Carlos Afonso Clara

**Estudo das expressões imunoistoquímicas dos
marcadores HIF-1 α , VEGF e PDGF-C correlacionados
com a angiogênese e o prognóstico em
glioblastomas**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Programa de Patologia
Orientador: Prof. Dr. Sérgio Rosemberg

São Paulo
2011

Carlos Afonso Clara

**Estudo das expressões imunoistoquímicas dos
marcadores HIF-1 α , VEGF e PDGF-C correlacionados
com a angiogênese e o prognóstico em
glioblastomas**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Programa de Patologia
Orientador: Prof. Dr. Sérgio Rosenberg

São Paulo
2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Clara, Carlos Afonso

Estudo das expressões imunoistoquímicas dos marcadores HIF-1 α , VEGF e PDGF-C correlacionados com a angiogênese e o prognóstico em glioblastomas / Carlos Afonso Clara. -- São Paulo, 2011.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Patologia.

Orientador: Sérgio Rosemberg.

Descritores: 1.Glioblastoma 2.Angiogênese patológica 3.Hipóxia
4.Imunoistoquímica 5.Sobrevida

USP/FM/DBD-017/11

Dedicatória

A minha mulher Rita e aos meus filhos Daniel, Beatriz e Luisa pela compreensão, companheirismo e amor, fundamentais para a realização deste trabalho.

Aos meus pais, Antonio e Georgina, pelo exemplo de vida e por terem proporcionado todas as condições para minha realização na vida pessoal e profissional.

A minha irmã Eliana, que está sempre próxima, por maior que seja a distância.

Aos meus pacientes

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Sérgio Rosemberg pela amizade e orientação.

À Profa. Dra. Suely Kazue Nagahashi Marie pela sua orientação, comprometimento, incentivo e extrema dedicação em todas as suas atividades.

Ao Dr. Edmundo Carvalho Mauad, mentor e introdutor da Pós Graduação na Fundação Pio XII e incansável lutador pela melhora da qualidade científica na instituição.

Ao Sr. Henrique Duarte Prata vice presidente da Fundação Pio XII, cujo apoio tem sido essencial para o desenvolvimento da pesquisa.

À Dra. Scylla Prata, presidente da Fundação Pio XII pelo amor à nossa instituição.

Ao Dr. José Reynaldo Walther de Almeida, companheiro no Serviço de Neurocirurgia pela ajuda, análise estatística e incentivo durante esta pós graduação.

Ao Dr. Sandro P. Cavalcante e Carlos Roberto de Almeida Junior, companheiros no Serviço de Neurocirurgia pelo suporte necessário durante minhas ausências.

À Dra. Alda Wakamatsu pela realização das reações imuno-histoquímicas.

À equipe do Laboratório LIM 15 da Faculdade de Medicina da USP, pela amizade e grande apoio durante a realização deste trabalho.

À equipe do Laboratório LIM 14 da Faculdade de Medicina da USP, pela realização dos TMAs.

Aos colegas do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII pelo apoio e incentivo.

À Dra. Maria Dirlei Ferreira Begnami do Departamento de Patologia do Hospital A.C. Camargo pelo apoio.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardos, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Neoplasias do Sistema Nervoso Central.....	20
1.1.1 Incidência e fatores de risco dos tumores do SNC.....	20
1.1.2 Sobrevida e fatores prognósticos dos tumores do SNC.....	23
1.1.3 Patologia dos gliomas.....	24
1.1.4 Aspectos clínicos e anatomopatológico do GBM.....	27
1.2 Biologia molecular dos gliomas.....	29
1.2.1 Alterações cromossômicas dos gliomas	31
1.2.2 Vias moleculares de sinalização da progressão tumoral dos astrocítomas.....	32
1.2.3 O papel das vias EGFR/RAS/NF1/PTEN/PI3K.....	34
1.2.4 O papel da via TP53/MDM2/p14arf.....	35
1.2.5 O papel da via p16(ink4)/CDK4/Rb.....	37
1.2.6 O papel do IDH1.....	37
1.2.7 Eventos moleculares da invasão tumoral.....	39
1.2.7.1. O papel da matriz extracelular	39
1.3 Angiogênese.....	41
1.3.1 Angiogênese nos gliomas.....	44
1.3.2 Mecanismos moleculares da neoformação vascular.....	45
1.3.3 Fator induzido por hipóxia (HIF-1)	46
1.3.3.1 Mecanismos moleculares da regulação do HIF-1.....	47
1.3.3.2 HIF e a regulação de células tronco cancerígenas.....	51
1.3.4 Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF).....	52
1.3.4.1. Mecanismo de ação e regulação do VEGF.....	53
1.3.5 Fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF).....	54
1.3.5.1 Mecanismo de ação e regulação do PDGF-C.....	55
1.4 Métodos moleculares para análise da angiogênese.....	56
1.4.1 Densidade microvascular (DMV) e proliferação celular.....	56
1.4.2 Tissue microarray (TMA).....	58

2 OBJETIVO.....	60
3 MÉTODO.....	62
3.1 Casuística.....	63
3.1.1 Casuística do HC-FMUSP.....	63
3.1.2 Casuística do HC-Barretos.....	64
3.2 Aprovação do Projeto de Estudo.....	64
3.3 Construção do TMA.....	65
3.4 Imunoistoquímica.....	66
3.5 Análise por microscopia óptica.....	69
3.5.1 Avaliação da imunorreatividade das células tumorais.....	69
3.5.2 Avaliação da densidade microvascular (DMV).....	70
3.6 Análise estatística.....	70
4 RESULTADOS.....	71
4.1 Resultados demográficos.....	72
4.2 Resultados imunoistoquímicos.....	74
4.2.1 Resultados da imunorreatividade tumoral do HIF-1 α , VEGF e PDGF-C.....	74
4.2.2 Correlação entre a imunorreatividade tumoral dos marcadores HIF-1 α , PDGF-C e VEGF.....	77
4.2.3 Resultados da densidade microvascular (DMV).....	79
4.2.4 Correlação entre HIF-1 α e a DMV.....	82
4.2.5 Correlação entre a imunorreatividade nas células tumorais e endoteliais pelo PDGF-C e VEGF.....	85
4.3 Análise da sobrevida.....	88
4.4 Regressão de Cox.....	90
5 DISCUSSÃO.....	91
5.1 Dados demográficos da amostra de GBM.....	92
5.2 A expressão do HIF-1 α nas células tumorais.....	95
5.3 A expressão do VEGF nas células tumorais.....	96
5.4 A expressão do PDGF-C nas células tumorais.....	97
5.5 A correlação da expressão imunoistoquímica nas células tumorais entre HIF-1 α e VEGF.....	98

5.6 A correlação da expressão imunoistoquímica nas células tumorais entre HIF-1 α e PDGF-C.....	99
5.7 A expressão do HIF-1 α e a DMV	100
5.8 A imunorreatividade nas células endoteliais pelo VEGF, PDGF-C, CD34 e CD105.....	101
5.9 A expressão tumoral do HIF-1 α correlacionada com a DMV medida pelo VEGF.....	102
5.10 A relação entre as expressões do VEGF e PDGF-C na célula tumoral e na célula endotelial.....	103
5.11 A correlação da expressão do VEGF nas células tumorais e nas células endoteliais.....	104
5.12 A expressão do HIF-1 α e do VEGF correlacionada ao prognóstico.....	105
6 CONCLUSÕES.....	107
7 ANEXOS.....	109
8 REFERÊNCIAS.....	129

