de proteínas que suprimem a imunidade sistêmica (CROTEAU et al., 2001, p. 60-81; PIEPMEIER, 2001, p. 3-9).

Entre as estratégias imunoterapêuticas promissoras estaria a sensibilização de citocinas, linfócitos, ou células nervosas à exposição antigênica de preparados de células gliomatosas: o produto assim determinado atacaria os tumores em modelos experimentais, reduzindo a massa e desenvolvendo memória imunológica no hospedeiro (ARCHER et al., 1999, p. 2646-2652; SALCMAN, 1999, p. 196-212; PIEPMEIER, 2001, p. 3-9).

Efeito inibidor significativo sobre o tumor têm sido obtido "in vitro" com o emprego de interleucinas (IL-12, IL-18), que estimulariam macrófagos a produzirem interferons e óxido nítrico, com ação anti-glioma importante, a ser testada "in vivo" (KITO et al., 2003, p. 385-392).

Também a interleucina-1, encontrada em níveis elevados de expressão em células gliais, parece exercer impacto inibidor sobre o crescimento tumoral e estaria associada a melhor sobrevida no GBM (CUNY et al., 2003, p. 299-301).

O melhor conhecimento dos mecanismos de proliferação e inibição celular, migração de células tumorais, angiogênese e modulação, podem trazer possibilidades de aberturas de novas frentes terapêuticas, como o desenvolvimento de agentes específicos para cada fase (CROTEAU et al., 2001, p. 60-81).

Esses agentes poderiam estar representados por anticorpos monoclonais. Nessa linha, ELLER et al. (2002, p. 1005-1013), demonstraram, em laboratório, a efetividade do anticorpo monoclonal C225 em bloquear o EGFR expresso em células de GBM implantadas em modelos animais, ao promover apoptose, diminuir a proliferação celular e a expressão do fator angiogênico VEGF.

KUNKEL et al. (2001, p. 6624-6628) através de metodologia semelhante com o emprego do anticorpo monoclonal DC101, contra o VEGF-2, conseguiram inibir a angiogênese e crescimento tumoral.

Outros agentes inibidores do EGFR, como o OSI-774 (Tarceva; Genentech), e o Tyrosinase Inhibitor AG1478, além de atuarem sobre o ciclo celular, agiram também contra componentes da matriz extracelular, inibindo a invasão tumoral (LAL et al., 2002, p. 3335-3339).

Outra forma de bloqueio aos receptores oncogênicos tem sido testada através do emprego dos inibidores da PTKs, envolvidas na transdução de sinais indutores da mitogênese, da membrana celular para o núcleo, que constituiriam o ponto de partida para o desencadeamento dos processos fosforilativos básicos da proliferação celular, via proteína Ras, ou CDK4/ciclina (CROTEAU et al., 2001, p. 60-81).

Um dos exemplos de aplicação prática desse princípio é o emprego do STI571 (Gleevec, Novartis), inibidor das PTKs usado no tratamento da leucemia mieloide crônica e atualmente empregado em ensaios clínicos para glioblastoma (KAPOOR; O'ROURKE; 2003, p. 1425-1435).



Relatos recentes têm demonstrado a influência do EGFR em combinação com PKCs (proteínas quinases C), como integrantes das vias regulatórias do ciclo celular, na gênese do glioma experimental.

Agentes inibidores das PKCs, como as estauporinas, GF-109203X e calfostin vêm sendo testados em modelos de glioma em laboratório, relacionados com oncogênese induzida por EGFR (KAPOOR; O'ROURKE; 2003, p. 1425-1435).

O EGFR, um dos desencadeadores dos mecanismos acima, também influiria na resistência à radiação e quimioterapia (BARKER et al., 2001, p. 410-418; CHAKRAWARTI et al., 2002, p. 4307-4312).

O emprego, em laboratório, contra células gliomatosas humanas, do agente AG/479, anti-EGFR, inibiria também a ação das PTKs, quebrando a resistência ao tratamento adjuvante (NAGANE et al., 2001, p.472-479; CHAKRAWARTI et al., 2002, p. 4307-4312).

Agentes anti invasivos, que agiriam sobre elementos da matriz extracelular, têm sido empregados, tanto experimental quanto clinicamente, como o SI-27 (YOSHIDA et al., 2003, p. 187-197).

O Marismastat, agente anti-metaloproteinases, têm sido testado em fases I/II de ensaios clínicos, de forma isolada ou em combinação com outros agentes quimioterápicos (CHOE et al., 2002, p. 2894-2901; GROVES et al., 2002, p. 1383-1388).

A angiogênese do GBM obedece a fatores etiológicos multifatoriais, que envolvem receptores tipo EGFR, VGFR, PDGFR, proteases e integrinas. Anticorpos monoclonais, moléculas inibidoras específicas dos receptores, quimioterápicos antiangiogênicos e antiproteases vêm sendo testados como elementos terapêuticos promissores, em laboratório e clinicamente (KUNKEL et al., 2001, p. 6624-6628; FINE et al., 2002, p. 708-715; GROVES et al., 2002, p. 1383-1388; LAL et al., 2002, p. 3335-3339; LOKKER et al., 2002, p. 3729-3735).

A integrina alfa V $\beta$ 3 tem alto nível de expressão em gliomas malignos e participaria de mecanismos relacionados com invasibilidade e angiogênese. O emprego do seu inibidor sintético específico, IS201, em modelos animais, mostrou

acentuada redução da angiogênese, diminuição da proliferação celular e incremento da apoptose, devendo em breve pelo seu potencial terapêutico adentrar ensaios de fase I (BELLO et al., 2003, p.177-185).

A identificação progressiva, através da biologia molecular, dos mecanismos estruturais e genéticos que envolvam oncogenes e genes supressores que influem na origem dos tumores, tem possibilitado o emprego de técnicas que envolvem transferência específica de material genético para células anormais, objetivando uma resposta terapêutica, cujo processo, na forma de apoptose, citólise ou citotoxicidade representaria a base da terapia gênica (BRADY et al., 1992, p. 225-230; WANG et al., 2001, p. 173-180).

Uma das técnicas mais empregadas para a transferência de material para a célula tumoral é a que utiliza, como veículo, vírus replicado, como o retrovírus, que seria produzido, como exemplo, a partir de fibroblastos de ratos e denominados de VPCs (“virus producing cells”). Outros veículos utilizados seriam na forma de adenovírus, lipossomos, ou plasmídeos (QURESHI et al., 2000, p. 663-669; PIEPMEIER, 2001, p. 3-9).

Outro dos modelos mais utilizados é a transferência de agentes controladores da apoptose ou reguladores do ciclo celular. Assim, WANG et al (2001, p. 173-180) demonstraram significativa redução no crescimento de celular de GBM, “in vitro” e “in vivo”, após a transferência dos genes supressores p16, p21 e p53, com o emprego de retrovírus como veículo.

Linhas de GBM, em laboratório, com deficiência de p53, podem ter a ação supressora do mesmo restaurada pela transferência do gene, também com o emprego de adenovírus ou plasmídeos como agente veiculantes. Com essa metodologia é possível, experimentalmente, induzir parada de crescimento tumoral e aumentar a sensibilidade das células à ação ionizante e quimioterápica (GOMEZ-MANZANO; KUEYO; KYRITSIS, 1996, p. 694-699; DORIGO et al., 1998, p. 535-540; HOROWITZ, 1999, p. 500-509; IKEDA et al., 2001, p. 35-43).

A transdução de PTEN por retrovírus para linhas de GBM desprovidas do mesmo, em laboratório, aumenta a atividade supressora de p53, além de sensibilizar as células à ação de agentes quimioterápicos (MAYO et al., 2002, p.5484-5489).

Outra estratégia usada em terapia gênica envolve o emprego de combinação de genes ativadores de drogas, seguido da administração de uma “pró-droga”, que seria convertida em uma droga citotóxica. Uma das combinações mais frequentemente usadas, seguindo esse modelo, utiliza a transferência do gene TK/HSV (“thymidine kinase-herpes simplex virus”) para as células tumorais, por retrovírus, com a administração subsequente de ganciclovir, que exerceria sua ação citotóxica sobre as células assim sensibilizadas (QURESHI et al., 2000, p. 663-669).

A enzima TK ativaria o ganciclovir, convertendo-o para seu metabólito citotóxico (fosfato de ganciclovir), o qual, incorporado ao DNA das células tumorais, danifica-o, levando à apoptose celular (QURESHI et al., 2000, p. 663-669; CHIOKA, 2003, p. 364-373).

Esse método tem sido empregado em ensaios de fase I e II, através de injeção estereotáxica direta, instilação através de reservatório de Ommaya ou instilação manual direta durante a craniotomia (CHIOKA, 2003, p. 364-373). Um relato de aparente cura do glioblastoma, seguindo essa metodologia foi descrito na literatura (VALERY et al., 2002, p. 1109-1112).

O emprego experimental simultâneo de dois agentes supressores (p53 e p16) foi estudado por KIM et al. (2002, p. 143-150), que demonstraram efeito inibitório somado de ambos os genes sobre o tumor.

Agentes genéticos ou celulares podem ser injetados diretamente no parênquima cerebral, por craniotomia ou estereotaxia, no líquido ou na corrente sanguínea (AMAR; ZLOKOVIC; APUZZO, 2003, p. 402-412).

Esforços terapêuticos vêm sendo desenvolvidos, com base nos conhecimentos adquiridos sobre as vias de sinalização onde ocorrem os desarranjos moleculares envolvidos na gênese dos gliomas.

Assim, o conceito de terapia local, com o emprego de cateteres implantados na periferia ou centro do tumor, que venham a servir de veículos transportadores de

moléculas reparadoras do ciclo celular (nanocirurgia), parece promissor a longo prazo, exigindo por isso esforços no sentido de melhor compreensão dos fenômenos moleculares bem como o aprimoramento das técnicas de abordagem local (DUNN; BLACK, 2003, p. 1411-1424).

A transferência de elementos gênicos diretamente para o cérebro ainda encontra, para maior efetividade, dificuldades a serem transpostas, como a forma ideal de veiculação, vetores mais apropriados, transposição de barreira hemato-encefálica, além da transferência de cargas genéticas efetivamente tumorílicas, com poder de difusão e retenção da capacidade funcional (ZLOKOVIC; APUZZO, 1997, p. 789-803; PIEPMEIER, 2001, p. 3-9; AMAR; ZLOKOVIC; APUZZO, 2003, p. 402-412).

A introdução de métodos estereotáxicos para facilitar a transferência de carga de maior concentração de vetores vêm sendo empregada em estudos de fase I (QURESHI et al., 2000, p. 663-669).

O conceito do emprego de injeção intraarterial do material genético vem sendo desenvolvido, o que traria vantagens de distribuição mais efetiva, utilização de maiores cargas vetoriais e a possibilidade de administrações repetidas. A terapia gênica, quando devidamente aperfeiçoada representaria uma mudança fundamental nos conceitos de tratamento neurocirúrgico, que passaria de ablativo para restaurador, ao serem introduzidos no cérebro agentes para reparar lesões e restabelecer funções (GUTIN; POSNER, 2000, p. 1-8; AMAR; ZLOKOVIC; APUZZO, 2003, p. 402-412; DUNN; BLACK, 2003, p. 1411-1424).

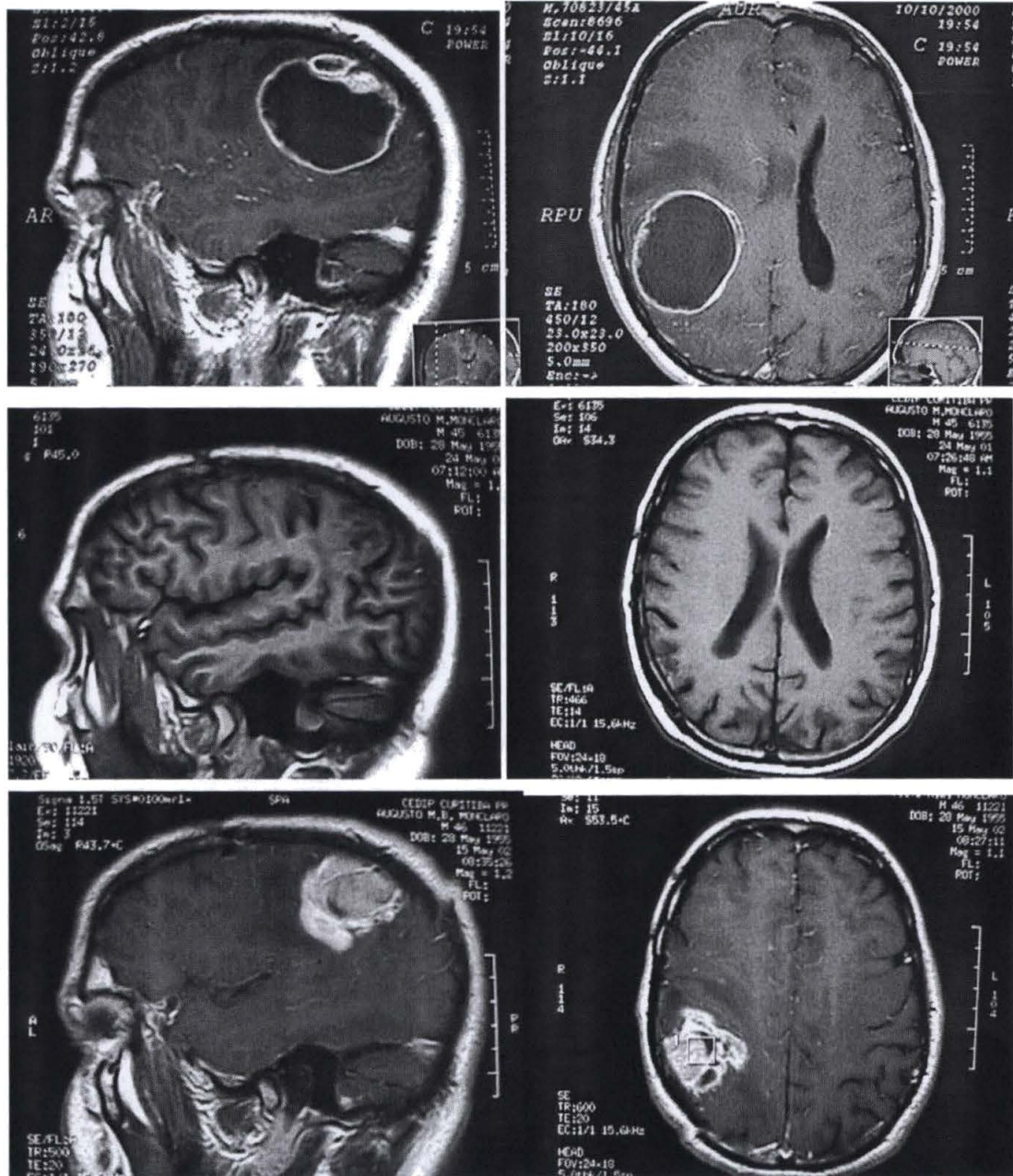
#### 2.4.9.5 Recorrência e reoperação

O aspecto infiltrativo do glioblastoma torna sua ressecção completa praticamente impossível na maioria das vezes (KELLY; DAUMAS-DUPORT; SCHEITHAUER, 1987, p. 450-459; SALCMAN, 1993, p. 379-390; SILBERGELD; CHICOINE, 1997, p. 525-531).

A recidiva tumoral acontece geralmente dentro de uma área de dois centímetros do local original do tumor (figura 8), sendo que em até 10% dos pacientes as células

poderão estar a mais de 4 cm. do sítio inicial, inviabilizando resseções cirúrgicas mais amplas (CHANDLER, et al., 1993, p. 716-720; GUTIN; POSNER, 2000, p. 1-8).

FIGURA. 8 – ASPECTOS INICIAIS E RECIDIVA DO GLIOBLASTOMA



FONTE: Dados do autor.

NOTA: Imagens de ressonância magnética, EM t1, em cortes sagitais (esquerda) e axiais (direita). Nas imagens superiores observa-se lesão tumoral parietal direita, com bordos irregulares, captação de contraste paramagnético em padrão anelar típico de glioblastoma. Nas imagens intermediárias obtidas após tratamento com cirurgia, radioterapia e quimioterapia nota-se regressão total da lesão. Nas imagens inferiores realizadas 1 ano após o tratamento inicial, nota-se recorrência da lesão localizada nas proximidades do sítio original.

Em casos selecionados, a reoperação pode trazer sobrevida adicional, que pode atingir até uma média de 37 semanas (DIRKS et al., 1993, p. 271-275; SALCMAN et al., 1994, p. 213-219).

Os casos reoperados existentes no banco de dados comum a este projeto apresentaram uma sobrevida média adicional de 14 semanas (HANEL, 2002, p. 69).

A reoperação deve ser sempre seguida de nova ofensiva terapêutica adjuvante, na forma de terapia por radiação ou quimioterapia, considerando as limitações da cirurgia em relação à extensão da lesão (BURGER; GREEN, 1987, p. 1617-1625; CHANDLER et al., 1993, p. 716-720; LACROIX et al., 2001, p. 190-198; HANEL, 2002, p.69).

Os pacientes com idade ao redor de 40 anos, com bom índice na escala de Karnofski, que apresentam um estudo de imagem favorável, constituem os melhores candidatos à reoperação (WATANABE et al., 1996, p. 217-224; NEWCOMB et al., 1998, p. 655-667; KLEIHUES; OHGAKI, 1999, p. 44-51; BREDEL et al., 2002, p. 1343-1347; BURTON et al., 2002, p. 180-187).

#### 2.4.10 Sobrevida e Qualidade de vida

A sobrevida média dos portadores de glioblastoma permanece ao redor de 1 ano após o diagnóstico, com apenas 2% a 5% dos pacientes tendo uma sobrevida ao redor de 3 anos (SALCMAN, 1980, p. 435-439; SCOTT et al., 1999, p. 183-188; BURTON et al., 2002, p. 180-187).

Entre os fatores prognósticos mais intimamente relacionados com maior sobrevida estão a idade, desempenho na escala de Karnofski, extensão da ressecção, histopatologia e radioterapia (BURGER; GREEN, 1987, p. 1617-1625; CHANDLER et al., 1993, p. 716-720; LACROIX et al., 2001, p. 190-198; HANEL, 2002, p.72).

Diferenças genéticas na população celular, com a amplificação/hiperexpressão dos oncogenes e mutação nos genes supressores poderiam influir nas diferenças de sobrevida (WATANABE et al., 1996, p. 217-224, NEWCOMB et al., 1998, p. 655-

667; KLEIHUES; OHGAKI, 1999, p. 44-51; BREDEL et al., 2002, p. 1343-1347; BURTON et al., 2002, p. 180-187).

O aprimoramento nas técnicas de cirurgia, radioterapia e o uso racional de quimioterapia têm contribuído para a obtenção de melhor qualidade de sobrevivência, com maior número de pacientes permanecendo em condições de vida independente e com menor prejuízo de suas funções cognitivas (HOCHBERG et al., 1979, p. 1016-1018; ARCHIBALD et al., 1994, p. 247-253; HANEL, 2002, p. 63-72).

### 3 PACIENTES E MÉTODOS

#### 3.1 POPULAÇÃO E SELEÇÃO

Foram analisados retrospectivamente 45 pacientes portadores de glioblastoma, extraídos de uma população de 102 pacientes, operados entre janeiro de 1991 a julho de 2002, tornada homogênea por pertencerem a uma única instituição (Hospital Nossa Senhora das Graças), que faz parte do “Banco de Patologia Tumoral do Sistema Nervoso Central da Cidade de Curitiba”

A maioria dos pacientes dessa amostra já serviu de substrato de pesquisa da importância de fatores clínicos e histológicos no prognóstico do glioblastoma, cujas conclusões culminaram em Dissertação (Mestrado), dentro do Programa de Pós Graduação em Clínica Cirúrgica, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná (HANEL, 2002, p. 1-101).

O estudo retrospectivo foi realizado após a metodologia ser aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa Médica do Hospital Nossa Senhora das Graças (Anexo 1), com prévia anuência dos pacientes ou familiares, formalizada pela assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 2).

A coleta de dados clínicos foi realizada de acordo com a revisão normatizada dos prontuários (Anexo 3).

Os critérios de inclusão no presente estudo compreenderam idade igual ou superior a 21 anos, seguimento clínico e por imagem de no mínimo 18 meses e/ou óbito, além de revisão do material histológico por dois observadores independentes que confirmaram o diagnóstico de glioblastoma de acordo com os critérios da OMS.

Todos os pacientes foram submetidos a tratamento cirúrgico, que variou de biópsia, ressecção parcial (até 90% da massa), até ressecção macroscópica total, seguida de radioterapia e eventualmente quimioterapia.

Os critérios de exclusão envolveram pacientes menores de 21 anos, aqueles cujo óbito não ocorreu por causa neurológica e os de diagnóstico histológico duvidoso.



Para efeito de metodologia estatística e análise dos resultados, a população de pacientes foi separada em dois grupos. O primeiro foi constituído por pacientes cuja história clínica, do início dos sintomas ao diagnóstico, foi igual ou inferior a 3 meses (grupo I ou primário).

O segundo grupo foi formado por pacientes cuja história clínica teve duração superior a 3 meses (grupo II ou secundário).

Essa divisão seguiu critérios clínicos descritos na literatura, com base em dados de cinética celular, visando identificar sub-grupos relacionados eventualmente com diferentes comportamentos biológicos (WATANABE et al., 1996, p. 217-224; KLEIHUES; OHGAKI, 1999, p. 44-51; SALCMAN, 1999, p. 25-35; KLEIHUES et al., 2000, p. 29-40; LAERUM et al., 2001, p. 1-8; BURTON et al., 2002, p. 180-187).

Após processamento histológico, os casos estudados foram submetidos à análise imunohistoquímica para identificação das proteínas EGFR, p53 e Ki-67, conforme a metodologia descrita na seqüência, seguida da correlação com a variável sobrevida e tendo idade como co-variável para cada sub-grupo de glioblastoma.

### 3.1.1 Análise Descritiva

A análise descritiva dos dados referentes à população estudada está expressa nas tabelas abaixo.

#### 3.1.1.1 Idade

As informações relativas à idade da população estudada estão contidas na tabela 5.

TABELA 5 - DADOS REFERENTES À IDADE DA POPULAÇÃO ESTUDADA

Variável	Grupo	número	Min-máx	Mediana	Média±DP
Idade (anos)	Primário	35	34-76	59,00	58,57±10,18
	Secundário	10	21-60	39,50	39,10±10,93
	Total	45	21-76	56,00	54,24±13,09

FONTE: Dados do Autor

### 3.1.1.2 Sexo

As informações relativas ao sexo da população estudada estão contidas na tabela 6.

**TABELA 6 - DADOS REFERENTES AO SEXO DA POPULAÇÃO ESTUDADA**

Grupo	Sexo	Frequência	%
Primário (n=35)	Masculino	22	62,86
	Feminino	13	37,14
Secundário (n=10)	Masculino	6	60,00
	Feminino	4	40,00
Total (n=45)	Masculino	28	62,22
	Feminino	17	37,78

FONTE: Dados do Autor

### 3.1.1.3 Variáveis na população geral

As variáveis e médias da população total, que serviram de base para o estudo estão contidas na tabela 7.

**TABELA 7 - MÉDIAS DAS VARIÁVEIS NA POPULAÇÃO GERAL**

Variável	Média ± DP (n=45)
EGFR%	29,35 ± 29,29
Ki 67%	31,73 ± 28,97
P53%	20,42 ± 25,85
Sobrevida <sup>(1)</sup>	13,58 ± 10,58
Idade <sup>(2)</sup>	54,24 ± 13,09

FONTE: Dados do Autor

NOTA: <sup>(1)</sup> Sobrevida em meses

<sup>(2)</sup> Idade em anos

#### 3.1.1.4 Intervalo entre início de sintomas e diagnóstico (ISD)

O ISD, em meses, que serviu de base para caracterização dos grupos primário e secundário está representado na tabela 8.

TABELA 8 - DADOS REFERENTES AO INTERVALO ENTRE INÍCIO DOS SINTOMAS E DIAGNÓSTICO (ISD) NA POPULAÇÃO ESTUDADA

Variável	Grupo	Número	Min-máx (meses)	Mediana (meses)	Média±DP (meses)
ISD	Primário	35	0,3-3	2,00	1,58±0,94
	Secundário	10	4,5-22	6,00	7,65±5,15
	Todos	45	0,30-22	2,00	2,93±3,55

## 3.2 HISTOLOGIA

### 3.2.1 Processamento Histológico

O material recebido no Serviço de Anatomia Patológica, previamente fixado em formol à 10% por um período de 24-48 horas, foi estudado macroscopicamente, avaliando-se peso, medidas e forma do espécime; cortado por navalha metálica descartável em fatias de aproximadamente 0,3cm; colocado em cápsulas metálicas, adequadamente identificados para o seguimento do material.

