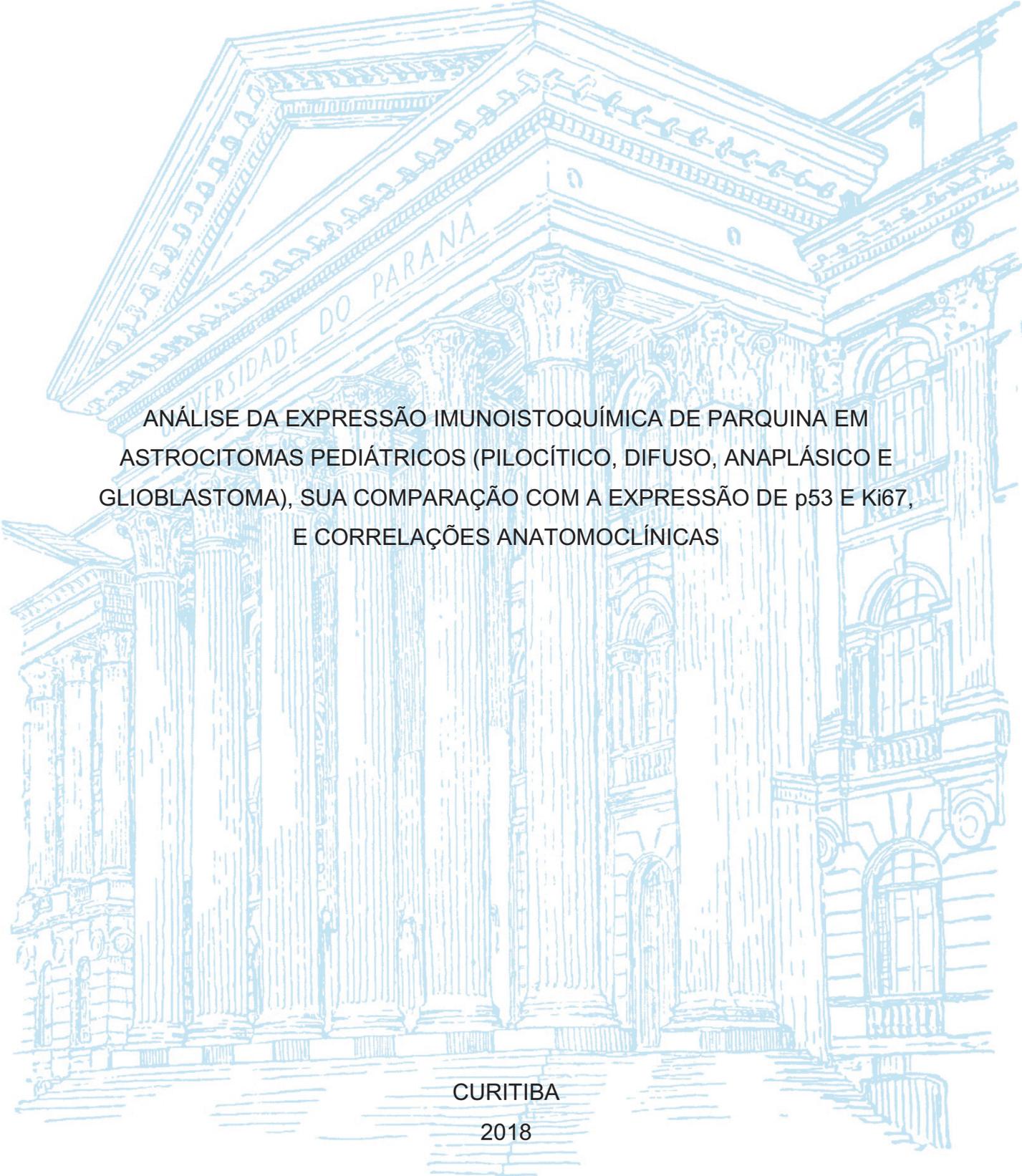


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

EDUARDO MORAIS DE CASTRO



ANÁLISE DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE PARQUINA EM
ASTROCITOMAS PEDIÁTRICOS (PILOCÍTICO, DIFUSO, ANAPLÁSICO E
GLIOBLASTOMA), SUA COMPARAÇÃO COM A EXPRESSÃO DE p53 E Ki67,
E CORRELAÇÕES ANATOMOCLÍNICAS

CURITIBA

2018

EDUARDO MORAIS DE CASTRO

ANÁLISE DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE PARQUINA EM
ASTROCITOMAS PEDIÁTRICOS (PILOCÍTICO, DIFUSO, ANAPLÁSICO E
GLIOBLASTOMA), SUA COMPARAÇÃO COM A EXPRESSÃO DE p53 E Ki67,
E CORRELAÇÕES ANATOMOCLÍNICAS

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia de Noronha

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939)

Castro, Eduardo Morais de

Análise da expressão imunistoquímica de parquina em astrocitomas pediátricos (pilocítico, difuso, anaplásico e glioblastoma), sua comparação com a expressão de P53 e Ki67, e correlações anatomoclínicas. / Eduardo Morais de Castro. – Curitiba, 2018.

85 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Lúcia de Noronha

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. Astrocitoma. 2. Glioma. 3. Sistema nervoso - Tumores. 4. Tumores em crianças. 5. Pediatria. 6. Antígeno Ki-67. 7. Proteína supressora de tumor p53. I. Título. II. Noronha, Lúcia de. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (20. ed.) 616.99481



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Patologia Básica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

TERMO DE APROVAÇÃO

“Análise da expressão imunoistoquímica de parquina em astrocitomas pediátricos (pilocítico, difuso, anaplásico e glioblastoma), sua comparação com a expressão de P53 e Ki67, e correlações anatomoclínicas”

por

Eduardo Morais de Castro

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos professores:

Profa. Dra. Lucia de Noronha – Presidente

Profa. Dra. Ana Paula Percicote

Profa. Dra. Vanessa Santos Sotomaior

Curitiba, 22 de junho de 2018.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, irmãos e familiares, pelo apoio incondicional ao longo de toda a minha vida. Obrigado!

À minha orientadora, Profa. Dra. Lúcia de Noronha, pela confiança depositada no trabalho e direcionamentos dados nos momentos cruciais. Obrigado!

Ao amigo Wilton Francisco Gomes, pelos conselhos e empréstimos intelectuais no campo da informática. Obrigado!

Aos colegas do Laboratório de Patologia Experimental da PUCPR: Ana Paula Camargo Martins, Marina Luise Viola Azevedo e Seigo Nagashima, por todo o empenho e boa vontade. Obrigado!

À colega Ana Paula Martins Sebastião pela paciência e tempo disponibilizados. Obrigado!

À Profa. Dra. Marcia Olandoski, por toda a ajuda com os números. Obrigado!

Aos funcionários do Biobanco do Instituto Pelé Pequeno Príncipe e do SAME e Serviço de Patologia do Hospital Pequeno Príncipe.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia e à Universidade Federal do Paraná pela oportunidade concedida.

RESUMO

Os tumores de sistema nervoso central são as neoplasias sólidas com maiores incidência e taxas de mortalidade na infância. Dentre eles, os astrocitomas são os mais comuns. São classificados histologicamente em graus 1 a 4, pela Organização Mundial de Saúde, sendo agrupados em baixo e alto grau. O diagnóstico se baseia em achados histopatológicos, porém existem métodos moleculares complementares que auxiliam no diagnóstico e indicam prognóstico. Recentemente, a proteína parkina, descoberta no contexto da doença de Parkinson, teve papel descrito em diversas neoplasias, incluindo gliomas dos adultos. O presente trabalho tem o objetivo de avaliar a presença de parkina através de pesquisa imunoistoquímica em astrocitomas da faixa etária pediátrica, correlacionando-a com o grau tumoral, com a presença de p53 e níveis de Ki67, além de correlação com variáveis anatomoclínicas, incluindo sobrevida e desfecho óbito. Para tal, amostras de astrocitomas pediátricos em blocos de parafina, provenientes do Hospital Pequeno Príncipe, diagnosticados entre os anos de 2003 a 2015, foram selecionados, sendo ao todo 108 casos. Estas amostras foram submetidas a pesquisa imunoistoquímica de parkina, p53 e Ki67. A leitura da marcação imunoistoquímica de parkina foi realizada por análise morfométrica e morfológica por Allred modificado. Cortes histológicos de p53 e Ki67 foram submetidos à análise morfológica, por escore de Allred modificado e contagem em *hotspot*, respectivamente. Observou-se menor expressão de parkina nos astrocitomas de alto grau, em comparação aos de baixo grau, por análise morfométrica ($p = 0,011$) e morfológica ($p = 0,036$). A proteína p53 apresentou comportamento inverso, tendo uma maior expressão imunoistoquímica nos tumores de alto grau ($p < 0,001$). A porcentagem de Ki67 também foi maior no grupo dos astrocitomas de alto grau ($p < 0,001$), em concordância com dados da literatura. A perda de expressão da proteína parkina pelos métodos de imunoistoquímica pode estar relacionada a mutações no gene *PRKN*, como já descrito em outras neoplasias e em gliomas da faixa etária adulta. Observou-se uma correlação entre sobrevida e grau histológico tumoral, assim como com a expressão imunoistoquímica de p53. O mesmo aconteceu com a mortalidade. A expressão de parkina, por outro lado, não apresentou, nesse estudo, resultado estatisticamente significativo, quando comparada à sobrevida e desfecho óbito. Dessa forma, a parkina se mostrou como um marcador de grau histológico em astrocitomas infantis, sendo menos expressa nos tumores de alto grau. Nesse estudo, não foi constatado impacto prognóstico da parkina. Porém, como esse é o primeiro estudo a avaliar a parkina no contexto de astrocitomas pediátricos, pesquisas futuras podem mudar esse cenário.

Palavras-chave: Gliomas pediátricos. Astrocitomas pediátricos. Parkina. p53.

ABSTRACT

Central nervous system tumors are solid tumors with the highest incidence and mortality rates in childhood. Among them, astrocytomas are the most common. Astrocytomas are histologically graded by the World Health Organization into grades 1 to 4. These four grades can be grouped into low grade and high grade astrocytomas. Diagnosis is based on histopathology, but there are ancillary molecular tests with both diagnostic and prognostic features. Parkin, a protein discovered in the context of Parkinson's disease, has been recently implicated in several tumors, including gliomas in adults. The aim of this study is to evaluate parkin immunohistochemical expression in pediatric astrocytomas. Then, compare this immunostaining to histological grade, p53 and Ki67 immunohistochemical expression, as well as anatomoclinical variables, including survival and mortality rates. One hundred and eight formalin-fixed paraffin-embedded samples from pediatric astrocytomas, diagnosed between 2003 and 2015 in Hospital Pequeno Príncipe were selected. These samples were submitted to immunohistochemical study, regarding parkin, p53 and Ki67. Parkin histological slides were analyzed by morphometry and morphology, through modified Allred score. Histological slides of p53 and Ki67 were analyzed morphologically, by modified Allred score and *hotspot* counting, respectively. Results showed lower parkin expression in high grade astrocytomas, compared to low grade, in morphometric ($p = 0,011$), as well as in morphological analysis ($p = 0,036$). p53 expression demonstrated opposite behavior. High grade tumors showed higher immunohistochemical expression ($p < 0,001$). Ki67 immunostaining percentage was also higher in high grade astrocytomas ($p < 0,001$), in consonance with literature database. Parkin loss of immunohistochemical expression may be related to *PRKN* gene mutations, as it has been described in other tumors, including gliomas in adults. Results showed also correlation between survival rates and histological grade, as well as p53 immunostaining. The same correlations were observed regarding mortality rates. The evaluation of parkin expression, on the other hand, demonstrated no statistical significance in this study, when compared to survival and mortality rates. Thus, parkin works as a histological grade marker in pediatric astrocytomas since it has lower immunohistochemical expression. in high grade astrocytomas. Our study did not show a prognostic role for this protein. However, since this is the first study evaluating parkin in pediatric gliomas, further research may change this scenario.

Keywords: Pediatric gliomas. Pediatric astrocytomas. Parkin. p53.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – GRÁFICO COM A PORCENTAGEM INICIAL DE CASOS, CLASSIFICADOS PELO GRAU HISTOLÓGICO DA OMS	36
FIGURA 2 – MÉTODO DE CONFECÇÃO DOS BLOCOS DE TMA	37
FIGURA 3 – BLOCO DE PARAFINA DE TMA	38
FIGURA 4 – LÂMINA HISTOLÓGICA CORADA EM HE (ESQUERDA) E LÂMINA HISTOLÓGICA CORADA POR IMUNOISTOQUÍMICA (DIREITA), DO BLOCO DE TMA	38
FIGURA 5 – (A) EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE PARQUINA EM ASTROCIOMA PILOCÍTICO (40X) (B) A MESMA AMOSTRA SUBMETIDA À MÁSCARA PARA ANÁLISE MORFOMÉTRICA	40
FIGURA 6 – EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE Ki67 EM <i>HOTSPOT</i> DE GLIOBLASTOMA (20X)	42
FIGURA 7 – AVALIAÇÃO DA SOBREVIDA GERAL, ATRAVÉS DA CURVA CURVA DE KAPLAN-MEIER	64
FIGURA 8 – AVALIAÇÃO DA SOBREVIDA GERAL, NOS ASTROCIOMAS DE BAIXO E ALTO GRAU, ATRAVÉS DA CURVA DE KAPLAN-MEIER. VALOR DE $p < 0,001$	65
FIGURA 9 – AVALIAÇÃO DA SOBREVIDA GERAL, NOS ASTROCIOMAS COM DISTRIBUIÇÃO DE PARQUINA FOCAL E DIFUSA, ATRAVÉS DA CURVA DE KAPLAN-MEIER. VALOR DE $p = 0,847$	66
FIGURA 10 – AVALIAÇÃO DA SOBREVIDA GERAL, NOS ASTROCIOMAS COM DISTRIBUIÇÃO DE p53 FOCAL E DIFUSA, ATRAVÉS DA CURVA DE KAPLAN-MEIER. VALOR DE $p = 0,021$	67

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DOS GLIOMAS – OMS, 2016	23
QUADRO 2 – CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DOS ASTROCITOMAS – OMS, 2016	26
QUADRO 3 – ESPECIFICAÇÕES DOS ANTICORPOS UTILIZADOS NO ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO	39
QUADRO 4 – ESCORE DE ALLRED ORIGINAL	41
QUADRO 5 – ESCORE DE ALLRED MODIFICADO	41

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – DADOS DESCRITIVOS DA AMOSTRA, INCLUINDO GRAU HISTOLÓGICO TUMORAL (ISOLADO E AGRUPADO), GÊNERO, TOPOGRAFIA DO TUMOR, IDADE E DESFECHO	45
TABELA 2 – DADOS DESCRITIVOS DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA TECIDUAL DE PARQUINA, DE p53 E DE Ki67	45
TABELA 3 – DISTRIBUIÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE PARQUINA DE ACORDO COM O GÊNERO (n=108)	46
TABELA 4 – INTENSIDADE DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE PARQUINA DE ACORDO COM O GÊNERO (n=108)	46
TABELA 5 – DISTRIBUIÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE p53 DE ACORDO COM O GÊNERO (n=105)	47
TABELA 6 – INTENSIDADE DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE p53 DE ACORDO COM O GÊNERO (n=105)	47
TABELA 7 – DISTRIBUIÇÃO E INTENSIDADE DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE PARQUINA, DE ACORDO COM A IDADE (n=67)	48
TABELA 8 – DISTRIBUIÇÃO E INTENSIDADE DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE p53, DE ACORDO COM A IDADE (n=64)	48
TABELA 9 – DISTRIBUIÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE PARQUINA, DE ACORDO COM A TOPOGRAFIA DA LESÃO (n=61)	49
TABELA 10 – DISTRIBUIÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE PARQUINA, DE ACORDO COM A TOPOGRAFIA DA LESÃO (n=61)	49
TABELA 11 – DISTRIBUIÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE p53, DE ACORDO COM A TOPOGRAFIA DA LESÃO (n=58)	49
TABELA 12 – INTENSIDADE DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE p53, DE ACORDO COM A TOPOGRAFIA DA LESÃO (n=58)	50

TABELA 13 – AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE PARQUINA EM RELAÇÃO AOS ASTROCITOMAS DE BAIXO E ALTO GRAU (n=108)	50
TABELA 14 – AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE PARQUINA EM RELAÇÃO AOS ASTROCITOMAS DE BAIXO GRAU E GLIOBLASTOMAS (n=104)	51
TABELA 15 – AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE PARQUINA EM RELAÇÃO AOS ASTROCITOMAS DE BAIXO E ALTO GRAU (n=108)	52
TABELA 16 – AVALIAÇÃO DA INTENSIDADE DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE PARQUINA EM RELAÇÃO AOS ASTROCITOMAS DE BAIXO E ALTO GRAU (n=108)	52
TABELA 17 – AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE PARQUINA EM RELAÇÃO AOS ASTROCITOMAS DE BAIXO GRAU E GLIOBLASTOMAS (n=104)	53
TABELA 18 – AVALIAÇÃO DA INTENSIDADE DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE PARQUINA EM RELAÇÃO AOS ASTROCITOMAS DE BAIXO GRAU E GLIOBLASTOMAS (n=104)	53
TABELA 19 – AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE p53 EM RELAÇÃO AOS ASTROCITOMAS DE BAIXO E ALTO GRAU (n=104)	54
TABELA 20 – AVALIAÇÃO DA INTENSIDADE DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE p53 EM RELAÇÃO AOS ASTROCITOMAS DE BAIXO E ALTO GRAU (n=104)	55
TABELA 21 – AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE p53 EM RELAÇÃO AOS ASTROCITOMAS DE BAIXO GRAU E GLIOBLASTOMAS (n=100)	55
TABELA 22 – AVALIAÇÃO DA INTENSIDADE DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE p53 EM RELAÇÃO AOS ASTROCITOMAS DE BAIXO GRAU E GLIOBLASTOMAS (n=100)	56

TABELA 23 – AVALIAÇÃO DA CONTAGEM DE Ki67 EM RELAÇÃO AOS ASTRO- CITOMAS DE BAIXO E ALTO GRAU (n=105)	56
TABELA 24 – AVALIAÇÃO DA CONTAGEM DE Ki67 EM RELAÇÃO AOS AS- TROCITOMAS DE BAIXO GRAU E GLIOBLASTOMAS (n=101)	57
TABELA 25 – AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE AS DISTRIBUIÇÕES DE PARQUINA E DE p53, NOS ASTROCITOMAS GRAU 1 (n=59)	57
TABELA 26 – AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE AS DISTRIBUIÇÕES DE PARQUINA E DE p53, NOS ASTROCITOMAS GRAU 2 (n=23)	58
TABELA 27 – AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE AS DISTRIBUIÇÕES DE PARQUINA E DE p53, NOS ASTROCITOMAS GRAU 3 (n=4)	58
TABELA 28 – AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE AS DISTRIBUIÇÕES DE PARQUINA E DE p53, NOS ASTROCITOMAS GRAU 4 (n=18)	58
TABELA 29 – AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE AS DISTRIBUIÇÕES DE PARQUINA E DE p53, NOS ASTROCITOMAS DE BAIXO GRAU (n=82)	59
TABELA 30 – AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE AS DISTRIBUIÇÕES DE PARQUINA E DE p53, NOS ASTROCITOMAS DE ALTO GRAU (n=22)	59
TABELA 31 – AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE AS INTENSIDADES DE PARQUINA E DE p53, NOS ASTROCITOMAS GRAU 1 (n=59)	59
TABELA 32 – AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE AS INTENSIDADES DE PARQUINA E DE p53, NOS ASTROCITOMAS GRAU 2 (n=23)	60
TABELA 33 – AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE AS INTENSIDADES DE PARQUINA E DE p53, NOS ASTROCITOMAS GRAU 3 (n=4)	60