LISTA DE ABREVIATURAS

AKT – proteína treonina quinase

ARF – gene ARF

CBTRUS – Central Brain Tumor Registry of the United States

CCND2 – gene CCND2

CDK4 – ciclina dependente da quinase 4

CDKN2A – ciclina dependente da quinase 2A

CDKN2B – ciclina dependente da quinase 2B

CDKN2C – ciclina dependente da quinase 2C

CD 105 - endogлина

DMV – densidade micro vascular

DNA – ácido desoxirribonucléico

ECM - matriz extracelular

EGF - fator de crescimento de epiderme

EGFR – receptor do fator de crescimento de epiderme

EGFRvIII – forma deletada vIII de EGFR

EUA – Estados Unidos da América

FGF - fator de crescimento de fibroblasto

FIH – fator de inibição do HIF-1

GBM - glioblastoma multiforme

HC Barretos – Hospital de Câncer de Barretos

HCFMUSP – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina USP

HIF1 – fator induzido por hipóxia 1

H.R. – “Hazard Ratio”

HRE – elemento de resposta à hipóxia

IC – intervalo de confiança

IDH1 – gene isocitrato desidrogenase 1

IGF – fator de crescimento semelhante à insulina

IL – 1 - interleucina 1

kDa – kilodalton

LOH – perda da heterozigosidade

MDM2 - mouse Double minute 2

MDM4 – mouse Double minute 4

MGMT – O(6)-metilguanina – DNA - metiltransferase

MMPs – metaloproteinases

MAPK – proteína quinase mitógeno-ativada

MEC – matriz extracelular

MTOR – “mammalian target of rapamycin”

NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NF1 – gene da neurofibromatose 1

NRP1 – neuropilin 1

NRP2 – neuropilin 2

OMS – Organização Mundial da Saúde

PDGF – fator de crescimento derivado da plaqueta

PDGFR – receptor do fator de crescimento derivado da plaqueta

PI3K – fosfatidilinositol-3-quinase

PLGF – fator de crescimento de placenta

PTEN – gene fosfatase e tensina homóloga

Rb - gene retinoblastoma

RNA – ácido ribonucleico

RTK – receptor tirosinoquinase

SDF1 – fator de célula estromal 1

SNC – sistema nervoso central

STAT-3 – fator ativador transcripcional 3

TGF – fator de crescimento transformador

TMA – “tissue microarray”

TNF - fator de necrose tumoral

VEGF - fator de crescimento endotelial vascular

VEGFR – receptor de crescimento endotelial vascular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição dos gliomas por subtipos histológicos.....	22
Figura 2 - Importantes alterações genéticas envolvidas no desenvolvimento e progressão dos astrocitomas.....	33
Figura 3 - Principais vias envolvidas na patogênese e progressão do GBM..	38
Figura 4 - Regulação do HIF-1 α sob hipóxia e condições normais de oxigênio.....	48
Figura 5 - Vias moleculares de regulação da angiogênese em resposta a hipóxia.....	50
Figura 6 - Imunoistoquímica dos marcadores HIF-1 α , PDGFC e VEGF.....	76
Figura 7 - Gráfico da distribuição do número de casos com expressão positiva e negativa nas células tumorais pelos marcadores HIF-1 α , PDGFC e VEGF.....	77
Figura 8 - Amostra seriada do caso 158 com expressão positiva nas células tumorais e endoteliais pelo HIF-1 α , VEGFC e PDGFC.....	78
Figura 9 - DMV baseada na positividade da marcação das células endoteliais pelo CD34, PDGFC, VEGF e CD105.....	79
Figura 10 - Amostra seriada do caso 200 apresentando marcações positivas nas paredes dos vasos pelos marcadores CD34(A), PDGFC(B), VEGF(C) e CD105(D).....	81
Figura 11 - Marcação nuclear pelas células endoteliais pelo KI-67.....	81
Figura 12 - DMV baseada na positividade da marcação das células endoteliais pelo CD34 nos casos de GBM com imunorreatividade negativa e positiva pelo HIF-1 α	82
Figura 13 - Amostra seriada do caso 194 com expressão positiva HIF-1 α (A1), CD34 (A2) e VEGF (A3).....	84
Figura 14 - Gráfico representando o teste de correlação de Spearman entre a DMV do VEGF e do CD34.....	85
Figura 15 - Gráfico mostrando a distribuição dos casos com imunorreatividade positiva e negativa nas células tumorais para os marcadores VEGF e PDGFC.....	86

Figura 16 - Amostra do TMA do caso 173 apresentando positividade nas células tumorais e endoteliais pelo VEGF (A). Caso 201 com marcação negativa das células tumorais e endoteliais pelo VEGF (B).....87

Figura 17 - Curvas de sobrevida comparando os casos de GBM com a imunorreatividade nuclear positiva e negativa pelo VEGF (A). Casos de GBM com imunorreatividade nuclear positiva e negativa para os marcadores HIF-1 α e VEGF (B)89

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Classificação dos Tumores do SNC, OMS 2007.....	26
Tabela 2 - Fatores endógenos angiogênicos e anti-angiogênicos.....	43
Tabela 3 - Anticorpos, clones, diluições e controles positivos usados no procedimento de imunoistoquímica.....	66
Tabela 4 - Resultados demográficos do estudo.....	73
Tabela 5 - Distribuição dos resultados imunoistoquímicos da casuística.....	75
Tabela 6 - Análise de regressão de Cox.....	90

Resumo

Clara CA. *Estudo das expressões imunoistoquímicas dos marcadores HIF-1 α , VEGF e PDGF-C correlacionados com a angiogênese e o prognóstico em glioblastomas*. [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.

O glioblastoma multiforme (GBM) é o tumor mais agressivo do Sistema Nervoso Central (SNC) e caracteriza-se por um alto poder angiogênico que está diretamente relacionado com a capacidade invasiva e inversamente com o prognóstico. A angiogênese contribui para a malignidade por prover a oxigenação e o suprimento nutricional necessários para o crescimento e invasão do tumor. O GBM prolifera sob um ambiente de hipóxia e o fator induzido por hipóxia (HIF-1 α) apresenta um papel fundamental na ativação da transcrição de genes alvo que favorecem a angiogênese e evitam a morte celular. O fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e o fator de crescimento derivado da plaqueta C (PDGF-C) são agentes de grande interesse na angiogênese tumoral e que podem ser modulados pelo HIF-1 α . Foi realizado “tissue microarray”(TMA) de 208 casos de GBM e estudados pelo método de imunoistoquímica os marcadores HIF-1 α , VEGF e PDGF-C. Os resultados foram correlacionados com a angiogênese avaliada através da densidade microvascular (DMV) pelo CD34, CD105, VEGF e PDGF-C, com a proliferação celular endotelial através da marcação nuclear pelo KI-67 e também com a sobrevida. A expressão tumoral do HIF-1 α foi observada em 184 casos (88,5%), a do VEGF em 131 (63%) e a do PDGF-C em 160 (77%). As DMVs medianas pelo CD34, PDGF-C, VEGF e CD105 foram, respectivamente, 20, 16, 5 e 6. Os GBMs com marcação positiva pelo HIF-1 α tiveram uma DMV mediana pelo CD34 de 30, enquanto que nos negativos a DMV mediana foi 14 ($p<0,001$). A expressão tumoral positiva pelo HIF-1 α teve correlação com a marcação