As cápsulas foram adequadamente condicionadas em Autotecnico (AO-American Optical- T/P8000), que realizou os processos de: desidratação, através de banhos em álcool etílico de concentrações crescentes, iniciando em 70% e terminando com álcool absoluto; clareamento, onde a peça é incluída em xilol, que é uma substância miscível com a parafina e impregnação pela parafina fundida. O material foi então incluído na parafina, cortado em micrótomo (AO-American Optical 820) em cortes de 4-6µm, sendo colocados em uma lâmina de vidro, tratados com albumina, corados em hematoxilina-eosina e montados com bálsamo e lamínula (BANCROFT; STEVENS, 1997; SPENCER, 1982).

### 3.2.2 Avaliação Histológica

Todos os casos foram revisados, utilizando-se os cortes corados em hematoxilina e eosina, para reavaliação dos diagnósticos e avaliação das áreas de necrose, proliferação vascular e atipias celulares.

As amostras tissulares foram reavaliadas por 2 observadores independentes, que culminaram com a confirmação do diagnóstico histológico, de acordo com os critérios da OMS.

## 3.3 IMUNOHISTOQUÍMICA

### 3.3.1 Procedimento Imunohistoquímico

Todas as reações foram realizadas na Unidade de Imunohistoquímica do Hospital de Clínicas da UFPR. O método imunoenzimático utilizado foi o da estreptavidina-biotina-peroxidase.

O Procedimento imunohistoquímico consta das seguintes fases:

- a) preparação dos cortes histológicos (desparafinização e hidratação): colocam-se as lâminas com cortes de parafina na estufa de 37°C, pelo período noturno (*overnight*) para que a parafina derreta; banha-se em xilol por 10 minutos; hidratam-se as secções de parafina com banhos consecutivos em soluções com concentrações decrescentes de álcool, a partir de álcool absoluto, até 90%, permanecendo um minuto em cada;
- b) recuperação antigênica: as amostras fixadas em formalina, especialmente quando não foi possível o controle de pH ou do tempo de fixação, requerem recuperação antigênica para a grande maioria dos epítomos pesquisados. O método utilizado foi o da incubação em calor úmido, onde as lâminas são incubadas em tampão citrato, em panela de pressão, durante 4 minutos e após resfriadas por 20 minutos;

- c) bloqueio da peroxidase endógena, realizada com uma solução de peróxido de hidrogênio a 6%, por 3 minutos, seguida de lavagem com água corrente e destilada;
- d) reação utilizando o complexo estreptavidina-biotina-peroxidase: colocam-se as lâminas em solução tamponada de citrato por 2 minutos, em temperatura ambiente (esta fase pode demorar de 2 minutos a 18 horas, dependendo da necessidade). Aplica-se o sistema de bloqueio da biotina (DAKO), incubando-se as lâminas em solução de avidina por 6 minutos, lavando-se e incubando-se em solução de biotina por 6 minutos. Adiciona-se o anticorpo primário e incuba-se por 30 minutos em câmara úmida. Banha-se em solução citrato. Adiciona-se a solução de união que contem os anticorpos secundários. Lavam-se as lâminas em solução tamponada de citrato com três trocas de 3 a 5 minutos cada;
- e) finalização e montagem das lâminas: secam-se as lâminas e coram-se com hematoxilina, hidratam-se as lâminas com banhos consecutivos em soluções com concentrações decrescentes de álcool, a partir de álcool absoluto, até 90%, permanecendo um minuto em cada. Limpam-se as lâminas com xilol e aplica-se a lamínula (WEISS; CHANG, 1997).

### 3.3.2 Critérios de Utilização de Anticorpos

A população celular nas fases G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> e M do ciclo celular pode fornecer um índice de atividade proliferativa do tumor. No presente estudo a atividade proliferativa dos tumores foi determinada pela presença e quantificação do antígeno Ki-67, contido no núcleo celular, o qual foi identificado pelo uso do anticorpo MIB-1 (MIB-1, DAKO, diluição 1.500) (HOSHINO; WILSON, 1979, p. 21-25; SIMMONS et al., 2001, p. 1122-1128).

O gene supressor p53 participaria dos mecanismos de apoptose e inibiria a proliferação celular tumoral ao atuar sobre o complexo CDK4/ciclina. Sua mutação, alteraria a proteína p53, o que pode ser identificável por imunoreação, implicando em

quebra de sua ação inibitória. A proteína p53 foi, no presente estudo, identificada pelo emprego do anticorpo monoclonal anti-p53 (DAKO, 1:800) (JAROS et al., 1992, p. 373-385).

A hiperexpressão do gene EGFR estaria relacionada aos eventos desreguladores da proliferação celular e às alterações iniciais relacionadas com a gênese do glioblastoma. A identificação da proteína desse oncogene foi feita pela utilização do anticorpo monoclonal anti-EGFR (ZY-MED 1:40) (JAROS et al., 1992, p. 373-385; WATANABE et al., 1996, p. 217-224).

Para todos os anticorpos foram utilizados controles positivos previamente testados, constituídos por casos de carcinoma mamário para o Ki-67 e p53, onde a positividade é nuclear. Carcinoma epidermóide, com positividade para membrana citoplasmática, foi o controle para o EGFR.

### 3.3.3 Avaliação Imunohistoquímica

Foram selecionados cortes histológicos para o estudo imunohistoquímico, a partir das preparações coradas pela hematoxilina e eosina. Os cortes eram representativos da neoplasia, sem artefatos técnicos. Cortes com extensas áreas de necrose foram descartados, por prejudicarem a avaliação imunohistoquímica.

O material selecionado foi estudado em um microscópio Olympus BX50, com lugar para 10 pessoas.

Dois observadores foram envolvidos, onde um determinou a classificação e o outro observador realizou a avaliação final em casos duvidosos. Ambos os avaliadores eram médicos patologistas e um deles neuropatologista.

Foi utilizada uma gráticula (*Graticules ltd, Tonbridge Kent, England*), adaptada à ocular do microscópio.

Todas as lâminas foram examinadas em um aumento de 400x, reproduzindo, em campos sem necrose e repletos de células tumorais justapostas, um total de 522 células fora das linhas de inserção do campo microscópico.

O critério de avaliação de positividade para os anticorpos Ki-67 e p53 foi a imunoreatividade nuclear e para o anticorpo EGFR foi considerada a positividade da membrana plasmática. Como descrito anteriormente, controles positivos previamente testados foram utilizados para cada um dos imunomarcadores e as reações foram avaliadas em adequadas condições técnicas.

Em cada um dos casos foram contadas 2610 células, em áreas representativas da neoplasia e com ausência de áreas de necrose. Na avaliação global de cada caso as regiões adequadas foram selecionadas utilizando-se uma variação de 5 a 10 campos de grande aumento, em movimentos seqüenciais do microscópio para o preenchimento de 2610 células, contando-se o total de imunorreativas.

### 3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O estudo foi retrospectivo, observacional, tipo coorte histórico.

Todas as variáveis foram expressas em médias e desvios padrões. Para a comparação dos grupos secundário e primário em relação à contagem de células em Ki67, EGFR e p53, adotou-se a análise de covariância (ANCOVA), considerando-se a idade do paciente como co-variável. Para investigar a associação entre P53 e tempo de sobrevida e EFGR e tempo de sobrevida, estimou-se o coeficiente de correlação parcial, controlando-se a variável idade do paciente. Na comparação dos percentuais de P53 e EGFR, considerou-se o teste t de Student para amostras pareadas. A relação entre o EGFR e o tempo de sobrevida, quando analisados especificamente os grupos com sobrevida maior que 8 meses e entre os pacientes com  $p53 < 12\%$ , foi estudada pelo coeficiente de correlação não paramétrica de postos de Spearman. Em todos os testes um valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo (WOOLSON, 1987).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 RESULTADOS HISTOLÓGICOS

Foram revisados um total de 45 casos. Alguns pacientes tiveram mais de uma ressecção tumoral e nestes foi selecionado apenas o caso inicial contendo os critérios diagnósticos e sem tratamento radioterápico.

Em todos os casos foram encontradas áreas de necrose, geográficas ou focais, envoltas por paliçada de células neoplásicas. Foram evidentes vasos proliferados e glomerulóides em todos os casos. A celularidade era bastante aumentada, com atipias citológicas, pleomorfismo e figuras de mitose. O tipo celular variou de caso para caso; em alguns casos se evidenciavam células gemistocíticas, em outros um padrão de células pequenas e em alguns casos predominavam as células gigantes com acentuado pleomorfismo.

Todos os 45 casos revisados confirmaram o diagnóstico prévio de glioblastoma.

### 4.2 RESULTADOS IMUNOHISTOQUÍMICOS

Os 45 casos submetidos ao estudo foram preparados pelo mesmo técnico e avaliados da mesma forma pelos mesmos observadores.

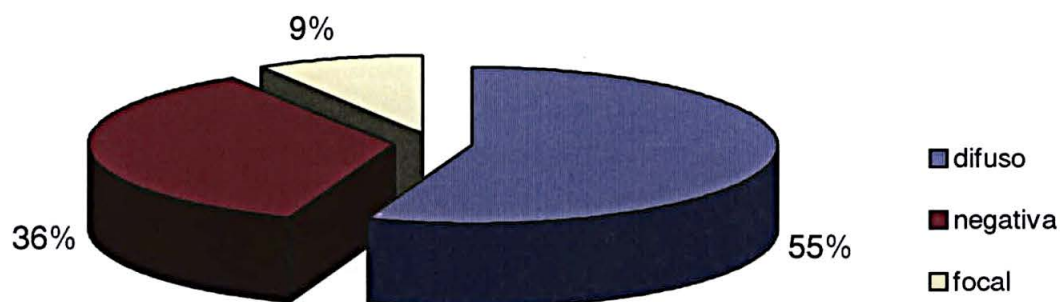
Os controles foram devidamente positivos. Todos os anticorpos testados resultaram em casos difusamente positivos, casos com reatividade focal e casos totalmente negativos.

#### 4.2.1 Anticorpo para o Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR)

As reações tiveram positividade de membrana, apresentando apenas 2 casos com discreta reação de fundo. A imunorreatividade foi de moderada a intensa nos casos positivos ou totalmente negativa. Em 16 casos (35,5%) as reações foram totalmente negativas. Em 29 (64,44%) as reações foram positivas (Gráfico 1).



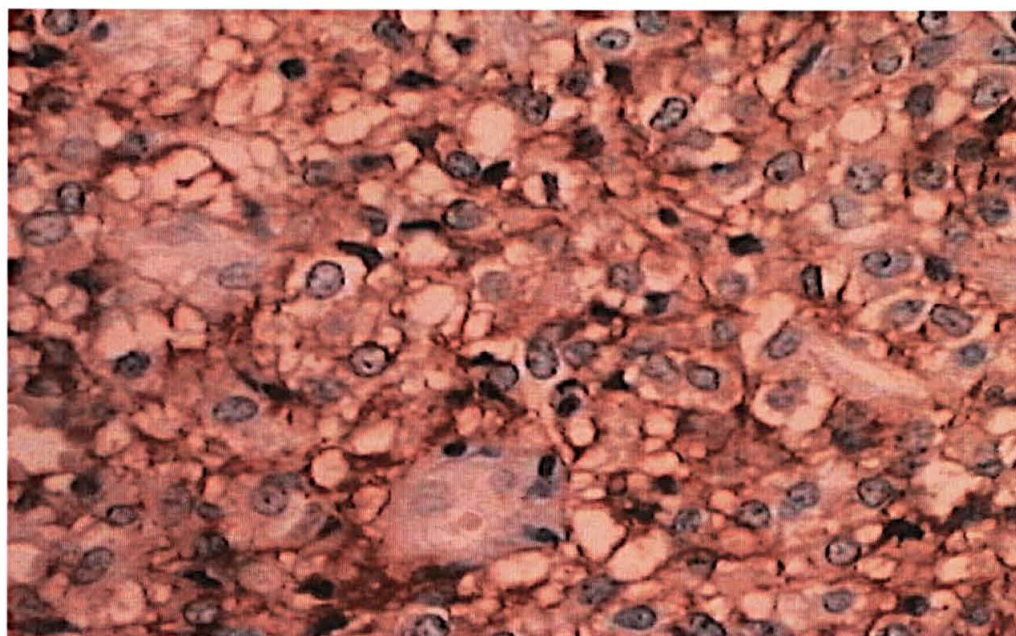
GRÁFICO 1 - EXPRESSÃO DE EGFR NA POPULAÇÃO ESTUDADA



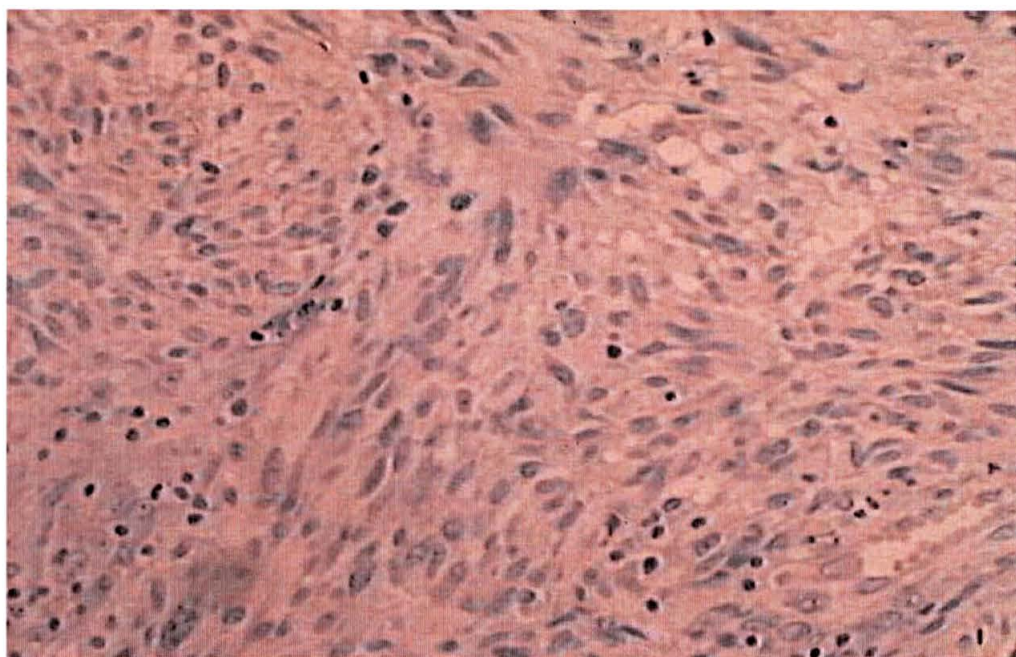
FONTE: Dados do autor

Nos casos imunorreativos observou-se que 25 deles tiveram imunoreação difusa e que em 4 casos a positividade foi forte, porém focal. A positividade máxima correspondeu a um caso em que das 2610 células estudadas 2255 foram positivas e a menor positividade foi encontrada no caso onde apenas 47 células tiveram imunoreação. Para efeito estatístico os casos difusos e focais serão considerados igualmente positivos (Figura 9).

FIGURA. 9 – IMUNOREATIVIDADE POSITIVA E NEGATIVA PARA O EGFR



A



B

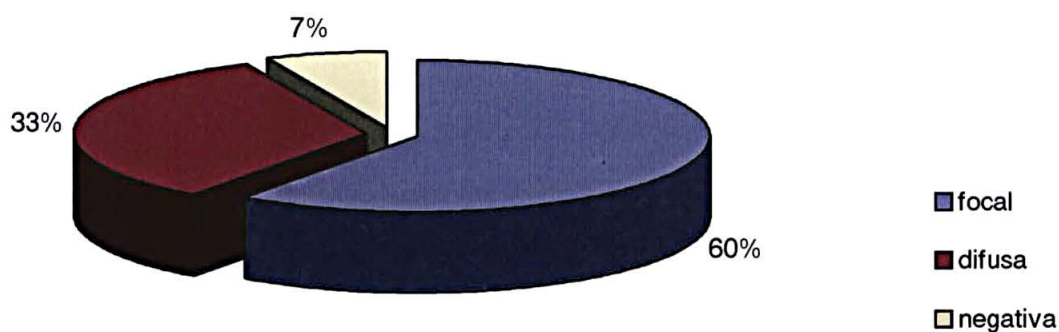
FONTE: Dados do autor.

NOTA: **A:** Reação imunohistoquímica pela técnica de estreptavidina-biotina-peroxidase para o anticorpo EGFR (positividade de membrana celular). Caso difusamente positivo (400x). **B:** Reação imunohistoquímica pela técnica de estreptavidina-biotina-peroxidase para o anticorpo EGFR. Caso negativo (200x).

#### 4.2.2 Anticorpo para o Marcador Proliferativo Ki67.

As reações tiveram positividade nuclear, com apenas 5 casos apresentando discreta reação de fundo. A imunorreatividade foi de moderada a intensa nos casos positivos ou totalmente negativa. Apenas 3 casos (6,66%) foram totalmente negativos e 42 (93,33%) foram positivos (Gráfico 2).

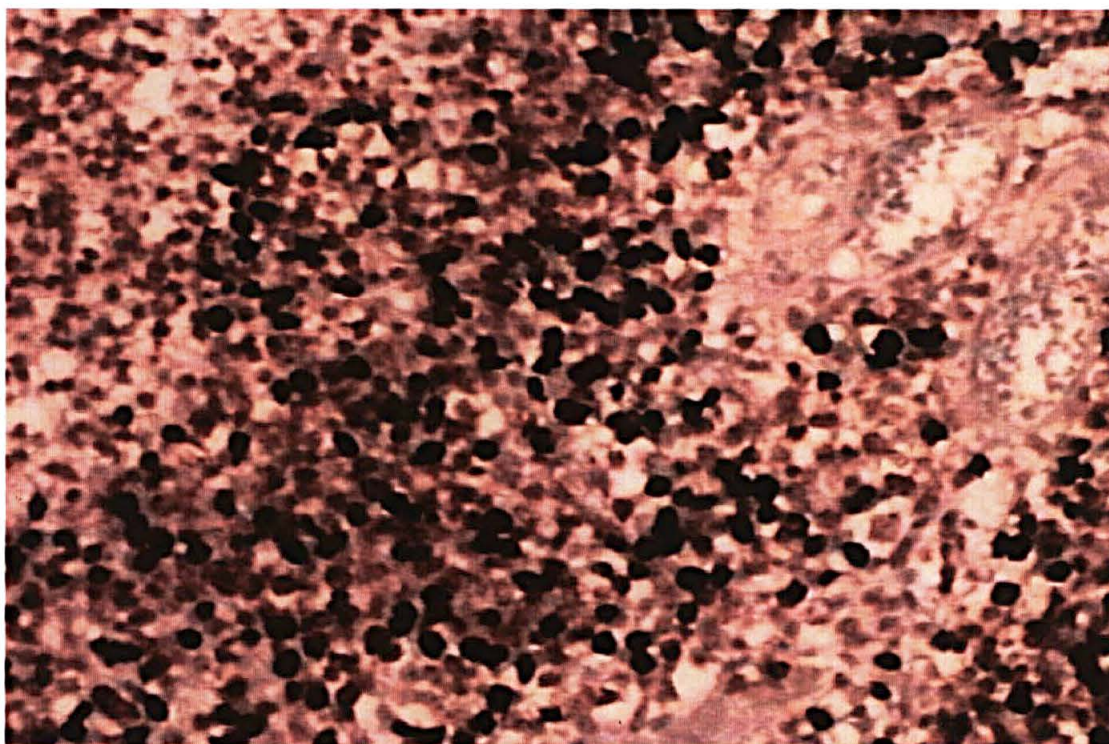
GRÁFICO 2 - EXPRESSÃO DE Ki-67 NA POPULAÇÃO ESTUDADA



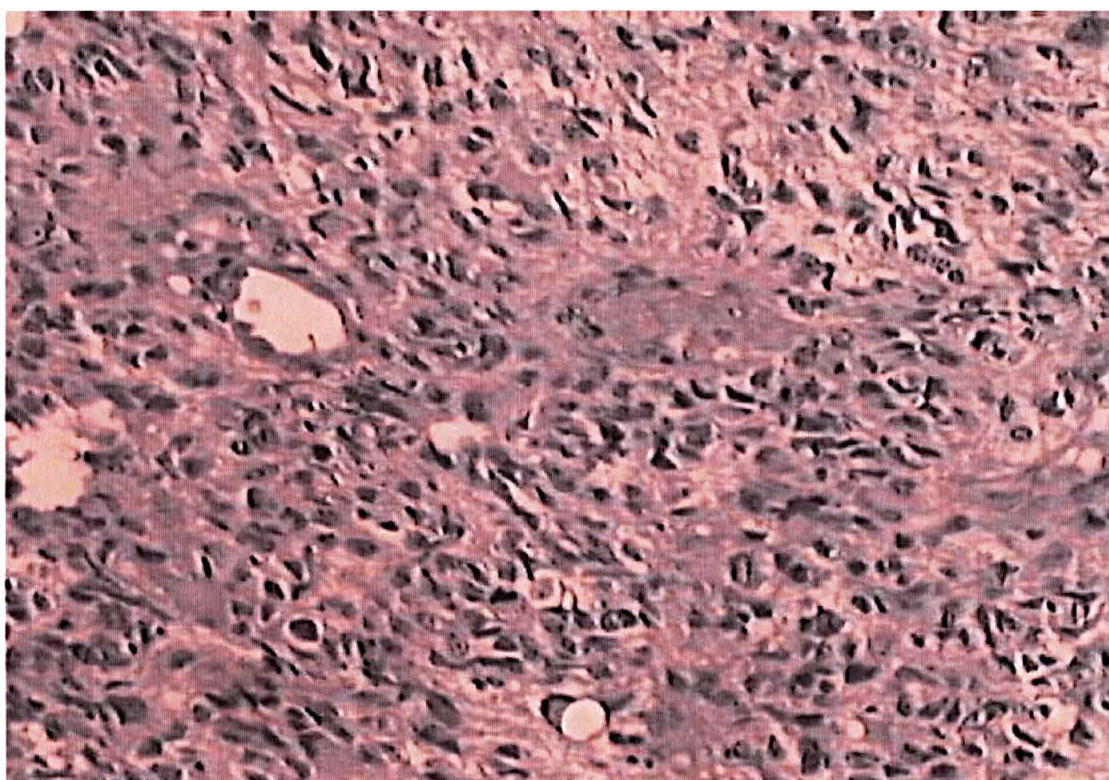
FONTE: Dados do autor

Entre os casos positivos, 15 deles demonstraram imunorreatividade difusa e 27 marcação focal. Para efeito estatístico, os casos difusos e focais serão considerados igualmente positivos (Figura 10).

FIGURA. 10 – IMUNOREATIVIDADE POSITIVA E NEGATIVA PARA O Ki67



A



B

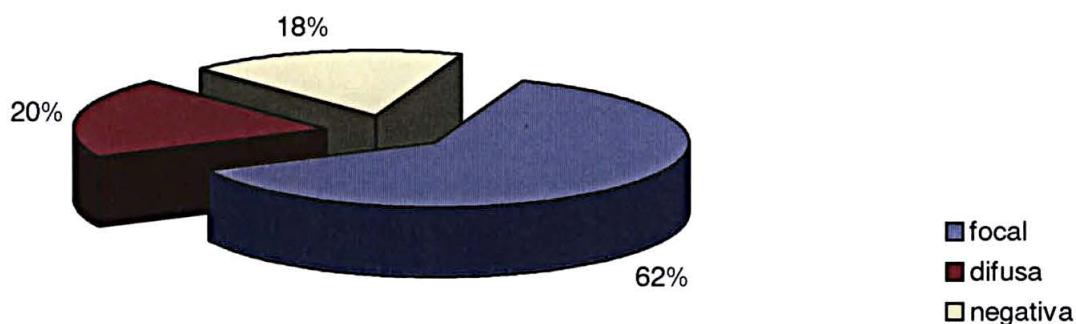
FONTE: Dados do autor.

NOTA: **A**: Reação imunohistoquímica pela técnica de estreptavidina-biotina-peroxidase para o anticorpo Ki67 (positividade nuclear). Caso difusamente positivo (200x). **B**: Reação imunohistoquímica pela técnica de estreptavidina-biotina-peroxidase para o anticorpo Ki67. Caso negativo (200x).

#### 4.2.3 Anticorpo para a Proteína Relacionada ao gene supressor tumoral p53

As reações tiveram positividade nuclear e apenas 2 casos apresentaram discreta reação de fundo. A imunorreatividade foi forte nos casos positivos ou totalmente negativa. Oito casos (17,7%) foram totalmente negativos e 37 (82,2%) foram positivos (Gráfico 3).