TABELA 34 – AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE AS INTENSIDADES DE PARQUINA E DE p53, NOS ASTROCITOMAS GRAU 4 (n=18)	61
TABELA 35 – AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE AS INTENSIDADES DE PARQUINA E DE p53, NOS ASTROCITOMAS DE BAIXO GRAU (n=82)	61
TABELA 36 – AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE AS INTENSIDADES DE PARQUINA E DE p53, NOS ASTROCITOMAS DE ALTO GRAU (n=22)	61
TABELA 37 – AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE A DISTRIBUIÇÃO DE PARQUINA E A CONTAGEM DE Ki67, DE ACORDO COM GRAUS HISTOLÓGICOS ISOLADOS E AGRUPADOS DOS ASTROCITOMAS	62
TABELA 38 – AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE A INTENSIDADE DE PARQUINA E A CONTAGEM DE Ki67, DE ACORDO COM GRAUS HISTOLÓGICOS ISOLADOS E AGRUPADOS DOS ASTROCITOMAS	63
TABELA 39 – TEMPO DE SOBREVIDA DOS PACIENTES QUE MORRERAM, INCLUINDO CORRELAÇÃO DESSES 5 CASOS COM O GRAU HISTOLÓGICO TUMORAL E AS EXPRESSÕES IMUNOISTOQUÍMICAS DE PARQUINA E DE p53	64
TABELA 40 – COMPARAÇÃO ENTRE DESFECHO ÓBITO E A MEDIANA DAS IDADES DOS PACIENTES	67
TABELA 41 – COMPARAÇÃO ENTRE DESFECHO ÓBITO E GÊNERO (n=67)	68
TABELA 42 – COMPARAÇÃO ENTRE DESFECHO ÓBITO E GRAU HISTOLÓGICO (n=67)	68
TABELA 43 – COMPARAÇÃO ENTRE DESFECHO ÓBITO E DISTRIBUIÇÃO DA EXPRESSÃO DE PARQUINA (n=67)	69
TABELA 44 – COMPARAÇÃO ENTRE DESFECHO ÓBITO E INTENSIDADE DA EXPRESSÃO DE PARQUINA (n=67)	69
TABELA 45 – COMPARAÇÃO ENTRE DESFECHO ÓBITO E DISTRIBUIÇÃO DA EXPRESSÃO DE p53 (n=4)	69

TABELA 46 – COMPARAÇÃO ENTRE DESFECHO ÓBITO E INTENSIDADE DA EXPRESSÃO DE p53 (n=64)	70
TABELA 47 – COMPARAÇÃO ENTRE DESFECHO ÓBITO E TOPOGRAFIA DA LESÃO (n=61)	70
TABELA 48 – COMPARAÇÃO ENTRE DESFECHO ÓBITO E DISTRIBUIÇÃO DA EXPRESSÃO DE PARQUINA (FOCAL X DIFUSA), RESTRITO AO GRAU HISTOLÓGICO 4 OU GBM (n=8)	71

LISTA DE SIGLAS

ATRX	– ATRX, Chromatin Remodeler
Bcl-xL	– B-cell Lymphoma-extra Large
BRAF	– B-Raf Proto-oncogene, Serine/threonine Kinase
CFS	– Common Fragile Sites
DAB	– 3,3'diaminobenzidine
DNA	– Desoxyribonucleic Acid
DX	– Diagnóstico
Fem	– Feminino
GBM	– Glioblastoma
H3F3	– H3 Histone Family Member 3A
HE	– Hematoxilina-Eosina
IAM	– Infarto Agudo do Miocárdio
IBM SPSS	– International Business Machines Statistical Package for the Social Sciences
IDH1	– Isocitrate Dehydrogenase 1
IDH2	– Isocitrate Dehydrogenase 2
INCA	– Instituto Nacional do Câncer
IT	– Infratentorial
MAPK	– Mitogen Activated Protein Kinases
Masc	– Masculino
NBR1	– Neighbor of BRCA1
OMS	– Organização Mundial da Saúde
PINK-1	– PTEN-induced Kinase-1
PRKN	– Parkin RBR E3 Ubiquitin Protein Ligase
PUC-PR	– Pontifícia Universidade Católica-Paraná
RING	– Really Interesting New Gene
RNM	– Ressonância Nuclear Magnética
SNC	– Sistema Nervoso Central
ST	– Supratentorial
TC	– Tomografia Computadorizada
TMA	– Tissue Microarray
TP53	– Tumor Protein p53

UFPR – Universidade Federal do Paraná
VEGF – Vascular Endotelial Growth Factor
VEGFR2 – Vascular Endotelial Growth Factor Receptor 2

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1 OS TUMORES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL NA INFÂNCIA	22
2.1.1 Dados gerais	22
2.1.2 Classificação histopatológica	22
2.1.3 Epidemiologia	23
2.1.4 Manifestações clínicas	23
2.1.5 Diagnóstico por neuroimagem	24
2.2 OS ASTROCITOMAS	24
2.2.1 Etiologia e epidemiologia	24
2.2.2 Diagnóstico por neuroimagem	25
2.2.3 Classificação dos astrocitomas e suas características histopatológicas e moleculares	25
2.3 A PARQUINA	28
2.3.1 Dados gerais	28
2.3.2 A parquina e sua multifuncionalidade	29
2.3.3 A parquina e os astrocitomas	32
3 OBJETIVOS	34
3.1 OBJETIVO GERAL	34
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
4 MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1 AMOSTRAS ESTUDADAS	35
4.2 PREPARO DE LÂMINAS HISTOLÓGICAS E TMA (TISSUE MICROARRAY)	36
4.3 ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO DAS AMOSTRAS	39
4.4 ANÁLISE MORFOMÉTRICA QUANTITATIVA DA PARQUINA	40
4.5 ANÁLISE MORFOLÓGICA SEMIQUANTITATIVA E QUALITATIVA DA PARQUINA E DO p53	41
4.6 ANÁLISE QUANTITATIVA DO Ki67	42
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
5 RESULTADOS	44
5.1 ANÁLISE DESCRITIVA DA AMOSTRA	44

5.2 ANÁLISE DAS VARIÁVEIS CLÍNICO-PATOLÓGICAS EM RELAÇÃO À EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE PARQUINA E DE p53	46
5.2.1 Avaliação da associação entre parquina e p53 (distribuição e intensidade) e gêneros	46
5.2.2 Avaliação da associação entre parquina e p53 (distribuição e intensidade) e idade	47
5.2.3 Avaliação da associação entre parquina e p53 (distribuição e intensidade) e topografia da lesão	48
5.3 AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE A ANÁLISE DE PARQUINA E GRAU HISTOLÓGICO TUMORAL	50
5.3.1 Avaliação da associação entre a análise morfométrica quantitativa de parquina e o grau histológico tumoral	50
5.3.2 Avaliação da associação entre a análise morfológica semiquantitativa e qualitativa de parquina (distribuição e intensidade) e o grau histológico tumoral	51
5.4 AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE A ANÁLISE MORFOLÓGICA SEMIQUANTITATIVA DE p53 (DISTRIBUIÇÃO E INTENSIDADE) E O GRAU HISTOLÓGICO TUMORAL	54
5.5 AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE A ANÁLISE QUANTITATIVA DE Ki67 E O GRAU HISTOLÓGICO TUMORAL	56
5.6 AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE PARQUINA E DE p53, DE ACORDO COM OS GRAUS HISTOLÓGICOS TUMORAIS	57
5.7 AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE PARQUINA E DE Ki67, DE ACORDO COM OS GRAUS HISTOLÓGICOS TUMORAIS	62
5.8 ANÁLISE DE SOBREVIDA E DESFECHO ÓBITO	63
5.8.1 Sobrevida geral	63
5.8.2 Avaliação da associação entre as variáveis categóricas (grau histológico tumoral, distribuição de parquina e de p53) e sobrevida	65
5.8.3 Avaliação da associação entre idade e óbito	67
5.8.4 Avaliação da associação entre variáveis categóricas (gênero, topografia, grau histológico tumoral, distribuição e intensidade de parquina e de p53), e desfecho óbito	68

5.8.5 Avaliação entre a distribuição de parquina e desfecho óbito, restrito ao grau histológico 4 (glioblastomas)	70
6 DISCUSSÃO	72
7 CONCLUSÃO	76
REFERÊNCIAS	77
ANEXO 1 – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA	83

1 INTRODUÇÃO

Os tumores do sistema nervoso central (SNC) são as neoplasias sólidas mais frequentes na faixa etária pediátrica e são as que possuem as maiores taxas de mortalidade (HUSAIN, 2014). Podem se originar de qualquer célula que componha o sistema nervoso, como neurônios, astrócitos, oligodendrócitos, células meningoteliais, entre outras (RIVERA, 2015). São classificadas em neoplasias benignas e malignas, estas com diversos graus de agressividade (FILHO, 2016). As manifestações clínicas são variáveis e incluem: cefaleia, vômito, alterações comportamentais e crises convulsivas (WILNE et al., 2006). O diagnóstico se baseia em correlações clínicas, de neuroimagem e anatomopatológicas. O tratamento pode ser apenas cirúrgico, ou associar-se a radio e quimioterapia (HUSAIN, 2014 e KASPER, 2015).

Dentre os tumores do SNC que acometem a população pediátrica, os gliomas de origem astrocitária (astrocitomas) são os mais prevalentes (HUSAIN, 2014). São classificados em graus 1 a 4, utilizando-se a classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS), cuja última edição é de 2016, na qual são avaliadas características histopatológicas e moleculares das lesões. O astrocitoma pilocítico é o tumor do SNC mais comum na infância. É classificado como grau 1 pela OMS e apresenta excelente prognóstico. Os graus 2, 3 e 4 incluem os astrocitomas infiltrativos – sendo respectivamente nominados de difuso (grau 2), anaplásico (grau 3) e glioblastoma (grau 4). As alterações histopatológicas avaliadas para a classificação dessas neoplasias incluem hiper celularidade, atipia nuclear (núcleos hipercromáticos e pleomórficos), índice mitótico, proliferação capilar glomeruloide e necrose. A partir do astrocitoma difuso (grau 2), tais alterações tornam-se cada vez mais evidentes, sendo que apenas o glioblastoma ou GBM (grau 4) apresenta necrose, com ou sem proliferação capilar glomeruloide (LOUIS et al. 2016 e ELLISON, 2013). No entanto, a pesquisa de marcadores resultantes de alterações genéticas específicas e com impacto diagnóstico e prognóstico, complementar à avaliação histopatológica, é cada vez mais frequente nas neoplasias.

Os gliomas podem também ser classificados em baixo e alto grau. Os de baixo grau são compostos pelos astrocitomas graus 1 e 2. Os de alto grau, pelos astrocitomas graus 3 e 4. O astrocitoma grau 1 é o de melhor

prognóstico, curado cirurgicamente na maioria dos casos. As neoplasias graus 2 e 3 podem progredir com o passar o tempo, tornando-se lesões de grau histológico mais elevado, com comportamento mais agressivo e prognóstico pior. Assim, o grau 4 pode surgir como uma transformação de graus 2 ou 3 (glioblastoma secundário), ou “de novo” (glioblastoma primário) (CASKEY et al., 2000). Por isso, não é rara a heterogeneidade histológica dos tumores, ou seja, graus variados em uma mesma lesão. Esta é uma característica bastante comum em gliomas, principalmente os da linhagem astrocitária (HUSAIN, 2014 e ELLISON, 2013). Os astrocitomas pediátricos, apesar de morfologicamente semelhantes aos astrocitomas da faixa etária adulta, apresentam comportamento clínico-biológico e alterações moleculares características (ELLISON, 2013). Os glioblastomas ou GBM pediátricos são primários ou “*de novo*” em sua maioria, enquanto os da faixa etária adulta geralmente progridem de astrocitomas graus 2 ou 3. A mutação dos genes *IDH1/IDH2* (Isocitrate Dehydrogenase 1/ Isocitrate Dehydrogenase 2) encontra-se em cerca de 80% dos adultos, enquanto estão presentes em menos de 10% dos pacientes pediátricos. Os genes mais comumente mutados nos astrocitomas de alto grau, pediátricos são o *ATRX* (*ATRX*, Chromatin Remodeler) e o *H3F3A* (*H3* Histone Family Member 3A), além da via do *TP53* (Tumor Protein p53). Os astrocitomas pilocíticos (grau 1) tem uma via molecular própria envolvendo alterações no gene *BRAF* (B-Raf Proto-oncogene, Serine/threonine Kinase) (APPIN e BRAT, 2015).

A parquina é uma proteína codificada pelo gene *PRKN* (Parkin RBR E3 Ubiquitin Protein Ligase). Foi descoberta e, inicialmente, avaliada no contexto da doença de Parkinson juvenil, fato que justifica seu nome. Hoje, é caracterizada como uma proteína multifuncional, que atua no controle de metabolismo proteico, homeostase mitocondrial e ciclo celular (ZHANG et al., 2016 e NARENDRA et al., 2008). Assim, sabe-se de sua importância em outras doenças, como Alzheimer, autismo, diabetes melito tipo 2 e diversas neoplasias (CESARI et al., 2003; ZHANG et al., 2016 e KAY et al., 2010).

O papel da parquina foi avaliado nos astrocitomas de pacientes adultos. Observou-se que sua maior expressão estava ligada aos astrocitomas de graus mais baixos (LIN et al., 2015). Além disso, a maior expressão de parquina

indicava menor proliferação celular neoplásica e maior sobrevida (LIN et al., 2015 e MAUGERI et al., 2015).

O presente estudo busca avaliar se o papel da parquina nos astrocitomas infantis é semelhante, uma vez que as vias moleculares de gliomagenese são diferentes nas duas faixas etárias. Os resultados podem ter impacto clínico, com a detecção de uma proteína com significado diagnóstico e prognóstico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 OS TUMORES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL NA INFÂNCIA

2.1.1 Dados gerais

Os tumores do sistema nervoso central (SNC) tem grande importância, pois incidem em todas as faixas etárias. São compostos por um grupo heterogêneo de lesões, com histopatologia complexa. São representados por lesões benignas e malignas, essas com variados graus de agressividade (FILHO, 2016). Seu estudo clínico é de grande importância na faixa etária pediátrica pois, nesse grupo de pacientes, são as neoplasias sólidas mais comuns e apresentam as taxas de mortalidade mais elevadas (HUSAIN, 2014 e KASPER, 2015). As manifestações clínicas são variadas, a depender da natureza e localização anatômica da lesão. O diagnóstico das neoplasias do SNC requer correlação entre aspectos clínicos, morfológicos e de neuroimagem (DUNHAM, 2010). As modalidades terapêuticas também variam, de acordo com a agressividade e topografia da neoplasia (HUSAIN, 2014)

2.1.2 Classificação histopatológica

A primeira classificação dos tumores do SNC foi publicada em 1926, por Bailey e Cushing (BAILEY et al., 1926). Baseada apenas em aspectos morfológicos, essa classificação norteou as classificações que viriam posteriormente. Atualmente, utiliza-se a classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS), cuja última edição foi publicada em 2016. Essa classificação agrupa e gradua as neoplasias, incorporando aspectos de biologia molecular, além de imunoistoquímica já utilizada nas classificações prévias, como ferramentas diagnósticas complementares (LOUIS et al., 2016). Os tumores do SNC podem se originar de qualquer célula que compõe o tecido nervoso, a saber: neurônios, astrócitos, oligodendrócitos, células meningoteliais, células endimárias, entre outras (RIVERA E TAKEI, 2015). Dentre os grupos de tumores do SNC, os gliomas são os mais comuns (HUSAIN, 2014).

QUADRO 1 – CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DOS GLIOMAS – OMS, 2016

GLIOMAS	GRAU DA OMS
• TUMORES OLIGODENDROGLIAIS E ASTROCITÁRIOS DIFUSOS	
ASTROCITOMA DIFUSO, IDH-MUTANTE	2
ASTROCITOMA ANAPLÁSICO, IDH-MUTANTE	3
GLIOBLASTOMA, IDH-MUTANTE	4
GLIOBLASTOMA, IDH-SELVAGEM	4
GLIOMA DIFUSO DA LINHA MÉDIA, H3K27M-MUTANTE	4
OLIGODENDROGLIOMA, IDH-MUTANTE E CODELEÇÃO 1p-19q	2
OLIGODENDROGLIOMA ANAPLÁSICO, IDH-MUTANTE E CODELEÇÃO 1p/19q	3
• OUTROS TUMORES ASTROCITÁRIOS	
ASTROCITOMA PILOCÍTICO	1
ASTROCITOMA SUBEPENDIMÁRIO DE CÉLULAS GIGANTES	1
XANTOASTROCITOMA PLEOMÓRFICO	2
XANTOASTROCITOMA PLEOMÓRFICO ANAPLÁSICO	3
• TUMORES EPENDIMÁRIOS	
SUBEPENDIMOMA	1
EPENDIMOMA MIXOPAPILAR	1
EPENDIMOMA	2
EPENDIMOMA, FUSÃO <i>RELA</i> POSITIVO	2 OU 3
EPENDIMOMA ANAPLÁSICO	3
• OUTROS GLIOMAS	
GLIOMA ANGIOCÊNTRICO	1
GLIOMA COROIDE DO 3º VENTRÍCULO	2

FONTE: Adaptado de LOUIS (2016)

2.1.3 Epidemiologia

Nos Estados Unidos, entre os anos de 2010 e 2014, a incidência de neoplasias do SNC na faixa etária pediátrica (0 a 14 anos) foi de 5,54 casos/100.000 habitantes (OSTROM et al., 2017). De acordo com dados do INCA (Instituto Nacional do Câncer), estima-se que, no Brasil, os tumores de SNC correspondam a 8 a 15% das neoplasias diagnosticadas na faixa etária pediátrica. As taxas de incidência apresentam variações nas diversas regiões do país (REIS et al., 2007). Dentro do grupo dos gliomas, os astrocitomas são as neoplasias mais frequentes (HUSAIN, 2014).

2.1.4 Manifestações clínicas

As manifestações clínicas dos tumores de SNC são bastante variáveis. Wilne et al (2006) revisaram 200 casos de tumores cerebrais na infância e verificaram que os sintomas iniciais mais comuns foram cefaleia, vômito, instabilidade motora, distúrbios visuais, alterações comportamentais e convulsões. A grande variedade de sintomas se dá em consequência de lesões em topografias distintas causarem distúrbios neurológicos também distintos. As manifestações podem ser graves e, até mesmo, letais, inclusive no caso de tumores benignos que exerçam efeito de massa, ou seja, danos cerebrais secundários à compressão causada pelo crescimento da massa tumoral.