tumoral pelo VEGF e PDGF-C ($p<0,001$). Houve também uma correlação entre a marcação do VEGF e do PDGF-C tanto no tumor ($p=0,001$) como na célula endotelial ($p<0,001$). A expressão do VEGF no tumor teve correlação com a sua expressão no vaso ($p<0,001$). Células endoteliais marcadas pelo PDGF-C e pelo VEGF também foram marcadas pelo CD105 e seus núcleos pelo KI-67 confirmando seu padrão neoangiogênico e proliferativo. A marcação nuclear das células tumorais pelo VEGF teve impacto na sobrevida ($p=0,002$), bem como as marcações nucleares pelo HIF-1 α e VEGF ($p=0,005$). Em conclusão, este estudo mostrou que a expressão do HIF-1 α está associada com as expressões do VEGF e do PDGF-C e que houve uma correlação desses marcadores com a angiogênese no GBM.

Descritores: glioblastoma, angiogênese patológica, hipóxia, imunoistoquímica, sobrevida.

Abstract

Clara CA. *Study of immunohistochemical expressions on the HIF-1 α , VEGF and PDGF-C markers, correlated to angiogenesis and to glioblastoma prognosis.* [thesis]. Faculty of Medicine, University of São Paulo, SP (Brazil); 2011.

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most aggressive tumour of the central nervous system (CNS) and is characterized by a high angiogenic power that is directly related to the invasiveness and inversely to the prognosis. Angiogenesis contributes to malignancy by providing the necessary oxygenation and nutritional supplement for the tumour's growth and invasion. GBM proliferates under a hypoxia environment and the hypoxia-inducible factor (HIF-1 α) plays a key role on the transcription of essential genes which promote angiogenesis and prevent cellular death. The vascular endothelial growth factor (VEGF) and the platelet-derived growth factor C (PDGF-C) are agents of great interest on tumour angiogenesis and may be modulated by the HIF-1 α . Tissue micro-array (TMA) was conducted on 208 cases of GBM and the HIF-1 α , VEGF and PDGF-C markers were studied under immunohistochemistry method. The results were correlated with angiogenesis assessed by micro-vessel density (MVD) for CD34, CD105, VEGF and PDGF-C, with endothelial cell proliferation by nuclear staining for KI-67, and also with survival. The tumour expression by HIF-1 α was observed in 184 cases (88.5%), by VEGF in 131 (63%) and by PDGF-C in 160 (77%). The median MVD for CD34, PDGF-C, VEGF and CD105 was respectively 20, 16, 5 and 6. The GBMs which stained positive for HIF-1 α showed a median MVD of 30 for CD34, whereas in negative ones, median MVD was 14 ($p < 0.001$). The positive tumour expression for HIF-1 α was correlated with tumour markings for VEGF and PDGF-C ($p < 0.001$). There was also a correlation between the markings for VEGF and PDGF-C in both the tumour ($p =$

0.001) and endothelial cell ($p < 0.001$). VEGF expression in the tumour was correlated with its expression in the blood vessel ($p < 0.001$). Endothelial cells marked for the PDGF-C and VEGF were also marked for CD105 and their nuclei for KI-67 confirming its neoangiogenic and proliferative pattern. The nuclear staining on tumour cells for VEGF had an impact on survival ($p = 0.002$), as well as the cases with nuclear staining for HIF-1 α and VEGF ($p = 0.005$). In conclusion, this study showed that HIF-1 α expression is associated with VEGF and PDGF-C and correlated with angiogenesis on GBM.

Descriptors: glioblastoma, angiogenesis, hypoxia, immunohistochemistry, survival.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

1.1 Neoplasias do Sistema Nervoso Central

Os tumores do Sistema Nervoso Central (SNC) são representados por uma população distinta e heterogênea de neoplasias benignas e malignas. Na última década observou-se um avanço no conhecimento sobre os eventos moleculares associados ao fenótipo destes tumores. (Mladkova e Chakravarti, 2009). Dessa forma, existe uma esperança de que tais conhecimentos possam gerar no futuro uma melhora da sobrevida e da qualidade de vida dos portadores dessas neoplasias, o que ainda não foi observado na prática, sobretudo se analisarmos o glioblastoma multiforme (GBM), cuja sobrevida a partir do diagnóstico é de aproximadamente um ano no adulto (Ohgaki e Kleihues, 2007). Portanto, ainda é necessária a realização de pesquisas tanto laboratoriais quanto estudos clínicos com o objetivo de se obter um maior controle de longo prazo dos tumores primários do SNC.

1.1.1 Incidência e fatores de risco dos tumores do SNC

Dados do Centro de Registro de Tumores Cerebrais dos Estados Unidos (CBTRUS) mostram um aumento significativo na incidência de tumores do SNC, primários ou não, nas três últimas décadas. Alguns fatores são apontados como prováveis causadores desse aumento, como,

por exemplo, o crescimento do tabagismo entre as mulheres e adolescentes, a sobrevida maior da população mundial, com expectativa de vida ao redor dos 75 anos, o grande avanço nas técnicas de diagnóstico de lesões do SNC, a melhoria do tratamento de doenças sistêmicas e malignas primárias, além do maior acesso da população aos recursos médicos de diagnóstico e tratamento.

O CBTRUS calculou uma estimativa mundial anual de 186.678 casos novos de tumores primários malignos e não malignos do SNC desde o ano de 2002. Para os Estados Unidos (EUA) foram estimados 62.930 casos novos de tumores primários do SNC para o ano de 2010.

A incidência anual de tumores primários malignos e não malignos do SNC nos EUA é de 18,71 casos para 100.000 indivíduos, sendo 7,19 casos para 100.000 indivíduos, somente para tumores malignos (aproximadamente 20.000 casos), o que representa cerca de 2% de todos os casos de câncer (CBTRUS, 2010; Chandana et al., 2008).

Os tumores cerebrais malignos primários são a primeira causa de morte por tumor sólido e a segunda por câncer em crianças. Em adolescentes e adultos (15 aos 34 anos) são a terceira causa mais frequente de morte relacionada ao câncer (Buckner, 2007). Estima-se que nos EUA em 2009, aproximadamente 13.000 mortes foram atribuídas a tumores primários do SNC (CBTRUS, 2010). Os gliomas correspondem a aproximadamente 30% de todos os tumores primários do SNC, e os astrocitomas e glioblastomas juntos correspondem a 76% dos gliomas. O

GBM é responsável por 17,1% de todos os tumores primários do SNC e por 53,8% dos gliomas. (Figura 1).