GRÁFICO 3 - EXPRESSÃO DE p53 NA POPULAÇÃO ESTUDADA



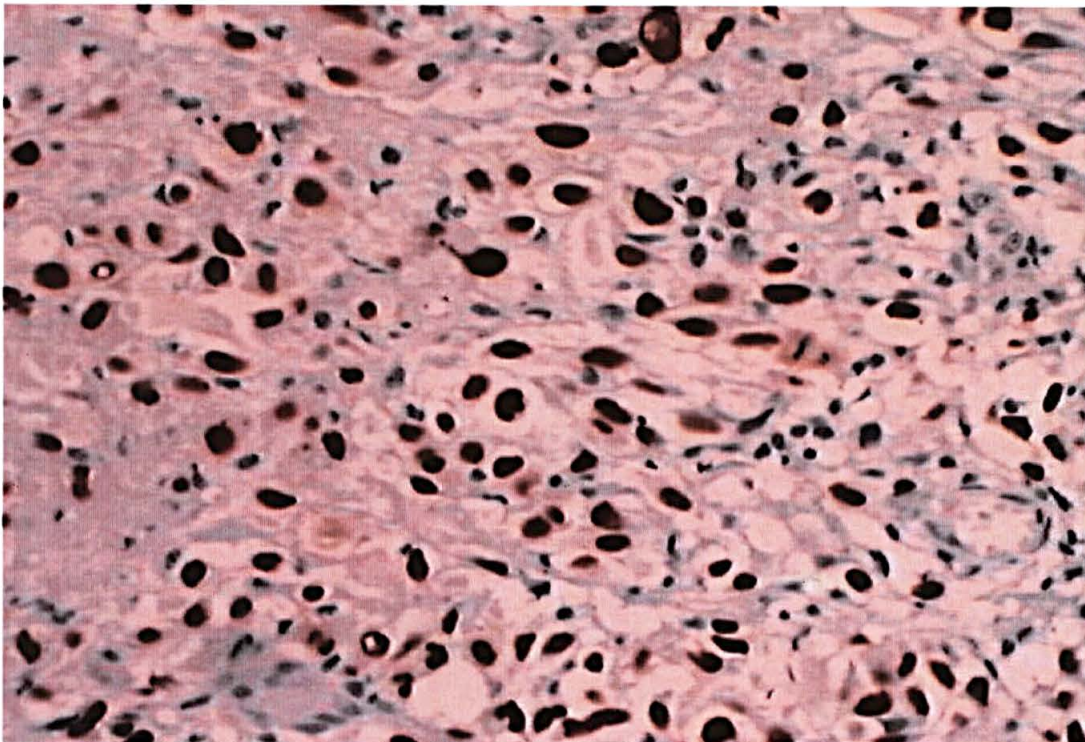
FONTE: Dados do autor

Entre os casos positivos, 9 deles demonstraram imunorreatividade difusa e 28 marcação focal. Para efeito estatístico os casos difusos e focais serão considerados igualmente positivos (Figura 11).

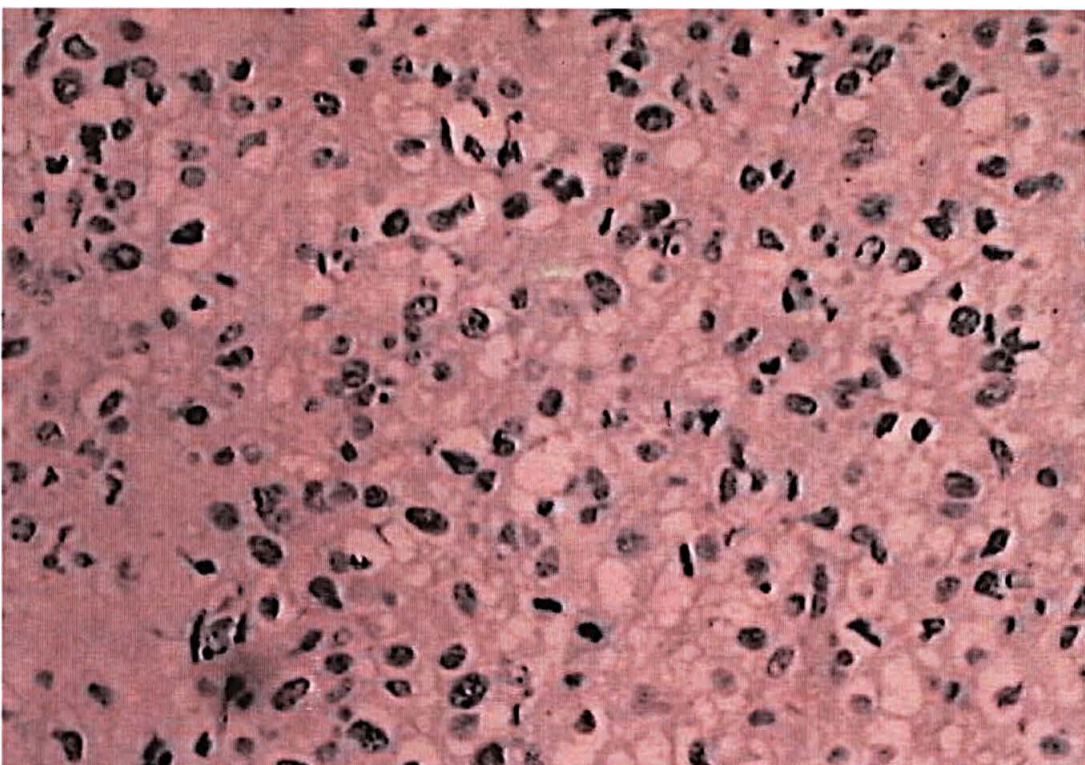
#### 4.3 RESULTADO DA DISTRIBUIÇÃO GERAL DOS DADOS COMPUTADOS

Os resultados de todos os elementos numéricos descritivos que serviram de base para o estudo estão contidos na tabela 9.

FIGURA. 11 – IMUNOREATIVIDADE POSITIVA E NEGATIVA PARA p53



A



B

FONTE: Dados do autor.

NOTA: **A:** Reação imunohistoquímica pela técnica de estreptavidina-biotina-peroxidase para o anticorpo p53 (positividade nuclear). Caso difusamente positivo (200x). **B:** Reação imunohistoquímica pela técnica de estreptavidina-biotina-peroxidase para o anticorpo p53. Caso negativo (200x).

TABELA 9 – DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES DE ACORDO COM OS CRITÉRIOS CLÍNICOS E IMUNOHISTOQUÍMICOS ESTUDADOS.

CASOS	IDADE	SEXO	TOTAL CÉLULAS	EGFR	KI-67	p53	SOBREVIDA <sup>(1)</sup>	GRUPO <sup>(2)</sup>	ISD <sup>(3)</sup>
1	39	M	2610	438	0	1232	16	S	7
2	46	F	2610	0	1740	1708	18	S	5
3	60	F	2610	1024	229	335	2	P	2
4	59	M	2610	80	164	253	9	P	0.3
5	67	M	2610	0	2103	294	2	P	0.3
6	71	F	2610	47	452	324	4	P	4
7	21	F	2610	0	283	1318	62	S	8
8	71	M	2610	0	387	274	13	P	1
9	67	F	2610	2255	943	329	2	P	3
10	60	M	2610	1124	2294	0	17	P	1
11	59	F	2610	1887	1840	342	10	P	2
12	61	F	2610	1034	1148	281	9	P	2.5
13	45	M	2610	0	134	1410	20	S	4.5
14	67	M	2610	874	2354	0	10	P	2.5
15	42	M	2610	784	792	254	18	P	1
16	48	F	2610	1728	0	330	23	P	1
17	43	M	2610	1894	458	326	13	P	2.5
18	50	M	2610	1598	164	284	15	P	1.5
19	56	M	2610	1754	157	264	12	P	3
20	55	M	2610	1698	1650	335	12	P	1
21	70	M	2610	1903	984	119	6	P	2
22	66	F	2610	894	141	348	15	P	3
23	58	M	2610	0	294	210	7	P	0.5
24	27	M	2610	0	744	2210	22	S	6
25	57	F	2610	1425	0	259	4	P	2
26	39	F	2610	0	152	315	19	P	2
27	53	M	2610	828	530	248	13	P	3
28	56	M	2610	0	470	292	7	P	2
29	63	M	2610	0	492	0	18	P	0.3
30	74	M	2610	42	515	325	3	P	0.7
31	39	M	2610	0	150	0	18	P	1
32	76	F	2610	323	740	0	3	P	1
33	70	F	2610	0	340	231	5	P	0.3
34	34	M	2610	0	1200	0	9	P	2.5
35	56	F	2610	1049	1154	294	7	P	2
36	52	F	2610	1856	1634	0	12	P	0.3
37	55	F	2610	1884	131	315	11	P	2
38	59	M	2610	0	148	131	7	P	2
39	72	M	2610	0	1902	0	5	P	0.5
40	40	M	2610	0	2450	319	30	P	2
41	60	F	2610	564	572	2231	26	S	6
42	48	M	2610	1329	350	274	7	P	0.5
43	43	M	2610	984	2198	2315	26	S	22
44	31	M	2610	1588	750	2295	32	S	7
45	56	M	2610	1588	1930	1354	12	P	2

FONTE: Dados do autor

NOTAS:

(1) Sobrevida em meses.

(2) Grupo Primário (P) e Secundário (S).

(3) Intervalo entre Sintomas e Diagnóstico em meses.

## 4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

### 4.4.1 EGFR como variável

O percentual de positividade de EGFR foi comparado nos grupos primário e secundário, com a idade dos pacientes como co-variável.

Em função desta variável ser uma variável de contagem, nas análises subseqüentes considerou-se a transformação raiz quadrada do número de células.

Inicialmente, testou-se a hipótese nula de homogeneidade de variâncias nos dois grupos, versus a hipótese alternativa de não homogeneidade. O resultado do teste de Cochran indicou a não rejeição da hipótese nula ( $p=0,6058$ ).

Em seguida, testou-se a hipótese nula de resultados médios de EGFR iguais nos dois grupos, versus a hipótese alternativa de resultados médios diferentes. Para tanto, adotou-se a análise de covariância considerando-se a variável idade como co-variável. O resultado do teste indicou a rejeição da hipótese nula no nível de significância de 5% ( $p=0,0484^*$ ). Na tabela 10 são apresentados os resultados de médias e desvios padrões.

TABELA 10 – ÍNDICE PERCENTUAL DE POSITIVIDADE DE EGFR NOS GRUPOS PRIMÁRIO E SECUNDÁRIO

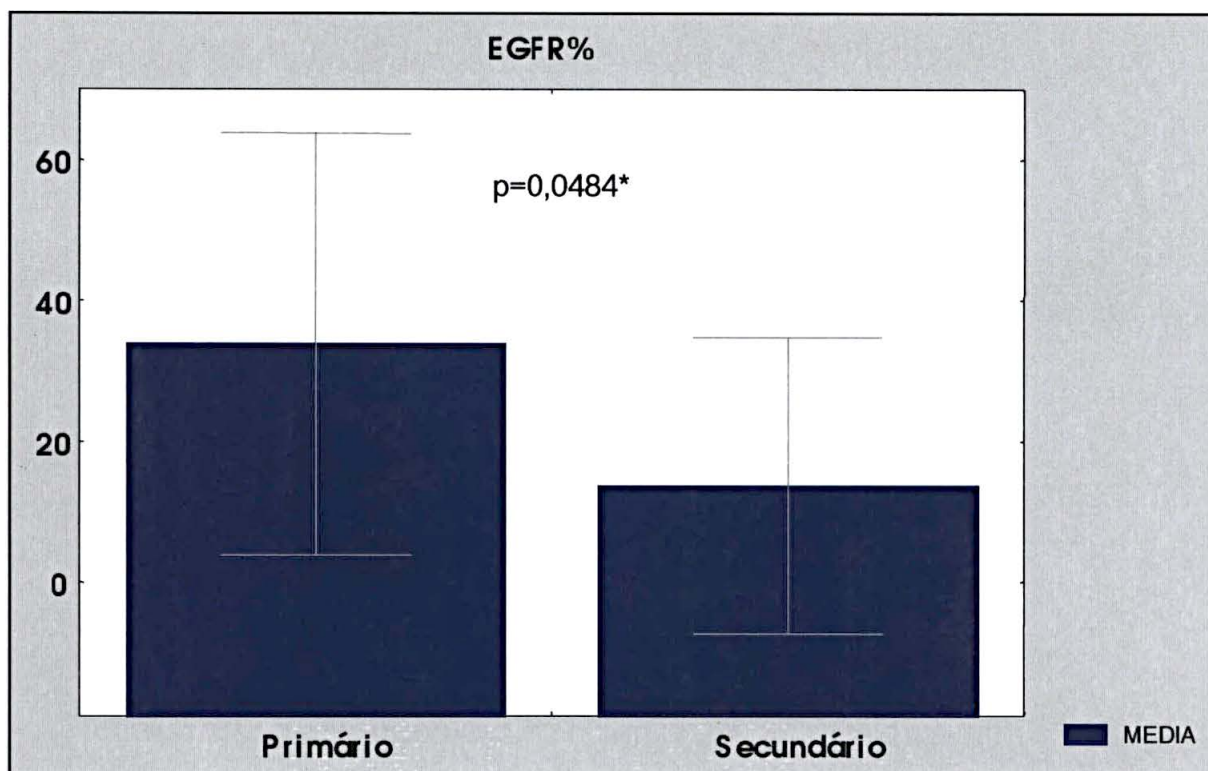
Grupo	EGFR% (Média ± DP)
Primário (n=35)	33,83 ±30,00
Secundário (n=10)	13,69 ±21,07

FONTE: Dados do autor

A comparação estatística do percentual de EGFR entre os grupos é representado no gráfico 4.



GRÁFICO 4 – COMPARAÇÃO DA INCIDÊNCIA DO EGFR ENTRE GRUPOS PRIMÁRIO E SECUNDÁRIO



FONTE: Dados do Autor

A incidência superior do EGFR no grupo primário em relação ao secundário foi estatisticamente significativa ( $p=0,0484^*$ ).

#### 4.4.2 p53 como variável

O percentual de positividade do p53 foi comparado nos grupos primário e secundário, com a idade do paciente servindo de controle.

Em função desta variável ser uma variável de contagem, nas análises subseqüentes considerou-se a transformação raiz quadrada do número de células.

Inicialmente, testou-se a hipótese nula de homogeneidade de variâncias nos dois grupos, versus a hipótese alternativa de não homogeneidade. O resultado do teste de Cochran indicou a não rejeição da hipótese nula (0,1941).

Em seguida, testou-se a hipótese nula de resultados médios de p53 iguais nos dois grupos, versus a hipótese alternativa de resultados médios diferentes. Para tanto,

adotou-se a análise de covariância considerando-se a variável idade como co-variável. O resultado do teste indicou a rejeição da hipótese nula no nível de significância de 5% ( $p < 0,0001^*$ ). Na tabela 11 são apresentados os resultados de médias e desvios padrões.

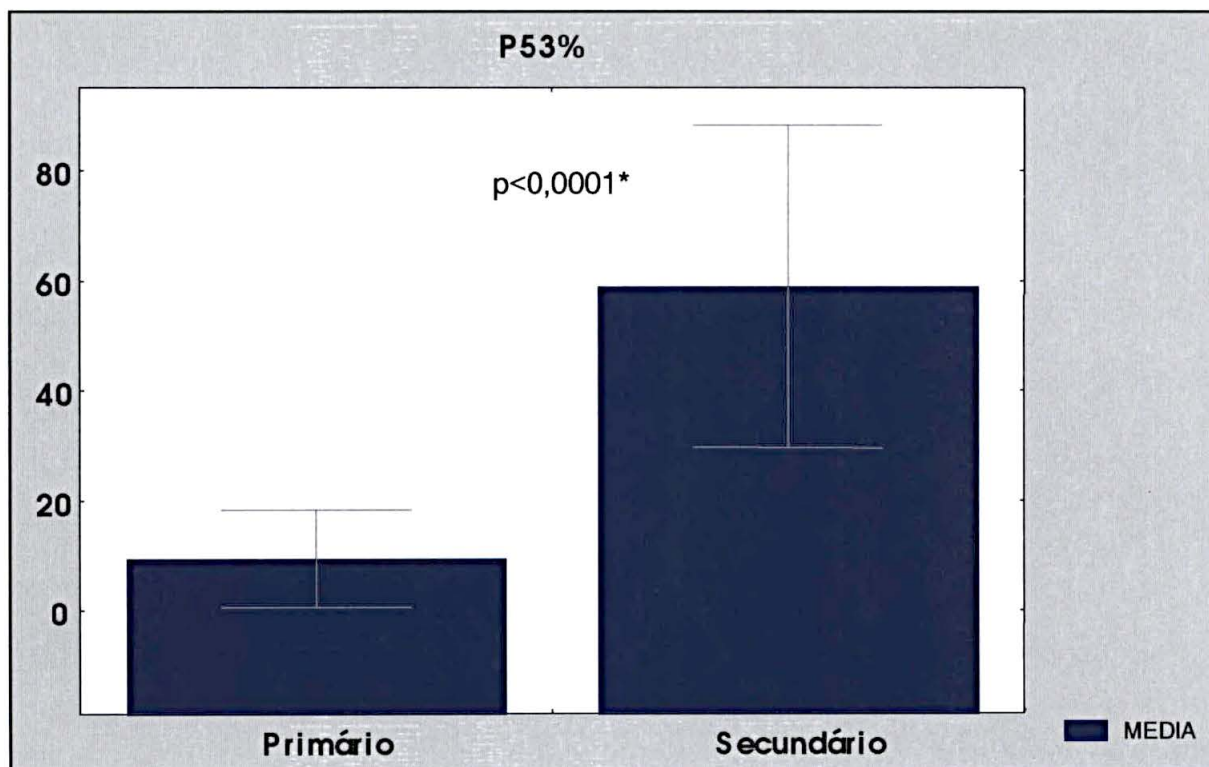
TABELA 11 – ÍNDICE PERCENTUAL DE POSITIVIDADE DE p53 NOS GRUPOS PRIMÁRIO E SECUNDÁRIO

Grupo	P53%
	Média ± DP
Primário (n=35)	9,44 ± 8,88
Secundário (n=10)	58,82 ± 29,34

FONTE: Dados do Autor

A comparação estatística de p53 entre os grupos é representada no gráfico 5.

GRÁFICO 5 - COMPARAÇÃO DA INCIDÊNCIA DO P53 ENTRE GRUPO PRIMÁRIO E SECUNDÁRIO



FONTE: Dados do autor

A incidência percentual superior do p53 no grupo secundário em relação ao primário foi estatisticamente significativa ( $p < 0.0001^*$ )

#### 4.4.3 Ki-67 como variável

O percentual de positividade de Ki-67 foi comparado nos grupos primário e secundário, com a idade servindo como co-variável.

Em função desta variável ser uma variável de contagem, nas análises subseqüentes considerou-se a transformação raiz quadrada do número de células.

Inicialmente, testou-se a hipótese nula de homogeneidade de variâncias nos dois grupos, versus a hipótese alternativa de não homogeneidade. O resultado do teste de Cochran indicou a não rejeição da hipótese nula (0,4421).

Em seguida, testou-se a hipótese nula de resultados médios de KI67 iguais nos dois grupos, versus a hipótese alternativa de resultados médios diferentes. Para tanto, adotou-se a análise de covariância considerando-se a variável idade como co-variável. O resultado do teste indicou a não rejeição da hipótese nula no nível de significância de 5% ( $p = 0,4276$ ). Na tabela 12 são apresentados os resultados de médias e desvios padrões.

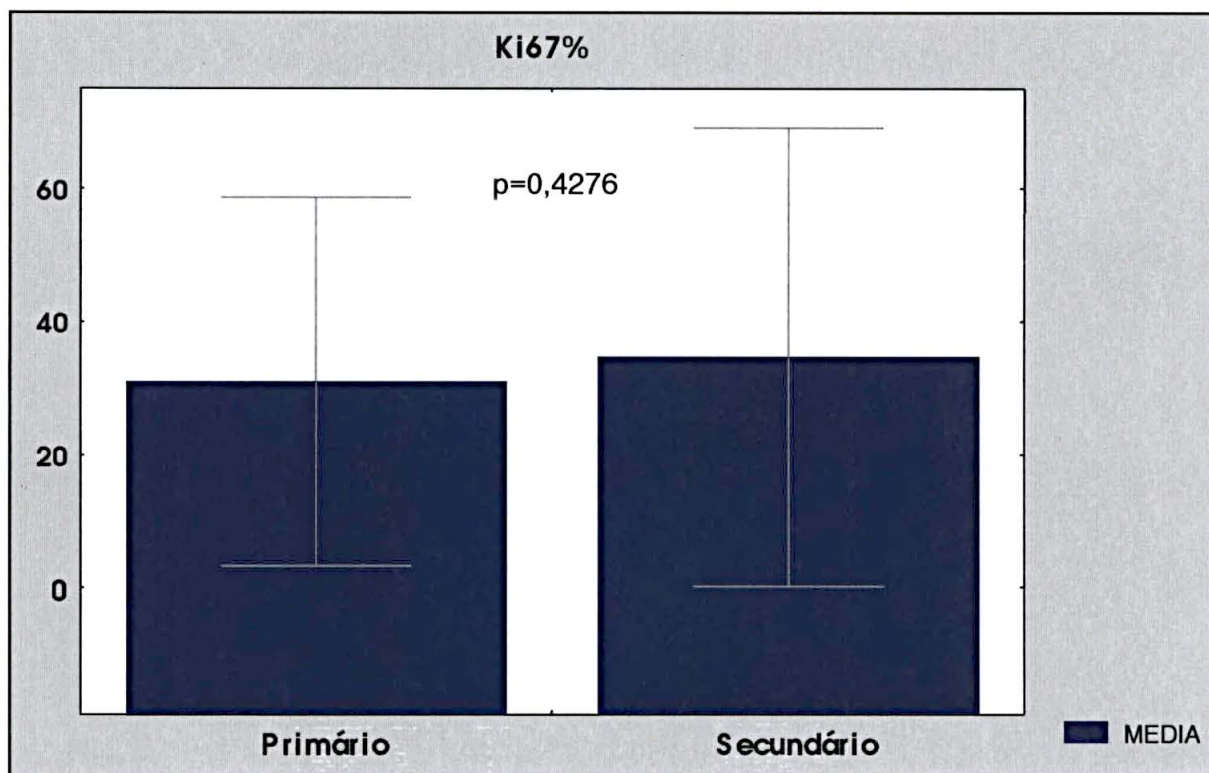
TABELA 12 – INCIDÊNCIA DE Ki-67 POSITIVO NOS GRUPOS PRIMÁRIO E SECUNDÁRIO

Grupo	Ki 67%
	Média ± DP
Primário (n=35)	30,91 ± 27,72
Secundário (n=10)	34,57 ± 34,47

FONTE: Dados do autor

A comparação estatística de incidência de Ki-67 entre os grupos primário e secundário é ilustrada no gráfico 6.

GRÁFICO 6 - INCIDÊNCIA DE Ki-67 NOS GRUPOS PRIMÁRIO E SECUNDÁRIO



FONTE: Dados do Autor

A diferença na porcentagem de positividade de Ki-67 entre os grupos primário e secundário não se revelou estatisticamente significativa ( $p=0.4276$ )

#### 4.4.4 Sobrevida como variável

Em função da assimetria desta variável, nas análises subseqüentes considerou-se a transformação logaritmo neperiano do tempo de sobrevida.

Inicialmente, testou-se a hipótese nula de homogeneidade de variâncias nos dois grupos, versus a hipótese alternativa de não homogeneidade. O resultado do teste de Cochran indicou a não rejeição da hipótese nula (0,0727).