2.1.5 Diagnóstico por neuroimagem

É de suma importância a correlação com dados obtidos em exames de neuroimagem para o diagnóstico correto. Exames como tomografia computadorizada (TC) e ressonância nuclear magnética (RNM) avaliam características importantes do tumor, como sua vascularização e sua relação com o parênquima cerebral adjacente. Caracterizam as lesões topograficamente (ST). Detectam informações extremamente úteis para a caracterização da lesão, como a presença de edema, calcificações, hemorragia e necrose. Essas características presentes nos tumores se apresentam como modificações antes e após a injeção de contraste (KASPER, 2015; GOURTSOYANNIS et al., 2005; e YOUSEM, 2010)

2.2 OS ASTROCITOMAS

2.2.1 Etiologia e epidemiologia

Os astrocitomas são as neoplasias originadas dos astrócitos e fazem parte do grupo dos gliomas, juntamente com as neoplasias originadas dos oligodendrócitos e das células ependimárias. São o grupo mais frequente de neoplasias primárias do SNC na infância (HUSAIN, 2014). Dentre as neoplasias do SNC diagnosticadas na faixa etária pediátrica (0 a 14 anos) entre os anos de 2010 e 2014 nos Estados Unidos, 52,8% foram gliomas. Os astrocitomas pilocíticos (grau 1) corresponderam a 18,2% dos casos e os

glioblastomas ou GBM (grau 4), a 2,8% (OSTROM et al., 2017). Quando acometem a faixa etária pediátrica, os astrocitomas ocupam classicamente a topografia infratentorial, região anatômica localizada abaixo da tenda do cerebelo. Essa informação é importante, uma vez que estes mesmos tumores na faixa etária adulta acometem principalmente a região supratentorial, caracterizando diferenças clínicas importantes entre esses dois grupos de pacientes (ELLISON, 2013).

2.2.2 Diagnóstico por neuroimagem

Os exames de imagem complementares mais comumente realizados são a TC e a RNM. Quando avaliados por TC, os astrocitomas pilocíticos e os difusos (OMS graus 1 e 2, respectivamente) geralmente não exibem realce de contraste e apresentam-se como massas de baixa densidade, com degeneração cística. A RNM mostra hipointensidade de sinal em T1 e hiperintensidade de sinal em T2, sem realce após injeção de gadolínio. Os astrocitomas anaplásicos (OMS grau 3) apresentam heterogeneidade de densidade tumoral e de intensidade de sinais em T1 e T2, quando avaliados por TC e RNM, respectivamente. Os GBM (OMS grau 4), quando avaliados por TC, apresentam-se como uma massa de limites irregulares, com realce de contraste em anel e região central hipodensa, devido à necrose, característica nessa lesão. A RNM mostra hiperintensidade de sinal em T1 e T2 e realce de contraste em anel (YOUSEM, 2010).

2.2.3 Classificação dos astrocitomas e suas características histopatológicas e moleculares

De acordo com a OMS, as neoplasias astrocitárias são classificadas em quatro graus, conforme mostra o QUADRO 2.

QUADRO 2 – CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DOS ASTROCITOMAS – OMS, 2016

TIPO HISTOLÓGICO	GRAU DA OMS
ASTROCITOMA PILOCÍTICO	1
ASTROCITOMA DIFUSO	2
ASTROCITOMA ANAPLÁSICO	3
GLIOBLASTOMA	4

FONTE: Adaptado de LOUIS (2016)

Os critérios histopatológicos avaliados incluem grau de hiper celularidade, atipia nuclear, índice mitótico, presença de vascularização glomeruloide e necrose (LOUIS, 2016). O astrocitoma pilocítico (grau 1 da OMS) ocorre quase sempre na faixa etária pediátrica. É o tumor cerebral mais comum nesse grupo de pacientes (ELLISON, 2013). Trata-se de uma lesão bem delimitada, geralmente com componente cístico. Ocorre majoritariamente em localização infratentorial, no cerebelo (FILHO, 2016). As lesões são bem delimitadas e o crescimento infiltrativo no parênquima adjacente é incomum. O quadro histopatológico é caracterizado por um padrão bifásico, um com células alongadas em arranjo compacto e denso, e outro com um fundo “piloso” e formação de microcistos. Acompanham, ainda, fibras de Rosenthal, agregados proteicos alongados e eosinofílicos (LOUIS, 2016). O índice mitótico é baixo e a presença de necrose é rara. Quando presente, deve-se considerar outros diagnósticos. Apresentam excelente prognóstico após a remoção cirúrgica e os relatos de progressão para graus mais elevados são extremamente raros (ELLISON, 2013). O astrocitoma difuso (grau 2 da OMS) apresenta aspecto infiltrativo, em comparação ao pilocítico (LOUIS, 2016). Apesar disso, esses astrocitomas (graus 1 e 2) são agrupados em astrocitomas de baixo grau (CASKEY et al., 2000). Do ponto de vista histopatológico, é composto por células com atipia nuclear discreta (núcleos irregulares e hiper cromáticos) e apresenta baixo índice mitótico. Suas variantes histológicas são: fibrilar (mais comum), protoplasmático e gemistocítico (HUSAIN, 2014). O astrocitoma anaplásico (grau 3 da OMS) é resultado da transformação de um astrocitoma

de grau mais baixo, via de regra, o difuso (grau 2). Apresenta celularidade mais alta e atipias mais evidentes, em comparação com o astrocitoma difuso. As células neoplásicas apresentam núcleos hipercromáticos e pleomórficos. Observa-se também a presença de numerosas mitoses. Pode haver neovascularização, porém a presença de necrose geográfica exclui esse diagnóstico (ELLISON, 2013 e LOUIS, 2016). O glioblastoma ou GBM (grau 4 da OMS) é uma neoplasia extremamente agressiva, com bordas infiltrativas. Frequentemente acomete os dois hemisférios cerebrais, criando imagem radiológica típica, descrita como “asa de borboleta”. Os achados microscópicos incluem atipias nucleares e pleomorfismo celular acentuados, células gigantes multinucleadas e índice mitótico alto. Caracteriza-se ainda por presença de necrose geográfica, com ou sem neovascularização glomeruloide. Os GBM são classificados em primários ou “*de novo*” e, secundários, quando surgem através da progressão de astrocitomas de graus mais baixos. Essa classificação é importante, pois as vias de gliomagênese são diferentes nos dois grupos. Na faixa etária adulta, a maioria dos GBM é secundária. Por outro lado, o GBM primário predomina na faixa etária pediátrica, sendo responsável por 90% dos casos (APPIN e BRAT, 2015). O prognóstico é ruim e a sobrevida após o diagnóstico é geralmente de meses. O GBM (grau 4), juntamente com o astrocitoma anaplásico (grau 3), são considerados astrocitomas de alto grau (ELLISON, 2013; CASKEY et al., 2000).

Do ponto de vista genético, quando se comparam os quatro graus de astrocitomas propostos pela OMS, também se observam diferenças. Descoberta recentemente, a duplicação no gene *BRAF* (B-Raf Proto-oncogene, Serine/Threonine Kinase), localizado no locus 7q34, está presente em mais de 80% dos casos de astrocitomas pilocíticos (KIERAN et al., 2014; HORBINSKI et al., 2012). Essa duplicação gera um ganho de função devido à formação da proteína de fusão *KIAA1549:BRAF*. Zhang et al (2013) evidenciaram que esta proteína deixa de ter o domínio autoinibitório, o que gera atividade permanente na via tumorigênica da *MAPK* (Mitogen Activated Protein Kinases). Os demais astrocitomas, por outro lado, apresentam alterações em outras vias. Nos adultos, os astrocitomas graus 2, 3 e 4 tem como base de sua formação a mutação nos genes *IDH1/IDH2* (Isocitrate Dehydrogenase 1/ Isocitrate Dehydrogenase 2). Essa mutação está presente em cerca de 80% dos

pacientes e confere um melhor prognóstico, em relação aos demais pacientes. Esses mesmos tumores, na faixa etária pediátrica, decorrem de outras mutações. Alterações nos genes *IDH1/IDH2* estão presentes em menos de 10% dos pacientes pediátricos. Recentemente, foi estabelecida uma relação entre mutações nos genes *ATRX* (*ATRX*, Chromatin Remodeler) e *H3F3A* (H3 Histone Family Member 3A), e gliomas pediátricos de alto grau (APPIN e BRAT, 2015). O *ATRX* é um gene localizado no cromossomo Xq21.1, cuja mutação leva ao alongamento alternativo de telômeros, tornando a célula imortal, o que exerce papel fundamental na gliomagenese infantil (ABEDALTHAGAFI et al., 2013 e SIEGAL, 2015). O mecanismo sugerido para esse alongamento é a perda de interação com histonas, proteínas que atuam no remodelamento da cromatina. As mutações no gene *H3F3A* também modificam as histonas e geram a histona H3.3. Existem diversas mutações nesse gene, e as mais comuns são as substituições de aminoácidos, principalmente K27M e G34R/V (SCHWARTZENTRUBER et al., 2012). Os pacientes com essa mutação no *H3F3A* apresentam pior prognóstico (VENETTI et al., 2014). A via molecular do *TP53* (Tumor Protein p53) também está alterada nos gliomas pediátricos de alto grau. Pollack et al (2002), bem antes das descobertas mais recentes, também demonstrou a superexpressão da proteína p53 em gliomas pediátricos de alto grau.

Assim, apesar de serem lesões histopatologicamente semelhantes às dos adultos, os astrocitomas pediátricos apresentam características clínicas, comportamento biológico e perfil genético e molecular próprios.

2.3 A PARQUINA

2.3.1 Dados gerais

O gene *PRKN* (Parkin RBR E3 Ubiquitin Protein Ligase), um dos maiores do genoma humano, codifica a proteína parkina. Esse gene se localiza no cromossomo 6q26, uma região classificada como sítio frágil comum (CFS – Common Fragile Sites), conhecida como *FRA6E* (STAROPOLI et al., 2003 e SHIMURA et al., 2001). Sítios frágeis comuns são regiões cromossômicas suscetíveis a instabilidade genômica, presentes em todos os

indivíduos, o que torna os genes presentes nessas regiões biologicamente importantes, devido ao seu papel potencial na carcinogênese (SMITH et al., 2006 e DENISON et al., 2003).

O *PRKN* é composto por 12 éxons e está presente em diversos órgãos, como cérebro, pulmão, cólon, testículo, ovários e coração (KAY et al., 2010; KITADA et al., 1998 e STAROPOLI et al., 2003). O produto do gene *PRKN*, a parquína, é uma proteína multifuncional, com 465 aminoácidos, que atua em diversos processos, tais como: metabolismo proteico, proteção contra estresse, homeostase mitocondrial, xenofagia e controle do ciclo, proliferação e migração celular (ZHANG et al., 2016; MANZANILLO et al., 2013; NARENDRA et al., 2008). Alterações nesse gene foram associadas a doenças como Parkinson, Alzheimer, autismo, diabetes melito tipo 2, hanseníase e diversas neoplasias (ZHANG et al., 2016; CESARI et al., 2003; KAY et al., 2010; MANZANILLO et al., 2013).

2.3.2 A parquína e sua multifuncionalidade

A parquína é uma proteína composta por domínio ubiquitina-like na porção N-terminal e regiões RING 1 e 2 na porção C-terminal, responsáveis pela função de E3 ubiquitina ligase. Assim, juntamente com outras proteínas da via da ubiquitina-proteassomo, atua na degradação de proteínas malformadas ou com perda de função, através de mono e poliubiquitinação das mesmas (MARTINEZ et al., 2017; PANICKER et al., 2017; DURCAN e FON, 2015; ZHENG e HUNTER, 2015).

Na doença de Parkinson, principalmente na forma autossômica recessiva ou familiar, a perda de função da parquína, em decorrência de diversas mutações no gene *PRKN* (deleções, inserções, variação do número de cópias), gera o acúmulo de proteínas anômalas no citoplasma de neurônios, levando à neurodegeneração e ao início precoce da doença (PANICKER et al., 2017; HATTORI e MIZUNO, 2017; KAY et al., 2010; CHAKRABORTY et al., 2017; STAROPOLI et al., 2003 e SHIMURA et al., 2001). Além disso, o acúmulo de proteínas ligadas ao ciclo celular, como a ciclina E, pode levar à progressão do ciclo celular. Quando esse estímulo à progressão do ciclo celular ocorre em células permanentes, que são células mitoticamente

incompetentes, como é o caso dos neurônios, isso resulta em morte celular, contribuindo para a neurodegeneração (VEERIAH et al., 2010 e VEERIAH et al., 2010).

O processo de mitofagia, uma forma seletiva de macroautofagia, também é um exemplo de perda de função da parkina (SHIRES et al., 2017; SWATEK e KOMANDER, 2016; SEIRAFI et al., 2015; CHEN e CHAN, 2009). As mitocôndrias senescentes, com alterações na polaridade das membranas, defeitos no ácido desoxirribonucleico (DNA) ou sujeitas à hipóxia, acumulam PINK-1 (PTEN-induced Kinase-1) em sua superfície levando ao recrutamento da parkina citosólica. A parkina poliubiquitina as proteínas da membrana mitocondrial, que se ligam então a várias proteínas, como o p62, optineurina e NBR1 (Neighbor of BRCA1), levando à formação dos autofagossomos, garantindo a não destruição da célula como um todo, através de mecanismos apoptóticos (VILLA et al., 2017; DRAKE et al., 2017; DURCAN e FON, 2015; CAULFIELD et al., 2015; KANE et al., 2014; TREMPE e FON, 2014). Danos menores, como a produção de radicais livres, sem alterar a polaridade da membrana mitocondrial, podem levar à formação de vesículas que degradam apenas as proteínas defeituosas, poupando a organela (SHLEVKOV e SCHWARZ, 2014). A remoção de mitocôndrias defeituosas é de grande importância na medida em que espécies reativas de oxigênio produzidas por estas organelas podem ter papel oncogênico. Desta forma, pode-se dizer que a mitofagia também atua como um processo de supressão tumoral (EID e KONDO, 2017). Um exemplo de doença bastante prevalente, na qual se observa o acúmulo de mitocôndrias disfuncionais, é o infarto agudo do miocárdio (IAM). Devido às altas taxas de metabolismo, o miocárdio possui uma elevada concentração de mitocôndrias. Assim, após o IAM, a atuação da parkina é essencial na remoção das mitocôndrias danificadas durante o evento isquêmico (SHIRES et al., 2017). A incapacidade de atuação na homeostase mitocondrial também é considerada uma das causas de perda de neuroproteção, contribuindo para a doença de Parkinson, assim como outras doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer e a esclerose amiotrófica lateral (ZHANG et al., 2016).

Além dessas funções, a parkina foi associada, através dos mecanismos de poliubiquitinação, à eliminação de microrganismos intracelulares, como o

Mycobacterium leprae ou o *Mycobacterium tuberculosis*, em um processo denominado xenofagia. Assim, a perda de expressão ou da função da parquina pode tornar os indivíduos mais suscetíveis à infecção por esses agentes infecciosos (MANZANILLO et al., 2013).

Com relação ao ciclo celular, a parquina atua nas suas diversas fases. Em cada uma delas, observa-se a variação da localização intracelular da parquina: na interfase, apresenta distribuição perinuclear; na mitose, localiza-se principalmente nos centrossomos e fusos mitóticos; e na citocinese, é encontrada em *midbody* (fuso central formado durante a citocinese) (SUN et al., 2013). Quando a parquina está superexpressa, há degradação das ciclinas D e E, e o ciclo celular é retido na fase G1, havendo parada de progressão na divisão celular (TAY et al., 2010 e YEO et al., 2012). Essa função da parquina também é uma das características do papel de gene supressor de tumor do *PRKN*. Por outro lado, quando há redução em sua expressão, observa-se estímulo à progressão do ciclo celular para as fases G2 e S (VEERIAH et al., 2010 e GONG et al., 2014). Assim, a ausência ou perda de função da parquina em diversas neoplasias contribui para a proliferação das células tumorais (BERNARDINI et al., 2017 e SHIRES et al., 2017). Estudos anteriores já demonstravam que deleções no braço longo do cromossomo 6, onde se localiza o *PRKN*, estavam associadas com o desenvolvimento de câncer de mama, ovário, pulmão, rim e pâncreas, além de melanoma, linfomas e leucemias. A introdução desse cromossomo intacto em células onde havia mutações reabilitou a capacidade de senescência da célula normal e, em linhagens de células neoplásicas, reduziu a tumorigênese (BERNARDINI et al., 2017; SUN et al., 2013; D'AMICO et al., 2015; KLIMCZAK et al., 2016 e TAY et al., 2010). Esse conhecimento prévio levou à hipótese de que haveria um ou mais genes supressores tumorais nessa região cromossômica. Com a descoberta e sequenciamento do gene *PRKN*, foi possível confirmar a perda de heterozigidade e redução de sua expressão gênica no contexto de diversas neoplasias (CESARI et al., 2003 e XU et al., 2014). Estudos com camundongos que tiveram o gene *PRKN* nocauteado mostraram um aumento no risco de desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (FUJIWARA et al., 2008). Outros estudos demonstraram que a indução de expressão de parquina em linhagens celulares que não a expressavam, resultou no aumento de sensibilidade à

indução apoptótica dessas células (DENISON et al., 2003). Em diversos tipos de tumores, alterações distintas no gene *PRKN* foram observadas (GONG et al., 2014). Essas mutações podem ser: pontuais, perda de heterozigosidade, alterações na regulação de RNAm, hipermetilação de promotor, perda do número de cópias, splicing anormal (XU et al., 2014). Outros estudos confirmaram que a deficiência de parkina gera progressão no ciclo celular por acúmulo de ciclinas D e E, levando um maior número de células às fases S e G2 do ciclo celular (GONG et al., 2014). A consequência é o surgimento de defeitos mitóticos, instabilidade cromossômica e proliferação celular desregulada, contribuindo para a carcinogênese. Tais achados foram evidenciados em modelos *in vivo* e *in vitro* (LEE et al., 2015 e VEERIAH et al., 2010). Ainda no contexto de supressão tumoral, observou-se uma relação entre a parkina e o p53. Essas duas proteínas, além dos efeitos sobre o ciclo celular, atuam também sobre o metabolismo da glicose na célula tumoral, reduzindo o efeito Warburg, uma via metabólica essencial nas células neoplásicas (ZHANG et al., 2013 e BERNARDINI et al., 2017). Recentemente, foi descrita uma associação entre a perda da parkina e o aumento de Bcl-xL (B-cell Lymphoma-extra Large), uma proteína com funções antiapoptóticas, o que contribuiria para a sobrevivência da célula neoplásica (GONG et al., 2017).