Figura 1 - Distribuição dos gliomas por subtipos histológicos (CBTRUS, 2010)

Em geral, a mediana etária para o diagnóstico de tumores primários do SNC é de 57 anos, e a mediana para o GBM e o meningioma é de 64 e 63 anos respectivamente, com pico de incidência ao redor dos 75 anos; nos oligodendrogliomas o pico varia de 35 a 55 anos. Na faixa etária pediátrica, a incidência maior do zero aos 14 anos é do astrocitoma pilocítico (19,1%), glioma maligno NOS (13,7%) e meduloblastoma (13%), nesta faixa etária o GBM corresponde a 2,5% dos tumores do SNC. Dos 15 aos 19 anos predominam os tumores pituitários (20,6%) seguidos pelos astrocitomas pilocíticos (11,7%), o GBM corresponde a 3,5% dos tumores do SNC (CBTRUS, 2010). Rosemberg e Fujiwara, em 2005, publicaram estudo epidemiológico com 1195 casos de tumores pediátricos do SNC, tendo encontrado uma maior incidência de astrocitoma pilocítico

(18,2%), meduloblastoma (11,2%) e craniofaringeoma (11%). O GBM representou 3,7%.

Dentre os principais fatores de risco associados a tumores do SNC encontram-se desordens genéticas como a neurofibromatose, com maior risco para gliomas do nervo óptico e astrocitomas, esclerose tuberosa, doença de Von Hippel-Lindau, síndromes de Li-Fraumeni, Gorlin e Turcot. A exposição a altas doses de radiação ionizante comprovadamente é um fator de risco. Outros fatores como o tabaco, substâncias químicas diversas, uso de álcool, telefone celular, trauma craniano e infecções são controversos (Chandana et al., 2008).

Sobrevida e fatores prognósticos dos tumores do SNC

O tipo histológico e a idade são os principais fatores prognósticos em pacientes com tumores primários do SNC. O estado clínico, o grau do tumor, a localização, a extensão da ressecção cirúrgica, o tratamento radioterápico e quimioterápico têm sido vinculados com a sobrevida em gliomas (Mineo et al., 2007; Stummer et al., 2008). A sobrevida mediana após o diagnóstico dos casos de astrocitomas difusos de baixo grau varia de 6 a 8 anos, enquanto que nos astrocitomas anaplásicos é de 3 a 5 anos e no GBM de 1 ano (Miller e Perry, 2007; Pouratian et al., 2008).

O papel de marcadores moleculares no prognóstico de tumores do SNC é objeto de inúmeras pesquisas, sendo bem estabelecido que a perda combinada dos cromossomos 1p e 19q em oligodendrogliomas é

um indicador de prognóstico favorável (Giannini et al., 2008). Nos tumores astrocitários, sobretudo no GBM, a amplificação do receptor de fator de crescimento de epiderme (EGFR) e uma alteração adicional no gene, denominado EGFRvIII, contribuem para a resistência às terapias e estão associadas a pior sobrevida em pacientes com GBM (Zawrocki e Biernat, 2005). O silenciamento epigenético da enzima reparadora de DNA O(6)-metilguanina-DNA-metiltransferase (MGMT) é considerado na atualidade, um forte marcador preditivo para uma evolução mais favorável em pacientes com GBM tratados com quimioterapia com agentes alquilantes como a temozolamida (Stupp et al., 2005, 2009).

1.1.3 Patologia dos gliomas

Os gliomas são um grupo de tumores histologicamente heterogêneos que se originam no cérebro através do desenvolvimento anormal de células não neuronais. Existe controvérsia se os gliomas se desenvolvem a partir de células tronco neurais ou progenitoras, ou da desdiferenciação de células maduras ou intermediárias (Sanai et al., 2005). São fundamentalmente de linhagem astrocitária, oligodendrogial ou ependimária. O comportamento biológico da maioria dos gliomas, mesmo as lesões de baixo grau, é essencialmente maligno (Burger et al., 1985; Doolittle, 2004).

Os gliomas ocorrem em todo o cérebro, mas demonstram certa predileção topográfica nos diferentes grupos etários. Nas crianças

tendem a ocorrer na linha média (hipotálamo e quiasma óptico) e na fossa posterior (tronco cerebral e cerebelo). Nos adultos geralmente são supratentoriais e centralizados na substância branca profunda dos hemisférios cerebrais (Stieber, 2001; Pfister e Witt, 2009).

A base para o conceito atual da classificação dos tumores do SNC foi lançada em 1856 por Virchow, que descreveu a neuroglia (Kettenmann e Ransom, 2005). Bailey e Cushing, em 1926, baseados em estudos de anatomia, histologia e embriologia realizaram sua classificação associando a análise prognóstica dos pacientes, a sobrevida e o comportamento biológico das neoplasias. O sistema de graduação para gliomas em ordem crescente de malignidade foi introduzido por Kernohan, em 1949 (Svien et al., 1949). A classificação de Saint Anne-Mayo, publicada por Daumas-Duport et al., em 1988, foi introduzida para aplicação no grupo de tumores astrocitários fibrilares ou difusos, baseando-se na presença ou ausência de atipia nuclear, mitoses, proliferação endotelial e necrose. A Organização Mundial da Saúde (OMS) concorda com o conceito de que muitos gliomas, sobretudo os tumores astrocitários, requerem níveis diferentes de classificação da malignidade histológica. A classificação da OMS para as neoplasias do sistema nervoso pode ser considerada como uma escala de malignidade refletindo o comportamento clínico e biológico das neoplasias, o perfil genético e o prognóstico dos tumores, sendo atualmente a classificação mais aceita e empregada para tumores do SNC (Louis et al., 2007). (Tabela 1).

Tabela 1- Classificação dos Tumores do SNC, OMS 2007

<p>Tumores Astrocitários Astrocitoma Pilocítico (grau I) Astrocitoma Subependimário de Cel.gigantes (grau I) Astrocitoma Polimixóide (grau II) Astrocitoma Difuso (grau II) Xantoastrocitoma Pleomórfico (grau III) Astrocitoma Anaplásico (grau III) Glioblastoma (grau IV) Glioblastoma de Células Gigantes (grau IV) Glosssarcoma (grau IV)</p> <p>Tumores Oligodendrogliais Oligodendroglioma (grau II) Oligodendroglioma Anaplásico (grau III)</p> <p>Tumores Oligoastrocitários Oligoastrocitoma (grau II) Oligoastrocitoma Anaplásico (grau III)</p> <p>Tumores Ependimários (grau I-III)</p> <p>Tumores do plexo coróide (grau I-III)</p> <p>Outros tumores neuroepiteliais Glioma Angiogênico (grau I) Glioma cordóide do terceiro ventrículo (grau II)</p> <p>Tumores glio-neurais e neuronais (grau I – III) Tumores da Pineal (grau I – IV) Tumores embrionários (grau IV)</p> <p>Tumores de nervos cranianos e espinhais Schwannoma (grau I) Neurofibroma (grau I) Perineuroma (grau I – III) Tumor maligno do nervo periférico (grau II – IV)</p> <p>Tumores das meninges Meningioma (grau I) Meningioma atípico (grau II) Meningioma anaplásico (grau III)</p> <p>Linfomas e neoplasias hematopoéticas Linfoma Maligno Plasmocitoma Sarcoma granulocítico</p> <p>Outros Sarcoma de células germinativas Tumores da região selar</p>
--

FONTE: Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. Acta Neuropathol. 2007;114(2):97-109.