Em seguida, testou-se a hipótese nula de resultados médios de tempos de sobrevida iguais nos dois grupos, versus a hipótese alternativa de resultados médios diferentes. Para tanto, adotou-se a análise de covariância considerando-se a variável idade como covariável. O resultado do teste indicou a rejeição da hipótese nula no

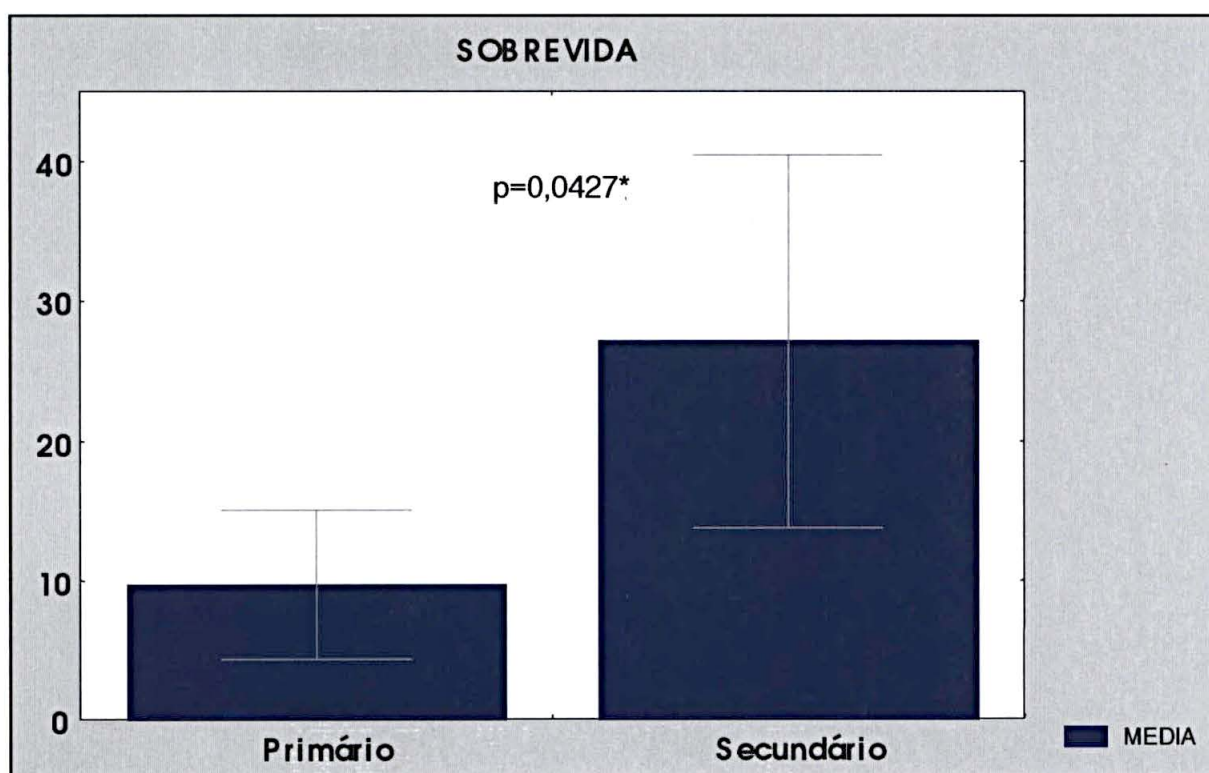
nível de significância de 5% ( $p=0,0427^*$ ) Na tabela 13 são apresentados os resultados de médias e desvios padrões e representada no gráfico 7.

**TABELA 13 - SOBREVIDA EM MESES NOS GRUPOS PRIMÁRIO E SECUNDÁRIO**

Grupo	Sobrevida Média $\pm$ DP
Primário (n=35)	9,71 $\pm$ 5,36
Secundário (n=10)	27,10 $\pm$ 13,34

FONTE: Dados do autor

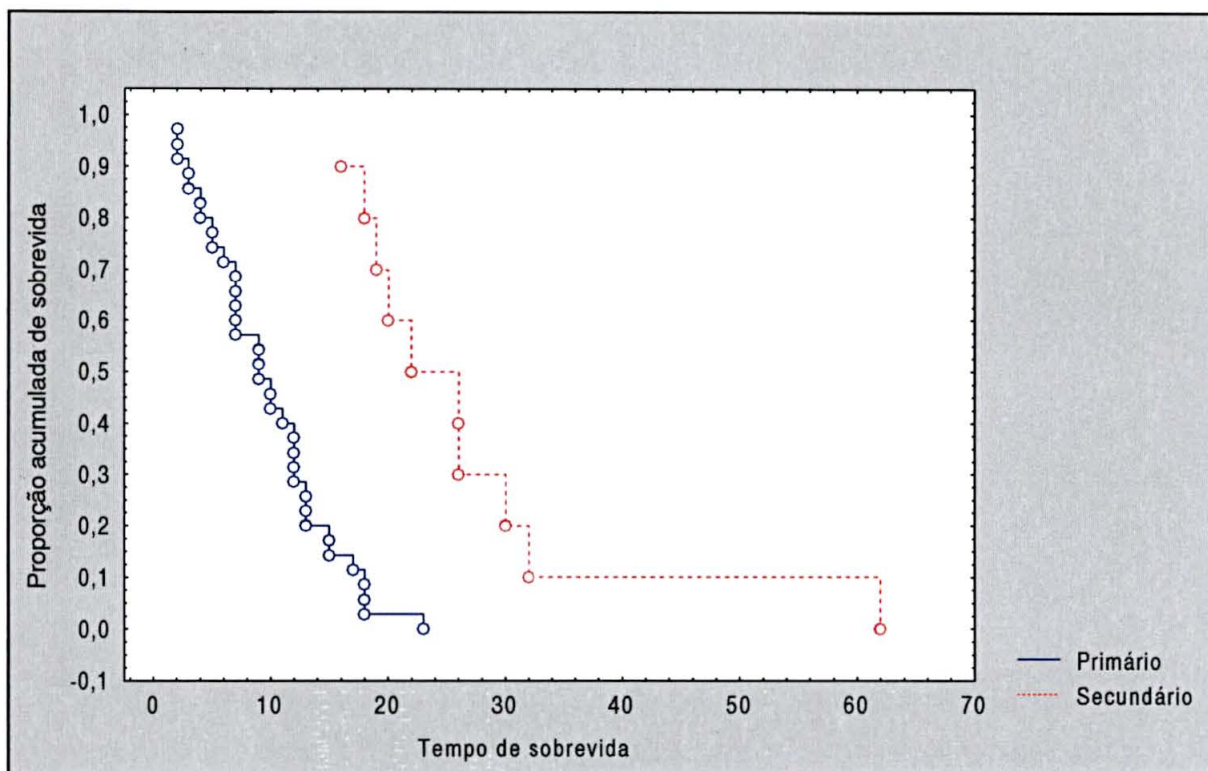
**GRÁFICO 7 – DIFERENÇAS DE SOBREVIDA ENTRE OS GRUPOS PRIMÁRIO E SECUNDÁRIO**



FONTE: Dados do autor

A proporção acumulada de sobrevivida nos dois grupos está ilustrada no gráfico 8.

GRÁFICO 8 – PROPORÇÃO ACUMULADA DE SOBREVIDA EM MESES NOS GRUPOS PRIMÁRIO E SECUNDÁRIO



FONTE: Dados do autor

A sobrevivência média do grupo secundário, superior a do primário, foi estatisticamente significativa ( $p=0,0427^*$ ).

#### 4.4.5 Comparação entre p53 e EGFR

##### 4.4.5.1 Grupo secundário

Considerando os pacientes classificados no grupo secundário, testou-se a hipótese nula de resultados médios iguais de P53 e EGFR, versus a hipótese alternativa de resultados médios diferentes. Para tanto, adotou-se o teste t de Student para amostras pareadas. O resultado do teste indicou a rejeição da hipótese nula no nível de significância de 5% ( $p=0,0002^*$ ). Na tabela 14 são apresentados os resultados de médias e desvios padrões.

TABELA 14 – INCIDÊNCIA DE P53 E EGFR NO GRUPO SECUNDÁRIO

Variável	Grupo Secundário (n=10)
	Média ± DP
P53%	58,82±29,34
EGFR%	13,69±21,07

FONTE: Dados do autor

Em relação à positividade em números absolutos no grupo secundário, 100% dos pacientes foram p53 positivo e 60% EGFR negativo.

A incidência percentual superior de p53 sobre o EGFR no grupo secundário foi estatisticamente significativa ( $p=0,0002^*$ ).

#### 4.4.5.2 Grupo primário

Considerando os pacientes classificados no grupo primário, testou-se a hipótese nula de resultados médios iguais de P53 e EGFR, versus a hipótese alternativa de resultados médios diferentes. Para tanto, adotou-se o teste t de Student para amostras pareadas. O resultado do teste indicou a rejeição da hipótese nula no nível de significância de 5% ( $p<0,0001^*$ ). Na tabela 15 são apresentados os resultados de médias e desvios padrões.

TABELA 15 – INCIDÊNCIA DE P53 E EGFR NO GRUPO PRIMÁRIO

Variável	Grupo Primário (n=35)
	Média ± DP
P53%	9,44 ± 8,88
EGFR%	33,83 ± 30,00

FONTE: Dados do autor

No grupo primário 77,1% dos pacientes foram EGFR positivo em números absolutos.

A incidência percentual superior de EGFR sobre p53 no grupo primário foi também estatisticamente significativa ( $p<0,0001^*$ ).

#### 4.4.6 Associação entre p53 e Tempo de Sobrevida

Testou-se a hipótese nula de que a correlação entre P53 e tempo de sobrevida é zero (ausência de associação), versus a hipótese alternativa de correlação diferente de zero (existência de associação). Em função de tempo de sobrevida ter relação com idade, nesta análise controlou-se esta última variável através da estimação da correlação parcial entre P53 e tempo de sobrevida.

Os resultados obtidos são apresentados na tabela 16.

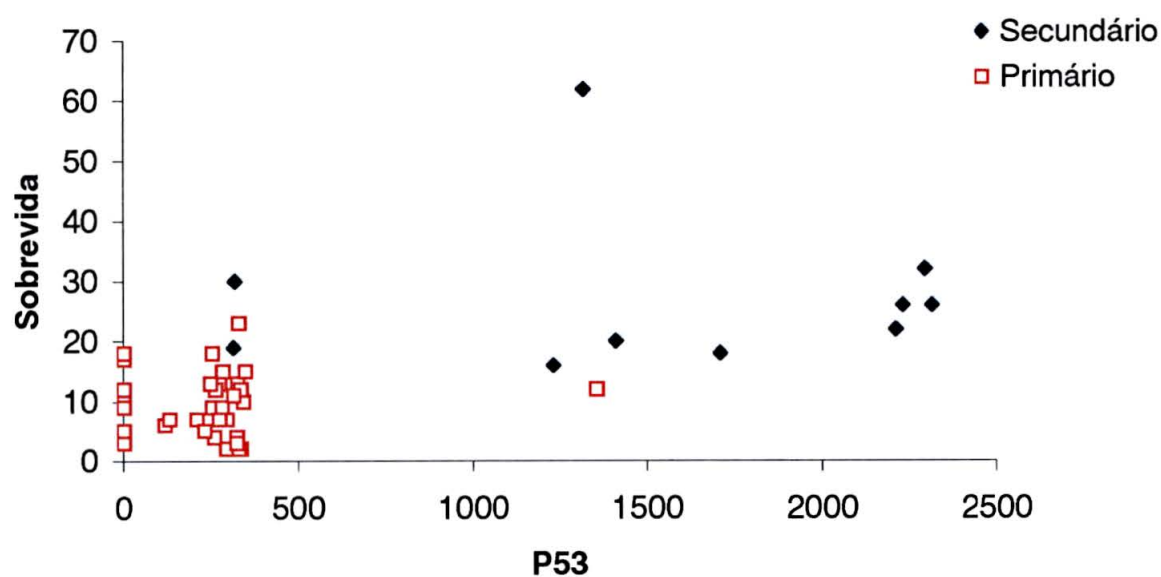
**TABELA 16 – CORRELAÇÃO PARCIAL ENTRE P53 E TEMPO DE SOBREVIDA**

Grupo	Coeficiente de correlação parcial estimado	Valor de p
Primário	-0,0315	0,8596
Secundário	0,0623	0,8736
Todos	0,3328	0,0273*

Fonte : Dados do autor

No gráfico 9 é apresentada a relação entre tempo de sobrevida e os resultado de P53.

**GRÁFICO 9 – RELAÇÃO ENTRE p53 E SOBREVIDA EM MESES**



FONTE: Dados do autor



Considerando-se os pacientes como um todo, pode-se concluir que existe uma associação positiva e significativa entre p53 e tempo de sobrevida, controlando-se a variável idade do paciente.

#### 4.4.7 Associação entre EGFR e Tempo de Sobrevida

Testou-se a hipótese nula de que a correlação entre EGFR e tempo de sobrevida é zero (ausência de associação), versus a hipótese alternativa de correlação diferente de zero (existência de associação). Em função de tempo de sobrevida ter relação com idade, nesta análise controlou-se esta última variável através da estimação da correlação parcial entre EGFR e tempo de sobrevida.

Os resultados obtidos são apresentados na tabela 17.

TABELA 17 – CORRELAÇÃO ENTRE EGFR E TEMPO DE SOBREVIDA

Grupo	Coeficiente de correlação parcial estimado	Valor de p
Primário	0,0885	0,6185
Secundário	0,0565	0,8852
Total	-0,1237	0,4236

FONTE: Dados do autor

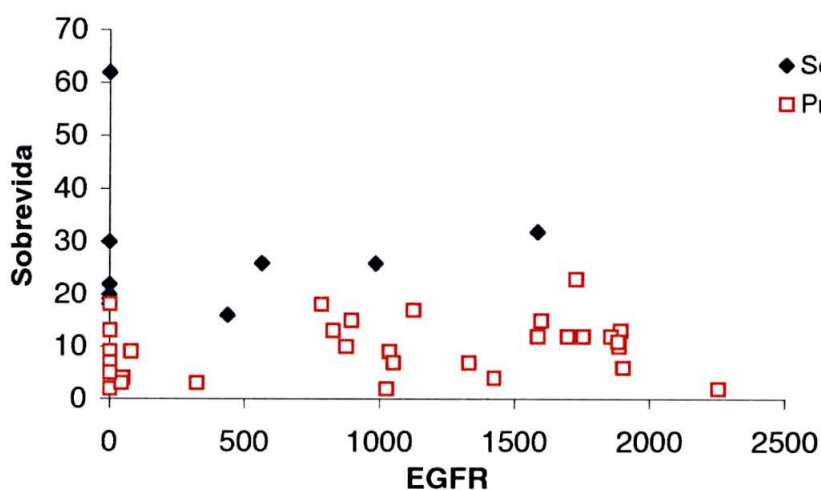
No gráfico 10 é apresentada a relação entre tempo de sobrevida e os resultados de EGFR.

Considerando-se o total de pacientes, não se pode concluir que existe uma associação significativa entre EGFR e tempo de sobrevida, controlando-se a variável idade do paciente.

A associação entre EGFR e sobrevida superior a 8 meses foi estudada no grupo de 30 pacientes que assim se comportaram, adotando-se o teste de correlação não-paramétrica de postos de Spearman.

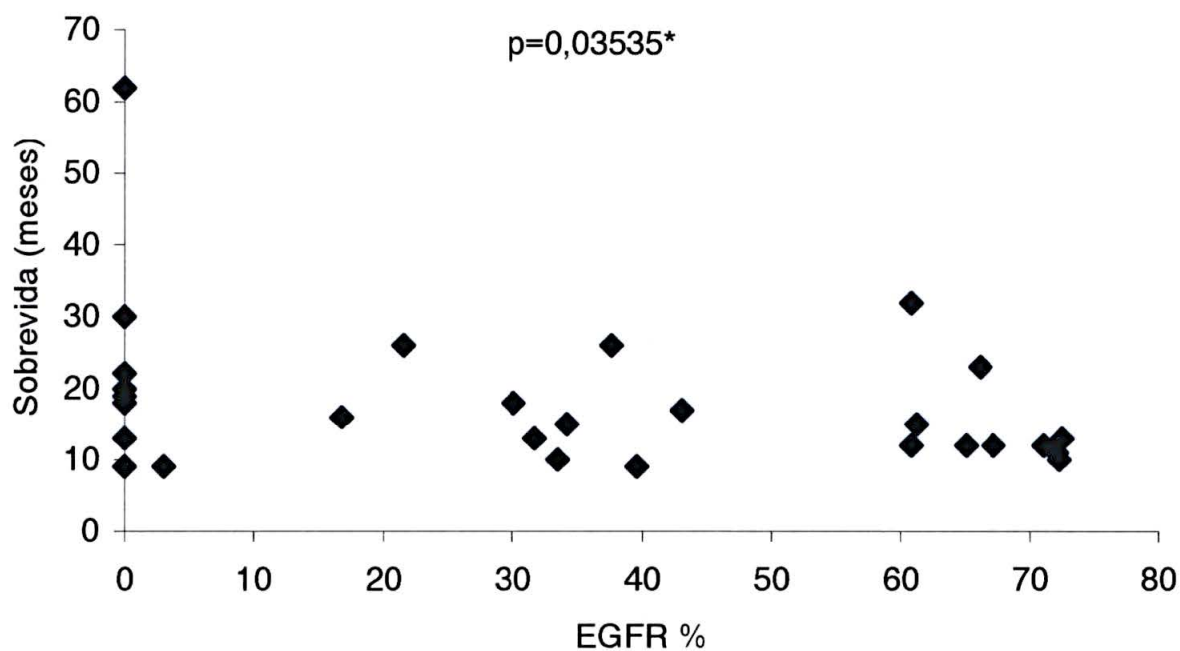
O estudo mostra uma correlação estatisticamente significativa ( $p=0,03535^*$ ) entre EGFR e sobrevida em pacientes com sobrevida superior a 8 meses, com condicionamento a pior prognóstico, demonstrado no gráfico 11.

GRÁFICO 10 – RELAÇÃO ENTRE EGFR E SOBREVIDA EM MESES



FONTE: Dados do autor

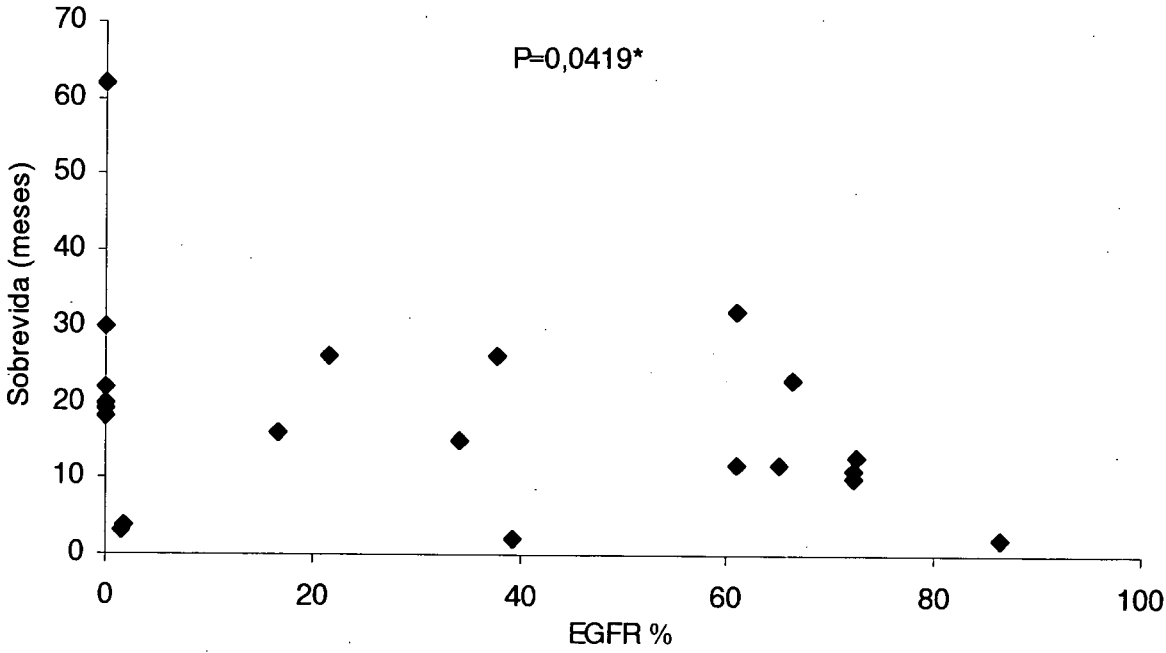
GRÁFICO 11 – RELAÇÃO ENTRE EGFR E SOBREVIDA EM 30 PACIENTES COM SOBREVIDA SUPERIOR A 8 MESES



FONTE: Dados do autor

O estudo mostra também uma correlação estatisticamente significativa ( $p=0,0419^*$ ) entre EGFR e sobrevivida após a exclusão da população com  $p53 < 12\%$ , com condicionamento a pior prognóstico, demonstrado no gráfico 12.

GRÁFICO 12 - RELAÇÃO ENTRE EGFR E SOBREVIDA EM 21 PACIENTES COM P53 > 12%



## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 OBSERVAÇÕES GERAIS

O glioblastoma, tumor primário mais maligno e mais comum do sistema nervoso central do adulto, permanece como o maior desafio, em termos de obtenção de cura, no âmbito da neurocirurgia oncológica. Apesar do grande avanço científico ocorrido nas últimas décadas, a sobrevida média de seus portadores continua a girar em torno de um ano, com apenas 2 a 5 % dos pacientes sobrevivendo mais de 3 anos (SALCMAN, 1980, p. 435-439; SCOTT et al., 1999, p. 183-188; BURTON et al., 2002, p. 180-187).

Essa inexpressividade em termos de sobrevida, contrasta com a crescente sofisticação tecnológica que envolve progressivamente os métodos de diagnóstico.

Desses, particularmente a RM permite um alto grau de sensibilidade e especificidade no reconhecimento da natureza da lesão (HOLT; MAKAVILLA, 1996, p. 753-774). A espectroscopia de prótons permite a detecção da presença de metabólitos cerebrais e suas células correspondentes, refinando ainda mais a capacidade de identificação dos elementos gliais contidos na massa tumoral (CASTILLO et al., 1998, p. 1-20).

As técnicas de difusão e perfusão refletem o grau de celularidade bem como demonstram os valores originais de alteração de fluxo sanguíneo cerebral, decorrentes da quebra da barreira hematoencefálica, indicativa de alta agressividade do tumor (SUGAHARA et al., 1998, p. 1479-1486; KONO et al., 2001, p. 1081-1088).

A tomografia por emissão de pósitrons, ao quantificar o consumo metabólico regional e global do glioblastoma, fornece importantes subsídios em relação ao diagnóstico, evolução e resposta terapêutica (FLOETH et al., 2001, p. 1517-1527).

As informações aqui resumidas, relativas aos progressos havidos com os métodos de imagem, satisfariam as necessidades básicas do cirurgião, em relação ao reconhecimento da lesão, suas características anatômicas e sua topografia, proporcionando de início um planejamento tático e terapêutico adequado.

O problema, no entanto, reside no fato de que, na maioria das vezes, quando a lesão é dessa forma reconhecida, o diagnóstico já será tardio. No momento em que o tumor se torna clinicamente sintomático, ele já poderá ter assumido um tamanho de 4 a 5 cm de diâmetro, pesar de 40 a 50 g e ser constituído por uma população de  $10^{11}$  células. Uma duplicação dessa massa, que poderia ocorrer num período de cerca de 12 a 40 dias, seria incompatível com sobrevida (SALCMAN, 1999, p. 25-35). Além disso, nessa fase de reconhecimento clínico, células já disseminadas à distância, não detectáveis pelas imagens, tornarão a ressecção cirúrgica completa impraticável, reduzindo-a a um método de tratamento apenas paliativo (GUTIN; POSNER, 2000, p. 1-8).

A terapia por radiação, envolvendo modernamente as técnicas conformacionais, braquiterapia e radiocirurgia, permanece ainda como o método terapêutico isolado mais eficaz, apesar dos acréscimos modestos na sobrevida a médio e longo prazo (LARSON; WARA, 1998, p. 34-42; SALCMAN, 1999, p. 196-212).

A busca por um agente quimioterápico realmente eficaz ainda persiste (GLIOMA METANALYSIS TRIALISTS GROUP, 2002, p. 1011-1018).

Essas limitações terapêuticas decorrem da complexidade que envolve os mecanismos da acelerada cinética celular do GBM, em decorrência do seu alto índice proliferativo e da natureza dos múltiplos desarranjos moleculares intra e extracelulares, responsáveis por seu comportamento biológico agressivo.

Somente nos últimos dez anos, com a evolução dos conceitos relacionados com a genética molecular, é que os mecanismos intrínsecos da gênese do glioblastoma vêm sendo melhor compreendidos (KLEIHUES; BURGER; SCHEITHAUER, 1993, p. 255-268).

Quando uma célula glial sofre alteração em sua expressão genética, todos os seus processos biológicos se modificam, e os mecanismos de crescimento celular, migração e vascularização se convertem em proliferação descontrolada, invasão à distância e angiogênese.

Fatores extracelulares, geralmente na forma de oncogenes, como os fatores de crescimento e as proteases, interagem, ao sofrerem mutações, com receptores de

membrana. Estes induzem, através de complexas vias de sinalização intracelulares, alterações moleculares sucessivas envolvendo oncogenes e genes supressores, cuja expressão final resulta na formação de células gliais neoplásicas e neovascularização (KAPOOR; O`ROURKE, 2003, p. 1425-1435).

Desvendar as intimidades dessas alterações moleculares responsáveis pelas cascatas mitogênicas, constituem um dos grandes desafios da genética molecular, nos dias atuais. Vários elementos componentes dessas cadeias de reações proliferativas (já discutidas nas seções anteriores), envolvendo receptores, enzimas e proteínas, com suas respectivas expressões gênicas, hoje são conhecidas, bem como algumas mutações que condicionam o desequilíbrio entre a ação de proto-oncogenes (promotores do crescimento celular) e os genes supressores (inibidores do ciclo).

A percepção exata da importância desses mecanismos, isoladamente ou em combinação, além de identificar alterações estruturais básicas envolvidas nas vias de sinalização, deverá abrir novas perspectivas terapêuticas, amparadas no objetivo de retificar codificações moleculares anormais, através das promissoras técnicas embutidas nos conceitos de terapia gênica e cirurgia molecular (nanocirurgia).