2.3.3 A parkina e os astrocitomas

O papel da parkina foi avaliado em alguns estudos no contexto de astrocitomas da faixa etária adulta. Lin et al (2015) evidenciaram que há redução na expressão de parkina em gliomas na faixa etária adulta. As mutações do gene *PRKN* apresentaram-se em razão direta ao grau histológico do tumor, sugerindo uma perda de parkina com a progressão tumoral. Assim, a expressão de parkina foi maior nos astrocitomas de baixo grau e menor nos astrocitomas de alto grau. Os resultados também mostraram que o estímulo à expressão de parkina, tanto em células *in vivo* quanto *in vitro*, correlacionou-se com menor proliferação das células tumorais. Por outro lado, a redução da expressão de parkina estimulou sua proliferação. Quando a sobrevida dos doentes foi avaliada, os dados mostraram que a maior expressão de parkina teve relação com maior taxa de sobrevida. Maugeri et al (2015) também

verificaram que, quando os astrocitomas foram comparados por grau, houve uma menor expressão imunohistoquímica de p16 no grau histológico mais elevado (GBM, grau 4 da OMS). Yeo et al (2012) corroboraram os achados, evidenciando que a perda da expressão da p16 promove a proliferação das células neoplásicas nos gliomas. Observou-se que a perda de p16 resultou em maiores níveis de ciclina D1, proporcionando a progressão do ciclo celular e incremento do índice mitótico. Veeriah et al (2010) perceberam um acúmulo de ciclina E, no contexto de redução da expressão da p16, sugerindo o mesmo resultado. A quantificação da expressão de p16 também se correlacionou inversamente com o grau tumoral dos gliomas. Além disso, a pesquisa demonstrou que a restauração da expressão da p16 em células *in vitro* e *in vivo* inibiu o crescimento tumoral, assim como demonstrado em outros estudos. Viotti et al (2014) verificaram que os níveis de p16 apresentaram padrão inverso aos de p53, em uma série de pacientes com GBM, oligodendroglioma e gliomas mistos. Há ainda uma associação inversa interessante entre a expressão de p16 e de VEGFR2 (Vascular Endotelial Growth Factor Receptor 2), um dos receptores de VEGF (Vascular Endotelial Growth Factor), proteína envolvida na neoangiogênese tumoral (YEO et al., 2012 e VEERIAH et al., 2010). Yin et al (2009), em consonância com os estudos descritos previamente, também constataram que a deleção do gene *PRKN*, entre outros, em amostras de glioblastoma, resultou na perda de expressão de p16 por essas células – perda de 50% em cerca de dois terços das amostras. Wang et al (2017) apresentaram um estudo no qual a superexpressão de p16 reduziu migração e invasão de linhagens celulares de glioblastoma *in vitro*. Por outro lado, o nocaute do gene *PRKN* nestas células estimulou a migração e invasão celular.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a presença de parquina, p53 e Ki67, através da técnica de imunohistoquímica, em astrocitomas pilocíticos, difusos, anaplásicos e glioblastomas de pacientes na faixa etária pediátrica, a fim de investigar a influência da parquina no diagnóstico e prognóstico desses pacientes.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a expressão tecidual da parquina, do p53 e do Ki67 nos casos de astrocitomas desse estudo.
- Comparar a expressão tecidual de parquina, p53 e Ki67 em cada um dos quatro graus histológicos dos astrocitomas, segundo a OMS (grau 1, 2, 3, 4), isolados e agrupados em baixo grau (graus 1 e 2) e alto grau (graus 3 e 4).
- Correlacionar a expressão imunohistoquímica da parquina com a do Ki67 e do p53.
- Correlacionar a expressão de parquina e do p53 com as variáveis clínico-patológicas.
- Correlacionar a expressão de parquina e do p53 com sobrevida e mortalidade.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS ESTUDADAS

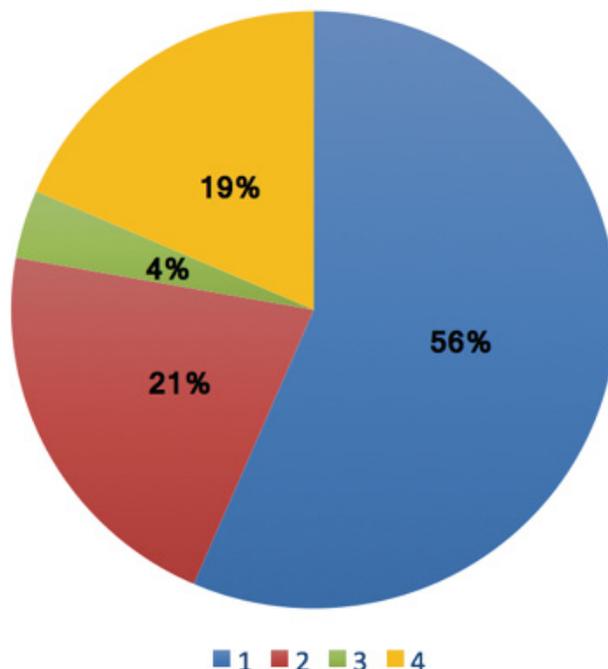
Este estudo foi revisto e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital Pequeno Príncipe, em Curitiba, Paraná (Número de registro: 1.787.170). Foram selecionados 186 casos de astrocitomas pediátricos, diagnosticados entre 2003 e 2015, provenientes do Hospital Pequeno Príncipe, referência nacional entre hospitais pediátricos. Após a seleção dos casos, avaliou-se a disponibilidade dos blocos de parafina. Os casos cujos blocos não se encontravam mais na instituição ou que não continham amostra neoplásica suficiente para a realização dos testes de imunohistoquímica foram excluídos. Ao final desta análise, restaram 108 casos, incluindo 61 astrocitomas pilocíticos (grau 1), 23 astrocitomas difusos (grau 2), 4 astrocitomas anaplásicos (grau 3) e 20 glioblastomas (grau 4), conforme mostra a FIGURA 1.

Os dados clínicos dos pacientes foram pesquisados em seus prontuários.

As seguintes variáveis clínico-patológicas foram consideradas para serem comparadas com a expressão tecidual de parkina, p53 e Ki67:

- gênero dos pacientes;
- idade dos pacientes ao diagnóstico;
- topografia da lesão;
- grupo histológico:
 - astrocitomas de baixo grau (graus 1 e 2)
 - astrocitomas de alto grau (graus 3 e 4)
- tempo de sobrevivência;
- desfecho óbito

FIGURA 1 – GRÁFICO COM A PORCENTAGEM INICIAL DE CASOS, CLASSIFICADOS PELO GRAU HISTOLÓGICO DA OMS



FONTE: o Autor (2017).

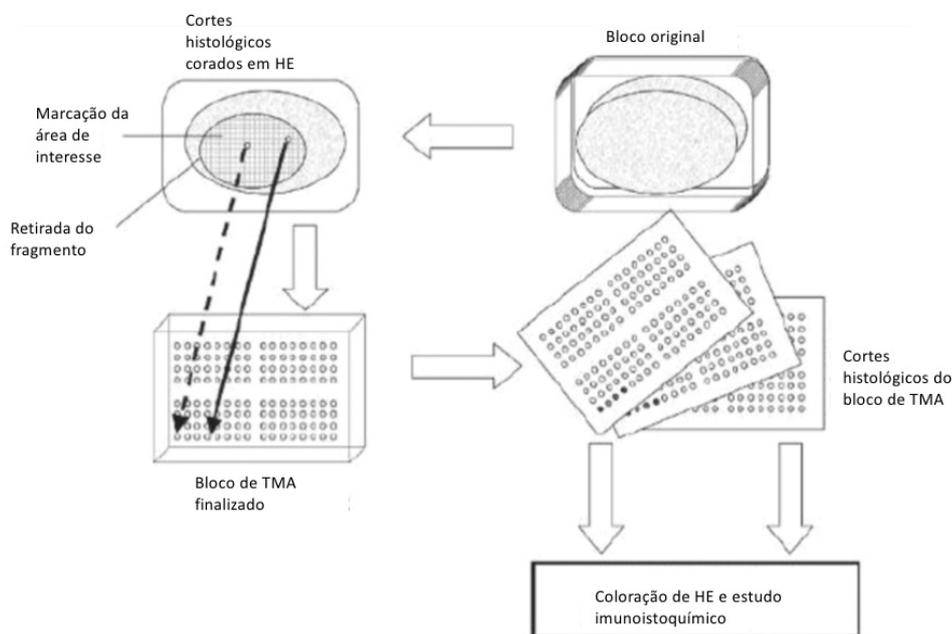
Após as reações de imunohistoquímica, alguns casos foram excluídos devido a artefatos técnicos e analíticos. Posteriormente, durante as avaliações de correlação anatomoclínica e desfecho, outros casos foram excluídos por ausência de dados de prontuário. Assim, observa-se uma variação no n, dependendo da análise em questão, conforme descrito em maiores detalhes nos resultados.

4.2 PREPARO DE LÂMINAS HISTOLÓGICAS E TMA (TISSUE MICROARRAY)

A partir dos blocos de parafina dos casos selecionados, foram feitos cortes histológicos com 4µm de espessura, utilizando-se uma placa fria (Leica EG1130, Alemanha), um micrótomo (Reichert-Jung 2030, Bicut, Alemanha) e uma lâmina cortante (Marienfeld). As lâminas histológicas foram coradas com a técnica de hematoxilina-eosina (HE). Posteriormente, foram observadas ao microscópio óptico, e foi realizada a marcação das áreas neoplásicas. Buscou-

se demarcar áreas nas quais alterações degenerativas como necrose, hemorragia e calcificações, bem como artefatos de fixação ou inclusão, não estivessem presentes. Por meio de broca Trefina Neodent[®], cilíndrica, de 3 mm de diâmetro, acoplada a uma caneta-pino-chave e a um motor de suspensão de 130 watts, da marca Bethil[®], foram coletadas as amostras dessas áreas selecionadas previamente. Para cada um dos 108 casos, foram coletadas duas amostras neoplásicas de áreas diferentes.

FIGURA 2 – MÉTODO DE CONFECÇÃO DOS BLOCOS DE TMA



FONTE: Adaptado de JAWHAR (2009)

Em seguida, desenhou-se um mapa cartesiano com a localização que as amostras de cada caso ocupariam no bloco de TMA. Estas amostras foram, então, reemblocadas utilizando-se parafina líquida, a 60°C, e colocadas sobre uma placa de gelo, a 10°C negativos, durante 30 minutos. O processo de confecção do TMA, resultou em novos blocos de parafina, conforme demonstrado pela FIGURA 3.

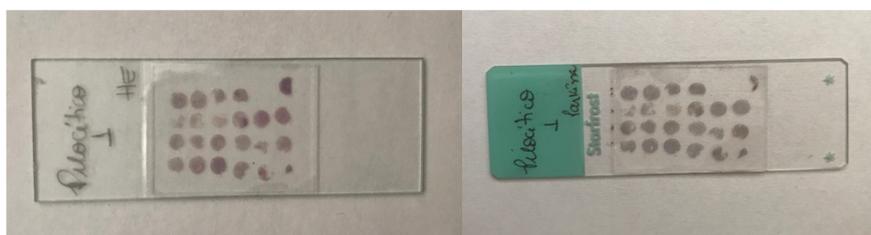
FIGURA 3 – BLOCO DE PARAFINA DE TMA



FONTE: O autor (2017).

A partir do TMA finalizado, foram realizados novos cortes histológicos sequenciais de 4µm de espessura com a utilização de uma placa fria (Leica EG1130, Alemanha) e um micrótomo (Reichert-Jung 2030, Bicut, Alemanha). Foram utilizadas as lâminas Marienfeld e Superfrost® Plus para o preparo dos cortes histológicos, que foram corados com hematoxilina e eosina (HE) e submetidos a estudo imunoistoquímico, respectivamente (FIGURA 4). Os cortes histológicos corados pelo HE tiveram o objetivo de confirmar a presença de neoplasia nas amostras do TMA.

FIGURA 4 – LÂMINA HISTOLÓGICA CORADA EM HE (ESQUERDA) E LÂMINA HISTOLÓGICA CORADA POR IMUNOISTOQUÍMICA (DIREITA), DO BLOCO DE TMA



FONTE: o Autor (2018).

4.3 ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO DAS AMOSTRAS

A partir dos cortes histológicos, realizou-se a pesquisa imunoistoquímica de parquina, p53 e Ki67. As lâminas foram submetidas à desparafinização com xilol, desidratação com álcool, e reidratação com água. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com álcool metílico e peróxido de hidrogênio. Em seguida, as lâminas foram incubadas com os anticorpos contra as proteínas estudadas, conforme diluição apresentada no QUADRO 3, em câmara úmida e fria (2 a 8°C), em processo *overnight*.

QUADRO 3 – ESPECIFICAÇÕES DOS ANTICORPOS UTILIZADOS NO ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO

PROTEÍNA	ANTICORPO	ESPECIFICAÇÕES	ORIGEM	MARCA	DILUIÇÃO
PARQUINA	anti-parkin antibody	monoclonal de camundongo	Cambridge MA - USA	Abcam	1:100
p53	anti-human p53 protein antibody	monoclonal de camundongo	Glostrup - Dinamarca	Dako	1:200
Ki67	anti-Ki67 antibody	monoclonal de camundongo	Glostrup - Dinamarca	Dako	1:150

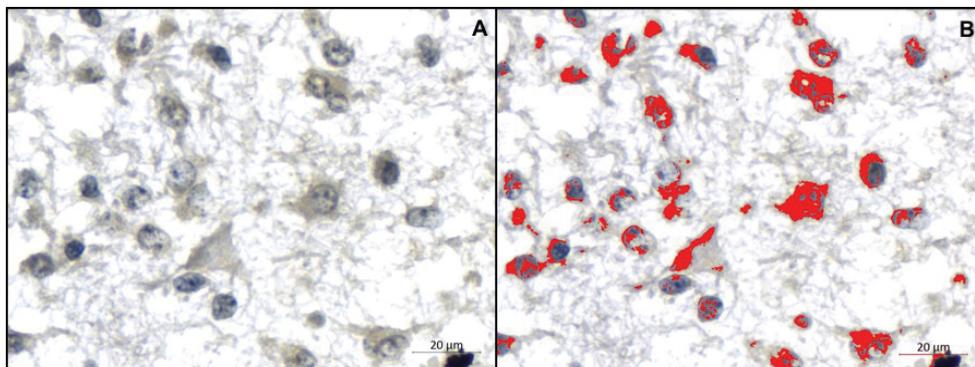
FONTE: o Autor (2017).

Para estes procedimentos, seguiu-se o protocolo do Laboratório de Patologia Experimental da PUC-PR. O protocolo ainda indicava as condições de incubação com polímero de revelação (*Spring*), adicionado após a incubação com os anticorpos. Duas soluções compunham este polímero: a primeira (*complement*), feita em 10 minutos e a segunda (*conjugate*), em 15 minutos. A revelação foi feita com complexo DAB (3,3'diaminibenzidine) + substrato e a contracoloração, com hematoxilina de Harris. Em seguida, realizou-se a desidratação com álcool etílico 100% e clarificação com xilol. Finalmente, as lâminas foram montadas, utilizando-se a resina Entellan[®].

4.4 ANÁLISE MORFOMÉTRICA QUANTITATIVA DA PARQUINA

Uma das técnicas utilizadas para a quantificação da expressão de parquina foi a morfometria. Inicialmente, as lâminas submetidas à imunohistoquímica com os anticorpos anti-parquina foram analisadas pelo digitalizador de lâminas automático AxioScan®, a partir do qual foram geradas imagens de cada uma das amostras do TMA. Foram selecionadas cerca de 50 imagens de cada amostra, com áreas neoplásicas mais representativas, excluindo-se aquelas com material necrótico ou áreas de artefato de corte ou perda de material durante o processamento (áreas em branco). Em seguida, essas imagens foram analisadas pelo *software* Image Proplus®, que utiliza morfometria de cores. Assim, criou-se uma máscara capaz de identificar e quantificar as áreas positivas de interesse. A cor analisada pelo *software* foi o castanho, indicativo de positividade para parquina. A máscara gerada tingia de cor vermelha estas áreas positivas de interesse. Aplicou-se, então, a máscara em cada uma das imagens selecionadas previamente. O *software* forneceu os resultados em micrômetros quadrados, gerando a área com marcação positiva em cada imagem. Finalmente, calculou-se a média destas áreas positivas nas imagens de cada amostra, obtendo-se a área com marcação positiva em cada amostra.

FIGURA 5 – (A) EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE PARQUINA EM ASTROCITOMA PILOCÍTICO (40X) (B) A MESMA AMOSTRA SUBMETIDA À MÁSCARA PARA ANÁLISE MORFOMÉTRICA



FONTE: o Autor (2018).

4.5 ANÁLISE MORFOLÓGICA SEMIQUANTITATIVA E QUALITATIVA DA PARQUINA E DO p53

Para a análise morfológica da parquina e do p53, foi utilizado o microscópio óptico Olympus CH30®, observando-se imagens das lâminas em objetivas de 4x, 10x e 40x. Um escore modificado de Allred foi criado para a avaliação da expressão imunistoquímica destas proteínas. Os QUADROS 4 e 5 descrevem os escores de Allred original e modificado, respectivamente. As amostras foram então classificadas, de acordo com a distribuição da positividade, em: focal, quando positiva em menos de 10% das células neoplásicas e difusa, quando acima de 10%. A intensidade da positividade também foi graduada em fraca e forte (graus 1 e 2, respectivamente).

QUADRO 4 – ESCORE DE ALLRED ORIGINAL

DISTRIBUIÇÃO	%	INTENSIDADE	MARCAÇÃO
GRAU 0	0	0	NENHUMA
GRAU 1	< 1	1	FRACA
GRAU 2	1 – 10	2	MODERADA
GRAU 3	10 – 33	3	FORTE
GRAU 4	33 – 66		
GRAU 5	66 – 100		

FONTE: ADAPTADO DE KURESHI (2010).

QUADRO 5 – ESCORE DE ALLRED MODIFICADO

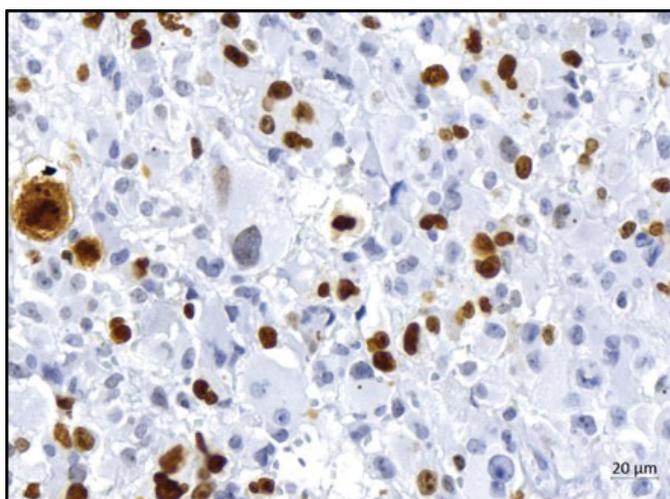
DISTRIBUIÇÃO	%	INTENSIDADE	MARCAÇÃO
GRAU 0	0	GRAU 0	NENHUMA
GRAU 1	< 10% - FOCAL	GRAU 1	FRACA
GRAU 2	> 10% - DIFUSO	GRAU 2	FORTE

FONTE: o Autor (2017).

4.6 ANÁLISE QUANTITATIVA DO Ki67

A avaliação da expressão da proteína Ki67 foi realizada através da contagem dos núcleos positivos e atribuição de porcentagem em relação ao total de células neoplásicas. Para essa análise, utilizou-se o microscópio Olympus CH30® e a contagem celular foi realizada por dois patologistas simultaneamente. Inicialmente, no campo de 4x, foi selecionada uma área com a maior positividade de núcleos (*hotspot*). Nessa área, agora no campo de 40x, foi selecionado novamente o *hotspot*. Esse *hotspot* foi dividido em quatro quadrantes. Escolheu-se um desses quatro quadrantes e realizou-se a contagem. Então os valores foram calculados em porcentagem, considerando-se os núcleos positivos em relação ao total de células neoplásicas.

FIGURA 6 – EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE Ki67 EM *HOTSPOT* DE GLIOBLASTOMA (20X)



FONTE: o Autor (2018).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados de variáveis quantitativas foram descritos por valores mínimos, valores máximos e medianas. Para variáveis categóricas, foram apresentados frequências e percentuais. A comparação entre dois grupos em relação a variáveis quantitativas foi feita usando-se o teste t de Student para amostras independentes. Para atender a condição de normalidade (avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov), os dados foram previamente submetidos a

uma transformação logarítmica. A associação entre duas variáveis qualitativas foi avaliada pelo teste exato de Fisher. A avaliação da sobrevida foi feita utilizando-se curvas de Kaplan-Meier e analisada usando-se o teste de Log-rank. Os dados foram analisados com o programa computacional IBM® SPSS Statistics v.20.0.

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DESCRITIVA DA AMOSTRA

As TABELAS 1 e 2 apresentam dados clínico-patológicos da amostra.