1.1.4 Aspectos clínicos e anatomopatológicos do GBM

O GBM é um tumor astrocitário caracterizado histologicamente por atipia nuclear, polimorfismo celular, atividade mitótica, necrose com celularidade periférica em pseudopaliçada e proliferação microvascular que o distinguem de um astrocitoma de menor grau. É classificado como grau IV pela OMS (Louis et al., 2007). Ocorre preferencialmente na substância branca dos hemisférios cerebrais ou na região dos gânglios da base e tálamos. A ocorrência na ponte é mais frequente em crianças. No cerebelo e na medula espinhal são mais raros (Mark e Mitchel, 2008)

Macroscopicamente, apresenta limites um pouco mais precisos, por vezes é possível observar a diferença entre a neoplasia e o tecido cerebral adjacente. No entanto, histologicamente as células tumorais infiltram o parênquima além dos limites macroscópicos visíveis. O tumor apresenta uma coloração esbranquiçada ou acinzentada, é frequente a presença de edema peritumoral com desvio de linha média e o colapamento ventricular. Podem ser observadas áreas de necrose, zonas de hemorragia ou cistos com material proteico (Maluf et al., 2009).

Os GBMs são subdivididos em dois subtipos distintos, primários e secundários, afetando idades diferentes e desenvolvendo-se através de vias genéticas distintas. O GBM primário corresponde a 90% dos casos e afeta indivíduos na quinta e sexta décadas de vida e que não têm evidência clínica ou histórica de astrocitoma prévio de menor grau. O GBM secundário desenvolve-se a partir da progressão de um astrocitoma

de menor grau, sendo mais comum em pacientes entre a terceira e a quarta décadas de vida. O aspecto histológico e o prognóstico são os mesmos para os dois tipos (Ohgaki, 2005; Ohgaki e Kleihues, 2007).

O início dos sintomas é frequentemente abrupto e sua duração até o diagnóstico é de poucos dias ou semanas e normalmente está relacionado a alterações neurológicas devidas à localização, efeito de massa e edema, além de cefaléia e crise convulsiva (Buckner, 2007).

A variante fenotípica chamada de glioblastoma de células pequenas caracteriza-se histologicamente por um tumor constituído por pequenas células com núcleos hipercromáticos e citoplasmas escassos lembrando células embrionárias (Maluf et al., 2009). O glioblastoma de células gigantes corresponde a cerca de 5% dos GBMs e caracteriza-se pelo predomínio de células gigantes multinucleadas e pela presença de rede de reticulina (Figarella-Branger et al., 2010). O gliossarcoma é uma variante rara, 2% dos GBMs, agressiva, com relatos de metástases extraneurais, é caracterizado por um padrão tecidual bifásico alternando áreas com diferenciação glial e mesenquimal (Beaumont et al., 2007; Maeda et al., 2010).

A classificação da OMS de 2007 para os tumores do SNC indica que oligoastrocitomas com necrose devem ser classificados como glioblastomas com componente oligodendroglial (Brat et al., 2008). Isto está baseado em estudos que sugerem que a necrose está associada a pior prognóstico em gliomas anaplásicos com ambos componentes oligodendrogliais e astrocitários (Louis et al., 2007). Esta determinação

tem gerado controvérsias entre inúmeros patologistas, cuja opinião, é de que estudos clínico-patológicos mais consistentes são necessários para se considerar uma nova entidade (Scheithauer et al., 2008).

1.2 Biologia molecular dos gliomas

Recentes avanços no conhecimento da biologia molecular dos tumores cerebrais tais como as alterações genômicas, estão melhorando o entendimento da patogênese tumoral e sua influência na graduação e classificação dos tumores do SNC. A identificação de alterações no genoma do tumor como, por exemplo, a inativação de genes que podem controlar a proliferação celular e induzir apoptose, tem gerado importantes avanços na biologia dos tumores gliais (Cancer Genome Atlas Research Network, 2008)

A oncogênese glial pode resultar de uma série de alterações cromossômicas que deverão incluir ganho ou perda de um cromossomo específico ou alterações estruturais de localização específica em um cromossomo. Técnicas moleculares avançadas identificam pequenas mudanças estruturais como deleções, mutações ou duplicações de material cromossômico. Essas mudanças estruturais podem levar à inativação de genes supressores de tumor e à amplificação de proto-oncogenes (Gu et al., 2009). O gene supressor de tumor TP53, com papel na regulação do ciclo celular e na carcinogênese, é um exemplo de

alteração gênica em tumores gliais e está presente em aproximadamente, 50% dos cânceres humanos (Nozaki et al., 1999).

Múltiplas alterações genéticas que regulam várias vias chave do controle do crescimento celular que levam à proliferação, invasão e resistência à morte celular têm sido identificadas nos gliomas. Essas cascatas de transdução altamente complexas implicam na sinalização entre múltiplas vias inter-relacionadas. Receptores de fatores de crescimento tais como, o EGFR e o receptor de fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGFR), primariamente atuam através dos receptores tirosinoquinases, estando envolvidos no início e progressão dos gliomas (Wrensch et al., 2005). A estimulação da atividade dos receptores de fator do crescimento ativa várias cascatas com alvos e efeitos moleculares. Um exemplo é a ativação de moléculas que mediam a transdução contribuindo para a transformação fenotípica. As vias envolvidas incluem a RAS/RAF/proteína quinase mitógeno-ativada (MAPK), STAT-3 e a fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) /AKT (de Groot e Gilbert, 2007).

A heterogeneidade celular e molecular e a inter-relação da sinalização entre essas várias vias moleculares podem explicar, em parte, a resistência terapêutica desses tumores. A inibição de uma via molecular específica pode resultar na ativação de uma ou mais vias compensatórias que permitem a sobrevivência das células tumorais. Isso representa o alto grau de robustez dos sistemas funcionais celulares. Mesmo assim, na atualidade, o objetivo é o desenvolvimento de inibidores

moleculares alvos específicos que possam atuar no bloqueio das vias moleculares sinalizadoras da transdução (Mercer et al., 2009).

1.2.1 Alterações cromossômicas dos gliomas

A perda combinada dos alelos dos cromossomos 1p e 19q é descrita em gliomas, sendo mais frequente nos oligodendrogliomas. É considerada um importante evento precoce da tumorigênese oligodendroglial (Hartmann e von Deimling, 2009; Ney e Lassman, 2009). Nos astrocitomas de baixo grau é relatada a perda de heterozigotidade (LOH: “loss of heterozygosity”) 17p e 22q (Kitange et al., 2003). A LOH do cromossomo 6q, 13q, 11p e 19q são descritas nos astrocitomas anaplásicos (Miyakawa et al., 2000; Kitange et al., 2003).

A mais frequente alteração cromossômica em GBMs primários é a LOH do cromossomo 10 (70% dos tumores), principalmente nas regiões 10p14-15, 10q23-24, e 10q25. Nos GBMs secundários, a LOH do cromossomo 10q também é frequente (70% dos tumores), já LOH do cromossomo 10p é rara. A LOH do cromossomo 10q25 está associada com a progressão histológica a partir do astrocitoma de baixo grau para astrocitoma anaplásico e GBM (Kimmelman et al., 1996; Ohgaki e Kleihues, 2007). Também é comumente observada a deleção da região cromossomal 9p23-24.1 (Solomon et al., 2008). A LOH do cromossomo 13q e a LOH do cromossomo 22q têm sido detectadas em 12% e 41%

respectivamente dos GBMs primários e em 38% e 82% dos GBMs secundários (Ino et al., 1999; Nakamura et al., 2000, 2005).