Dentro dessa linha de investigação e com base nos conceitos biológicos recentemente adquiridos, foi investigada a participação e importância do oncogene EGFR e do gene supressor p53 através das suas alterações proteicas respectivas, como eventuais participantes da mitogênese do glioblastoma, correlacionando-os com variáveis clínicas, objetivando extrair informações prognósticas com aplicabilidades terapêuticas potenciais. Foi também estudada a importância da determinação da capacidade proliferativa do tumor, através de imunopositividade do antígeno Ki-67. Os resultados dessas análises passarão a ser discutidos.

## 5.2. Ki-67

O antígeno Ki-67, contido no núcleo da célula ativa, é expresso nas fases G, S, G2 e M do ciclo celular. Sua identificação, pela imunopositividade, ao reagir com o anticorpo MIB-1, reflete a capacidade proliferativa do tumor. Apenas 3 casos desta

série foram negativos (6,66%), contra 42 (93,33%) positivos. A média de porcentagem de positividade no total foi de  $31,73\% \pm 28,97\%$ .

A comparação, no entanto, da positividade do Ki-67 entre os grupos primário e secundário não revelou diferença estatisticamente significativa ( $p=0,4276$ ), girando em torno de  $30,91\% \pm 27,77$  para o grupo primário e  $34,57\% \pm 34,47$  para o secundário.

Considerando-se que a sobrevida maior no grupo secundário é significativa, com amparo estatístico, infere-se que a proporção das células positivas (índice proliferativo) em ambos os grupos não influenciou na sobrevida, despendo-se portanto, o método, de valor prognóstico no presente estudo.

Exemplos ilustrativos da casuística, aparentemente paradoxais, embora isoladamente sem valor estatístico, podem ser encontrados no caso 43, de maior sobrevida no grupo, cujo índice proliferativo foi de 84,2%, e no caso 25, de baixa sobrevida, em que o índice foi de 0 (zero) (tabela9).

A importância da determinação do Ki-67 como elemento indicador de prognóstico é controversa. Para KLEIHUES et al. (2000, p. 29-40), o índice proliferativo do Ki-67 não permite extrair conclusões prognósticas em bases individuais, considerando também que no balanço de influência entre a presença de necrose e proliferação celular, responsáveis pelo volume tumoral, a primeira tem encontrado maior significância em termos de prognóstico (RAZA et al., 2002, p. 2-12).

Nos estudos de LAERUM et al (2001, p.1-8), a positividade de Ki-67 foi, de modo estatisticamente significativa, superior no grupo de curta sobrevida. No entanto, a expressão de positividade não refletiu o índice proliferativo (percentual de células), limitando-se a considerá-lo positivo a partir de 5%, dificultando dessa forma a avaliação proporcional.

Para SIMMONS et al. (2001, p. 1122-1228), altos níveis de Ki-67 foram associados à pior sobrevida apenas em pacientes jovens. Tentativas de correlacionar seus índices aos de p53 não tiveram validade estatística.

No presente estudo, em que p53 foi utilizada como variável e idade como co-variável, as condições relacionadas com a pior sobrevida em jovens não foram confirmadas.

BREDEL et al (2002, p. 1343-1347), concluíram, paradoxalmente, que a alta expressão de Ki-67 é associada à maior sobrevida em seus pacientes de glioblastoma.

O questionamento que pode ser feito a esse estudo está ligado aos fenômenos relacionados com cinética celular e tratamento. Altas porcentagens de células ativas representam na realidade um substrato maior de células passíveis de responder à radiação e quimioterapia, cuja ação terapêutica não atua sobre o compartimento de células inativas (G0). Dessa forma, pacientes com alto índice proliferativo poderiam representar os que melhor respondem ao tratamento adjuvante, prejudicando a interpretação do prognóstico baseado unicamente neste parâmetro.

BURTON et al. (2002, p. 180-187) demonstraram menor índice proliferativo no grupo de sobreviventes a longo prazo, confirmando estudos prévios de SCOTT et al. (1999, p.183-188). Uma possível explicação sobre a discordância desses achados em relação ao presente estudo pode estar relacionada ao espectro maior de sobrevida daqueles grupos onde uma dezena de pacientes sobreviveu até 3 anos, envolvendo outras variáveis a serem consideradas.

Diferenças metodológicas de contagem podem também influir na determinação desses resultados. Ao contrário das situações descritas nos outros estudos, na presente investigação o índice proliferativo foi calculado em relação a um número constante de células tumorais em todas as amostragens. Essa uniformidade, ao evitar viés de seleção em amostras, pode proporcionar aferição de índices proliferativos mais fidedignos.

A padronização dos estudos em termos de variáveis a serem utilizadas, a homogeneização das populações, a observação de relevância dos tratamentos utilizados nos resultados, além da introdução de novos marcadores de síntese de DNA, poderão acrescentar mais informações em relação à importância da determinação do índice proliferativo no prognóstico do glioblastoma, que não se revelou significativo, na presente análise, em relação ao Ki-67.



### 5.3 EGFR

A hiperexpressão do EGFR, reflexo de sua mutação gênica, é capaz de desenvolver glioblastoma em laboratório, pelos mecanismos já descritos, de transdução de sinais alterados da membrana para o interior da célula, conforme discutido em seção anterior (2.4.8).

No entanto, sua importância clínica como fator oncogênico e o reflexo de sua participação como elemento determinante de prognóstico ainda são questões controversas (KLEIHUES et al. 2000, p. 29-40).

O método usado nesta análise, de aferição da anormalidade mutacional de EGFR, através de reação imunohistoquímica, com a utilização de anticorpo específico, indica a hiperexpressão da anormalidade proteica, mas não caracteriza a natureza da mutação básica, que é a amplificação da região cromossômica que aloja cópias extras de EGFR naquele segmento. Essa anormalidade genética seria melhor demonstrada por técnicas de hibridização genômica comparativa. A diferença de metodologia utilizada, embora consagrada na literatura, poderia suscitar dúvidas sobre a legitimidade das interpretações. Essa dúvida foi dirimida por estudos comparativos em que as técnicas de hibridização e imunohistoquímica demonstram que os níveis de amplificação e hiperexpressão são superponíveis e relacionadas (WATANABE et al., 1996, p. 217-224; RUTKA et al., 2000, p. 1034-1051; SIMMONS et al., 2001, p. 1222-1228).

As análises comparativas do presente estudo permitiram demonstrar a predominância, estatisticamente significativa do EGFR ( $p=0,0484$ ), no grupo primário em relação ao secundário. Quando a sobrevida foi analisada como variável, o grupo primário, onde predomina o EGFR, mostrou sobrevida significativamente inferior à do grupo secundário ( $p=0,0427$ ), de forma significativa.

Quando a população de EGFR positivo foi comparada à população de p53 no grupo primário, o predomínio percentual de EGFR foi estatisticamente significativo ( $p<0,0001$ ). Da mesma forma, o percentual de células EGFR positivas no grupo

secundário foi significativamente menor que o percentual de p53 ( $p=0.0002$ ). No grupo primário, em números absolutos, 77,1% dos casos foram EGFR positivas.

Apesar da relação entre EGFR e o tempo de sobrevida no grupo total de pacientes não ser significativa ( $p=0,4236$ ), estudos estratificados demonstraram que em sub-grupos a relação tem significância. No grupo de 30 pacientes, em que a sobrevida foi superior a 8 meses, a importância do EGFR como elemento de prognóstico foi significativa ( $p=0,035351$ ), coincidindo com a exclusão de pacientes com baixo percentual de p53. Quando o grupo de pacientes com menor percentual de p53 (<12%) foi isolado, a relação entre EGFR e tempo de sobrevida se revelou significativa ( $p=0,0419$ ).

O predomínio significativo do EGFR no grupo primário, de maior média de idade e de menor sobrevida, ao contrário do predomínio de p53 no grupo secundário, de menor média de idade e maior sobrevida, confirma os achados de KLEIHUES e OHGAKI (1999, p. 44-51), que sugerem a existência de sub-grupos de glioblastomas, com distintos padrões genéticos e diferentes comportamentos biológicos.

A análise desses resultados permite uma série de considerações. O alto percentual de positividade de EGFR no grupo primário permite inferir, com base nas suas propriedades oncogênicas demonstradas experimentalmente, uma forte relação entre sua presença e a origem do glioblastoma no grupo primário, como provável elemento etiológico desencadeante das complexas alterações moleculares que se processam da membrana para o interior da célula glial.

O estudo comparativo de percentuais de EGFR e p53 nos 2 grupos permite sugerir uma interação antagônica em termos de influência recíproca nos resultados da avaliação etiológica e prognóstica, resultante de mecanismos desreguladores distintos.

Ainda, somente quando pacientes com percentuais baixos de positividade para p53 foram excluídos, é que o EGFR se tornou estatisticamente significativo em relação ao prognóstico. Esse achado encontra suporte no conhecimento sobre as influências inibitórias, demonstradas nas vias de sinalização do ciclo celular, da proteína p53 normal ("wild-type") sobre fatores de crescimento, incluindo EGFR (LAERUM et al., 2001, p. 1-8).

A estratificação dessa análise específica com exclusão do grupo de baixo percentual de p53 positivos e conseqüentemente de alto percentual de proteína normal (“wild-type”), liberaria a ação oncogênica do EGFR, desprovido da ação inibitória do p53 normal, favorecendo um pior prognóstico.

Já anteriormente, WATANABE et al (1996, p. 217-224) haviam sugerido uma relação mutuamente excludente entre esses dois fatores, em sub-grupos de glioblastoma, sem no entanto estudá-la como índice de prognóstico.

O valor prognóstico de EGFR, em estudos anteriores, foi objeto de controvérsias. Alguns grupos não encontraram associação entre essa anormalidade e sobrevida (WAHA et al, 1996, p. 634-641; RAINOV et al., 1997, p. 13-28; NEWCOMB et al., 1998, p. 655-667; BOUVIER-LABIT et al., 1998, p. 381-388).

Outros concluíram pela sua participação como fator negativo de prognóstico (JAROS et al., 1992, p. 373-385; HIESIGER et al., 1993, p. 93-104; ZHU et al., 1996, p. 809-815; KORKOLOPOULOU et al., 1997, p. 1269-1278; ETIENNE et al., 1998, p. 2383-2390).

No entanto, a falta de estratificação e análise adequada de variáveis nesses estudos não permitem correlação adequada de dados, prejudicando as conclusões.

Em termos absolutos, esta análise revela que o achado de 77,1% de positividade de EGFR para o grupo primário é o maior registrado entre os estudos relevantes analisados, onde ocorreram variações de 25% a 65% (LAERUM et al., 2001, p. 1-8; BURTON et al., 2002, p. 180-187). As células do grupo de alta positividade nos estudos de LAERUM et al. (2001, p. 1-8) induziram, em laboratório, um alto grau de invasibilidade tumoral, em comparação com o grupo de células EGFR negativos, cujos pacientes também tiveram melhor sobrevida.

A análise da participação do EGFR como elemento etiopatogênico e como fator de prognóstico se torna complexa, pela interação com múltiplas variáveis que podem também influir na sobrevida, como a idade e p53. Outros fatores que poderiam participar com significância dos mecanismos proliferativos do ciclo celular (oncogenes e genes supressores) já comentados em seções anteriores e que não foram incluídos neste estudo, poderiam fazer parte de sub-grupos de comportamento diverso.

No entanto, há suficiente evidência, nesta análise, para caracterizar clinicamente a hiperexpressão de EGFR como elemento patogênico importante no glioblastoma. A demonstração de seu predomínio e de sua interação num grupo bem caracterizado em termos de percentual de positividade, média de idade, sobrevida e relação com p53 foram bem delineadas. Isso possibilitou a estratificação de dados homogêneos, colocando seus componentes num grupo (primário) de comportamento biológico bem definido e de pior prognóstico.

A partir dessas informações é possível ser sugerida a necessidade da determinação da imunopositividade do EGFR como avaliação de rotina, além da avaliação histopatológica, no glioblastoma. A identificação de sua hiperexpressão, particularmente na presença das co-variáveis descritas teria valor prognóstico.

Novas implicações terapêuticas, diversas das convencionais, baseadas em estudos experimentais e em ensaios clínicos iniciais, encontram maior suporte nos achados da presente análise, ao se definir um sub-grupo de pacientes em que o EGFR poderia servir de alvo específico de tratamento.

O emprego de agentes do tipo anticorpo monoclonal, drogas inibidoras de tirosina quinase, responsáveis pela transdução de sinais mitogênicos da membrana para o interior celular, agentes inibidores das PKCs, que integram vias regulatórias do ciclo celular ligadas ao EGFR, são exemplos de ensaios experimentais e clínicos da fase I e II que se revelam promissores ao focalizar EGFR como alvo terapêutico (ELLER et al., 2002, p. 1005-1013; LAL et al., 2002, p. 3335-3339; KAPOOR; O'ROURFE, 2003, p. 1425-1435).

A resistência ao tratamento adjuvante (terapia por radiação e quimioterapia), sugerida experimentalmente e atribuída em parte à hiperexpressão de EGFR, poderia também ser atenuada pelo uso de agentes específicos tipo AG/479, anti-EGFR (BARKER et al., 2001, p. 410-418; NAGANE et al., 2001, p. 472-479; CHAKRAWARTI et al., 2002, p. 4307-4312).

A sugestão de existência de um sub-grupo específico de pacientes, em que o EGFR poderia servir de alvo terapêutico, identificado nos moldes do presente

estudo, deve estimular possibilidades de novos protocolos de tratamento e abrir promissoras avenidas futuras de terapia para o glioblastoma.

#### 5.4 p53

O gene supressor p53, do cromossomo 17p, codifica a proteína p53, ligada ao DNA. Sua ação reguladora sobre o ciclo celular se dá por transcrição sobre p21, que inibe o complexo oncogênico CDK4/ciclina, impedindo a progressão da fase G1 para a fase S do ciclo celular (CROTEAU et al., 2001, p. 60-81).

Além disso, p53 participaria também dos fenômenos de apoptose, nas células que sofrem dano ao DNA.

O transtorno funcional de p53 implicaria na perda de sua capacidade apoptótica e de inibição sobre o ciclo celular, ao cessar sua atividade reguladora sobre o DNA. (NUSSBAUM; MCINNES; WILLARD, 2002, p. 285-290).

Apesar dos conhecimentos recentemente adquiridos através da biologia molecular, a importância clínica da determinação de p53 permanece como objeto de discussão.

Na presente análise, as alterações de p53, determinadas por imunohistoquímica, conforme descrito, foi estudada em 2 grupos de pacientes portadores de glioblastoma, separados em primário e secundário, de acordo com critérios de duração de história clínica estabelecidos na literatura, conforme citados na seção anterior. A variável p53 foi também cotejada com as variáveis EGFR, e sobrevida, tendo a idade como co-variável.

O predomínio percentual de p53 no grupo secundário foi superior ao primário, com significância estatística ( $p < 0,0001$ ).

Quando a sobrevida foi analisada como variável, o grupo secundário, onde predomina o p53, mostrou sobrevida superior ao primário, de forma significativa ( $p = 0,0427$ ).

Quando a população de p53 foi comparada à de EGFR no grupo secundário, o predomínio percentual de p53 foi estatisticamente significativo ( $p = 0,0002$ ).

No grupo primário, o percentual de p53 foi significativamente inferior ao de EGFR ( $p < 0,0001$ ).

No grupo secundário, em números absolutos, a positividade de p53 foi de 100%, sendo 60% negativos para EGFR.

Na análise da associação entre percentual positivo de p53 e tempo de sobrevida na população geral, houve correlação significativa ( $p = 0,0273$ ), estabelecendo valor prognóstico favorável à positividade de p53.

Conforme descrito na metodologia, a caracterização de anormalidade da proteína p53 foi determinada por imunohistoquímica, baseada na reação contra o anticorpo monoclonal anti-p53. A proporção de p53 positivo deve refletir conceitualmente o grau de mutação do gene supressor correspondente, na população estudada.

Do ponto de vista genético, a mutação mais frequentemente detectada em p53 ocorre entre os exons 5 a 8 do gene. O tipo de mutação mais comumente encontrada é a chamada "mutação em ponto", em que apenas uma base nitrogenada do complexo molecular é substituída, alterando dessa forma a seqüência de transcrição e codificação da proteína, que é modificada na sua estrutura e função (McDONALD, 1996, p. 13-31; NUSSBAUM; MCINNES; WILLARD, 2002, p. 13-27).

O método genético mais fidedigno de detecção desse tipo de mutação é o da análise de reação em cadeia da polimerase (PCR), que demonstra as alterações moleculares das fitas de DNA, seguidas de análise seqüencial. As eventuais diferenças entre percentual de imunopositividade e de mutações, avaliados por diferentes métodos poderiam eventualmente prejudicar a análise de resultados. No entanto, de acordo com os trabalhos comparativos entre os dois métodos mencionados na literatura, embora possa haver alguma discrepância percentual, ela não é significativa a ponto de alterar a análise dos resultados e objetivos a serem alcançados. Watanabe et al., (1996, p. 217-224) encontraram 67% de mutações contra 90% de casos imunopositivos, e ambos os achados foram significativamente menores nos glioblastomas de pior sobrevida.

De acordo com Newcomb et al., (1998, p. 655-677), mais de 90% dos seus pacientes imunopositivos também apresentavam mutações. Para Simmons et al. (2001, p. 1122-1128) geralmente as mutações de p53 são também hiperexpressas, mas o reverso não é verdadeiro, isto é, o número de casos imunopositivos deve exceder os mutantes, numa mesma amostra. Esses achados são corroborados por Burton et al. (2002, p. 180-187).

Considerando tais fatos, deduz-se que a imunopositividade pode não representar apenas um marcador de mutação gênica, mas refletir também, de uma forma mais abrangente, outras anormalidades nas vias de sinalização do complexo ciclo que envolve p53, às quais contribuiriam da mesma forma para seu prejuízo funcional

Apesar dos avanços ocorridos no conhecimento dos mecanismos genéticos, o papel de p53 como fator participante da gênese do glioblastoma expresso com relevância clínica e sua importância no prognóstico permanece controverso. Alguns autores creditam à sua alteração um pior prognóstico. (JAROS et al., 1992, p. 373-385; SOINI et al., 1994, p. 786-792; KORKOLOPOULOU et al., 1997, p. 1269-1278).

Outros não estabeleceram valor prognóstico à sua anormalidade (RAINOV et al., 1997, p. 13-28; NEWCOMB et al., 1998, p. 655-667; KRAUS et al., 2001, p. 263-272). No entanto dois estudos recentes relacionaram disfunção de p53 com maior sobrevida (TADA et al., 1998, p. 1793-1797; BURTON et al., 2002, p. 180-187).

Diferenças metodológicas nos critérios de seleção e ausência de estratificação adequada das variáveis devem influir nessas discrepâncias. Os achados definem, no presente estudo, um subgrupo específico de pacientes, cuja história clínica é mais longa, onde a média de idade é inferior à da população estudada, onde a sobrevida é maior do que a da população geral e onde o predomínio de p53 é superior ao EGFR de forma significativa.

Essa caracterização de um grupo de melhor prognóstico, aqui denominado secundário, encontra suporte na literatura. (KLEIHUES; OHGAKI, 1999, p. 44-51)

Novamente a comparação deste grupo com o anteriormente descrito (primário) sugere comportamento biológico distinto, provavelmente com base nas diferenças genéticas, a julgar pelas discrepâncias de predomínio de p53 e EGFR entre ambos.

Dessa forma, a etiopatogenia do grupo primário estaria relacionada com os desarranjos moleculares de EGFR, conforme já descrito, a partir da célula tronco e progenitoras, resultando diretamente na origem do glioblastoma.

A evolução clínica mais arrastada, associada à menor média de idade e maior sobrevida dos pacientes do grupo secundário sugere uma etiopatogenia molecular diversa, em que o aspecto fenotípico final do glioblastoma resultaria de uma progressão à partir de um astrocitoma mais diferenciado. Essa hipótese encontra suporte nos trabalhos de Watanabe et al., (1996, p. 217-224) e Shiraishi et al., (2002, p. 249-257), que ao avaliarem biópsias prévias de casos de astrocitomas que progrediram para glioblastoma, encontraram significativo percentual de alterações de p53, variando de 30-40% nos astrocitomas e evoluindo para 60-70% nos astrocitomas anaplásicos. É sugerido também que a progressão final para glioblastoma dependeria adicionalmente de outras alterações moleculares, que não somente as de p53 iniciais, envolvendo também o gene PTEN, outro regulador do ciclo proliferativo, além de hiperexpressão de  $PGFR\alpha$  (KLEIHUES et al., 2000, p. 29-40). Os achados da presente análise encontram suporte na descrição das alterações progressivas acima citadas, incriminando a anormalidade de p53 como provável fator etiopatogênico do glioblastoma no grupo secundário e também como marcador prognóstico em função do comportamento biológico mais arrastado desse tipo de tumor.

O conhecimento advindo das informações contidas no presente trabalho pode fornecer substrato à aplicação de novas modalidades terapêuticas em desenvolvimento. Para tais procedimentos encontrarem suporte clínico, torna-se necessária a incorporação de métodos de diagnóstico na prática diária que identifiquem as anormalidades genéticas, além da histopatologia convencional.

A definição de um subgrupo de p53 imunopositivo predominante, com as características descritas nesta análise, poderá trazer à tona novas sugestões terapêuticas, que envolveriam abordagens inovativas, direcionadas não só a suprimir a proliferação no glioblastoma, mas também, quando dirigidas aos astrocitomas, prevenir a progressão à malignidade.



O desenvolvimento de técnicas de terapia gênica, em laboratório e em ensaios clínicos de fase I, buscam promissoramente restaurar a função de p53, pela introdução na célula tumoral, da proteína p53 normal ("wild type"). Essas transduções "in vitro" e "in vivo", utilizando retrovírus, adenovírus, ou plasmídeos como vetores, têm demonstrado retificação das anormalidades moleculares através da regularização fenotípica das células tumorais, incremento da apoptose e parada de crescimento, além de aumentarem a sensibilidade das células à radiação ionizante e a quimioterápicos (GOMEZ-MANZANNO; KUEYO; KYRITSIS, 1996, p. 694-699; DORIGO et al., 1998, p. 535-540; HOROWITZ, 1999, p. 500-509; IKEDA et al., 2001, p. 35-43; CHIOKA, 2003, p. 364-373).

A adição de diferentes genes supressores num mesmo vetor têm sido sugerida com intuito de produzir efeito inibitório somado sobre diferentes etapas do ciclo celular. (WANG et al., 2001, p. 173-180; KIM et al., 2002, p. 143-150).

Em resumo, o presente trabalho define dois sub grupos distintos ligados ao glioblastoma, caracterizados em suas variáveis de forma estatisticamente significante, identificando dois possíveis fatores etiopatogênicos (EGFR e p53), relacionados também com o tempo médio de sobrevida.

A análise atribui a ambos valor prognóstico, quando analisados em confronto com a população geral (p53) e com subgrupos específicos (p53 e EGFR). Os resultados permitem também sugerir a incorporação rotineira de métodos de imunohistoquímica e no futuro próximo de genética molecular à análise histopatológica convencional, na busca de refinamento na obtenção de informações quanto à etiopatogenia e prognóstico das lesões. Dessa forma a identificação de fatores oncogênicos poderá também fornecer subsídios adicionais ao desenvolvimento de estratégias terapêuticas dirigidas a alvos específicos.

Finalmente, as informações aqui disponibilizadas poderão servir de base a novos protocolos de investigação que poderão contribuir para o aprofundamento dos conhecimentos acerca dos complexos mecanismos relacionados com a gênese e tratamento do glioblastoma.

## 6 - CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo permitem concluir que:

- a) Foram identificados dois sub-grupos de glioblastoma, com comportamento clínico e biológico diversos.
- b) As evidências produzidas sinalizam a importância de p53 como fator participante na gênese e tempo de sobrevida no sub-grupo de melhor prognóstico, além de servir como marcador de prognóstico favorável na população geral estudada.
- c) As evidências produzidas apontam para a importância do EGFR como elemento influente na gênese e tempo de sobrevida do glioblastoma, particularmente no sub-grupo de pior prognóstico.
- d) O índice proliferativo determinado pelo marcador Ki-67 não foi identificado como elemento determinante de prognóstico nos dois sub-grupos identificados.

ANEXO 1 TERMO DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA MÉDICA  
DO HOSPITAL NOSSA SENHORA DAS GRAÇAS

Curitiba, 11 de novembro de 2003.

## **Parecer Consubstanciado**

**Comissão de Ética em Pesquisa**

**Hospital Nossa Senhora das Graças/ Unidade de Neurologia Clínica S/C Ltda**

**Projeto "O valor prognóstico da determinação histoquímica da proteína do gene supressor Tp53 e do receptor do fator de crescimento epitelial no glioblastoma"**

**Pesquisador Responsável: Dr. João Cândido de Araujo**

**Instituição: Hospital Nossa Senhora das Graças**

**Data de apresentação: 14 de outubro de 2003**

**Data da reunião de avaliação de relatórios: 04 de novembro de 2003**

A Comissão recebeu relatório da médica Dra. Loreni S. Kovalhuk.