A amostra analisada era composta inicialmente por 108 casos classificados, respectivamente, como grau histológico 1, 2, 3 e 4. Quando agrupados em astrocitomas de baixo e alto grau, foram obtidos 84 e 24 casos, respectivamente. A tabela mostra ainda, divididos por grau histológico, dados de gênero, média de idade ao diagnóstico e topografia do tumor. O valor do n, para cada uma dessas variáveis, não é o mesmo, pois não foram obtidos dados de prontuário de todos os casos iniciais. O desfecho dos pacientes evidenciou 5 óbitos, sendo 4 pacientes classificados como grau 4, e um paciente, como grau 2.

A análise morfométrica parquina na amostra como um todo revelou expressão tecidual mediana de $115,2\mu\text{m}^2$ (mínima de $2,25\mu\text{m}^2$ e máxima de $2985,0\mu\text{m}^2$). A análise morfológica da parquina revelou distribuição focal em 46,3% dos casos e difusa, em 53,7%. Com relação à intensidade da marcação, observou-se intensidade fraca em 94,4% e forte, em 5,6%. A análise morfológica do p53 mostrou distribuição focal em 57,7% dos casos e difusa, em 42,3%. Com relação à intensidade da marcação, 55,8% dos casos apresentou intensidade fraca e 44,2%, forte. A análise imunoistoquímica do Ki67 evidenciou uma porcentagem mediana de 7,0%, com 1,0% de porcentagem mínima e 52,0% de máxima.

TABELA 1 – DADOS DESCRITIVOS DA AMOSTRA, INCLUINDO GRAU HISTOLÓGICO TUMORAL (ISOLADO E AGRUPADO), GÊNERO, TOPOGRAFIA DO TUMOR, IDADE E DESFECHO

DADOS CLINICO-PATOLÓGICOS DA AMOSTRA					
GRAU HISTOLÓGICO n*=108	GRAU	1	2	3	4
	n	61	23	4	20
GRAU HISTOLÓGICO AGRUPADO n*=108	GRAU	BAIXO GRAU		ALTO GRAU	
	n	84		24	
GÊNERO n=108	FEM	35	12	3	7
	MASC	26	11	1	13
TOPOGRAFIA n*=61	ST	11	7	3	7
	IT	27	5	0	1
MÉDIA DA IDADE AO DX n*=67	ANOS	5,58	7,32	11,64	9,20
		(0,15-14,39)	(0,03-12,93)	(8,32-14,46)	(2,10-13,79)
DESFECHO n*=67	VIVOS	42	13	3	4
	MORTOS	0	1	0	4

Legenda: *O n apresenta variações por ausência de dados de prontuário; MASC-masculino; FEM-feminino; ST-supratentorial; IT-infratentorial; DX-diagnóstico

TABELA 2 – DADOS DESCRITIVOS DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA TECIDUAL DE PARQUINA, DE p53 E DE Ki67

EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA				
PARQUINA MORFOMETRIA n*=108	MÍNIMO	2,25		
	MÁXIMO	2985,0		
	MEDIANA	115,2		
PARQUINA MORFOLOGIA n*=108	DISTRIBUIÇÃO	FOCAL	50	46,3%
		DIFUSA	58	53,7%
	INTENSIDADE	FRACA	102	94,4%
		FORTE	6	5,6%
p53 MORFOLOGIA n*=104	DISTRIBUIÇÃO	FOCAL	60	57,7%
		DIFUSA	44	42,3%
	INTENSIDADE	FRACA	58	55,8%
		FORTE	46	44,2%
Ki67 CONTAGEM - % n*=105	MÍNIMO	1,0		
	MÁXIMO	52,0		
	MEDIANA	7,0		

Legenda: *O n apresenta variações por artefatos técnicos e analíticos. Os dados morfométricos estão em micrômetros quadrados (μm^2)

5.2 ANÁLISE DAS VARIÁVEIS CLÍNICO-PATOLÓGICAS EM RELAÇÃO À EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE PARQUINA E DE p53

5.2.1 Avaliação da associação entre parquina e p53 (distribuição e intensidade) e gênero:

Os resultados das associações entre gênero e parquina e p53 não apresentaram significância estatística ($p > 0,05$), conforme demonstram as TABELAS 3, 4, 5 e 6.

TABELA 3 – DISTRIBUIÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE PARQUINA DE ACORDO COM O GÊNERO (n=108)

PARQUINA (DISTRIBUIÇÃO)	GÊNERO	
	FEMININO	MASCULINO
FOCAL	26	24
	45,6%	47,1%
DIFUSA	31	27
	54,4%	52,9%
TOTAL	57	51

Legenda: Valor de $p > 0,05$ (teste exato de Fisher, $p < 0,05$); variação do n em decorrência de exclusões por ausência de dados de prontuário ou por artefatos técnicos e analíticos

TABELA 4 – INTENSIDADE DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE PARQUINA DE ACORDO COM O GÊNERO (n=108)

PARQUINA (INTENSIDADE)	GÊNERO	
	FEMININO	MASCULINO
FRACA	53	49
	92,9%	96,1%
FORTE	4	2
	7,1%	3,9%
TOTAL	57	51

Legenda: Valor de $p > 0,05$ (teste exato de Fisher, $p < 0,05$); variação do n em decorrência de exclusões por ausência de dados de prontuário ou por artefatos técnicos e analíticos

TABELA 5 – DISTRIBUIÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE p53 DE ACORDO COM O GÊNERO (n=105)

p53 (DISTRIBUIÇÃO)	GÊNERO	
	FEMININO	MASCULINO
FOCAL	29	29
	55,8%	59,2%
DIFUSA	23	20
	44,2%	40,8%
TOTAL	52	49

Legenda: Valor de $p > 0,05$ (teste exato de Fisher, $p < 0,05$); variação do n em decorrência de exclusões por ausência de dados de prontuário ou por artefatos técnicos e analíticos

TABELA 6 – INTENSIDADE DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE p53 DE ACORDO COM O GÊNERO (n=105)

p53 (INTENSIDADE)	GÊNERO	
	FEMININO	MASCULINO
FRACA	29	28
	55,8%	57,1%
FORTE	23	21
	44,2%	42,9%
TOTAL	52	49

Legenda: Valor de $p > 0,05$ (teste exato de Fisher, $p < 0,05$); variação do n em decorrência de exclusões por ausência de dados de prontuário ou por artefatos técnicos e analíticos

5.2.2 Avaliação da associação entre parquima e p53 (distribuição e intensidade) e idade:

Observa-se uma associação significativa entre a intensidade de expressão imunoistoquímica de parquima e a idade ($p = 0,037$). Parece haver uma correlação inversa entre a idade e a intensidade, sendo a marcação imunoistoquímica de parquima fraca em pacientes mais velhos. As demais associações não foram significativas ($p > 0,05$), como demonstram as TABELAS 7 e 8.

TABELA 7 – DISTRIBUIÇÃO E INTENSIDADE DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE PARQUINA, DE ACORDO COM A IDADE (n=67)

PARQUINA		n	IDADE (ANOS)			VALOR DE p*
			MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO	
DISTRIBUIÇÃO	FOCAL	31	7,6	1,5	14,5	0,092
	DIFUSA	36	4,3	0,0	14,4	
INTENSIDADE	FRACA	63	5,8	0,2	14,4	0,037
	FORTE	4	2,8	0,0	3,7	

Legenda: *Teste t de Student para amostras independentes, $p < 0,05$; variação do n em decorrência de exclusões por ausência de dados de prontuário ou por artefatos técnicos e analíticos

TABELA 8 – DISTRIBUIÇÃO E INTENSIDADE DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE p53, DE ACORDO COM A IDADE (n=64)

p53		n	IDADE (ANOS)			VALOR DE p*
			MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO	
DISTRIBUIÇÃO	FOCAL	38	4,7	0,0	14,5	0,531
	DIFUSA	26	6,6	0,2	13,8	
INTENSIDADE	FRACA	36	5,7	0,0	14,5	0,990
	FORTE	28	4,6	1,1	13,8	

Legenda: *Teste t de Student para amostras independentes, $p < 0,05$; variação do n em decorrência de exclusões por ausência de dados de prontuário ou por artefatos técnicos e analíticos

5.2.3 Avaliação da associação entre parquina e p53 (distribuição e intensidade) e topografia da lesão:

Os resultados das associações entre topografia e parquina e p53 não apresentaram significância estatística ($p > 0,05$), conforme demonstram as TABELAS 9, 10, 11 e 12.

TABELA 9 – DISTRIBUIÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE PARQUINA, DE ACORDO COM A TOPOGRAFIA DA LESÃO (n=61)

PARQUINA (DISTRIBUIÇÃO)	TOPOGRAFIA	
	IT	ST
FOCAL	17	12
	51,5%	42,9%
DIFUSA	16	16
	48,5%	57,1%
TOTAL	33	28

Legenda: Valor de $p > 0,05$ (teste exato de Fisher, $p < 0,05$); variação do n em decorrência de exclusões por ausência de dados de prontuário ou por artefatos técnicos e analíticos

TABELA 10 – INTENSIDADE DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE PARQUINA, DE ACORDO COM A TOPOGRAFIA DA LESÃO (n=61)

PARQUINA (INTENSIDADE)	TOPOGRAFIA	
	IT	ST
FRACA	31	27
	93,9%	96,4%
FORTE	2	1
	6,1%	3,6%
TOTAL	33	28

Legenda: Valor de $p > 0,05$ (teste exato de Fisher, $p < 0,05$); variação do n em decorrência de exclusões por ausência de dados de prontuário ou por artefatos técnicos e analíticos

TABELA 11 – DISTRIBUIÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE p53, DE ACORDO COM A TOPOGRAFIA DA LESÃO (n=58)

p53 (DISTRIBUIÇÃO)	TOPOGRAFIA	
	IT	ST
FOCAL	19	15
	61,3%	55,6%
DIFUSA	12	12
	38,7%	44,4%
TOTAL	31	27

Legenda: Valor de $p > 0,05$ (teste exato de Fisher, $p < 0,05$); variação do n em decorrência de exclusões por ausência de dados de prontuário ou por artefatos técnicos e analíticos

TABELA 12 – INTENSIDADE DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE p53, DE ACORDO COM A TOPOGRAFIA DA LESÃO (n=58)

p53 (INTENSIDADE)	TOPOGRAFIA	
	IT	ST
FRACA	19	13
	61,3%	48,1%
FORTE	12	14
	38,7%	51,9%
TOTAL	31	27

Legenda: Valor de $p > 0,05$ (teste exato de Fisher, $p < 0,05$); variação do n em decorrência de exclusões por ausência de dados de prontuário ou por artefatos técnicos e analíticos

5.3 AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE A ANÁLISE DE PARQUINA E GRAU HISTOLÓGICO TUMORAL

5.3.1 Avaliação da associação entre a análise morfométrica quantitativa de parquina e o grau histológico tumoral:

Avaliou-se a correlação entre a expressão imunoistoquímica da parquina, através de análise morfométrica, e os astrocitomas. Inicialmente, comparou-se os astrocitomas agrupados em baixo grau (graus 1 e 2) e alto grau (graus 3 e 4). Posteriormente, comparou-se os astrocitomas de baixo grau com os glioblastomas (grau 4). Resultados significativos foram encontrados ao se observar uma maior expressão de parquina em astrocitomas de baixo grau ($p = 0,011$), conforme mostram as TABELAS 13 e 14.

TABELA 13 – AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE PARQUINA EM RELAÇÃO AOS ASTROCITOMAS DE BAIXO E ALTO GRAU (n=108)

VARIÁVEL	ASTROCITOMAS	n	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO	VALOR DE p*
PARQUINA	BAIXO GRAU	84	143,3	5,6	2985,1	0,011
	ALTO GRAU	24	48,4	2,2	1548,4	

Legenda: *Teste t de Student para amostras independentes, $p < 0,05$; variação do n em decorrência de exclusões por ausência de dados de prontuário ou por artefatos técnicos e analíticos

TABELA 14 – AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE PARQUINA EM RELAÇÃO AOS ASTROCITOMAS DE BAIXO GRAU E GLIOBLASTOMAS (n=104)

VARIÁVEL	ASTROCITOMAS	n	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO	VALOR DE p*
PARQUINA	BAIXO GRAU	84	143,3	5,6	2985,1	0,002
	GRAU 4	20	37,9	2,25	1351	

Legenda: *Teste t de Student para amostras independentes, $p < 0,05$; variação do n em decorrência de exclusões por ausência de dados de prontuário ou por artefatos técnicos e analíticos

5.3.2 Avaliação da associação entre a análise morfológica semiquantitativa e qualitativa de parquina (distribuição e intensidade) e o grau histológico tumoral:

Avaliou-se a correlação entre a distribuição e a intensidade da marcação imunoistoquímica da parquina, por meio do escore Allred modificado, e os astrocitomas. Inicialmente, comparou-se os astrocitomas agrupados em baixo grau (graus 1 e 2) e alto grau (graus 3 e 4). Posteriormente, comparou-se os astrocitomas de baixo grau com os glioblastomas (grau 4), conforme evidenciam as TABELAS 15, 16, 17 e 18. Com relação à análise da distribuição da parquina, observou-se uma associação nos astrocitomas agrupados em baixo e alto grau ($p = 0,036$). A parquina tende a ter distribuição difusa nos astrocitomas de baixo grau e; focal, nos de alto grau, conforme mostra a TABELA 15. Não houve resultados significativos com relação à intensidade de marcação da parquina ($p > 0,05$).

TABELA 15 – AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE PARQUINA EM RELAÇÃO AOS ASTROCITOMAS DE BAIXO E ALTO GRAU (n=108)

PARQUINA (DISTRIBUIÇÃO)	ASTROCITOMAS	
	BAIXO GRAU	ALTO GRAU
FOCAL	34	16
	40,5%	66,7%
DIFUSA	50	8
	59,5%	33,3%
TOTAL	84	24

Legenda: Valor de $p = 0,036$ (teste exato de Fisher, $p < 0,05$); variação do n em decorrência de exclusões por ausência de dados de prontuário ou por artefatos técnicos e analíticos

TABELA 16 – AVALIAÇÃO DA INTENSIDADE DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE PARQUINA EM RELAÇÃO AOS ASTROCITOMAS DE BAIXO E ALTO GRAU (n=108)

PARQUINA (INTENSIDADE)	ASTROCITOMAS	
	BAIXO GRAU	ALTO GRAU
FRACA	78	24
	92,9%	100,0%
FORTE	6	0
	7,1%	0,0%
TOTAL	84	24

Legenda: Valor de $p > 0,05$ (teste exato de Fisher, $p < 0,05$); variação do n em decorrência de exclusões por ausência de dados de prontuário ou por artefatos técnicos e analíticos

TABELA 17 – AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE PARQUINA EM RELAÇÃO AOS ASTROCITOMAS DE BAIXO GRAU E GLIOBLASTOMAS (n=104)

PARQUINA (DISTRIBUIÇÃO)	ASTROCITOMAS	
	BAIXO GRAU	GRAU 4
FOCAL	34	12
	40,5%	60,0%
DIFUSA	50	8
	59,5%	40,0%
TOTAL	84	20

Legenda: Valor de $p > 0,05$ (teste exato de Fisher, $p < 0,05$); variação do n em decorrência de exclusões por ausência de dados de prontuário ou por artefatos técnicos e analíticos

TABELA 18 – AVALIAÇÃO DA INTENSIDADE DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE PARQUINA EM RELAÇÃO AOS ASTROCITOMAS DE BAIXO GRAU E GLIOBLASTOMAS (n=104)

PARQUINA (INTENSIDADE)	ASTROCITOMAS	
	BAIXO GRAU	GRAU 4
FRACA	78	20
	92,9%	100,0%
FORTE	6	0
	7,1%	0,0%
TOTAL	84	20

Legenda: Valor de $p > 0,05$ (teste exato de Fisher, $p < 0,05$); variação do n em decorrência de exclusões por ausência de dados de prontuário ou por artefatos técnicos e analíticos

5.4 AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE A ANÁLISE MORFOLÓGICA SEMIQUANTITATIVA E QUALITATIVA DE p53 (DISTRIBUIÇÃO E INTENSIDADE) E O GRAU HISTOLÓGICO TUMORAL

Avaliou-se a correlação entre a distribuição e a intensidade da marcação imunoistoquímica do p53, por meio do escore Allred modificado, e os astrocitomas. Inicialmente, comparou-se os astrocitomas agrupados em baixo alto grau. Posteriormente, comparou-se os astrocitomas de baixo grau com os glioblastomas (grau 4). Os astrocitomas de alto grau apresentaram marcação difusa e intensa de p53 (distribuição - $p < 0,001$; intensidade - $p = 0,015$), quando comparados aos de baixo grau, o mesmo ocorrendo para o glioblastoma com relação à distribuição ($p < 0,001$) e à intensidade ($p = 0,010$). Os resultados estão evidenciados nas TABELAS 19, 20, 21 e 22.

TABELA 19 – AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE p53 EM RELAÇÃO AOS ASTROCITOMAS DE BAIXO E ALTO GRAU (n=104)

p53 (DISTRIBUIÇÃO)	ASTROCITOMAS	
	BAIXO GRAU	ALTO GRAU
FOCAL	56	4
	68,3%	18,2%
DIFUSA	26	18
	31,7%	81,8%
TOTAL	82	22

Legenda: Valor de $p < 0,001$ (teste exato de Fisher, $p < 0,05$); variação do n em decorrência de exclusões por ausência de dados de prontuário ou por artefatos técnicos e analíticos

TABELA 20 – AVALIAÇÃO DA INTENSIDADE DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE p53 EM RELAÇÃO AOS ASTROCITOMAS DE BAIXO E ALTO GRAU (n=104)

p53 (INTENSIDADE)	ASTROCITOMAS	
	BAIXO GRAU	ALTO GRAU
FRACA	51	7
	62,2%	31,8%
FORTE	31	15
	37,8%	68,2%
TOTAL	82	22

Legenda: Valor de $p = 0,015$ (teste exato de Fisher, $p < 0,05$); variação do n em decorrência de exclusões por ausência de dados de prontuário ou por artefatos técnicos e analíticos

TABELA 21 – AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE p53 EM RELAÇÃO AOS ASTROCITOMAS DE BAIXO GRAU E GLIOBLASTOMAS (n=100)

p53 (DISTRIBUIÇÃO)	ASTROCITOMAS	
	BAIXO GRAU	GRAU 4
FOCAL	56	2
	68,3%	11,1%
DIFUSA	26	16
	31,7%	88,9%
TOTAL	82	18

Legenda: Valor de $p < 0,001$ (teste exato de Fisher, $p < 0,05$); variação do n em decorrência de exclusões por ausência de dados de prontuário ou por artefatos técnicos e analíticos

TABELA 22 – AVALIAÇÃO DA INTENSIDADE DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE p53 EM RELAÇÃO AOS ASTROCITOMAS DE BAIXO GRAU E GLIOBLASTOMAS (n=100)

p53 (INTENSIDADE)	ASTROCITOMAS	
	BAIXO GRAU	GRAU 4
FRACA	51	5
	62,2%	27,8%
FORTE	31	13
	37,8%	72,2%
TOTAL	82	18

Legenda: Valor de $p = 0,010$ (teste exato de Fisher, $p < 0,05$); variação do n em decorrência de exclusões por ausência de dados de prontuário ou por artefatos técnicos e analíticos

5.5 AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE A ANÁLISE QUANTITATIVA DE Ki67 E O GRAU HISTOLÓGICO TUMORAL

Avaliou-se a correlação entre a porcentagem de células neoplásicas com expressão imunoistoquímica de Ki67 e os astrocitomas. Inicialmente, comparou-se os astrocitomas agrupados em baixo e alto grau. Posteriormente, comparou-se os astrocitomas de baixo grau com os glioblastomas (grau 4). Resultados significativos foram encontrados, conforme as TABELAS 23 e 24. Conforme esperado, os astrocitomas de alto grau, especialmente o glioblastoma, têm índice mitótico mais elevado ($p < 0,001$).