1.2.2 Vias moleculares de sinalização da progressão tumoral dos astrocitomas

Os sintomas neurológicos dos tumores cerebrais dependem primariamente de sua localização no SNC, mas o tempo de progressão clínica e a chance de maior sobrevida livre de doença estão relacionados às suas características biológicas. Na classificação patológica dos astrocitomas, como já relatado anteriormente, a OMS utiliza o grau de malignidade tumoral para dividi-los em quatro graus: astrocitoma pilocítico grau I, astrocitoma fibrilar grau II, astrocitoma anaplásico grau III e glioblastoma grau IV.

A progressão dos astrocitomas está vinculada a múltiplas alterações genéticas que promoverão a progressão tumoral. Estudos moleculares identificaram pelo menos três eventos genéticos complexos que incluem alterações nas vias de sinalização envolvendo genes receptores tirosinoquinase (RTK), ativação da via PI3K e a inativação das vias dos genes supressores de tumor TP53 e retinoblastoma (Rb) (Franco-Hernandez et al., 2007; Cancer Genome Atlas Research Network, 2008).

A figura 2 mostra importantes alterações genéticas envolvidas no desenvolvimento e progressão dos astrocitomas.

Figura 2 - Importantes alterações genéticas envolvidas no desenvolvimento e progressão dos astrocitomas. Esquema adaptado de (Kitange et al., 2003., Cancer Genome Atlas Research Network, 2008)

1.2.3 O papel das vias EGFR/RAS/NF1/PTEN/PI3K

Os receptores de fatores de crescimento são ativados através da ligação ao seu respectivo ligante no seu domínio extracelular o que resulta em recrutamento da PI3K na membrana celular. A PI3K fosforilada em PIP2 e PIP3 ativa efetores moleculares como AKT e mTOR. Isto resulta na proliferação e aumento da sobrevivência celular e bloqueio da apoptose (Mellinghoff et al., 2005). O gene supressor de tumor NF1 pode atuar como um regulador negativo da RAS, e também apresenta um papel na mediação da via AKT-mTOR (Lee e Stephenson, 2007). (Figura 3).

A amplificação do EGFR é encontrada em aproximadamente, 45% dos GBMs primários, mas é rara em GBMs secundários (Zawrocki e Biernat, 2005). Cerca de 80% dos casos com amplificação do EGFR apresentam um rearranjo gênico e outras mutações que, com frequência, resultam em ativação constitutiva do EGFR. Um receptor mutante constitutivamente ativo do EGFR, EGFRvIII, está coexpressado em cerca de 50% dos GBMs com amplificação do EGFR (Biernat et al., 2004; Gan et al., 2009). O EGFR regula diversos processos celulares através de sinalizações via Ras-MAPK e PIK3/AKT que estão associados com o fenótipo dos gliomas de alto grau (Mischel e Cloughesy, 2003). É considerado um importante alvo terapêutico para pacientes com GBM (Belda-Iniesta et al., 2008; Karpel-Massler et al., 2009). (Figura 3).

Outra importante alteração genética encontrada com maior frequência em GBMs primários do que em secundários, envolve o gene supressor de tumor PTEN (Fosfatase e tensina homóloga) localizado no cromossomo 10q23. Mutações do PTEN são encontradas em aproximadamente, 36% dos glioblastomas primários e estão associadas ao processo de malignização dos astrocitomas. Sua inativação seja por deleção ou por mutação, antagoniza as vias PI3K/AKT/mTOR (Knobbe et al., 2002; Endersby e Baker, 2008). (Figura 3).

A estimulação do PDGFR resulta na inativação da sinalização das vias RAS/RAF/MAPK e também da PI3K/AKT e está envolvida na sobrevivência celular, proliferação, invasão e resistência à apoptose (de Groot e Gilbert, 2007).

1.2.4 O papel da via TP53/MDM2/p14arf

O gene supressor de tumor TP53, localizado no cromossomo 17p13.1, codifica uma proteína de 53 kilodaltons (kDa) denominada proteína p53, que tem papel importante no controle do ciclo celular e na resposta das células ao dano no DNA. Sua inativação, seja por mutação ou por LOH do cromossomo 17p, é um evento genético precoce em alguns subgrupos de astrocitomas. A inativação do TP53 parece estar envolvida, portanto, na gênese dos astrocitomas de baixo grau, e possivelmente tem papel na regulação da angiogênese e na progressão

para GBM, sendo encontrada em 62% dos GBMs secundários e em 35% dos GBMs primários (Nozaki et al., 1999; Gaiser et al., 2009).

A proteína p53 está envolvida em diversos processos celulares, incluindo o aumento da expressão da proteína p21 e a inibição de algumas ciclinas. As ciclinas também participam de várias funções celulares e são reguladoras do ciclo celular (Ono et al., 1997; Macaluso et al., 2005).

O gene supressor de tumor TP53 é controlado pelo gene MDM2 “mouse Double minute 2”, localizado no cromossomo 12q14.3-q15. A proteína codificada pelo gene MDM2 liga-se ao p53, regulando negativamente sua atividade transcripcional e estabilidade. A amplificação do MDM2 ocorre em 15% dos astrocitomas anaplásicos e GBMs primários. O MDM2 pode funcionar como um oncogene, promovendo proliferação celular aumentada. Assim, os GBMs primários podem apresentar p53 “não funcional”, devido a sua inibição pelo gene MDM2 hiperexpresso (Buolamwini et al., 2005; Vu e Vassilev, 2010).

A proteína p14arf é produto dos genes ARF e CDKN2A. Esta proteína interage com a proteína MDM2, resultando na ativação e estabilização do TP53. A expressão de ARF pode ser inibida pelo TP53. A hiperexpressão de p14arf induz apoptose celular independentemente do TP53. A inativação de p14arf, por deleção homozigótica ou por hipermetilação, foi observada em 50% dos GBMs primários e em 70% dos GBMs secundários (Watanabe et al., 2003; Bello e Rey, 2006). (Figura 3).

1.2.5 O papel da via p16(ink4)/CDK4/Rb

A proteína codificada Rb1 (gene do retinoblastoma) controla a progressão através do ciclo celular nas fases G1 e S. A fosforilação do Rb1 é produzida pela CDK4 (ciclina dependente da quinase 4) e a proteína encarregada de inibir esta ciclina é a p16(ink4) (inibidor da ciclina dependente da quinase 4). A perda funcional do Rb1 pode resultar na alteração das expressões dos genes p16, CDK4. (Figura 3). A deleção homozigótica do gene p16, e/ou a amplificação do CDK4, faz com que Rb1 esteja continuamente fosforilada levando a uma divisão celular incontrolada. Estas alterações estão presentes no GBM, sendo mais frequente no GBM secundário (Franco-Hernandez et al., 2007).