Estudo inclui a revisão de 60 casos de glioblastoma, em que os pacientes foram submetidos a tratamento cirúrgico entre janeiro de 1991 a dezembro de 2002. O protocolo de pesquisa inclui análise de material de biópsia cirúrgica excisional previamente coletado. Os objetivos são analisar alterações genéticas e o índice proliferativo ocorridos em amostras de tumores, por técnica de imunohistoquímica. Será feita a determinação da presença da proteína p53 (marcador da anormalidade mutacional do gene codificador Tp53) e a caracterização da hiperexpressão do receptor do fator de crescimento epitelial (reflexo de mutação gênica), quanto ao valor prognóstico da ocorrência simultânea ou mutuamente excludente destes parâmetros. As informações prognósticas poderão auxiliar na identificação de subgrupos de pacientes com glioblastoma com evolução clínica diversa, que poderão se beneficiar de novas opções terapêuticas. O protocolo de pesquisa não adiciona riscos ao tratamento do indivíduo na pesquisa e a confidencialidade será preservada.

Sem mais, atentamente,



**Dra Lúcia Cristina Manoel de Macedo**  
Coordenadora

### Documentos incluídos

1. Protocolo de pesquisa
2. Termo de consentimento livre e esclarecido
3. Folha de rosto
4. Declaração do investigador sobre orçamento e centros onde o estudo se realizará
5. Carta de aprovação desta Comissão
6. Curriculum vitae do pesquisador responsável

## ANEXO 2

Iniciais do paciente _____ Número do paciente _____
--

### Informações para o paciente e Consentimento Livre e Esclarecido

#### AVALIAÇÃO DOS FATORES PROGNÓSTICOS EM GLIOBLASTOMA

**Nome do paciente:** \_\_\_\_\_

**Número do paciente:** \_\_\_\_\_

**Nome e Endereço do investigador:** João Cândido Araújo

R. Alcidez Munhoz, 433 – Curitiba-PR – 80810-040

**Telefone:** 41-3350191

<p><b>Este documento deve estar em duas vias, uma para o paciente, outra para o investigador.</b></p>
---

**Caro paciente,**

Por favor, leia este documento com atenção. Trata-se de um convite para participar de uma pesquisa, na qual você não é obrigado a participar. É importante que você leia todas essas informações para conhecer a proposta do estudo. Se você não entender qualquer informação deste formulário, seu médico estará a disposição para esclarecer suas dúvidas.

**Objetivo do estudo**

Analisar alterações genéticas ocorridas nos tumores em estudo, através das alterações de proteína ocorridas, que são demonstráveis por métodos de imunohistoquímica, no mesmo material patológico previamente estudado. Outros elementos clínicos, patológicos e radiológicos já foram avaliados e correlacionados. Serão estudados neste desdobramento do projeto, na mesma população o índice proliferativo dos tumores e alterações ocorridas nos genes supressores (p53, p21, p27). e oncogenes (EGFR). A análise dos dados extraídos, isoladamente e em correlação com os já existentes, deverá fornecer novos subsídios para melhor compreensão do comportamento biológico do tumor, nuances de prognóstico e novas estratégias terapêuticas.

**Eu sou obrigado a participar do estudo?**

Não. Sua participação é voluntária. Se você preferir não participar, não precisa se explicar. Você também pode desistir a qualquer momento sem dar explicações. Seu acompanhamento médico e relacionamento não serão afetados.

**O que vai acontecer se eu participar?**

Se você concordar em participar do estudo, antes de mais nada, nós pediremos que você assine um termo de adesão ao estudo (este consentimento informado). Durante o estudo você passará por consultas médicas rotineiras, as mesmas que se submeteria caso não concorde com a adesão, consultas estas para controle do tratamento vigente. Caso o paciente esteja impossibilitado de comparecer a consulta, faremos contato telefônico para controle evolutivo. O paciente deverá informar o médico caso haja qualquer intercorrência no período de acompanhamento, ficando o ônus do contato telefônico a cargo do investigador.

**Quais são os benefícios do estudo?**

O estudo pode conduzir à identificação de fatores prognósticos modificáveis, beneficiando futuros portadores deste tumor cerebral bem como permitindo a implantação de novas modalidades terapêuticas baseadas nas evidências fornecidas pela presente investigação.

**Quais os riscos envolvidos?**

Nenhum. Dado que o estudo não apresenta nenhuma intervenção diferente da rotina do tratamento do glioblastoma, o presente estudo não adiciona nenhum risco extra ao tratamento do indivíduo envolvido na pesquisa.

**Haverá algum custo envolvido?**

Você não será pago diretamente por participar do estudo, mas qualquer gasto extra com telefone ou transporte para consultas será reembolsado. Consultas extras, fora da rotina de tratamento, também serão reembolsadas.

**Quem está organizando e conduzindo o estudo?**

O estudo foi organizado e será conduzido pelos Serviços de Neurocirurgia e Patologia do Hospital Nossa Senhora das Graças em conjunto com o Serviço de Neuropatologia do Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná, ambos em Curitiba, Paraná.

**Confidencialidade**

Sua privacidade estará protegida. As pessoas que trabalham neste estudo vão verificar seu prontuário. Pela assinatura deste termo de consentimento, você está concordando em permitir que estas pessoas vejam estas anotações. Quando os resultados deste estudo forem publicados, sua identidade continuará preservada ficando toda responsabilidade por sua privacidade diretamente ligada ao pesquisador principal deste estudo.

**Posso mudar de idéia?**

Sua participação no estudo é voluntária. Você não estará abrindo mão de seus direitos se assinar este termo de consentimento. Você pode desistir do estudo a qualquer momento, sem afetar seu tratamento presente ou futuro. Da mesma forma você pode ser desligado do estudo caso não siga corretamente as orientações do seu médico.

**Quem contactar**

Por favor, releia e estude essas informações e esclareça suas dúvidas. Você pode contatar o médico do estudo, Dr. João Cândido Araújo pelo telefone 41-3350191, a qualquer momento se tiver outras dúvidas. Ele vai lhe manter atualizado sobre o estudo bem como pode fornecer qualquer informação sobre seus direitos como sujeito da pesquisa.

*Consentimento Informado do paciente ou representante legal*

**Favor preencher abaixo o nome do médico com quem você falou sobre o estudo e assinale um X nas respostas abaixo. (coluna do SIM ou do NÃO)**

Eu falei com o Dr. \_\_\_\_\_ sobre o estudo.

PERGUNTA	Sim	Não
1. Eu li o consentimento informado e tenho uma cópia deste		
2. Eu pude conversar com o médico e esclarecer todas as minhas dúvidas		
3. O médico explicou-me o estudo e eu entendi		
4. Eu entendo que vou receber informações sobre os objetivos do estudo neste consentimento informado		
5. Eu entendo que as informações sobre este estudo serão mantidas dentro de sigilo, sem qualquer identificação do paciente		
6. Eu entendo que tenho liberdade para desistir do estudo a qualquer momento, sem dar qualquer explicação e sem prejuízo em futuros tratamentos		
7. Eu concordo em participar do estudo e dou meu consentimento pleno e espontâneo.		

Nome do paciente: (letra de forma) \_\_\_\_\_

Assinatura do paciente: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Nome da testemunha: (letra de forma) \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Nome do médico: (letra de forma) \_\_\_\_\_

Assinatura do médico: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

### ANEXO 3 - INSTRUMENTO UTILIZADO PARA COLETA DOS DADOS DE REVISÃO DOS PRONTUÁRIOS MÉDICOS E DADOS DE SEGUIMENTO

## 1) Identificação

Nome: \_\_\_\_\_ Idade \_\_\_\_\_  
 Registro: \_\_\_\_\_ Sexo M F Cirurgião: \_\_\_\_\_  
 Endereço: \_\_\_\_\_  
 Data da internação: / / Data do diagnóstico / /  
 2) Clínica (HX + EF) Cefaléia N/V Papiledema  
 Déficit focal Outros

Duração início sintomas / diagnóstico: \_\_\_\_\_

Karnofski pré-operatório: \_\_\_\_\_

## 3) Exames de imagem

RM & TC \_\_\_\_\_

## 4) Cirurgia

Data da cirurgia / / Local da lesão: \_\_\_\_\_  
**Grau de ressecção** Total Parcial \_\_\_ % **Biópsia**  
**Complicações pós-operatórias** \_\_\_\_\_

5) Radioterapia pós-operatória S N DI: / / . DT: / / .

6) Quimioterapia S N Esquema: # de ciclos

## 7) Evolução

Estado atual \_\_\_\_\_  
 Karnofski (6m) (12m) (18m) (24m) (36m)

8) Reoperação S N Data:

Karnofski pré-op nesta ocasião:

## 9) Morte

Data: / / .

Causa Morte: Relacionada ao GBM S N

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADELMAN, L. S. Grading astrocytomas. **Neurosurg Clin N Am**, Philadelphia, v. 5, n. 1, p. 35-41, jan. 1994.
- ALEXANDER, E.; LOEFFLER, J. S. Radiosurgery for primary malignant brain tumors. **Semin Surg Oncol**, Hoboken, v. 14, n. 1, p. 43-52, jan./feb. 1998.
- AMAR, A. P.; ZLOKOVIC, B. V.; APPUZO, M. L. Endovascular restorative neurosurgery: a novel concept for molecular and cellular therapy of the nervous system. **Neurosurgery**, Baltimore, v. 52, n. 2, p. 402-412, feb. 2003.
- ARAUJO, J. C. Glioblastoma multiforme. In: SIQUEIRA, M. G.; NOVAES, V. (Ed.). **Tumores intracranianos**. Porto Alegre: Edições Missau, 1982. p. 145-176.
- ARAUJO, J. C. Oligodendrogliomas. In: SIQUEIRA, M. G.; NOVAES, V. (Ed.). **Tumores intracranianos**. Rio de Janeiro: Revinter, 1999. p. 191-195.
- ARAUJO, J. C. Tratamento cirúrgico dos gliomas em áreas eloqüentes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEUROCIRURGIA, XXIV, 2002, Fortaleza. **SBN**. Fortaleza: SBN, 2002, CD-ROM.
- ARCHER, G. E.; SAMPSON, J. H.; LORIMER, J.A.; McLENDON, R. E.; KUAN, C. T.; FRIEDMAN, A. H.; PASTAN, I. H.; BIGNER, D. D. Regional treatment of epidermal growth factor receptor VIII expressing neoplastic meningitis with a single-chain immunotoxin, MR-1. **Clin Cancer Res**, Philadelphia, v. 5, n. 9, p. 2646-2652, sep. 1999.
- ARCHIBALD, Y. M.; LUNN, D.; RUTTAN, L. A., MACDONALD, D. R.; DEL MAESTRO, R. F.; BARR, H. W.; PEXMAN, J. H.; FISHER, B. J.; GASPAR, L. E.; CAIRNCROSS, J. G.: Cognitive functioning in long-term survivors of high-grade glioma. **J Neurosurg**, Chicago, v. 80, n. 2, p. 247-253, feb. 1994.
- BANCROFT, J. D.; STEVENS, A. **Theory and practice of histological techniques**. New York: Churchill Livingstone, 1977.
- BARKER, F. G.; DAVIS, R. L.; CHANG, S. M.; PRADOS, M. D.: Necrosis as a prognostic factor in glioblastoma multiforme. **Cancer**, New York, v. 77, n. 6, p. 1161-1166, mar. 1996.
- BARKER, F. G.; SIMMONS, M. L.; CHANG, S. M.; PRADOS, M. D.; LARSON, D. A.; SNEED, P. K. WARA, W. M.; BERGER, M. S.; CHEN, P.; ISRAEL, M. A.; ALDAPE, K. D. Epidermal growth factor receptor over expression and radiation response in glioblastoma multiforme. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, New York, v. 51, n.2, p. 410-418, oct. 2001.

BARKER, F. G.; CHANG, S. M.; LARSON, D. A.; SNEED, P. K.; WARA, W. M., WILSON, C. B.; PRADOS, M. D. Age and radiation response in glioblastoma multiforme. **Neurosurgery**, Baltimore, v. 49, n. 6, p. 1288-1297, dec. 2001.

BATZDORF, U.; MALAMUD, U.: The problem of multicentric gliomas. **J Neurosurg**, Chicago, v. 20, p. 122-126. feb. 1963.

BELLO, L.; LUCINI, V.; GIUSSANI, C.; CARRABBA, G.; PLUDERI, M.; SCAGLIONE, F.; TOMEI, G.; VILLANI, R.; BLACK, P. M., BIRKFALIA, A.; CARROLL, R. S. IS201, a specific alphavbeta3 integrin inhibitor, reduces glioma growth "*in vivo*". **Neurosurgery**, Baltimore, v. 52, n. 1, p. 177-185, jan. 2003.

BECKER, G.; HOFMANN, E.; WOYDT, M.; HULSMANN, U.; MAURER, M.; LINDNER, A.; BECKER, T.; KRONE, A. Postoperative neuroimaging of high-grade gliomas: comparison of transcranial sonography, magnetic resonance imaging, and computed tomography. **Neurosurgery**, Baltimore, v. 44, n. 3, p. 469-477, mar. 1999.

BERGER, M. S.; COHEN, W. A.; OJEMANN, G. A. Correlation of motor cortex brain mapping data with magnetic resonance imaging. **J Neurosurg**, Chicago, v. 72, n. 3, p. 383-387, mar. 1990.

BERGER, M. S. Malignant astrocytomas: surgical aspects. **Semin Oncol**, v. 21, n. 2, p. 172-185, apr. 1994.

BERGER, M. S.; LEIBEL, S. A.; BRUNER, J. M.; FINLAY, J. L.; LEVIN, V. A. Primary central nervous system tumors of the supratentorial compartment. In: LEVIN, V. A. (Ed). **Cancer in the central nervous system**, 1st ed. New York: Churchill Livingstone, 1996. p. 57-126.

BERNSTEIN, J. J.; WOODARD, C. A.: Glioblastoma cells do not intravasate into blood vessels. **Neurosurgery**, Baltimore, v. 36, n. 1, p. 124-132, jan. 1995.

BERRY, M.; BUTT, A. M. Structure and function of glia in the central nervous system. In: GRAHAM, D. I.; LANTOS, P. L. (Ed.). **Greenfield's Neuropathology**, 6th ed. London: Arnold, 1997. p. 63-85.

BLACK, P. M.; BLACK, C. T.: History of neurosurgery for intracranial mass lesions. **Neurosurg Clin N Am**, Philadelphia, v. 12, n.1, p. 1-9, jan. 2001.

BOUVIER-LABIT, C.; CHINOT, O.; OCHI, C., GAMBARELLI, D.; DUFOUR, H.; FIGARELLA-BRANGER, D.: Prognostic significance of Ki67, p53 and epidermal growth factor receptor immunostaining in human glioblastomas. **Neuropathol Appl Neurobiol**, Nottingham, v. 24, n. 5, p. 381-388, oct. 1998.



BRADY, L. W.; MIYAMOTO, C.; WOO, D. V.; RACKOVER, M.; EMRICH, J.; BENDER, H.; DADPARVAR, S.; STEPLEWSKI, Z.; KOPROWSKI, H.; BLACK, P.: Malignant astrocytomas treated with iodine-125 labeled monoclonal antibody 425 against epidermal growth factor receptor: a phase II trial. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** Elmsford, v. 22, n. 1, p.225-230, jan. 1992.

BRANDES, A.; ERMANI, M.; BASSO, V.; PARIS, M.K.; LUMADRI, F.; BERTI, F.; AMISTAT, P.; GARDIMAN, M.; IUZZOLINO, P.; URAZZI, S.; MONFARDIN, S. Temozolomide in patients with glioblastoma multiforme at second relapse after first nitrosurea procarbazine failure: a phase II study. **Oncology**, Basel, New York, v. 63, n. 1, p. 38-41, jan. 2002.

BRANDES, A.; TURAZZI, S.; BASSO, V.; PASETTO, L.M.; GUGLIELMI, B.; VOLPIN, L.; IUZZOLINO, P.; AMISTAT, P.; PINNA, G.; SCIENZA, R.; ERMANI, M. A multidrug combination designed for reversing resistance to BCNU in glioblastoma multiforme. **Neurology**, Cleveland, v. 58, n. 12, p. 1759-1763, jun. 2002.

BREDEL, M.; PIRIBAUER, M.; MACOSI, C.; BIRNER, P.; GATTERBAUER, B.; FISCHER, I.; STRÖBEL, T.; RÖSSLER, K.; BUDKA, H.; HAINFELLNER, J.A. High expression of DNA topoisomerase II  $\alpha$  and Ki-67 antigen is associated with prolonged survival in glioblastoma patients. **Eur J Cancer**, v.38, n. 10, p. 1343-1347, jul. 2002.

BRONSTEIN, K. S.: Epidemiology and classification of brain tumors. **Crit Care Nurs Clin North Am**, v. 7, n.1, p. 79-89, mar. 1995.

BURGER, P. C.; GREEN, S. B.: Patient age, histologic features, and length of survival in patients with glioblastoma multiforme. **Cancer**, New York, v. 59, n. 9, p.1617-1625, may 1987.

BURGER, P. C.; VOLLMER, R. T.: Histologic factors of prognostic significance in the glioblastoma multiforme. **Cancer**, New York, v. 46, n. 1, p. 1179-1186, sep. 1980.

BURTON, E.C.; LAMBORN, K.R.; FORSYTH, P.; SCOTT, J.; O'CAMPO, J.; UYEHARA-LOCK, J.; PRADOS, M.; BERGER, M.; PASSE, S.; UHM, J.; O'NEILL, B. P.; JENKINS, R. B.; ALDAPE, K. D.: Aberrant p53, mdm2, and proliferation differ in glioblastomas from long-term compared with typical survivors. **Clin Cancer Res**, Denville, v. 8, n. 1, p.180-187, jan. 2002.

BURTON, E.C.; LAMBORN, K.R.; FEURSTEIN, B.G.; PRADOS, M. SCOTT, J.; PASSE, S.; JENKINS, R.B.; ALDAPE, K.D. Genetic aberrations defined by comparative genomic hybridization distinguish long term from typical survivors of glioblastoma. **Cancer Res**, Chicago, v.62, n. 21, p. 6205-6210, nov 2002.

CAIRNCROSS, J.G.; UEKI, K.; ZLATESCU, M. C.; LISLE, D. K.; FINKELSTEIN, D. M.; HAMMOND, R. R.; SILVER, J. S.; STARK, P. C.; MACDONALD, D. R.; INO, Y.; RAMSAY, D. A.; LOUIS, D. N.: Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. **J Natl Cancer Inst**, v. 90, n. 19, p. 1473-1479, oct. 1998.

CARLSON, B. M. **Human embryology & developmental biology**, 2nd ed. St. Louis: Mosby, 1999.

CARTRON, P.F.; OLIVER, L.; MARTIN, S.; MOREAU, C.; LeCABELLEC, M.T.; JESQUEL, P.; MEFLAH, K.; VALLETTE, F.M. The expression of a new variant of the pro apoptotic molecule Baxpsi, is correlated with an increased survival of glioblastoma patients. **Human Mol Genet**, Oxford, v. 11, n. 6, p. 675-687; mar. 2002.

CASTILLO, M.; KWOCK, L.; SCATLIFF, J.; MUKHERJI, S. K.: Proton MR spectroscopy in neoplastic and non-neoplastic brain disorders. **Magn Reson Imaging Clin North Am**, Philadelphia, v. 6, n. 1, p.1-20, feb. 1998.

CHANANA, A.D.; CAPALA, J.; CHADHA, M.; CODERRE, J.A.; DIAZ, A.Z.; ELOWITZ, E.H.; IWAI, J.; JOEL, D.D.; LIU, H.G.B.; PENDIZICK, N.; PERESS, N.S.; SHADY, M.S.; SLATKIN, D.N.; TYSON, G.W.; WIELOPOLSKI, L. Boron neutron capture therapy for glioblastoma multiforme: Interim results from the phase I/II dose escalation studies. **Neurosurgery**, Baltimore, v. 44, n. 6, p. 1182-1192, jun 1999.

CHANDLER, K. L.; PRADOS, M. D.; MALEC, M.; WILSON, C. B.: Long-term survival in patients with glioblastoma multiforme. **Neurosurgery**, Baltimore, v. 32, n. 5, p. 716-720, may 1993.

CHANG, C.H.; HORTON, J.; SCHOENFELD, D.; SALAZER, O.; PEREZ-TAMAYO, R.; KRAMER, S.; WEINSTEIN, A.; NELSON, J.S.; TSUKADA, Y.: Comparison of postoperative radiotherapy and combined postoperative radiotherapy and chemotherapy in the multidisciplinary management of malignant gliomas. A joint Radiation Therapy Oncology Group and Eastern Cooperative Oncology Group study. **Cancer**, New York, v. 52, n. 6, p.997-1007, sep. 1983.

CHAKRAVARTI, A.; CHAKLADAR, A.; DELANGY, M.A.; LATHAN, D.E.; LOEFLER, J.S. The epidermal growth factor mediates resistance to sequential administration of radiation and chemotherapy in primary human glioblastoma cells in a Ras-dependent manner. **Cancer Res**, Chicago, v. 62, n. 15, p. 4307-4315, aug. 2002.

CHESNUT, R. M.; ABITBOL, J. J.; CHAMBERLAIN, M.; MARSHALL, L. F.: Vertebral collapse with quadraparesis due to metastatic glioblastoma multiforme: case report and review of the literature. **J Neurooncol**, Boston, v. 16, n. 2, p. 135-140, may 1993.

CHIOCCA, E.A. Gene therapy: a prime for neurosurgeons. **Neurosurgery**, Baltimore, v. 53, n. 2, p. 364-373, aug. 2003.

CHOE, G.; PARK, J.K.; STEELE, J.L.; KREMEN, T.J.; LIAU, L.M.; VINTERS, H.V.; CLOUGHESY, T.F.; MITCHEL, P.S. Active matrix methaloproteinase-9 expression is associated with primary glioblastoma multiforme sub-type. **Clin Cancer Res**, Denville, v.8, n. 9, p. 2894-2901, sep 2002.

CORREA, C.F. Radioterapia intersticial para o tratamento dos tumores encefálicos. **Arq Bras Neurocir**, São Paulo, v.21, n.1-2, p. 8-40, jan/fev 2002.

CROTEAU, D.; MIKKELSEN, T.; REMPEL, S. A.; BOGLER, O.; ROSENBLUM, M.: New innovations and developments for glioma treatment. **Clin Neurosurg**, Baltimore, v. 48, p. 60-81, 2001.

CUNY, E.; LOISEAU, H.; PENCHET, G.; ELLIE, E.; AISANT, J.; VITAL, A ; VINCEDEAU, P.; DEMOTES, J.M.; Association of elevated glial expression of interleukin-1 $\beta$  with improved survival in patients with glioblastoma multiforme. **J. Neurosurg**, Chicago, v. 96, n. 2, p. 299-301, feb. 2003.

DAUMAS-DUPORT, C.; SCHEITHAUER, B.; O'FALLON, J.; KELLY, P.: Grading of astrocytomas. A simple and reproducible method. **Cancer**, New York, v. 62, n.10, p. 2152-2165, nov. 1988.

DEANGELIS, L. M.; BURGER, P. C.; GREEN, S. B.; CAIRNCROSS, J. G.: Malignant glioma: who benefits from adjuvant chemotherapy? **Ann Neurol**, Boston, v. 44, n. 4, p. 691-695, oct. 1998.

DESMEULES, M.; MIKKELSEN, T.; MAO, Y.: Increasing incidence of primary malignant brain tumors: influence of diagnostic methods. **J Natl Cancer Inst**, Bethesda, v. 84, n. 6, p. 442-445, mar. 1992.

DIRKS, P.; BERNSTEIN, M.; MULLER, P. J.; TUCKER, W. S.: The value of reoperation for recurrent glioblastoma. **Can J Surg**, Toronto, v. 36, n. 3, p. 271-275, jun. 1993.

DOHRMANN, G. J.; DUNSMORE, R. H.: Glioblastoma multiforme of the cerebellum. **Surg Neurol**, New York, v. 3, n. 4, p. 219-223, apr. 1975.

DUNN, I.F; BLACK, P. McL. The neurosurgeon as local oncologist : cellular and molecular neurosurgery in malignant glioma therapy. **Neurosurgery**, Baltimore, v. 52, n. 6, p. 1411-1424, jun. 2003.

DORIGO, O.; TURLA, S.T.; LEBEDEVA, S.; GAERSET, R.A. Sensitization of rat glioblastoma multiforme to cisplatin "*in vivo*" following restoration of "wild type" p53 function. **J Neurosurg**, Chicago, v. 88, n. 3, p. 535-540, mar. 1998.