TABELA 23 – AVALIAÇÃO DA CONTAGEM DE Ki67 EM RELAÇÃO AOS ASTROCITOMAS DE BAIXO E ALTO GRAU (n=105)

VARIÁVEL	ASTROCITOMAS	n	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO	VALOR DE p^*
Ki67	BAIXO GRAU	82	6,0	1,0	28,0	<0,001
	ALTO GRAU	23	16,0	2,0	52,0	

Legenda: *Teste t de Student para amostras independentes (após transformação logarítmica), $p < 0,05$; variação do n em decorrência de exclusões por artefatos técnicos e analíticos

TABELA 24 – AVALIAÇÃO DA CONTAGEM DE Ki67 EM RELAÇÃO AOS ASTROCITOMAS DE BAIXO GRAU E GLIOBLASTOMAS (n =101)

VARIÁVEL	ASTROCITOMAS	n	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO	VALOR DE p*
Ki67	BAIXO GRAU	82	6,0	1,0	28,0	<0,001
	GRAU 4	19	14,0	2,0	52,0	

Legenda: *Teste t de Student para amostras independentes (após transformação logarítmica), $p < 0,05$; variação do n em decorrência de exclusões por artefatos técnicos e analíticos

5.6 AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE PARQUINA E DE p53, DE ACORDO COM OS GRAUS HISTOLÓGICOS TUMORAIS

Inicialmente, comparou-se a relação entre a distribuição da expressão das proteínas parquina e p53 dentro de cada grau histológico de astrocitoma, conforme mostram as TABELAS 25 a 28. Posteriormente, a avaliação foi feita agrupando-se os astrocitomas em baixo e alto grau, conforme as TABELAS 29 e 30. Foi feita a mesma avaliação, comparando-se a intensidade de expressão das duas proteínas, conforme TABELAS 31 a 36. Não houve resultados estatisticamente significativos em nenhuma das análises ($p > 0,05$).

TABELA 25 – AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE AS DISTRIBUIÇÕES DE PARQUINA E DE p53, NOS ASTROCITOMAS GRAU 1 (n=59)

p53 (DISTRIBUIÇÃO)	PARQUINA (DISTRIBUIÇÃO)	
	FOCAL	DIFUSA
FOCAL	18	22
	81,8%	59,5%
DIFUSA	4	15
	18,2%	40,5%
TOTAL	22	37

Legenda: Valor de $p > 0,05$ (teste exato de Fisher, $p < 0,05$); variação do n em decorrência de exclusões por ausência de dados de prontuário ou por artefatos técnicos e analíticos

TABELA 26 – AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE AS DISTRIBUIÇÕES DE PARQUINA E DE p53, NOS ASTROCITOMAS GRAU 2 (n=23)

p53 (DISTRIBUIÇÃO)	PARQUINA (DISTRIBUIÇÃO)	
	FOCAL	DIFUSA
FOCAL	8 72,7%	8 66,7%
DIFUSA	3 27,3%	4 33,3%
TOTAL	11	12

Legenda: Valor de $p > 0,05$ (teste exato de Fisher, $p < 0,05$); variação do n em decorrência de exclusões por ausência de dados de prontuário ou por artefatos técnicos e analíticos

Os quatro casos de astrocitoma grau 3 apresentaram distribuição focal de parquina. Devido à ausência de casos com marcação difusa de parquina, não foi possível a realização do teste estatístico nesse grupo, conforme a TABELA 27, abaixo.

TABELA 27 – AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE AS DISTRIBUIÇÕES DE PARQUINA E DE p53, NOS ASTROCITOMAS GRAU 3 (n=4)

p53 (DISTRIBUIÇÃO)	PARQUINA (DISTRIBUIÇÃO)	
	FOCAL	DIFUSA
FOCAL	2 50,0%	0 0,0%
DIFUSA	2 50,0%	0 0,0%
TOTAL	4	0

Legenda: Teste exato de Fisher não aplicado no grupo de astrocitomas grau 3

TABELA 28 – AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE AS DISTRIBUIÇÕES DE PARQUINA E DE p53, NOS ASTROCITOMAS GRAU 4 (n=18)

p53 (DISTRIBUIÇÃO)	PARQUINA (DISTRIBUIÇÃO)	
	FOCAL	DIFUSA
FOCAL	2 20,0%	0 0,0%
DIFUSA	8 80,0%	8 100,0%
TOTAL	10	8

Legenda: Valor de $p > 0,05$ (teste exato de Fisher, $p < 0,05$); variação do n em decorrência de exclusões por ausência de dados de prontuário ou por artefatos técnicos e analíticos

TABELA 29 – AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE AS DISTRIBUIÇÕES DE PARQUINA E DE p53, NOS ASTROCITOMAS DE BAIXO GRAU (n=82)

p53 (DISTRIBUIÇÃO)	PARQUINA (DISTRIBUIÇÃO)	
	FOCAL	DIFUSA
FOCAL	26	30
	78,8%	61,2%
DIFUSA	7	19
	21,2%	38,8%
TOTAL	33	49

Legenda: Valor de $p > 0,05$ (teste exato de Fisher, $p < 0,05$); variação do n em decorrência de exclusões por ausência de dados de prontuário ou por artefatos técnicos e analíticos

TABELA 30 – AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE AS DISTRIBUIÇÕES DE PARQUINA E DE p53, NOS ASTROCITOMAS DE ALTO GRAU (n=22)

p53 (DISTRIBUIÇÃO)	PARQUINA (DISTRIBUIÇÃO)	
	FOCAL	DIFUSA
FOCAL	4	0
	28,6%	0,0%
DIFUSA	10	8
	71,4%	100,0%
TOTAL	14	8

Legenda: Valor de $p > 0,05$ (teste exato de Fisher, $p < 0,05$); variação do n em decorrência de exclusões por ausência de dados de prontuário ou por artefatos técnicos e analíticos

TABELA 31 – AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE AS INTENSIDADES DE PARQUINA E DE p53, NOS ASTROCITOMAS GRAU 1 (n=59)

p53 (INTENSIDADE)	PARQUINA (INTENSIDADE)	
	FRACA	FORTE
FRACA	32	2
	59,3%	40,0%
FORTE	22	3
	40,7%	60,0%
TOTAL	54	5

Legenda: Valor de $p > 0,05$ (teste exato de Fisher, $p < 0,05$); variação do n em decorrência de exclusões por ausência de dados de prontuário ou por artefatos técnicos e analíticos

TABELA 32 – AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE AS INTENSIDADES DE PARQUINA E DE p53, NOS ASTROCIOMAS GRAU 2 (n=23)

p53 (INTENSIDADE)	PARQUINA (INTENSIDADE)	
	FRACA	FORTE
FRACA	16 72,7%	1 100,0%
FORTE	6 27,3%	0 0,0%
TOTAL	22	1

Legenda: Valor de $p > 0,05$ (teste exato de Fisher, $p < 0,05$); variação do n em decorrência de exclusões por ausência de dados de prontuário ou por artefatos técnicos e analíticos

Os quatro casos de astrocitoma grau 3 apresentaram parquina com marcação de intensidade fraca. Devido à ausência de casos com marcação de intensidade forte, não foi possível a realização do teste estatístico nesse grupo, conforme mostra a TABELA 33, abaixo.

TABELA 33 – AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE AS INTENSIDADES DE PARQUINA E DE p53, NOS ASTROCIOMAS GRAU 3 (n=4)

p53 (INTENSIDADE)	PARQUINA (INTENSIDADE)	
	FRACA	FORTE
FRACA	2 50,0%	0 0,0%
FORTE	2 50,0%	0 0,0%
TOTAL	4	0

Legenda: Teste exato de Fisher não aplicado no grupo de astrocitomas grau 3

Os 18 casos de astrocitoma grau 4 ou GBM apresentaram parquina com marcação de intensidade fraca. Devido à ausência de casos com marcação de intensidade forte, não foi possível a realização do teste estatístico nesse grupo, conforme mostra a TABELA 34, abaixo.

TABELA 34 – AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE AS INTENSIDADES DE PARQUINA E DE p53, NOS ASTROCITOMAS GRAU 4 (n=18)

p53 (INTENSIDADE)	PARQUINA (INTENSIDADE)	
	FRACA	FORTE
FRACA	5	0
	27,8%	0,0%
FORTE	13	0
	72,2%	0,0%
TOTAL	18	0

Legenda: Teste exato de Fisher não aplicado no grupo de astrocitomas grau 4 ou GBM

TABELA 35 – AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE AS INTENSIDADES DE PARQUINA E DE p53, NOS ASTROCITOMAS DE BAIXO GRAU (n=82)

p53 (INTENSIDADE)	PARQUINA (INTENSIDADE)	
	FRACA	FORTE
FRACA	48	3
	63,2%	50,0%
FORTE	28	3
	36,8%	50,0%
TOTAL	76	6

Legenda: Valor de $p > 0,05$ (teste exato de Fisher, $p < 0,05$); variação do n em decorrência de exclusões por ausência de dados de prontuário ou por artefatos técnicos e analíticos

Os 22 casos de astrocitomas de alto grau apresentaram parquina com marcação de intensidade fraca. Devido à ausência de casos com marcação de intensidade forte, não foi possível a realização do teste estatístico nesse grupo, conforme mostra a TABELA 36, abaixo.

TABELA 36 – AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE AS INTENSIDADES DE PARQUINA E DE p53, NOS ASTROCITOMAS DE ALTO GRAU (n=22)

p53 (INTENSIDADE)	PARQUINA (INTENSIDADE)	
	FRACA	FORTE
FRACA	7	0
	31,8%	0,0%
FORTE	15	0
	68,2%	0,0%
TOTAL	22	0

Legenda: Teste exato de Fisher não aplicado no grupo de astrocitomas de alto grau.

5.7 AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE PARQUINA E DE Ki67, DE ACORDO COM OS GRAUS HISTOLÓGICOS TUMORAIS

Avaliou-se também a associação entre parquina e Ki67 para cada um dos graus histológicos de astrocitoma. Inicialmente, comparou-se a expressão das proteínas em astrocitomas agrupados em baixo grau (graus 1 e 2) e alto grau (graus 3 e 4). Posteriormente, comparou-se em cada grau histológico isoladamente. Para aqueles grupos nos quais houve marcação de zero ou 1 caso apenas em determinada categoria, não foi possível a aplicação do teste estatístico. Naqueles casos em que o teste estatístico foi aplicado, não se evidenciou associação significativa ($p > 0,05$), conforme mostram as TABELAS 37 e 38, abaixo.

TABELA 37 – AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE A DISTRIBUIÇÃO DE PARQUINA E A CONTAGEM DE Ki67, DE ACORDO COM GRAUS HISTOLÓGICOS ISOLADOS E AGRUPADOS DOS ASTROCITOMAS

ASTROCITOMA (GRAU)	PARQUINA (DISTRIBUIÇÃO)	Ki67				VALOR DE p*
		n*	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO	
BAIXO GRAU	FOCAL	34	8,0	1,0	14,0	0,223
	DIFUSA	48	5,0	1,0	28,0	
ALTO GRAU	FOCAL	15	16,0	4,0	44,0	0,790
	DIFUSA	8	19,0	2,0	52,0	
1	FOCAL	23	8,0	1,0	14,0	0,062
	DIFUSA	36	4,0	1,0	14,0	
2	FOCAL	11	8,0	2,0	14,0	0,423
	DIFUSA	12	7,5	2,0	28,0	
3	FOCAL	4	19,0	4,0	44,0	-
	DIFUSA	0				
4	FOCAL	11	14,0	6,0	31,0	0,797
	DIFUSA	8	19,0	2,0	52,0	

Legenda: *Teste t de Student para amostras independentes (após transformação logarítmica), $p < 0,05$; variação do n em decorrência de exclusões por artefatos técnicos e analíticos

TABELA 38 – AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE A INTENSIDADE DE PARQUINA E A CONTAGEM DE Ki67, DE ACORDO COM GRAUS HISTOLÓGICOS ISOLADOS E AGRUPADOS DOS ASTROCITOMAS

ASTROCITOMA (GRAU)	PARQUINA (INTENSIDADE)	Ki67				VALOR DE p*
		n*	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO	
BAIXO GRAU	FRACA	76	6,0	1,0	17,0	0,413
	FORTE	6	6,5	2,0	28,0	
ALTO GRAU	FRACA	23	16,0	2,0	52,0	-
	FORTE	0				
1	FRACA	54	5,0	1,0	14,0	0,846
	FORTE	5	6,0	1,0	14,0	
2	FRACA	22	7,5	2,0	14,0	-
	FORTE	1	28,0	28,0	28,0	
3	FRACA	4	19,0	4,0	44,0	-
	FORTE	0				
4	FRACA	19	14,0	2,0	52,0	-
	FORTE	0				

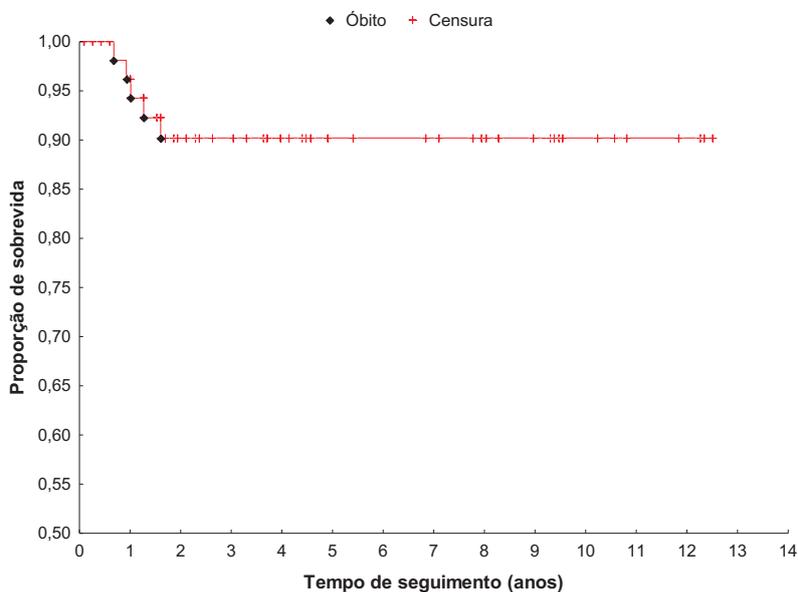
Legenda: *Teste t de Student para amostras independentes (após transformação logarítmica), $p < 0,05$; variação do n em decorrência de exclusões por artefatos técnicos e analíticos

5.8 ANÁLISE DE SOBREVIDA E DESFECHO ÓBITO

5.8.1 Sobrevida geral:

Para as análises apresentadas a seguir, foram considerados 67 casos para os quais foram obtidos os dados de seguimento clínico e óbito. Desses 67 casos, foram constatados 5 óbitos, correspondendo a 7,5%.

FIGURA 7 – AVALIAÇÃO DA SOBREVIDA GERAL, ATRAVÉS DA CURVA DE KAPLAN-MEIER



FONTE: o Autor (2018).

Abaixo, a TABELA 39 mostra os tempos de sobrevivência dos 5 pacientes que morreram. O tempo mínimo foi de 0,68 ano (8,2 meses) e, o máximo, foi de 1,61 anos (19,3 meses). Dos cinco óbitos, quatro foram classificados como astrocitomas grau 4 ou GBM e um, como astrocitoma grau 2.

TABELA 39 – TEMPO DE SOBREVIDA DOS PACIENTES QUE MORRERAM, INCLUINDO CORRELAÇÃO DESSES 5 CASOS COM O GRAU HISTOLÓGICO TUMORAL E AS EXPRESSÕES IMUNOISTOQUÍMICAS DE PARQUINA E DE p53

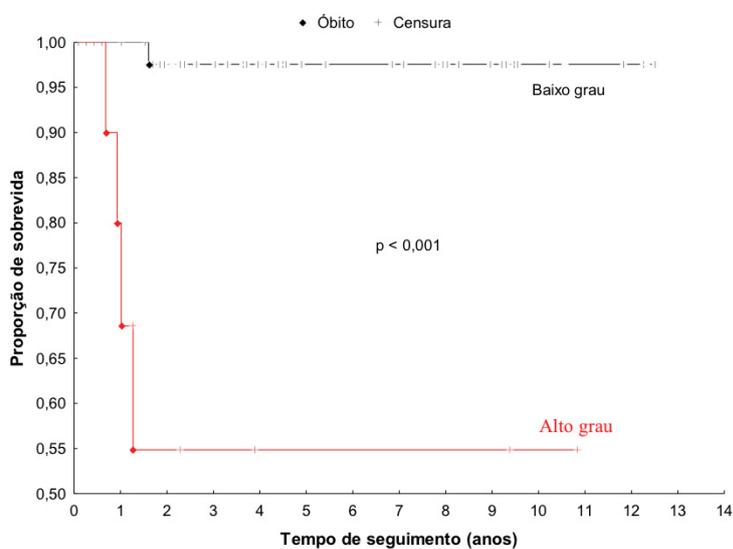
CASO	TEMPO DE SOBREVIDA (ANOS)	GRAU	DISTRIBUIÇÃO PARQUINA	INTENSIDADE PARQUINA	DISTRIBUIÇÃO p53	INTENSIDADE p53
1	1,61	2	DIFUSA	FRACA	DIFUSA	FRACA
2	1,27	4	FOCAL	FRACA	*	*
3	1,01	4	FOCAL	FRACA	DIFUSA	INTENSA
4	0,93	4	DIFUSA	FRACA	DIFUSA	INTENSA
5	0,68	4	DIFUSA	FRACA	DIFUSA	INTENSA

Legenda: *Reação imunoistoquímica para pesquisa de p53 não funcionou.

5.8.2 Avaliação da associação entre variáveis categóricas (grau histológico tumoral, distribuição de parquira e de p53) e sobrevida:

Os resultados foram descritos nas curvas de Kaplan-Meier abaixo (teste de Log-rank).

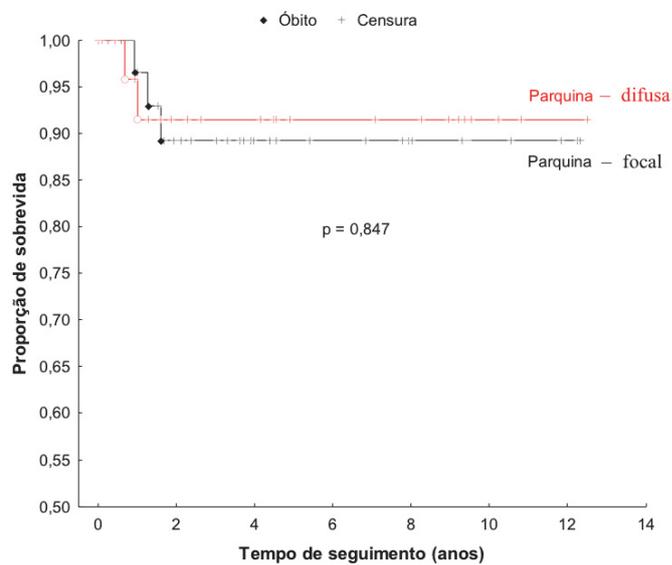
FIGURA 8 – AVALIAÇÃO DA SOBREVIDA GERAL, NOS ASTROCITOMAS DE BAIXO E ALTO GRAU, ATRAVÉS DA CURVA DE KAPLAN-MEIER. VALOR DE $p < 0,001$



FONTE: o Autor (2018).