1.2.6 O papel do IDH1

O gene IDH1 codifica a isocitrato desidrogenase 1, que cataliza a carboxilação oxidativa de α cetoglutarato isocitrato, resultando na produção de NADPH. Ao contrário de outras formas mitocondriais do IDH, o IDH1 está presente no citosol e tem um papel no controle celular do dano oxidativo. Estudos recentes têm demonstrado cerca de 12% de frequência de mutações do IDH1, sendo mais observado em pacientes jovens e no GBM secundário, estando associado com melhor prognóstico (Parsons et al., 2008).

Figura 3. Principais vias envolvidas na patogênese e progressão do GBM (Ohgaki e Kleihues, 2009)

1.2.7 Eventos moleculares da invasão tumoral

Os astrocitomas, tanto de baixo grau como de alto grau, possuem uma marcante tendência a se infiltrarem no tecido cerebral adjacente ao tumor, indicando que o fenótipo invasivo é precocemente adquirido na tumorigênese. Existe uma preferência pela invasão ao longo dos tratos na substância branca, como ocorre nos gliomas que atravessam o corpo caloso (lesões em “asa de borboleta”). Outros gliomas permanecem confinados na substância branca interrompendo abruptamente a junção entre a substância branca e a cinzenta. Alguns apresentam padrão migratório com crescimento preferencial ao redor de neurônios na substância cinzenta, crescimento perivascular, e infiltração subpial (Bellail et al., 2004; Nakada et al., 2007).

1.2.7.1 O papel da matriz extracelular

A matriz extracelular (MEC) é encontrada no espaço intersticial de todos os órgãos. Sua composição varia para cada tecido, sendo composta por vários tipos de colágenos, glicoproteínas não colagenosas e proteoglicanos, os quais têm papel importante na regulação da migração, na sobrevivência e na diferenciação celular (VanMeter et al., 2001; Nakada et al., 2003).

No cérebro, em geral, a matriz extracelular é escassa e mal definida, consistindo basicamente de ácido hialurônico, exceto em duas áreas: ao

redor dos vasos sanguíneos e da superfície pial (glia limitans). Nessas áreas, existe uma lâmina basal bem definida que inclui colágeno (Bellail et al., 2004).

As células dos astrocitomas preferencialmente envolvem os espaços perivasculares e subpiais, áreas onde a lâmina basal é bem definida, mas também envolvem os espaços perineurais e a substância branca, áreas onde a MEC é mal definida. Essas células neoplásicas criam um micro-ambiente favorável à invasão depositando componentes de MEC permissivos, entre os quais tenascina, elastina, fibronectina, colágenos, fibronectina, laminina, ácido hialurônico e proteoglicanos (Fillmore et al., 2001).

A invasão das células dos astrocitomas ocorre por meio da natureza complexa das interações célula-célula e MEC. As proteases são elaboradas pelas células astrocitárias, incluindo as proteases de cisteína (catepsina B e S), protease aspártica (catepsina D), protease de serina (uroquinase e ativadores do plasminogênio tecidual), glicosidases e metaloproteases de matriz (MMP2, MMP3, MMP9). Essas proteases seletivas degradam o ambiente extracelular permitindo a facilitação da migração. Suas ações também remodelam o ambiente envolvido de forma a facilitar o crescimento da célula tumoral (Levicar et al., 2003).

A degradação proteolítica da MEC por proteases é um passo importante do mecanismo de invasão tumoral. As metaloproteases MMP2 (gelatinase A), MMP9 (gelatinase B) e a MMP3 (stromelisina) estão frequentemente expressadas em astrocitomas de alto grau (Varga et al.,

2010). Outras proteases com expressão aumentada em astrocitomas são a catepsina D e o ativador de plasminogênio tipo uroquinase (Fukuda et al., 2005).

1.3 Angiogênese

A angiogênese é definida como a formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes, sendo essa neovascularização um aspecto bem estabelecido e fundamental na biologia do câncer (Folkman, 1974; Eichhorn et al., 2007).

A angiogênese é essencial para o crescimento da grande maioria dos tumores primários e de suas metástases. Os tumores podem absorver nutrientes e oxigênio suficientes por difusão simples até o tamanho de 1 a 2 mm, sendo que a partir desse ponto o tumor requer a elaboração de um suprimento vascular para continuar progredindo. Acredita-se que esse processo envolva o recrutamento de vasos maduros vizinhos ao tecido hospedeiro para iniciar o desenvolvimento de novos capilares sanguíneos os quais crescem em direção à massa tumoral, infiltrando-a. Os tumores podem crescer pelo compartilhamento de vasos sanguíneos existentes no tecido hospedeiro. Os vasos envolvidos pelo tumor poderão sofrer alterações que geram um ambiente de hipóxia que será o fator de estimulação da angiogênese na margem tumoral. O controle da angiogênese tumoral depende do balanço de vários fatores ativadores (fatores angiogênicos) e inibidores (fatores antiangiogênicos), que podem

ser secretados pelas células tumorais, pelas células do tecido infiltradas pelo tumor, assim como por macrófagos e fibroblastos (Ferrara, 2004; Eichhorn et al., 2007). (Tabela 2).

Tabela 2 - Fatores endógenos angiogênicos e anti-angiogênicos

Fatores Angiogênicos	Fatores Antiangiogênicos
VEGF (Fator de crescimento endotelial vascular)	Trombospondina 1,2
FGF (Fator de crescimento de fibroblasto)	Endostatina
TGF α / TGF β (Fator de crescimento transformador α/β)	Angiostatina
PDGF (Fator de crescimento derivado da plaqueta)	Interferon α/β
FGH (Fator de crescimento de hepatócito)	Interleucina I2
TNF α (Fator de necrose tumoral α)	Fragmento 4 do Fator de plaqueta
EGF (Fator de crescimento de epiderme)	Angiopoetina 2
PGF (Fator de crescimento placentário)	Macrófago humano
Fator tecidual	Metaloelastase
Interleucinas 6/8	Metaloproteinase 1-2 do inibidor tecidual
Angiogenina	Inibidor do fator de crescimento endotelial
Angiopoetina 1	Vasostatina
Ciclo-oxigenase 2	Fragmento da anti-trombina III
Óxido nítrico	Fragmento do gene osteopontina

FONTE: Pang RWC. et al. Clinical implications of angiogenesis in cancers. Vascular Health and Risk Management. 2006;2(2):97-108.

1.3.1 Angiogênese nos gliomas

A angiogênese é reconhecida como um evento chave no crescimento e na progressão contínua dos gliomas, que se caracterizam pelo alto grau de proliferação vascular. Nos tumores astrocitários o grau de proliferação vascular tem uma direta correlação com o aumento da malignidade, e o GBM é o tumor astrocitário com maior grau de proliferação vascular. A neovascularização nos gliomas cerebrais correlaciona-se diretamente com a sua agressividade biológica, grau de malignidade, capacidade de recidivar e, inversamente, com a sobrevida pós-operatória (Fischer et al., 2005).

Os vasos tumorais neoformados são estrutural e funcionalmente anormais e impõem um ambiente de baixa tensão de oxigênio e de alta pressão intersticial. A barreira hematoencefálica contribui para a patogenia do edema associado ao tumor, com aumento no risco de hemorragia peri e intratumoral. Nos glioblastomas, os vasos sanguíneos são tortuosos, desorganizados, permeáveis, caracterizados por anormalidades no endotélio, na cobertura pericítica e na membrana basal. Em adição à perda da integridade da barreira hematoencefálica, os tumores cerebrais exibem fatores patológicos para a necrose tumoral, hipóxia e desencadeamento do processo angiogênico com proliferação endotelial (Stiver, 2004; Fischer et al., 2005).