EARNEST, F.; KELLY, P. J.; SCHEITHAUER, B. W., KALL, B. A.; CASCINO, T. L.; EHMAN, R. L.; FORBES, G. S.; AXLEY, P. L.: Cerebral astrocytomas: histopathologic correlation of MR and CT contrast enhancement with stereotactic biopsy. **Radiology**, Illinois, v. 166, n. 3, p. 823-827, mar. 1988.

ELLER, J.R.; LONGO, S.L.; HICFLIN, D.J.; CANUTA, J.W. Activity of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody C225 against glioblastoma multiforme. **Neurosurgery**, Baltimore, v. 51, n. 4, p. 1005-1013, oct. 2002.

ERMOIAN, R.P.; FRUNISS, C.S.; LAMBORN, K.R.; BASILA, D.; BERGER, M.S.; GOTTSCHAL, A.R.; NICHOLAS, M.K.; STOKOE, D.; HASS, D.A. Dysregulation of PTEN and protein kinase B is associated with glioma histology and patient survival. **Clin Cancer Res**, Denville, v. 8, n. 5, p. 1100-1106, may 2002.

ETIENNE, M. C.; FORMENTO, J. L.; LEBRUN-FRENA, Y. C.; GIOANNI, J.; CHATEL, M.; PAQUIS, P.; BERNARD, C.; COURDI, A.; BENSADOUN, R. J.; PIGNOL, J. P.; FRANCOUAL, M.; GRELLIER, P.; FRENAY, M.; MILANO, G.: Epidermal growth factor receptor and labeling index are independent prognostic factors in glial tumor outcome. **Clin Cancer Res**, Denville, v. 4, n. 10, p. 2383-2390, oct. 1998.

FINE, H.A.; FIGG, W.; JACKLE, K.; WEN, P.Y.; KYRITISIS, A.P.; LOEFER, J.S.; LEVIN, V.A.; BLACK, P.M.; KAPLAN, R.; PLUDA, J.M. Phase III trial of the antiangiogenic agent thalidomide in patients with recurrent high grade gliomas. **J Clin Oncol**, New York, v. 18, n. 4, p. 708-715, feb 2002.

FLOETH, F. W.; AULICH, A.; LANGEN, K. J.; BURGER, K. J.; BOCK, W. J.; WEBER, F.: MR imaging and single-photon emission CT findings after gene therapy for human glioblastoma. **Am J Neuroradiol**, Baltimore, v. 22, n. 8, p. 1517-1527, sep. 2001.

FULTS, D. Molecular themes in glial tumor. In: RAFFEL, C.; HARTH IV, G.R. (Ed.). **The molecular basis of neurosurgical disease**. Baltimore: Williams e Wilkins, 1996. p. 162-178.

FUSE, T.; TANIKAWA, M.; NAKANISHI, M., IKEDA, K.; TADA, T.; INAGAKI, H.; ASAI, K.; KATO, T.; YAMADA, K.: p27Kip1 expression by contact inhibition as a prognostic index of human glioma. **J Neurochem**, London, v. 74, n. 4, p. 1393-1399, apr. 2000.

GANJU, V.; JENKINS, R. B.; O'FALLON, J. R., SCHEITHAUER, B. W.; RANSOM, D. T.; KATZMANN, J. A.; KIMMEL, D. W.: Prognostic factors in gliomas. A multivariate analysis of clinical, pathologic, flow cytometric, cytogenetic, and molecular markers. **Cancer**, New York, v. 74, n. 3, p. 920-927, aug. 1994.

GILBERT, M.R.; FRIEDMAN, H.S.; KUTTECH, J.F.; PRADOS, M.D.; OLSON, J.J.; REAMAN, G.H.; ZAKENDEN, S.L. A phase II study of temozolomide in patients with newly diagnosed supratentorial malignant glioma before radiation therapy. **Neuro-oncol**, Charlottesville, v. 4, n. 4, p. 261-267, oct. 2002.

GLIOMA META-ANALYSIS TRIALISTS GROUP. Chemotherapy in adult high grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomized trials. **Lancet**, London, v. 359, n. 23, p. 1011-1018, mar. 2002.

GREIG, N. H.; RIES, L. G.; YANCIK, R.; RAPOPORT, S. I.: Increasing annual incidence of primary malignant brain tumors in the elderly. **J Natl Cancer Inst**, Bethesda, v. 82, n. 20, p. 1621-1624, oct. 1990.

GOMEZ-MANZANO, C.; KUEYO, J.; KYRITSIS, A.P. Adenovirus mediated transfer of the p53 gene produces rapid and generalized deaths of human glioma cells via apoptosis. **Cancer Res**, Chicago, v. 56, n. 4, p. 694-699, feb. 1996.

GROVES, M.D.; PUDUVALLI, V.K.; HESS, K.R.; JOECKLE, K.A.; PETERSON, P.; YUNG, A.W.K.; LEVIN, V.A. Phase II trial of temozolomide plus the matrix metalloproteinase inhibitor, Marismastat, in recurrent and progressive glioblastoma multiforme. **J Clin Oncol**, New York, v. 20, n. 5, p. 1383-1388, mar. 2002.

GURUKANGAN, S.; COKGOR, L.; RICH, J.N.; EDWARDS, S.; AFRONTTI, M.L.; QUINN, J.A.; HERNDUN, J.E.; PROVENZALE, J.M.; McLENDON, R.E.; TOURT-UHLIG, S.; SAMPSON, J.H.; STAFFORD-FOX, V.; ZAKROEN, S. EARLY, M.; FRIEDMAN, A.H.; FRIEDMAN, J.S. Phase I study of gliadel wafers plus Temozolomide in adults with recurrent supratentorial high-grade gliomas. **Neuro-oncol**, Charlottesville, v. 3, n. 4, p. 246-250, oct. 2001.

GUTIN, P.H.; POSNER, J.B. Neuro-oncology: diagnosis and management of cerebral gliomas - past, present and future. **Neurosurgery**, Baltimore, v. 47, n. 1, p. 1-8, jul 2000.

HALL, W.A.; LIU, H.; MARTIN, A.; POZZA, C.H.; MAXWELL, R.E.; TRUWITT, C.L. Safety, efficacy and functionality of high-field strength interventional magnetic resonance imaging for neurosurgery. **Neurosurgery**, Baltimore, v. 46, n. 3, p. 632-642, mar. 2002.

HANEL, R. A.: **Fatores prognósticos em glioblastoma**. Curitiba, 2002. 101f. Dissertação (mestrado em cirurgia). Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

HERHOLZ, K.; PIETRZYK, U.; VOGES, J., SCHRODER, R.; HALBER, M.; TREUER, H.; STURM, V.; HEISS, W. D.: Correlation of glucose consumption and tumor cell density in astrocytomas. A stereotactic PET study. **J Neurosurg**, Chicago, v. 79, n. 6, p. 853-858, dec. 1993.

HERMINGHAUS, S.; DIERKS, T.; PILATUS, V.; MULLER-HARTMAN, W.; WITTSACK, J.; MARQUARDT, G.; LABISCH, C. LAUFERMAN, H.; GLENN, G.; OLDFIELD, E. Determination of histopathological tumor grade in neuroepithelial tumors by using spectral pattern analysis of "in vivo" spectroscopic data. **J Neurosurg**, Chicago, v. 98, n. 1, p. 74-81, jan. 2003.

HIESIGER, E. M.; HAYES, R. L.; PIERZ, D. M.; BUDZILOVICH, G. N.: Prognostic relevance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) and c- neu/erbB2 expression in glioblastomas (GBMs). **J Neurooncol**, Boston, v. 16, n. 2, p. 93-104, may 1993.

HOCHBERG, F. H.; LINGGOOD, R.; WOLFSON, L.; BAKER, W. H.; KORNBLITH, P.: Quality and duration of survival in glioblastoma multiforme. Combined surgical, radiation, and lomustine therapy. **JAMA**, Chicago, v. 241, n. 10, p. 1016-1018, mar. 1979.

HOLT, R. M.; MARAVILLA, K. R. Supratentorial Gliomas: Imaging. In: WILKINS, R. H.; RENGACHARY, S. S. (Eds): **Neurosurgery**, 2nd ed. New York: McGraw-Hill, 1996, p 753-774.

HOROWITZ, J. Adenovirus mediated p53 gene therapy: overview of preclinical studies and potential clinical applications. **Curr Opin Mol Ther**. London, v. 1, n. 4, p. 500-509, aug. 1999.

HOSHINO, T.; BARKER, M.; WILSON, C. B.; BOLDREY, E. B.; FEWER, D.: Cell kinetics of human gliomas. **J Neurosurg**, Chicago, v. 37, n. 1, p. 15-26, jul. 1972.

HOSHINO, T.; WILSON, C. B.; ROSENBLUM, M. L.; BARKER, M.: Chemotherapeutic implications of growth fraction and cell cycle time in glioblastomas. **J Neurosurg**, Chicago, v. 43, n. 2, p.127-135, aug. 1975.

HOSHINO, T.; WILSON, C. B.: Cell kinetic analyses of human malignant brain tumors (gliomas). **Cancer**, New York, v. 44, n. 3, p. 956-962, sep. 1979.

HOSHINO, T.; WILSON, C. B.; MURAOKA, I.: The stathmokinetic (mitostatic) effect of vincristine and vinblastine on human gliomas. **Acta Neuropathol**, Berlin, v. 47, n. 1, p. 21-25, jun. 1979.

IKEDA, J.; TADA, M.; LAYA, H.; TSUCHIYA, K.; OKAICHI, K.; MISHIMA, K.; SAWAMURA, Y.; JULCI, G.; LIU, T.J.; VANMEYER, E.C. Restoration of endogenous wild-type p53 activity in a glioblastoma cell line with intrinsic temperature sensitive p53 induces growth arrest but not apoptosis. **Int J Cancer**, Genève v. 94, n. 1, p. 35-43, oct. 2001.

IWADATE. Y.; FUJIMOTO, S.; TAGAWA, M.; NAMBA, H.; SUEYOSHI, K.; HIROSE, M.; SAKIYAMA, S.: Association of p53 gene mutation with decreased chemosensitivity in human malignant gliomas. **Int J Cancer**, Genève, v. 69, n. 3, p. 236-240, jun. 1996.

JACOBS, A.; JOGES, J.; REZKE, R.; LERCHER, M.; GROSSMAN, N.A.; KRACHT, L.; KAEST, C.; WAGNER, R.; WIENHARD, K.; WEISS, W.D. Positron emission tomography of vector mediated gene expression in gene therapy for gliomas. **Lancet**, London, v. 358, n. 9283, p. 727-729, sep. 2001.

JAROS, E.; PERRY, R. H.; ADAM, L.; KELLY, P. J.; CRAWFORD, P.J.; KALBAG, R. M.; MENDELOW, A. D.; SENGUPTA, R. P.; PEARSON, A. D.: Prognostic implications of p53 protein, epidermal growth factor receptor, and Ki-67 labelling in brain tumours. **Br J. Cancer**, London, v. 66, n. 2, p.373-385, aug. 1992.

JONAS, S.; BECHSTEIN, W. O.; LEMMENS, H. P., NEUHAUS, R.; THALMANN, U.; NEUHAUS, P.: Liver graft-transmitted glioblastoma multiforme. A case report and experience with 13 multiorgan donors suffering from primary cerebral neoplasia. **Transpl. Int.**, Heidelberg, v. 9, n. 4, p. 426-429, apr. 1996.

KAMIRO, T.; TADA, K.; SHIKAISHI, S.; SHINOJIMA, N.; NAKAMURA, K.; FUCHI, M.; KURATSU, J.; JAYA, H.; USHIO, Y. Analysis of homozygous deletion of the p16 gene and correlation with survival with glioblastoma multiforme. **J. Neurosurg**, Chicago, v. 96, n. 5, p. 815-822, may 2002.

KAPOOR, G.S.; O'ROURKE, D.M. Mitogenic signaling cascades in glial tumors. **Neurosurgery**, Baltimore, v. 52, n. 6, p. 1425-1435, jun.2003.

KARNOFSKI, D.; ABELMANN, W.; CRAVER, L.: The nitrogen mustards in the palliative treatment of carcinoma; with particular reference to bronchogenic carcinoma. **Cancer**, New York, v. 1, p. 634-656, 1948.

KELLY, P.J.; DUMAS-DUPORT, C.; SCHEITHAUER, B.W. Stereotatic histological correlations of computed tomography and magnetic resonance imaging-defined abnormalities in patients with glial neoplasms. **Mayo Clin. Proc.**, Rochester, v. 62, n. 6, p. 450-459, jun.1987.

KERNOHAN, J. W.; MABON, R. F.; SVIEN, H. J.; ADSON, A. W.: A simplified classification of gliomas. **Proc Staff Meet Mayo Clinic**, Rochester, n. 24, p. 71-75, 1949.

KIDA, S.; ELLISON, D. W.; STEART, P. V.; WELLER, R. O.: Characterization of perivascular cells in astrocytic tumours and peritumoral oedematous brain. **Neuropathol Appl Neurobiol**, Oxford, n. 21, v. 2, p. 121-129, apr. 1995.

KIM, T. S.; HALLIDAY, A. L.; HEDLEY-WHYTE, E. T.; CONVERY, K.: Correlates of survival and the Daumas-Duport grading system for astrocytomas. **J Neurosurg**, Chicago, v 74,n. 1, p. 27-37, jan. 1991.

KIM, S.K.; WANG, F.C.; CHU, B.K.; CHUNG, H.T.; KIM, Y.Y.; SIM, S.Y.; LEE, C.T.; KIM, H.B. Interaction between p53 and p16 expressed by adenoviral vectors in human malignant glioma. **J. Neurosurg**, Chicago, v. 97, n. 1, p. 143-150, jul. 2002.

KIRLA, R.; SALMINEN, E.; HUHTALA, S., NUUTINEN, J.; TALVE, L.; HAAPASALO, H.; KALIM, H.: Prognostic value of the expression of tumor suppressor genes p53, p21, p16 and prb, and Ki-67 labelling in high grade astrocytomas treated with radiotherapy. **J Neurooncol**, Boston, v. 46, n.1, p.71-80, 2000.

KITO, I.; KUFUDA, E.; YUKOTA, A.; YAMASHITA, V. Citotoxicity in glioma cells due to interleukin-12 and interleukin-18 stimulated macrophages mediated by interferon  $\gamma$  regulated nitric oxide. **J. Neurosurg**, Chicago, v. 98, n. 2, p. 385-392, feb. 2003.

KLEIHUES, P.; BURGER, P. C.; SCHEITHAUER, B. W. The new WHO classification of brain tumours. **Brain Pathol**, Zürich, v. 3, n.3, p.255-268, jul. 1993.

KLEIHUES, P.; SOYLEMEZOGLU, F.; SCHAUBLE, B.; SCHEITHAUER, B. W.; BURGER, P. C.: Histopathology, classification, and grading of gliomas. **Glia**, New York, v. 15, n.3, p.211-221, nov. 1995.

KLEIHUES, P.; OHGAKI, H.: Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. **Neuro-Oncol**, Charlottesville, v.1, n.1, p. 44-51, jan. 1999.

KLEIHUES, P.; BURGER, P. C.; COLLINS, V. P.; NEWCOMB, E. W.; OHGAFI, I.; CAVENEE, W.K. Glioblastoma. In: KLEIHUES, P.; CAVENEE, W. K. (Ed.). **Pathology and genetics of tumors of the nervous system**. Lyon: IARC Press, 2000. p. 29-40.

KONO, K.; INOUE, Y.; NAKAYAMA, K., SHAKUDO, M.; MORINO, M.; OHATA, K.; WAKASA, K.; YAMADA, R.: The role of diffusion-weighted imaging in patients with brain tumors. **AJNR Am J Neuroradiol**, Baltimore, v. 22, n.7, p. 1081-1088, aug. 2001.

KORKOLOPOULOU, P.; CHRISTODOULOU, P.; KOUZELIS, K.; HADJIYANNAKIS, M.; PRIFTIS, A.; STAMOULIS, G.; SERETIS, A.; THOMAS-TSAGLI, E.: MDM2 and p53 expression in gliomas: a multivariate survival analysis including proliferation markers and epidermal growth factor receptor. **Br J Cancer**, London, v. 75, n. 9, p. 1269-1278, 1997.

KRAUS, J. A.; WENGHOEFER, M.; GLESMANN, N.; MOHR, S.; BECK, M.; SCHMIDT, M. C.; SCHRODER, R.; BERWEILER, U.; ROGGENDORF, W.; DIETE, S.; DIETZMANN, K.; HEUSER, K.; MULLER, B.; FIMMERS, R.; VON DEIMLING, A.; SCHLEGEL, U.: TP53 gene mutations, nuclear p53 accumulation, expression of Waf/p21, Bcl-2, and CD95 (APO-1/Fas) proteins are not prognostic factors in de novo glioblastoma multiforme. **J Neurooncol**, Boston, v. 52, n.3, p. 263-272, may 2001.



KUNKEL, P.; ULBRICHT, V.; BOHLEN, P.; BROCKMAN, M.A.; FILLBRANDT, R.; STAUROU, D.; WESTPHAL, M.; LAMZUS, K. Inhibition of glioma angiogenesis and growth "in vivo" by systemic treatment with a monoclonal antibody against vascular endothelial growth-factor receptor-2. **Cancer Res**, Chicago, v. 61, n. 18, p. 6624-6628, sep. 2001.

KYRITSIS, A. P.; BONDY, M. L.; HESS, K. R.; CUNNINGHAM, J. E.; ZHU, D.; AMOS, C. J.; YUNG, W. K.; LEVIN, V. A.; BRUNER, J. M.: Prognostic significance of p53 immunoreactivity in patients with glioma. **Clin Cancer Res**, Denville, v. 1, n.1, p. 1617-1622, dec. 1995.

LACROIX, M.; ABI-SAID, D.; FOURNEY, D. R.; GOKASLAN, Z. L.; SHI, W.; DEMONTE, F.; LANG, F. F.; MCCUTCHEON, I. E.; HASSENBUSCH, S. J.; HOLLAND, E.; HESS, K.; MICHAEL, C.; MILLER, D.; SAWAYA, R.: A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. **J Neurosurg**, Chicago, v 95, n. 2, p.190-198, aug. 2001.

LAERUM, O.D.; NYGAAR, S.J.T.; STEINE, S.; MORK, S.J.; ENGEBRAATEN, O.; PERAUD, A.; KLEIHUES, P.; OHGAKI, H. Invasiveness "in vitro" and biological markers in human primary glioblastomas. **J. Neuro-oncol**, v. 54,n. 1, p. 1-8, aug. 2001.

LAL, A.; GLAZER, C.A.; MARTINSON, H.M.; FRIEDMAN, H.S.; ARCHER, G.E.; SAMPSON, J.H.; RIGGINS, G.J. Mutant epidermal growth factor receptor up-regulates molecular effects of tumor invasion. **Cancer Res**, Chicago, v. 62, n.12, p. 3335-3339, jun. 2002.

LANTOS, P. L.; VANDENBERG, S. R.; KLEIHUES, P. Tumors of the nervous system. In: GRAHAM, D. I.; LANTOS, P. L. (Eds): **Greenfield's Neuropathology**, 6th ed. London: Arnold, 1997, p 583-879.

LARSEN, W. J. The second week. In: LARSEN, W. J. (Ed): **Human Embryology**, 2nd ed. New York: Churchill Livingstone Inc., 1997, p 33-48.

LARSON, D.A.; WARA, W. M.: Radiotherapy of primary malignant brain tumors. **Semin Surg Oncol**, New York, v. 14, n.1, p.34-42, jan./feb. 1998.

LEE, D. Y.; KIM, Y. M.; YOO, S. J.; CHO, B. K.; CHI, J. G.; KIM, I. O.; WANG, K. C.: Congenital glioblastoma diagnosed by fetal sonography. **Childs Nerv Syst**, Berlin, v. 15, n.4, p. 197-201, Apr. 1999.

LEIBEL, S. A. Teleradiotherapy: methods and expectations. In: Apuzzo, M. L. (Ed): **Malignant gliomas**. Park Ridge: American Association of Neurological Surgeons, 1990, p 159-171.

LIBERMANN, T. A.; NUSBAUM, H. R.; RAZON, H.; KRIS, R.; LAX, I.; SOREQ, H.: Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGFR gene in primary brain tumor of glial origin. **Nature**, London, v. 313, n. 5598, p.144-147, Jan. 1985.

LOKKER, N.A.; SULLIVAN, C.M.; HOLLENBACK, S.J.; ISRAEL, M.A.; GIESE, N.A. Platelet derived growth factor (PDGF) signaling regulates survival and mitogenic pathways in glioblastoma cells: evidence that the novel PDGF-C and PDGF-D ligands may play role in the development of brain tumors. **Cancer Res**, Chicago, v. 62, n. 13, p. 3729-3735, jul. 2002.

LUND-JOHANSEN, M.; BJERKVIG, R. HUMPHREY, P.A.; BIGNER, S.H.; BIGNER, D.D.; LAERUM, O.D. Effect of epidermal growth factor on glioma cell growth migration and invasion "*in vitro*". **Cancer Res**, Chicago, v. 50, n. 18, p. 6039-6044, sep.1990.

MACDONALD, D. R.: Temozolomide for recurrent high-grade glioma. **Semin Oncol**, New York, v. 28, n. 4, suppl. 13, p. 3-12, aug. 2001.

MAHALEY, M. S., JR.; METTLIN, C.; NATARAJAN, N.; LAWS, E. R., JR.; PEACE, B. B.: National survey of patterns of care for brain-tumor patients. **J Neurosurg**, Chicago, v. 71, n.6, p. 826-836, dec. 1989.

MALCA, S. A.; ROCHE, P. H.; PELLET, W.: Secondary localizations of cerebral glioblastoma. Pathogenic and anatomoclinical focus apropos of a case of multiple bone metastases disclosed by vertebral involvement. **Neurochirurgie**, Paris, v. 39, n.5, p. 315-321, 1993.

MAYO, L.D.; DIXON, J.E.; DURDEN, D.L.; TONKS, N.K.; DONNER, D.B. PTEN protects p53 from MDM2 and sensitizes cancer cells to chemotherapy. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 277, n. 7, p. 5484-5489, feb. 2002.

MCDERMOTT, M. W.; SNEED, P. K.; GUTIN, P. H.: Interstitial brachytherapy for malignant brain tumors. **Semin Surg Oncol**, New York, v.14, n. 1, p. 79-87, jan/feb. 1998.

MCDONALD, J. Nucleic acids. In: RAFFEL, C.; HARTH IV, G.R. (Ed.). **The molecular basis of neurosurgical diseases**. Baltimore: Williams e Wilkins, 1996. p. 13-31.

MCLENDON, R. E.; ENTERLINE, D. S.; TIEN, R. D.; THORSTAD, W. L.; BRUNER, J. M. Tumors of central neuroepithelial origin. In: BIGNER, D. D.; MCLENDON, R. E.; BRUNER, J. M. (Eds): **Russel and Rubinstein's Pathology of Tumors of the Nervous System**, 6th ed . London: Arnold, 1998, p 307-572.

MOORE, M. R.; BLACK, P. M.; ELLENBOGEN, R.; GALL, C. M.; ELDREDGE, E.: Stereotactic craniotomy: methods and results using the Brown-Roberts-Wells stereotactic frame. **Neurosurgery**, Baltimore, v. 25, n.4, p. 572-577, oct. 1989.

NAGANE, M.; COUFAL, F.; LIN, H.; BOGLER, O.; CAVENEE, W. K.; HUANG, H. J. A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced tumorigenicity on human glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis. **Cancer Res**, Chicago, v.56, n. 21, p. 5079-5086, nov. 1996.

NAGANE, M.; NARITA, Y.; MISHIMA, K.; LEVITZKI, A.; BURGESS, A.W.; CAVENEE, W.K.; HUANG, H.J. Human glioblastoma xenografts overexpressing a tumor specific mutant epidermal growth factor receptor sensitized to cisplatin by the AG1478 tyrosine kinase inhibitor. **J Neurosurg**, Chicago, v. 95, n. 3, p. 472-479, sep. 2001.

NAKAISO, M.; UNO, M.; HARADA, M.; KAGEJI, T.; TAKIMOTO, O.; NAGAHIRO, S. Brain abscess and glioblastoma identified by combined proton magnetic resonance spectroscopy and diffusion-weighted magnetic resonance imaging. Two case reports. **Neurol Med Chir**, Tokyo, v.42, n. 8, p. 346-348, aug. 2002.

NARITA, Y.; NAGANE, M.; MISHIMA, K.; HUANG, H.J.; FURNARI, F.B.; CAVENEE, W.K. Mutant epidermal growth factor receptor signaling down-regulates p27 growth through activation of the phosphatidylinositol 3- kinase/AKT pathway in glioblastomas. **Cancer Res**, Chicago, v. 62, n. 22, p. 6764-6769, nov. 2002.