A FIGURA 8 mostra associação significativa, em razão inversa, entre a sobrevida e o grau histológico. Quanto maior o grau histológico, menor é a sobrevida ($p < 0,001$).

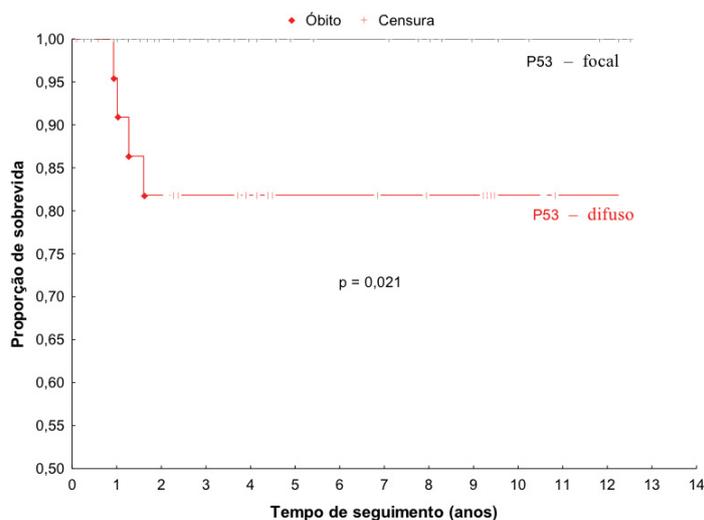
FIGURA 9 – AVALIAÇÃO DA SOBREVIDA GERAL, NOS ASTROCITOMAS COM DISTRIBUIÇÃO DE PARQUINA FOCAL E DIFUSA, ATRAVÉS DA CURVA DE KAPLAN-MEIER. VALOR DE $p = 0,847$



FONTE: o Autor (2018).

Não se evidenciou diferença estatisticamente significativa entre a distribuição de parquina (focal e difusa) e a sobrevivência ($p > 0,05$), conforme apresentado na FIGURA 9.

FIGURA 10 – AVALIAÇÃO DA SOBREVIDA GERAL, NOS ASTROCITOMAS COM DISTRIBUIÇÃO DE p53 FOCAL E DIFUSA, ATRAVÉS DA CURVA DE KAPLAN-MEIER. VALOR DE $p = 0,021$



FONTE: o Autor (2018).

A FIGURA 10 mostra associação significativa, inversa, entre a sobrevivência e a distribuição de p53 (focal e difusa). Nos casos com distribuição difusa de p53, a sobrevivência foi menor ($p = 0,021$).

5.8.3 Avaliação da associação entre idade e óbito:

TABELA 40 – COMPARAÇÃO ENTRE DESFECHO ÓBITO E A MEDIANA DAS IDADES DOS PACIENTES (n=67)

VARIÁVEL	CLASSIFICAÇÃO	IDADE (ANOS)				VALOR DE p^*
		n	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO	
ÓBITO	NÃO	62	5,0	0,0	14,5	0,210
	SIM	5	8,5	2,1	13,8	

Legenda: Valor de $p > 0,05$ (Teste t de Student para amostras independentes, $p < 0,05$); variação do n em decorrência de exclusões por ausência de dados de prontuário ou por artefatos técnicos e analíticos.

Não se evidenciou associação significativa entre idade e óbito ($p > 0,05$), conforme apresentado na TABELA 40.

5.8.4 Avaliação da associação entre variáveis categóricas (gênero, topografia, grau histológico tumoral, distribuição e intensidade de parquina e de p53,) e desfecho óbito:

TABELA 41 – COMPARAÇÃO ENTRE DESFECHO ÓBITO E GÊNERO (n=67)

ÓBITO	GÊNERO	
	FEMININO	MASCULINO
NÃO	38	24
	97,4%	85,7%
SIM	1	4
	2,6%	14,3%
TOTAL	39	28

Legenda: Valor de $p > 0,05$ (teste exato de Fisher, $p < 0,05$); variação do n em decorrência de exclusões por ausência de dados de prontuário ou por artefatos técnicos e analíticos.

TABELA 42 – COMPARAÇÃO ENTRE DESFECHO ÓBITO E GRAU HISTOLÓGICO (n=67)

ÓBITO	GRAU HISTOLÓGICO	
	BAIXO	ALTO
NÃO	55	7
	98,2%	63,6%
SIM	1	4
	1,8%	36,4%
TOTAL	56	11

Legenda: Valor de $p = 0,002$ (teste exato de Fisher, $p < 0,05$); variação do n em decorrência de exclusões por ausência de dados de prontuário ou por artefatos técnicos e analíticos.

TABELA 43 – COMPARAÇÃO ENTRE DESFECHO ÓBITO E DISTRIBUIÇÃO DA EXPRESSÃO DE PARQUINA (n=67)

ÓBITO	PARQUINA (DISTRIBUIÇÃO)	
	FOCAL	DIFUSA
NÃO	29 93,5%	33 91,7%
SIM	2 6,5%	3 8,3%
TOTAL	31	36

Legenda: Valor de $p > 0,05$ (teste exato de Fisher, $p < 0,05$); variação do n em decorrência de exclusões por ausência de dados de prontuário ou por artefatos técnicos e analíticos.

TABELA 44 – COMPARAÇÃO ENTRE DESFECHO ÓBITO E INTENSIDADE DA EXPRESSÃO DE PARQUINA (n=67)

ÓBITO	PARQUINA (INTENSIDADE)	
	FRACA	FORTE
NÃO	58 92,1%	4 100,0%
SIM	5 7,9%	0 0,0%
TOTAL	63	4

Legenda: Valor de $p > 0,05$ (teste exato de Fisher, $p < 0,05$); variação do n em decorrência de exclusões por ausência de dados de prontuário ou por artefatos técnicos e analíticos.

TABELA 45 – COMPARAÇÃO ENTRE DESFECHO ÓBITO E DISTRIBUIÇÃO DA EXPRESSÃO DE p53 (n=64)

ÓBITO	p53 (DISTRIBUIÇÃO)	
	FOCAL	DIFUSA
NÃO	38 100,0%	22 84,6%
SIM	0 0,0%	4 15,4%
TOTAL	38	26

Legenda: Valor de $p = 0,024$ (teste exato de Fisher, $p < 0,05$); variação do n em decorrência de exclusões por ausência de dados de prontuário ou por artefatos técnicos e analíticos.

TABELA 46 – COMPARAÇÃO ENTRE DESFECHO ÓBITO E INTENSIDADE DA EXPRESSÃO DE p53 (n=64)

ÓBITO	p53 (INTENSIDADE)	
	FRACA	FORTE
NÃO	35	25
	97,2%	89,3%
SIM	1	3
	2,8%	10,7%
TOTAL	36	28

Legenda: Valor de $p > 0,05$ (teste exato de Fisher, $p < 0,05$); variação do n em decorrência de exclusões por ausência de dados de prontuário ou por artefatos técnicos e analíticos.

TABELA 47 – COMPARAÇÃO ENTRE DESFECHO ÓBITO E TOPOGRAFIA DA LESÃO (n=61)

ÓBITO	TOPOGRAFIA	
	IT	ST
NÃO	33	23
	100,0%	82,1%
SIM	0	5
	0,0%	17,9%
TOTAL	33	28

Legenda: Valor de $p = 0,016$ (teste exato de Fisher, $p < 0,05$); variação do n em decorrência de exclusões por ausência de dados de prontuário ou por artefatos técnicos e analíticos.

Não se evidenciou associação significativa ($p > 0,05$) entre desfecho óbito e as variáveis gênero, distribuição e intensidade de marcação imunoistoquímica de parquina e intensidade da marcação imunoistoquímica de p53, conforme demonstrado pelas TABELAS 41, 43, 44 e 46. A associação entre óbito e as variáveis grau histológico, distribuição de marcação imunoistoquímica de p53 e topografia apresentaram significância estatística, conforme as TABELAS 42, 45 e 47.

5.8.5 Avaliação entre a distribuição da parquina e desfecho óbito, restrito ao grau histológico 4 (glioblastomas):

Não se evidenciou associação significativa entre distribuição de parquina e óbito, restrito aos GBM ou grau histológico 4 ($p > 0,05$).

TABELA 48 – COMPARAÇÃO ENTRE DESFECHO ÓBITO E DISTRIBUIÇÃO DA EXPRESSÃO DE PARQUINA (FOCAL X DIFUSA), RESTRITO AO GRAU HISTOLÓGICO 4 OU GBM (n=8)

ÓBITOS NO GRAU HISTOLÓGICO 4	PARQUINA (DISTRIBUIÇÃO)	
	FOCAL	DIFUSA
NÃO	2	2
	50,0%	50,0%
SIM	2	2
	50,0%	50,0%
TOTAL	4	4

Valor de $p > 0,05$ (teste exato de Fisher, $p < 0,05$); variação do n em decorrência de exclusões por ausência de dados de prontuário ou por artefatos técnicos e analíticos.

Em suma, observou-se correlação estatisticamente significativa entre o grau histológico e as três proteínas analisadas por imunistoquímica: parquina, tanto pela avaliação morfométrica, quanto pela morfológica semiquantitativa; p53 e Ki67. A parquina é mais expressa nos astrocitomas de baixo grau enquanto o p53 e Ki67, nos de alto grau. Com relação à avaliação da relação entre parquina e variáveis clínicas, observou-se correlação apenas entre intensidade da marcação de parquina e idade dos pacientes, sendo mais forte em pacientes mais jovens. A sobrevida, por sua vez, teve correlação apenas com o grau histológico e a expressão de p53, nesse estudo. A mortalidade também foi influenciada pelo grau histológico e pela expressão de p53, além da topografia da lesão. Quanto maiores o grau histológico e a expressão de p53, menor é a sobrevida e mais alta a mortalidade. Lesões de localização supratentorial também se correlacionam com maior mortalidade.

6 DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a expressão de parquina nos astrocitomas infantis. Por se tratar de um tumor com elevada incidência, associado a elevadas taxas de mortalidade, seu maior conhecimento pode gerar novas ferramentas diagnósticas, prognósticas e terapêuticas.

A parquina, codificada pelo gene *PRKN*, é uma proteína promissora no campo da oncologia. Dentre as múltiplas funções da parquina, encontra-se a de controle do ciclo celular (TAY et al., 2010 e YEO et al., 2012). Sua presença foi confirmada com sinal de bom prognóstico em diversas neoplasias, como cólon, ovário e mama (KLIMCZAK et al., 2016 e DA SILVA-CAMARGO et al., 2018). A proposta desse estudo foi a pesquisa imunoistoquímica da proteína parquina nos astrocitomas infantis, incluindo os quatro graus histológicos da OMS – pilocítico, difuso, anaplásico e glioblastoma. Objetivou-se verificar a presença dessa proteína nos astrocitomas e um possível papel de indicador prognóstico, como já demonstrado previamente em outros tumores (KLIMCZAK et al., 2016; DA SILVA-CAMARGO et al., 2018 e LIN et al., 2015).

O estudo imunoistoquímico da parquina foi avaliado por dois métodos: análise morfométrica (análise quantitativa objetiva) e análise morfológica pelo Allred modificado (análise semiquantitativa ou subjetiva). Foram realizadas também as pesquisas imunoistoquímicas das proteínas p53 e Ki67 nas amostras tumorais, com o objetivo de avaliação do comportamento da amostra, uma vez que essas duas proteínas são bem caracterizadas na literatura. A proteína p53 foi avaliada semiquantitativamente pelo mesmo escore de Allred modificado. O Ki67 foi avaliado quantitativamente por contagem em *hotspot*, com resultado em porcentagem.

A amostra inicial de 108 casos sofreu algumas variações ao longo do estudo, devido a exclusões por artefatos técnicos e analíticos e/ou ausência de dados de prontuário. Era dividida em 61 astrocitomas grau 1 (pilocítico), 23 astrocitomas grau 2 (difuso), 4 astrocitomas grau 3 (anaplásico) e 20 astrocitomas grau 4 (glioblastomas). Quando agrupados em astrocitomas de baixo grau (graus 1 e 2) e astrocitomas de alto grau (graus 3 e 4), resultavam em 84 e 24 casos, respectivamente. Após coletas de dados em prontuários, houve uma redução no número de casos (ver TABELA 1). Verificou-se que

dentre os astrocitomas de baixo grau, 37 eram pacientes do gênero masculino e 47 do gênero feminino. Dezoito casos eram de localização supratentorial e 32, infratentorial. Nos astrocitomas de alto grau, 14 eram do gênero masculino e 10 do gênero feminino. Dez casos eram de localização supratentorial e apenas 1, infratentorial. As médias de idade ao diagnóstico dos graus 1 a 4 foram, respectivamente, 5,58; 7,32; 11,64 e 9,20 anos. Dos 5 óbitos constatados, 4 eram glioblastomas (grau 4) e apenas 1 era astrocitoma difuso (grau 2). Esses dados são concordantes com a literatura, na medida em que a maioria dos astrocitomas na faixa etária pediátrica são astrocitomas pilocíticos (grau 1), sendo tumores majoritariamente localizados em região infratentorial, principalmente no cerebelo (OSTROM et al., 2017 e ELLISON, 2013)). Tem excelente prognóstico, sendo quase sempre curáveis cirurgicamente (DUNHAM, 2010 e ELLISON, 2013). Os astrocitomas de alto grau, por outro lado, têm localização preferencial supratentorial e prognóstico reservado (RIZZO et al., 2015). Esse dado fica evidenciado pelo fato de 4 óbitos em 5 terem sido em pacientes com o diagnóstico de astrocitomas de alto grau.

Quando se avaliou a relação entre a presença de parquina e p53, em relação às variáveis gênero e idade, observou-se relevância estatística apenas na intensidade de parquina, inversa à idade dos pacientes ($p = 0,037$). Estudos prévios, correlacionando a expressão de parquina e astrocitomas, não avaliaram se há influência da idade (LIN et al., 2015 e YIN et al., 2009). Correlação inversa entre expressão de parquina e grau histológico foi demonstrada em adultos (MAUGERI et al., 2015). Nesse momento, pensamos que, como os pacientes com diagnóstico de astrocitoma de alto grau tinham maior média de idade, talvez a intensidade menor de marcação de parquina não fosse pela idade em si, mas pelo alto grau histológico. Porém, essa correlação entre intensidade de marcação imunoistoquímica e grau histológico não se confirmou, conforme discutido a seguir.

A comparação da expressão de cada uma das três proteínas (parquina, p53 e Ki67) com o grau histológico tumoral foi feita de duas formas. Na primeira, os astrocitomas foram agrupados em baixo e alto grau. Na segunda, comparou-se os astrocitomas de baixo grau com os GBM. Ambas as avaliações foram significativas na análise da parquina tanto por morfometria quanto por morfologia, bem como do p53 e também do Ki67.

A avaliação entre parquina e grau histológico demonstrou uma correlação inversa. Astrocitomas de baixo grau tem maior expressão imunohistoquímica de parquina, comparados aos de alto grau. A análise morfométrica de parquina mostrou uma área de marcação mediana de 143,3 nos astrocitomas de baixo grau e 48,4 nos astrocitomas de alto grau ($p = 0,011$). A análise morfológica semiquantitativa, no que diz respeito à distribuição, manteve a mesma relação, predominando a distribuição difusa nos astrocitomas de baixo grau e focal, nos de alto grau ($p = 0,036$). Dessa forma, ainda que as vias moleculares dos gliomas adultos e pediátricos sejam distintas, a parquina apresenta expressão reduzida nos astrocitomas infantis de alto grau, como demonstrado em astrocitomas de adultos por Yeo et al (2012) e Maugeri et al (2015). Conforme mencionado previamente, não houve correlação entre intensidade de parquina e grau histológico.

A análise morfológica da proteína p53 apresentou comportamento inverso, possuindo uma relação direta com o grau histológico tumoral, tanto na distribuição ($p < 0,001$) quanto na intensidade ($p < 0,015$). Essa mesma relação já havia sido demonstrada por Pollack et al (1997, 2002) há mais de duas décadas.

A contagem de Ki67 também apresentou uma correlação direta com o grau histológico tumoral ($p < 0,001$). Essa também é uma correlação esperada, uma vez que o índice mitótico é um dos critérios avaliados na classificação histológica dos astrocitomas, sendo maior nos graus mais elevados (ELLISON, 2013 e DUNHAM, 2010).

Assim, isoladamente, obteve-se uma relação inversa entre parquina e grau histológico tumoral, e direta entre p53 e grau histológico tumoral. Porém, quando se avaliou a correlação entre parquina e p53, dentro de cada grau tumoral, isolados e agrupados em baixo e alto grau, esta não foi evidenciada nesse estudo. Também não foi evidenciada uma correlação com significância estatística entre parquina e Ki67, dentro de cada grau tumoral, isolados e agrupados em baixo e alto grau. No entanto, estudos com uma amostra maior podem ser realizados com o objetivo de se estabelecer se há ou não tal correlação.

A análise da sobrevida e do desfecho óbito foi realizada com base em dados de prontuários de 67 dos 108 casos iniciais.

Observou-se uma maior sobrevida nos pacientes com astrocitomas de baixo grau, em comparação com os de alto grau ($p < 0,001$), em consonância com dados de literatura. O grau histológico é o fator prognóstico independente com maior impacto na sobrevida (QADDOUMI, 2009).

Houve também diferença estatística entre a expressão de p53 e a sobrevida, com relação inversa. Os astrocitomas com expressão focal de p53 tiveram maior sobrevida em relação aos de expressão difusa ($p = 0,021$). Esta situação pode ser explicada pela maior expressão de p53 em astrocitomas de alto grau e a menor sobrevida destes. Esse resultado também reflete conhecimentos prévios da literatura (ELLISON, 2013 e POLLACK, 2002).

O grupo com expressão difusa de p53 teve uma sobrevida discretamente maior que o grupo com expressão focal, porém sem relevância estatística ($p = 0,847$).

Foram constatados 5 óbitos. Observou-se correlação entre óbito e topografia, grau histológico e expressão de p53. Todos os pacientes tinham tumores de localização supratentorial. Ao contrário dos astrocitomas de baixo grau, com tendência de localização infratentorial, principalmente na fossa posterior, os astrocitomas de alto grau, são majoritariamente supratentoriais (OSLOBANU e FLORIAN, 2015). Dentre os 5 óbitos, 4 eram pacientes com diagnóstico de glioblastoma (grau 4) e 1 de astrocitoma difuso (grau 2), refletindo a maior mortalidade de graus histológicos maiores (QADDOUMI, 2009). É interessante ressaltar que o paciente diagnosticado com astrocitoma difuso, assim com os diagnosticados com glioblastoma, teve expressão imunohistoquímica de p53 difusa. Apesar de este ser um astrocitoma de baixo grau (difuso, grau 2), o óbito pode ter sido influenciado pela elevada expressão de proteína p53, indicador de pior prognóstico. Com relação ao tempo de sobrevida, o paciente diagnosticado com astrocitoma grau 2, teve o maior tempo (1,61 anos). Dos quatro óbitos classificados como glioblastomas, dois tiveram expressão de p53 focal e dois, difusa. A análise estatística não demonstrou neste estudo diferença entre expressão de p53 e desfecho óbito, restrito ao grau 4, ou GBM (TABELA 48). No entanto, estudos futuros com uma casuística mais expressiva e maior tempo de seguimento clínico podem ser úteis para avaliar o papel prognóstico da p53.

7 CONCLUSÃO

Por fim, observa-se que a expressão de parquina se comporta como um marcador do grau tumoral, ou seja, ela acompanha o grau tumoral, correlacionando-se inversamente com ele. Os astrocitomas de baixo grau apresentam uma expressão maior, enquanto os de alto grau, perdem expressão de parquina. A perda de expressão de parquina pode estar relacionada a mutações no gene *PRKN*, como demonstrado em outras neoplasias. Não se evidenciou neste estudo um papel direto da parquina alterando o desfecho da doença, seja melhorando a sobrevida ou reduzindo a mortalidade, ao contrário do que foi demonstrado em outras neoplasias ou, até mesmo, nos gliomas da faixa etária adulta (CESARI et al., 2003; LIN et al., 2015 e MAUGERI et al., 2015). No entanto, como esse é o primeiro estudo a avaliar o papel da parquina em astrocitomas infantis, futuras pesquisas com amostras populacionais maiores e tempo de seguimento clínico mais longo podem trazer novos conhecimentos com relação a essa associação.

REFERÊNCIAS

- ABEDALTHAGAFI, M. et al. The alternative lengthening of telomere phenotype is significantly associated with loss of ATRX expression in high-grade pediatric and adult astrocytomas: a multi-institutional study of 214 astrocytomas. **Modern Pathology**, v. 26, p. 1425-1432, 2013.
- APPIN, A. L.; BRAT, D. J. Biomarker-driven diagnosis of diffuse gliomas. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 45, p. 87-96, 2015.
- ARMSTRONG, D. et al. **Pediatric Neuropathology: a text-atlas**. Springer, 2007.
- BAILEY, P. et al. A classification of the tumors of the glioma group on a histogenetic basis with a correlated study of prognosis. Philadelphia: Lippincott, 1926.
- BERNARDINI, J. P. et al. Parkin and mitophagy in cancer. **Oncogene**, v. 36, n. 10, p.1315-1327, 2017.
- CASKEY, L. S. et al. Toward a molecular classification of the gliomas: histopathology, molecular genetics, and gene expression profiling. **Histopathology**, v. 15, n. 3, p. 971-981, 2000.
- CAULFIELD, T. R. et al. Activation of the E3 ubiquitin ligase parkin. **Biochem Soc Trans**, v. 43, n. 2, p. 269-274, 2015.
- CESARI, R. et al. Parkin, a gene implicated in autosomal recessive juvenile parkinsonism is a candidate tumor suppressor gene on chromosome 6q25-q27. **Proc Natl Acad Sci**, v. 100, n. 10, p. 5956-5961, 2003.
- CHAKRABORTY, J. et al. Post translational modification of parkin. **Biology Direct**, v. 12, p. 2-11, 2017.
- CHEN, H.; CHAN, D. Mitochondrial dynamics – fusion, fission movement and mitophagy – in neurodegenerative diseases. **Human Molecular Genetics**, v. 18, p. 169-176, 2009.
- COSTA, C. A. et al. Transcriptional repression of p53 by parkin and impairment by mutations associated with autosomal recessive juvenile Parkinson's disease. **Nature Cell Biology**, v. 11, n. 11, p. 1370-1377, 2009.
- DA SILVA-CAMARGO, C. C. V. et al. Parkin protein expression and its impact on survival with advanced colorectal cancer. **Cancer Biol Med**, v. 15, p. 61-69, 2018.
- D'AMICO, A. G. et al. Expression pattern of parkin isoforms in lung adenocarcinoma. **Tumor Biol**, v. 36, n. 7, p. 5133-5141, 2015.

DENISON, S. R. et al. Alterations in the common fragile site gene Parkin in ovarian and other cancers. **Oncogene**, v. 22, p. 8370-8378, 2003.

DRAKE, L. E. et al. Expanding perspectives on the significance of mitophagy in cancer. **Seminars in Cancer Biology**, v. 47, p. 110-124, 2017.

DUNHAM, C. Pediatric. Brain tumors: a histologic and genetic update on commonly encountered entities. **Seminars in diagnostic pathology**, v. 27, p. 147-159, 2010.

DURCAN, T. M.; FON, E. A. The three Ps of mitophagy: Parkin, PINK1, and post-translational modifications. **Genes and Development**, v. 29, p. 989-999, 2015.

EID, N.; KONDO, Y. Parkin in cancer: mitophagy-related/unrelated tasks. **World J Hepatol**, v.9, p. 349-351, 2017.

ELLISON, D. et al. **Neuropathology**, 3^a ed. Mosby, 2013.

FILHO, G. B. **Bogliolo Patologia**, 9^a ed. Guanabara Koogan, 2016.

FUJIWARA, M. et al. Parkin as a tumor suppressor gene for hepatocellular carcinoma. **Oncogene**, v. 27, p. 6002-6011, 2008.

GONG, Y. et al. Pan-cancer analysis links Park2 to BCL-XL-dependent control of apoptosis. **Neoplasia**, v. 19, n. 2, p. 75-83, 2017.

GONG, Y. et al. Pan-cancer genetic analysis identifies PARK2 as a master regulator of G1/S cyclins. **Nat Genet**, v. 46, n. 6, p.588-594, 2014.

GOURTSOYANNIS, N. C. et al. **Radiologic-pathologic Correlations from Head to Toe**. Springer, 2005.

GRIMALDO, L. et al. Involvement of parkin in the ubiquitin proteasome system-mediated degradation of N-type voltage-gated Ca²⁺ channels. **Plos One**, p.1-18, 2017.

HATTORI, N; MIZUNO, Y. Twenty years since the discovery of the parkin gene. **J Neural Transm**, v. 124, n. 9, p. 1037-1054, 2017.

HORBINSKI, C. et al. Interplay among BRAF, p16, p53, MIB1 in pediatric low-grade gliomas. **Neuro-Oncology**, v. 14, n.6, p. 777-789, 2012.

HUSAIN, A. N. **Biopsy Interpretation of Pediatric Lesions**. Wolters Kluwer Health, 2014.

JAWHAR, N. M. T. Tissue microarray: a rapidly evolving diagnostic and research tool. **Annals of Saudi Medicine**, v. 20, n. 2, p, 123-127, 2009.

JUNG, Y. et al. Loss of parkin reduces inflammatory arthritis by inhibiting p53 degradation. **Redox Biology**, v. 12, p. 666-673, 2017.

KAHLE, P. J.; HAASS, C. How does parkin ligate ubiquitin to Parkinson's disease? **EMBO Rep**, v. 5, n. 7, p. 681-685, 2004.

KANE, L. A. et al, PINK1 phosphorylates ubiquitin to activate Parkin E3 ubiquitin ligase activity. **J Cell Biol**, v. 205, n. 2, p.143-153, 2014.

KASPER, D. L. et al. **Harrison's Principles of Internal Medicine**, 19^a ed. New York: McGraw Hill, 2015.

KAY, D. M. et al. A comprehensive analysis of deletions, multiplications, and copy number variations in PARK2. **Neurology**, v. 75, p. 1189-1194, 2010.

KIERAN, M. W. Targeting BRAF in pediatric brain tumors. **ASCO Educational Book**, p. 436-440, 2014.

KITADA, T. et al. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. **Nature**, v. 392, p. 605-608, 1998.

KLIMCZAK, P. M. et al. Association of a PARK2 germline variant and epithelial ovarian cancer in a Southern Brazilian population. **Oncology**, v. 91, n. 2, p. 101-105, 2016.

LEE, S. B. et al. Parkin regulates mitosis and genomic instability through Cdc20/Cdh1. **Mol Cell**, v. 60, p. 21-34, 2015.

LIN, D. et al. Genomic and functional analysis of the E3 ligase PARK2 in glioma. **Can Res**, v.75, n.9, p.1815-1827, 2015.

LOUIS, D. N. et al. The 2016 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta Neuropathol**, v. 114, p. 97-109, 2016.

MANZANILLO, P. S. et al. The ubiquitin ligase parkin mediates resistance to intracellular pathogens. **Nature**, v. 501, n. 7468, p. 512-516, 2013.

MARTINEZ, A. et al. Multi-story parkin. **Oncotarget**, v. 8, n. 31, p. 50327-50328, 2017.

MAUGERI, G et al. Expression profile of parkin isoforms in human gliomas, **International Journal of Oncology**, v. 47, p. 1282-1292, 2015.

NARENDRA, D. et al. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. **J. Cell. Biol**, v. 183, n. 5, p. 795-803, 2008.

OSLOBANU, A. e FLORIAN, St. I. Anatomic locations in high grade glioma. **Romanian Neurosurgery**, v.24, n. 3, p. 271-277, 2015.

OSTROM, Q. T. et al. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010-2014. **Neuro-Oncology** v. 19, p. 1-88, 2017.

PANICKER, N. et al. Activation mechanisms of the E3 ubiquitin ligase parkin. **Biochemical Journal**, v. 474, p. 3075-3086, 2017.

POLLACK, I. F. et al. Expression of p53 and prognosis in children with malignant gliomas. **N Engl J Med**, v. 346, n. 6, p. 420-427, 2002.

POLLACK, I. F. et al. The relationship between Tp53 mutations and overexpression of p53 and prognosis in malignant gliomas of childhood. **Cancer Research**, v. 57, p. 304-309, 1997.

QADDOUMI, I. et al. Outcome and prognostic features in pediatric gliomas: a review of 6212 cases from the surveillance, epidemiology, and end results (SEER) database. **Cancer**, v. 115, n. 24, p. 5761-5770, 2009.

QURESHI, A. and PERVEZ, S. Allred scoring for ER reporting and its impact in clearly distinguishing ER negative from ER positive breast cancers. **J Pak Med Assoc**, v. 60, n. 5, p. 350-353, 2010.

REIS, R. S. et al. Incidência de tumores pediátricos no Brasil. **Revista Brasileira de Cancerologia** v. 53, p. 5-15, 2007.

RIVERA, A., TAKEI, H. **Advances in Surgical Pathology Brain Cancer**. Wolters Kluwer Health, 2015.

RIZZO, D. et al. Molecular biology in pediatric high-grade glioma: impact on prognosis and treatment. **Biomed Research International**, v. 2015, 10 p., 2015.

SEIRAFI, M. et al. Parkin structure and function. **FEBS Journal**, v. 282, p.2076-2088, 2015.

SHIMURA, H. et al. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. **Nature Genetics**, v.25, p. 302-305, 2000.

SHIMURA, H. et al. Ubiquitination of a new form of α -synuclein by parkin from human brain: implications for Parkinson's disease. **Science**, v. 293, n. 5528, p. 263-269, 2001.

SHIRES, S. E. et al. Beyond mitophagy, the diversity and complexity of parkin function. **Circ Res**, v. 120, p. 1234-1236, 2017.

SCHWARTZENTRUBER, J. et al. Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodeling genes in pediatric glioblastomas. **Nature**, v. 482, p. 226-231, 2012.

SIEGAL, T. Clinical impact of molecular biomarkers in gliomas. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 22, p. 437-444, 2015.

SMITH, D. I. et al. Common fragile sites, extremely large genes, neural development and cancer. **Cancer Letters**, v. 232, p. 48-57, 2006.

STAROPOLI, J. F. et al. Parkin Is a component of an SCF-like ubiquitin ligase complex and protects postmitotic neurons from kainate excitotoxicity. **Neuron**, v. 37, n. 5, p. 735-749, 2003.

SUN, X. et al. Parkin deficiency contributes to pancreatic tumorigenesis by inducing spindle multipolarity and misorientation. **Cell cycle**, v. 12, n. 7, p. 1133-1141, 2013.

SWATEK, K. N.; KOMANDER, D. Ubiquitin modifications. **Cell Research**, v. 26, p. 399-422, 2016.

TAY, S. et al. Parkin enhances the expression of cyclin-dependent kinase 6 and negatively regulates the proliferation of breast cancer cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 38, p. 2931-2938, 2010.

VEERIAH, S. et al. Somatic mutations of the Parkinson's disease-associated gene PARK2 in glioblastoma and other human malignancies. **Nature Genetics**, v. 42, n. 1, p. 77-83, 2010.

VEERIAH, S. et al. The familial Parkinson disease gene PARK2 is a multisite tumor suppressor on chromosome 6q25.2-27 that regulates cyclin E. **Cell Cycle**, v.9, p. 1451-1452, 2010.

VENETTI, S. et al. A sensitive and specific histopathologic prognostic marker for H3F3A K27M mutant pediatric glioblastomas. **Acta Neuropathol**, v. 128, p.743-753, 2014.

VILLA, E. et al. Parkin-Independent mitophagy controls chemotherapeutic response in cancer cells. **Cell Reports**, v. 20, p. 2846-2859, 2017.

VIOTTI, J et al. Glioma tumor grade correlates with parkin depletion in mutant p53-linked tumors and results from loss of function of p53 transcriptional activity. **Oncogene**, v. 33, p. 1764-1775, 2014.

WANG, H. et al. PARK2 negatively regulates the metastasis and epithelial-mesenchymal transition of glioblastoma cells via ZEB1. **Oncology Letters**, v. 14, p. 2933-2939, 2017.

WILNE, S. H. et al. The presenting features of brain tumor: a review of 200 cases. **Arch Dis Child**, v. 91, p. 502-506, 2006.

XU, L. et al. An emerging role of *PARK2* in cancer. **J Mol Med (Berl)**, v. 92, n. 1, p. 31-42, 2014.

YEO, C et al. Parkin pathway activation mitigates glioma cell proliferation and predicts patient survival. **Cancer Research**, v. 72, n.10, p. 2543-2553, 2012.

YIN, D. et al. High-resolution genomic copy number profiling of glioblastoma multiforme by single nucleotide polymorphism DNA microarray. **Mol Cancer Res**, vol. 7, n. 5, p. 665-677, 2009.

YOUSEM, D. M. **Neuroradiology: the requisites**, 3^a ed. Mosby, 2010.

ZHANG, C. et al. Parkin regulation and neurodegenerative disorders. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 7, p. 1-15, 2016.

ZHANG, C. et al. Parkin, a p53 target gene, mediates the role of p53 in glucose metabolism and the Warburg effect. **PNAS**, v. 108, n. 39, p. 16259-16264, 2011.

ZHANG, J. et al. Whole-genome sequencing identifies genetic alterations in pediatric low-grade gliomas. **Nature Genetics**, v. 45, n.6, p. 602-612, 2013.

ZHENG, X.; HUNTER, T. How phosphoubiquitin activates parkin. **Cell Research**, v. 25, p. 1087-1088, 2015.

ANEXO 1 – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA

HOSPITAL DE CRIANÇAS
CÉSAR PERNETTA E
HOSPITAL PEQUENO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise da expressão imunistoquímica da parquína em astrocitomas (pilocítico, difuso, anaplásico e glioblastoma secundário) e sua correlação

Pesquisador: EDUARDO MORAIS DE CASTRO

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 60779216.9.0000.0097

Instituição Proponente: ASSOCIACAO HOSPITALAR DE PROT INFANCIA DR RAUL CARNEIRO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.787.170

Apresentação do Projeto:

O trabalho pretende avaliar a ação de tumores no Sistema Nervoso Central. Desta forma, neste estudo de caráter imunistoquímico procurar-se-á detectar e quantificar a presença das proteínas p53, ki67 e parquína nestes tumores. Investiga-se se a seria parquína um novo marcador imunistoquímico preditivo de grau neoplásico e melhor prognóstico também em astrocitomas.

O estudo pretende utilizar o material cirúrgico dos pacientes, contido nos blocos de parafina, retirados do Serviço de Anatomia Patológica do Centro de Patologia de Curitiba de crianças diagnosticadas e acompanhadas no Serviço de Oncologia Pediátrica do HPP. A partir deste material será conduzida reação química e analisados via imagem. Na sequência, será realizada leitura de prontuário e comparação do desfecho para análise de relevância estatística para avaliar se existe correlação entre a expressão da parquína nos astrocitomas infantis em diferentes graus e o desfecho clínico do paciente (recidiva, sobrevida, mortalidade).

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Análise e comparação da expressão imunistoquímica de parquína em astrocitomas (pilocítico, difuso, anaplásico e glioblastomas secundários) de

Endereço: Rua Desembargador Motta, nº 1070

Bairro: Água Verde

CEP: 80.250-060

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3310-1416

Fax: (41)3310-1416

E-mail: comissao.etica.pesquisa@hpp.org.br

HOSPITAL DE CRIANÇAS
CÉSAR PERNETTA E
HOSPITAL PEQUENO



Continuação do Parecer: 1.787.170

pacientes pediátricos.

Objetivo Secundário:

Analisar a expressão imunoistoquímica da parquina em relação ao grau histológico da neoplasia

Correlacionar a expressão imunoistoquímica da parquina com a do Ki67 e p53

Analisar a sobrevida e a relação com a progressão tumoral

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Aponta-se baixo risco, uma vez que estaria ligado apenas a divulgação inadvertida de informações e a quebra da confidencialidade das informações. Já os benefícios são secundários aos usuários, uma vez que ligado ao avanço da ciência e da medicina.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa bem delineada com objetivos claros, relevante e atual. O uso de material de laboratório em assistência aos pacientes teve a permissão do responsável pelo mesmo e a confidencialidade dos dados foi garantida.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos adequados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Lembramos que conforme as normas da CONEP/MS o pesquisador deverá enviar ao CEP relatórios semestrais sobre o andamento do estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador em caso de relevância. Salientamos ainda a necessidade do envio do relatório final do estudo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_800863.pdf	05/10/2016 18:13:53		Aceito
Outros	cartacoordenador_eduardocastro.pdf	05/10/2016 18:12:56	EDUARDO MORAIS DE CASTRO	Aceito
Outros	termoresponsabilidade_eduardocastro.pdf	04/10/2016 21:09:42	EDUARDO MORAIS DE CASTRO	Aceito
Outros	termoconfidencialidade_eduardocastro.pdf	04/10/2016 21:09:22	EDUARDO MORAIS DE CASTRO	Aceito

Endereço: Rua Desembargador Motta, nº 1070

Bairro: Água Verde

CEP: 80.250-060

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3310-1416

Fax: (41)3310-1416

E-mail: comissao.etica.pesquisa@hpp.org.br

HOSPITAL DE CRIANÇAS
CÉSAR PERNETTA E
HOSPITAL PEQUENO



Continuação do Parecer: 1.787.170

Outros	informede participacao_eduardocastro.pdf	04/10/2016 21:08:54	EDUARDO MORAIS DE CASTRO	Aceito
Outros	declaracaousodados_eduardocastro.pdf	04/10/2016 21:08:24	EDUARDO MORAIS DE CASTRO	Aceito
Outros	declaracaotomarpublico_eduardocastro.pdf	04/10/2016 21:07:57	EDUARDO MORAIS DE CASTRO	Aceito
Outros	autorizacaodiretortecnico_eduardocastro.pdf	04/10/2016 21:07:24	EDUARDO MORAIS DE CASTRO	Aceito
Outros	autorizacaochefedepartamento_eduardocastro.pdf	04/10/2016 21:06:22	EDUARDO MORAIS DE CASTRO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	dispensatermoconsentimento_eduardocastro.pdf	04/10/2016 21:05:05	EDUARDO MORAIS DE CASTRO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_eduardocastro.pdf	04/10/2016 21:04:43	EDUARDO MORAIS DE CASTRO	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto_eduardocastro.pdf	04/10/2016 21:03:52	EDUARDO MORAIS DE CASTRO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CURITIBA, 21 de Outubro de 2016

Assinado por:
NILTON KIESEL FILHO
(Coordenador)

Endereço: Rua Desembargador Motta, nº 1070
Bairro: Água Verde **CEP:** 80.250-060
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3310-1416 **Fax:** (41)3310-1416 **E-mail:** comissao.etica.pesquisa@hpp.org.br