NEGENDANK, W. G.; SAUTER, R.; BROWN, T. R., EVELHOCH, J. L.; FALINI, A.; GOTSIS, E. D.; HEERSCHAP, A.; KAMADA, K.; LEE, B. C.; MENGEOT, M. M.; MOSER, E.; PADAVIC-SHALLER, K. A.; SANDERS, J. A.; SPRAGGINS, T. A.; STILLMAN, A. E.; TERWEY, B.; VOGL, T. J.; WICKLOW, K.; ZIMMERMAN, R. A.: Proton magnetic resonance spectroscopy in patients with glial tumors: a multicenter study. **J Neurosurg**, Chicago, v. 84, n. 3, p. 449-458, mar. 1996.

NELSON, J. S.; TSUKADA, Y.; SCHOENFELD, D., FULLING, K.; LAMARCHE, J.; PERESS, N.: Necrosis as a prognostic criterion in malignant supratentorial, astrocytic gliomas. **Cancer**, New York, v.52, n. 3, p. 550-554, aug. 1983.

NEWCOMB, E. W.; COHEN, H.; LEE, S, R.; BHALLA, S. K.; BLOOM, J.; HAYES, R. L.; MILLER, D. C.: Survival of patients with glioblastoma multiforme is not influenced by altered expression of p16, p53, EGFR, MDM2 or Bcl-2 genes. **Brain Pathol**, Zurich, v. 8, n. 4, p.655-667, oct. 1998.

NICHOLS, T.L.; KABALKA, G.W.; MILLER, L.F.; KHAN, M.K.; SMITH, G.T. Improved treatment planning for boron neutron capture therapy for glioblastoma multiforme using fluorine-18 labeled boronophenylamine and positron emission tomography. **Med Phys**, Lancaster, v. 29, n. 10, p. 2351-2358, oct. 2002.

NITTA, T.; SATO, K.: Prognostic implications of the extent of surgical resection in patients with intracranial malignant gliomas. **Cancer**, New York, v. 75, n. 11, p. 2727-2731, jun. 1995.

NUSBAUM, R. L.; MCINNES, R. R.; WILLARD, H. F. Genética e câncer. In: THOMPSON E THOMPSON (Ed.). **Genética Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2002. p. 274-293.

NWOKEDI, E.C.; DIBIASE, S.J.; JABBOUR, S.; HERMAN, J.; AMIN, P.; CHIN, L.S. Gamma-knife stereotactic radiosurgery for patients with glioblastoma multiforme. **Neurosurgery**, Baltimore, v. 50, n. 1, p. 41-46, jan. 2002.

O'RAHILLY, R.; MÜLLER, F. The first appearance of the nervous system. In: O'RAHILLY, R.; MÜLLER, F. (Eds): **The Embryonic Human Brain**. New York: Wiley-Liss Inc, 1994. p. 29-34.

OEHRING, R. D.; MILETIC, M.; VALTER, M. M., PIETSCH, T.; NEUMANN, J.; FIMMERS, R.; SCHLEGEL, U.: Vascular endothelial growth factor (VEGF) in astrocytic gliomas - a prognostic factor? **J Neurooncol**, Boston, v. 45, n. 2, p. 117-125, 1999.

OSBORN, A. G. Astrocytomas and other glial neoplasms. In: OSBORN, A. G. (Ed): **Diagnostic neuroradiology**. St Louis: Mosby, 1994, p 529-578.

PALMA, L.; DI LORENZO, N.; GUIDETTI, B.: Lymphocytic infiltrates in primary glioblastomas and recidivous gliomas. Incidence, fate, and relevance to prognosis in 228 operated cases. **J Neurosurg**, Chicago, v. 49, n. 6, p. 854-861, dec.1978.

PATRONAS, N. J.; DI CHIRO, G.; KUFTA, C., BAIRAMIAN, D.; KORNBLITH, P. L.; SIMON, R.; LARSON, S. M.: Prediction of survival in glioma patients by means of positron emission tomography. **J Neurosurg**, Chicago, v. 62, n. 6, p.816-822, jun. 1985.

PIEPMEIER, J. M.: Cerebral gliomas: how tumor biology affects management. **Clin Neurosurg**, Baltimore, v.48, p. 3-9, 2001.

PRASAD, G.; WANG, H.; AGRAWAL, S.; ZHANG, R. Antisense anti-MDM2 oligonucleotides as a novel approach to the treatment of glioblastoma multiforme. **Anticancer Res**, Athens, v. 22, n. 1, p.107-116, jan./fev., 2002.

PRESTON-MARTIN, S.: Epidemiology of primary CNS neoplasms. **Neurol Clin**, Philadelphia, v.14, n.2, p. 273-290, may 1996.

PU, P.; LIU, X.; LIU, A.; AUI, J.; ZHANG, Y. Inhibition effect of antisense epidermal growth factor RNA on the proliferation of rat C6 glioma cells "*in vitro*" and "*in vivo*". **J. Neurosurg**, Chicago, v. 92, n. 1, p. 132-139, jan. 2000.

QURESHI, N.H.; STAT, D.; BANKIEWICZ, K.S.; LOVIS, D.N.; HOCHBERG, F.H.; CHIOCCA, E.A.; HARSH, G.R. Multicolumn infusion of gene therapy cells into human brain tumors: technical report. **Neurosurgery**, Baltimore, v. 46, n. 3, p. 663-669, mar. 2000.

RAINOV, N. G.; DOBBERSTEIN, K. U.; BAHN, H.; HOLZHAUSEN, H. J.; LAUTENSCHLAGER, C.; HEIDECKE, V.; BURKERT, W.: Prognostic factors in malignant glioma: influence of the overexpression of oncogene and tumor-suppressor gene products on survival. **J Neurooncol**, Boston, v. 35, n. 1, p. 13-28, oct. 1997.

RAZA, S. M.; LANG, F. F.; AGGARWAL, B. B.; FULLER, G. N.; WILDRICK, D. M.; SAWAYA, R.: Necrosis and glioblastoma: a friend or a foe? A review and a hypothesis. **Neurosurgery**, Baltimore, v. 51, n. 1, p.2-12, jul. 2002.

RUTKA, J. T.; TAYLOR, M.; MAINPRIZE, T.; LANGLOIS, A.; IVANCHUK, S.; MONDAL, S.; DIRKS, P.: Molecular biology and neurosurgery in the third millennium. **Neurosurgery**, Baltimore, v. 46, n. 5, p. 1034-1051, may 2000.

ROTTA, J. M. Avanços no tratamento cirúrgico dos tumores cerebrais profundos. In: CONGRESSO DE ATUALIZAÇÃO E EDUCAÇÃO CONTINUADA EM NEUROCIRURGIA, IX, 1999. **SBN-EDU**. Brasília: SBN, 1999. CD-ROM.

RUSSEL, S.M.; KELLY, P.J. Incidence and clinical evolution of postoperative deficits after volumetric stereotactic resection of glial neoplasms involving the supplementary motor area. **Neurosurgery**, Baltimore, v. 52, n. 3, p. 506-513, mar. 2003.

SABEL, M.; FELSBURG, J.; MESSING-JUNGER, M.; NEUEN-JACOB, E.; PIEK, J.: Glioblastoma multiforme at the site of metal splinter injury: a coincidence? Case report. **J Neurosurg**, Chicago, v. 91, n. 6, p. 1041-1044, dec. 1999.

SALCMAN, M.: Survival in glioblastoma: historical perspective. **Neurosurgery**, Baltimore, v. 7, n. 5, p. 435-439, nov. 1980.

SALCMAN, M.; EBERT, P. S.: In vitro response of human glioblastoma and canine glioma cells to hyperthermia, radiation, and chemotherapy. **Neurosurgery**, Baltimore, v. 29, n. 4, p. 526-531, oct. 1991.

SALCMAN, M. Intrinsic cerebral glioma. In: APUZZO, M. (Ed): **Brain surgery: complication avoidance and management**. Churchill Livingstone Inc., 1993, p 379-390.

SALCMAN, M.; SCHOLTZ, H.; KAPLAN, R. S.; KULIK, S.: Long-term survival in patients with malignant astrocytoma. **Neurosurgery**, Baltimore, v. 34, n. 2, p. 213-219, feb. 1994.

SALCMAN, M. Biologia dos gliomas. In: SIQUEIRA, M. G.; NOVAES, V. (Eds): **Tumores intracranianos**. Rio de Janeiro: Revinter, 1999, p 25-35.

SALCMAN, M. Gliomas malignos. In: SIQUEIRA, M. G.; NOVAES, V. (Eds): **Tumores intracranianos**, Rio de Janeiro: Revinter, 1999, p 196-212.

SALVATI, M.; CERVONI, L.; ARTICO, M.; CARUSO, R.; GAGLIARDI, F. M.: Long-term survival in patients with supratentorial glioblastoma. **J Neurooncol**, Boston, v.36, n. 1, p. 61-64, jan. 1998.

SANO, T.; LIN, H.; CHEN, X., LANGFORD, L. A.; KOUL, D.; BONDY, M. L.; HESS, K. R.; MYERS, J. N.; HONG, Y. K.; YUNG, W. K.; STECK, P. A.: Differential expression of MMAC/PTEN in glioblastoma multiforme: relationship to localization and prognosis. **Cancer Res**, Chicago, v. 59, n. 8, p. 1820-1824, apr. 1999.

SAWAYA, R.: Fifty years of neurosurgery argue in favor of glioma resection. **Clin Neurosurg**, Baltimore, v. 48, p. 10-19, 2001.

SCHIFF, D.; O'NEILL, B.; WIJDICKS, E.; ANTIN, J. H.; WEN, P. Y.: Gliomas arising in organ transplant recipients: An unrecognized complication of transplantation? **Neurology**, Minneapolis, v. 57, n. 8, p. 1486-1488, oct. 2001.

SCHOLD JR.S.C. A brief history of the diagnosis and treatment of central nervous system tumors. In: SCHOLD JR.S.C.; BURGER, P. C.; MENDELSON, D. B.; GLATSTEIN, E. J.; MICKEY, B. E.; MINNA, J. D. (Eds): **Primary tumors of the brain and the spinal cord**. Boston: Butterworth-Heinemann, 1997, p 1-11.

SCHWARTZ, R. B.; CARVALHO, P. A.; ALEXANDER, E., III, LOEFFLER, J. S.; FOLKERTH, R.; HOLMAN, B. L.: Radiation necrosis vs high-grade recurrent glioma: differentiation by using dual-isotope SPECT with <sup>201</sup>Tl and <sup>99m</sup>Tc-HMPAO. **AJNR Am J Neuroradiol**, Baltimore, v.12, n. 6, p. 1187-1192, nov./dec. 1991.

SCHWARTZ, R. B.; HOLMAN, B. L.; POLAK, J. F., GARADA, B. M.; SCHWARTZ, M. S.; FOLKERTH, R.; CARVALHO, P. A.; LOEFFLER, J. S.; SHRIEVE, D. C.; BLACK, P. M.; ALEXANDER, E., III: Dual-isotope single-photon emission computerized tomography scanning in patients with glioblastoma multiforme: association with patient survival and histopathological characteristics of tumor after high-dose radiotherapy. **J Neurosurg** Chicago, v. 89, n. 1, p. 60-68, jul. 1998.

SCOTT, J. N.; NEWCASTLE, N. B.; BRASHER, P. M., FULTON, D.; MACKINNON, J. A.; HAMILTON, M.; CAIRNCROSS, J. G.; FORSYTH, P.: Which glioblastoma multiforme patient will become a long-term survivor? A population-based study. **Ann Neurol**, Boston, v. 46, n. 2, p.183-188, aug. 1999.

SHAMISA, A.; BANCE, M.; NAG, S., TATOR, C.; WONG, S.; NOREN, G.; GUHA, A.: Glioblastoma multiforme occurring in a patient treated with gamma knife surgery. Case report and review of the literature. **J Neurosurg**, Chicago, v. 94, n. 5, p. 816-821, may 2001.

SHAPIRO, WR. The therapy of primary brain tumors. **BNI Quarterly**, Phoenix, v.14, p.4-32, 1998.

SHINGU, T.; YAMADA, K.; HARA, N.; MORITAKA, K.; OSAGO, H.; TERASHIMA, M.; VEMURA, P.T.; YAMASAKI, T.; TSUCHIYA, M. Growth inhibition of human malignant glioma cells induced by the p53 specific inhibitor. **J Neurosurg**, Chicago, v. 98, n. 1, p. 154-161, jan. 2003.

SHIRAISHI, S.; TADA, K.; NAKAMURA, K.; MAKINU, K.; KOCHI, M.; LAYA, H.; KUKAT, S.; USHIO, Y. Influence of p53 mutations on patients with glioblastoma multiforme. **Cancer**, New York, v. 95, n. 2, p. 249-257, jul. 2002.

SHRIEVE, D. C.; ALEXANDER, E., III; BLACK, P. M., WEN, P. Y.; FINE, H. A.; KOOY, H. M.; LOEFFLER, J. S.: Treatment of patients with primary glioblastoma multiforme with standard postoperative radiotherapy and radiosurgical boost: prognostic factors and long-term outcome. **J Neurosurg**, Chicago, v. 90, n. 1, p. 72-77, jan. 1999.

SHRIEVE, D. C.; ALEXANDER, E., III; WEN, P. Y., FINE, H. A.; KOOY, H. M.; BLACK, P. M.; LOEFFLER, J. S.: Comparison of stereotactic radiosurgery and brachytherapy in the treatment of recurrent glioblastoma multiforme. **Neurosurgery**, Baltimore, v.36, n. 2, p. 275-282, feb. 1995.

SHWEIKI, D.; ITIN, A.; SOFFER, D.; KESHET, E.: Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. **Nature**, London, v. 359, n. 6398, p. 843-845, oct. 1992.

SILBERGELD, D. L.; CHICOINE, M. R.: Isolation and characterization of human malignant glioma cells from histologically normal brain. **J Neurosurg**, Chicago, v. 86, n. 3, p. 525-531, mar. 1997.

SIMMONS, N. E.; LAWS, E. R., JR.: Glioma occurrence after sellar irradiation: case report and review. **Neurosurgery**, Baltimore, v. 42, n. 1, p.172-178, jan. 1998.

SIMMONS, M. L.; LAMBORN, K. R.; TAKAHASHI, M.; CHEN, P.; ISRAEL, M. A.; BERGER, M. S.; GODFREY, T.; NIGRO, J.; PRADOS, M.; CHANG, S.; BARKER, F. G. 2<sup>nd</sup>; ALDAPE, K.: Analysis of complex relationships between age, p53, epidermal growth factor receptor, and survival in glioblastoma patients. **Cancer Res**, Chicago, v. 61, n. 3, p.1122-1128, feb. 2001.

SNEED, P. K.; STAUFFER, P. R.; GUTIN, P. H., PHILLIPS, T. L.; SUEN, S.; WEAVER, K. A.; LAMB, S. A.; HAM, B.; PRADOS, M. D.; LARSON, D. A.: Interstitial irradiation and hyperthermia for the treatment of recurrent malignant brain tumors. **Neurosurgery**, Baltimore, v. 28, n. 2, p. 206-215, feb 1991.

SOINI, Y.; NIEMELA, A.; KAMEL, D.; HERVA, R.; BLOIGU, R.; PAAKKO, P.; VAHAKANGAS, K.: p53 immunohistochemical positivity as a prognostic marker in intracranial tumours. **APMIS**, Copenhagen, v. 102, n. 10, p.786-792, oct. 1994.

SPENCER, M. Fundamentals of light microscopy. **Cambridge University Press**, 1982.

STUPP, R.; DIETRICH, P.Y.; OSTERMAN, K.R.A.; JEVIC, S.; PICA, A.; MAILLARD, I.; MEULI, R.; JANZER, R.; PIZZOLATO, G.; MIRALBELL, R.; PORCHET, F.; REGLI, L.; TRIBOLET, N.; MIRIMANOF, R.O. Promising survival for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme treated with combinant radiation plus tomazolimide following adjuvant temozolomide. **J Clin Oncol**, New York, v. 20, n. 5, p. 1375-1382, mar. 2002.

SUBACH, B. R.; WITHAM, T. F.; KONDZIOLKA, D., LUNSFORD, L. D.; BOZIK, M.; SCHIFF, D.: Morbidity and survival after 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea wafer implantation for recurrent glioblastoma: a retrospective case-matched cohort series. **Neurosurgery**, Baltimore, v. 45, n. 1, p. 17-22, jul 1999.

SUGAHARA, T.; KOROGI, Y.; KOCHI, M., IKUSHIMA, I.; HIRAI, T.; OKUDA, T.; SHIGEMATSU, Y.; LIANG, L.; GE, Y.; USHIO, Y.; TAKAHASHI, M.: Correlation of MR imaging-determined cerebral blood volume maps with histologic and angiographic determination of vascularity of gliomas. **AJR Am J Roentgenol**, Springfield, v. 171, n. 6, p.1479-1486, dec. 1998.

SUGAHARA, T.; KOROGI, Y.; KOCHI, M., IKUSHIMA, I.; SHIGEMATU, Y.; HIRAI, T.; OKUDA, T.; LIANG, L.; GE, Y.; KOMOHARA, Y.; USHIO, Y.; TAKAHASHI, M.: Usefulness of diffusion-weighted MRI with echo-planar technique in the evaluation of cellularity in gliomas. **J Magn Reson Imaging**, Chicago, v. 9, n.1, p.53-60, jan.1999.

TADA, M.; MATSUMOTO, R.; IGGO, R.D.; ONIMARU, R.; SHIKATO, H.; SAWAMURA, Y.; SHINOE, Y. Selective sensitivity to radiation of cerebral glioblastomas harboring p53 mutations. **Cancer Res**, Chicago, v. 58, n. 9, p. 1793-1797, may 1998.

TAMBER, M.S.; RUTKA, J. Pediatric supratentorial high-grade glioma. **Neurosurg Focus**, Chicago, v. 14, n. 2, p. 1-8, feb. 2003.

TARNAWSKI, R.; SOKUL, M.; PIENIAZEK, T.; MACIEJEWSKI, B.; WALECKI, J.; MISZCZYL, L.; KRUPSKA, J. 1H-MRS in vivo predicts the early treatment outcome of postoperative radiotherapy for malignant gliomas. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, Elmsford, v. 52, n. 5, p. 1271-1276, apr. 2002.

TORRES, L. F.; ALMEIDA, R.; AVILA, S.; ALESSI, S.; FREITAS, R.: Brain tumours in south Brazil: a retrospective study of 438 cases. **Arq Neuropsiquiatr** São Paulo, v. 48, n. 3, p.279-285, sep. 1990.



TRALINS, K.S.; DOUGLAS, J.C.; STELZER, K.J.; MANHOFF, D.A.; SILBERGLD, D.L.; ROSTOMILLY, R.; HUMMEL, S.; SCHARNHORST, J.; KRHON, K.A.; SPENCER, A.M. Volumetric analysis of 18-FDGPET in glioblastoma multiforme: prognostic information and possible role in definition of target volumes in radiation dose scalation. **J Nucl Med**, Chicago, v. 43, n. 12, p. 1667-1673, dec. 2002.

VALERY, C.A.; SEILHEAN, D.; BOYER, O.; MARRO, B.; HAUM, J.J.; KEMENY, J.L. MARSAULT, C. PHILIPON, J.; KLATZMAN, D. Long – term survival after gene therapy for a recurrent glioblastoma. **Neurology**, Minneapolis, v. 58, n. 7, p. 1109-1112, apr. 2002.

VALTONEN, S.; TIMONEN, U.; TOIVANEN, P., KALIMO, H.; KIVIPELTO, L.; HEISKANEN, O.; UNSGAARD, G.; KUURNE, T.: Interstitial chemotherapy with carmustine-loaded polymers for high-grade gliomas: a randomized double-blind study. **Neurosurgery**, Baltimore, v. 41, n.1, p. 44-48, jul.1997.

VANNEMREDDY, P. S.; FOWLER, M.; POLIN, R. S.; TODD, J. R.; NANDA, A.: Glioblastoma multiforme in a case of acquired immunodeficiency syndrome: investigation a possible oncogenic influence of human immunodeficiency virus on glial cells. Case report and review of the literature. **J Neurosurg**, Chicago, v. 92, n.1, p.161-164, jan 2000.

WAHA, A.; BAUMANN, A.; WOLF, H. K.; FIMMERS, R.; NEUMANN, J.; KINDERMANN, D.; ASTRAHANTSEFF, K.; BLUMCKE, I.; VON DEIMLING, A.; SCHLEGEL, U. Lack of prognostic relevance of alterations in the epidermal growth factor receptor-transforming growth factor-alpha pathway in human astrocytic gliomas. **J Neurosurg**, Chicago, v. 85, n. 4, p.634-641, oct. 1996.

WANG, T. J.; HUANG, M. S.; HONG, C. Y.; TSE, V.; SILVERBERG, G. D.; HSIAO, M. Comparisons of tumor suppressor p53, p21, and p16 gene therapy effects on glioblastoma tumorigenicity in situ. **Biochem Biophys Res Commun**, New York, v. 287, n. 1, p. 173-180, sep. 2001.

WALKER, M. D.; ALEXANDER E., JR; HUNT, W. E., MACCARTY, C. S.; MAHALEY, M. S., JR.; MEALEY, J., JR.; NORRELL, H. A.; OWENS, G.; RANSOHOFF, J.; WILSON, C. B.; GEHAN, E. A.; STRIKE, T. A.: Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical trial. **J Neurosurg**, Chicago, v. 49, n. 3, p. 333-343, sep. 1978.

WALKER, M.D.; GREEN, S.; BYAR, D. Randomized comparisons of radiotherapy and nitrosureas for treatment of malignant gliomas after surgery. **N Engl J Med**, Boston, v. 303, n. 23, p. 1323-1329, dec. 1980.

WALLACE, C. J.; FORSYTH, P. A.; EDWARDS, D. R.: Lymph node metastases from glioblastoma multiforme. **AJNR Am J Neuroradiol**, Baltimore, v.17, n. 10, p.1929-1931, nov/dec 1996.

WATANABE, K.; TACHIBANA, O.; SATA, K., YONEKAWA, Y.; KLEIHUES, P.; OHGAKI, H.: Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. **Brain Pathol**, Zurich, v. 6, n. 3, p.217-224, jul. 1996.

WEISS, I.M.; CHANG, K.L.; Practical applications of imunohistochemistry (handout of short course – 65). **The United States and Canadian Academy of Pathology**, Duarte -CA, 1997.

WILSON, C. B.: Glioblastoma: the past, the present, and the future. **Clin Neurosurg**, Baltimore, v. 38, p. 32-48, 1992.

WIRTZ, C.R.; KNAUTH, M.; STAUBRT, A.; BONSANTO, M.M.; SARTOR, K.; KUNZE, S.; TRONNIER, V.M. Clinical evaluation and follow-up results for intraoperative magnetic ressonance imaging in neurosurgery. **Neurosurgery**, Baltimore, v. 46, n. 5, p. 1112-1122, may 2000.

WOOLSON, R.F.; **Statistical methods for the analysis of biomedical data**. New York, John Wily & Sons, 1987.

YAO, C.K.; KOMATA, T.; KONDO, Y.; KANSAWA, T.; KONDO, S.; GERMANO, I.M. Molecular response of human glioblastoma cells to ionizing radiation| cell cycle arrest, modulation of expression of cyclin dependent kinase inhibitors and autophagy. **J. Neurosurg**, Chicago, v. 98, n. 2, p. 378-384, feb. 2003.

YOSHIDA, D.; WATANABE, K.; NOHA, M.; TAKAHASHI, H.; TERAMOTO, A.; LUGISAKI, Y. Anti-invasive effect of an anti-matrix metalloproteinase agent in a murine brain slice model using serial monitoring of green fluorecent protein-labeled glioma cells. **Neurosurgery**, Baltimore, v. 52, n. 1, p. 187-197, jan. 2003.

YUNG, W. K.; PRADOS, M. D.; YAYA-TUR, R., ROSENFELD, S. S.; BRADA, M.; FRIEDMAN, H. S.; ALBRIGHT, R.; OLSON, J.; CHANG, S. M.; O'NEILL, A. M.; FRIEDMAN, A. H.; BRUNER, J.; YUE, N.; DUGAN, M.; ZAKNOEN, S.; LEVIN, V. A.: Multicenter phase II trial of temozolomide in patients with anaplastic astrocytoma or anaplastic oligoastrocytoma at first relapse. Temodal Brain Tumor Group. **J Clin Oncol**, v. 17, n. 9, p. 2762-2771, sep. 1999.

ZLOKOVIC, B.V.; APUZZO, M.L.J. Cellular and molecular neurosurgery: Pathways from concept to reality – Part 1: Target disorders and concept approaches to gene therapy of the central nervous system. **Neurosurgery**, Baltimore, v. 40, n. 4, p. 789-803, apr. 1997.

ZHU, A.; SHAEFFER, J.; LESLIE, S.; KOLM, P.; EL-MAHDI, A. M.: Epidermal growth factor receptor: an independent predictor of survival in astrocytic tumors given definitive irradiation. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, Elmsford, v. 34, n. 4, p. 809-815, mar. 1996.

ZÜLCH, K. **Brain tumors. Their biology and pathology**, 3rd ed. Berlin Heidelberg: Springer Verlag, 1986.