A classificação da OMS distingue os astrocitomas difusos de baixo e de alto grau pela presença de proliferação microvascular como um critério

diagnóstico e um parâmetro prognóstico independente. O GBM é reconhecidamente um tumor angiogênico, sendo este um fator importante para o seu crescimento, progressão, agressividade e pior prognóstico. Dessa forma, o processo angiogênico envolve múltiplos alvos moleculares que são, na atualidade, foco de inúmeras pesquisas para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas antiangiogênicas para o GBM (Eichhorn et al., 2007; Anderson et al., 2008).

1.3.2 Mecanismos moleculares da neoformação vascular

A sequência de eventos que leva à formação de novos vasos sanguíneos envolve inicialmente o aumento da permeabilidade vascular mediada pelo VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) com consequente extravasamento de proteínas plasmáticas associadas à dilatação de vasos nativos e redução na sua cobertura pericítica; então células epiteliais migram e proliferam. Nessa sequência de ocorrências existe a deposição de matriz angiogênica para o desenvolvimento de novos vasos. Isto envolve o rompimento da membrana basal vascular e da matriz extracelular através da ação de proteases (catepsinas), metaloproteases (MMPs) e de outras enzimas. Algumas dessas moléculas na matriz extracelular apresentam uma alta afinidade a receptores tirosinoquinases de adesão focal, um passo crucial na angiogênese dos gliomas. O processo angiogênico finaliza com a reunião de células endoteliais para formar o lume vascular acompanhado pela

elaboração de uma nova membrana basal e o recrutamento de pericitos (Dvorak, 2005; Jain et al., 2007)

A desestabilização dos vasos sanguíneos causa hipóxia. A hipóxia e as mutações em células neoplásicas levam à secreção de fatores de crescimento, tais como, VEGF, PDGF, fator de crescimento de fibroblasto (FGF), interleucinas, fator de crescimento derivado da célula estromal 1 (SDF1), fator de crescimento de epiderme (EGF), fator de crescimento transformador (TGF), que são cruciais no processo angiogênico. A resposta angiogênica na progressão dos gliomas é resultado de um balanço alterado e complexo entre fatores pró e antiangiogênicos. (Dunn et al., 2000).

1.3.3 Fator induzido por hipóxia (HIF-1)

A hipóxia é considerada um dos mais importantes estímulos para a angiogênese em tumores malignos e o fator induzido por hipóxia (HIF-1) apresenta um papel fundamental na resposta celular em condições de baixa tensão de oxigênio (Liao e Johnson, 2007)

O HIF-1 é composto por duas subunidades: HIF-1 α e HIF-1 β . O gene HIF-1 α está localizado no cromossomo 14 (14q21-q24) enquanto que o gene HIF-1 β está localizado no cromossomo 1 (1q21). HIF-1 α e HIF-1 β são proteínas grandes que compreendem 826 e 789 aminoácidos, respectivamente. Ambas são sinalizadoras nucleares tendo um padrão caracterizado por duas α hélices conectadas por uma alça. Este padrão

recebe o nome de “basic-helix-loop-helix” (bHLH). Cada hélice contém resíduos básicos de aminoácidos que facilitam a ligação com o DNA. O domínio HLH é responsável pela dimerização das subunidades. O HIF-1 β é constitutivamente expressado e está presente em todas as condições de oxigênio, sendo identificado como um translocador nuclear. A expressão e a atividade do HIF-1 α são reguladas pela concentração celular de oxigênio, e, sob hipóxia, HIF-1 α está superexpresso (Ke e Costa, 2006; Rankin e Giaccia, 2008).

1.3.3.1 Mecanismos moleculares da regulação do HIF-1

A síntese de HIF-1 α é regulada pela ativação das vias PIK3 e *ERK*-MAPK, ambas reconhecidamente envolvidas na tumorigênese de neoplasias malignas, entre as quais, o GBM (Semenza, 2003).

A hipóxia induz à estabilização e à hiperexpressão do HIF-1 α o qual forma um heterodímero com HIF-1 β . Esse complexo, junto a proteínas co-ativadoras (p300/CBP, Ref-1, SCRC-1), transloca-se para o núcleo ligando-se a elementos de resposta à hipóxia (HRE), induzindo a atividade transcripcional de genes fundamentalmente envolvidos na angiogênese e invasão tumoral, sobrevivência e metabolismo celular (Semenza, 2009).

Quando o oxigênio está presente, o HIF-1 α é hidroxilado em resíduos específicos e reconhecido pelo gene supressor de tumor de von Hippel Lindau cujo produto liga-se ao HIF-1 α hidroxilado levando à

ubiquitinação e à degradação proteossômica. O HIF-1 α é também regulado pela ação do fator de inibição do HIF-1 (FIH) e sua hidroxilação em asparagina-803 inibe a interação do HIF-1 α aos seus co-ativadores p300 e CBP, impedindo sua ativação (Chen et al., 2009). (Figura 4).

Figura 4 - Regulação do HIF-1 α sob hipóxia e condições normais de oxigênio (Kaur et al, 2004)

A atividade do HIF-1 pode também estar aumentada através da ativação de mecanismos não hipóxicos. HIF-1 α e seus co-ativadores p300/CBP podem ser diretamente fosforilados através da ativação da via p42/p44-MAPK que leva ao aumento da atividade transcricional do complexo HIF-1. As alterações genéticas também modulam a expressão do HIF-1, tais como alterações em genes supressores de tumores e

oncogenes. A inativação do TP53, tanto por mutação somática ou inativação funcional, pode resultar no aumento de expressão do HIF-1 α (Schmid et al., 2004; Khromova et al., 2009). A inativação do PTEN leva ao aumento da resposta transcricional da via PI3K-AKT e também ao aumento da expressão de HIF-1 α (Zundel et al., 2000; Semenza, 2010).

A ativação do HIF-1 α em nível transcricional resulta na ativação de fatores de crescimento tais como, VEGF, SDF1, EGF, TGF- α , PDGF, PLGF, IGF, angiotensina, angiopoetina, receptores Tie e trombina, a maioria apresentando propriedades angiogênicas. Aproximadamente uma centena de genes transcritos pela atividade do HIF-1 já foram identificados, sendo este o mais potente estimulador da expressão do VEGF (Pugh e Ratcliffe, 2003). (Figura 5).

* CEP: Célula endotelial primitiva

Figura 5 - Vias moleculares de regulação da angiogênese em resposta à hipóxia
Esquema adaptado de Semenza et al., 2009

1.3.3.2 HIF e a regulação de células tronco cancerígenas

As células tronco neoplásicas do glioblastoma apresentam algumas características semelhantes das células tronco neurais normais, incluindo a expressão de marcadores de células tronco neurais, a capacidade de proliferação e renovação, a formação de neuroesferas, e a habilidade para diferenciar-se em várias linhagens nervosas (neurônio, astrócito, oligodendrócito). No entanto, as células tronco neoplásicas têm em relação às células tronco normais, uma expressão aberrante de marcadores de diferenciação, com alta capacidade proliferativa, anormalidades cromossômicas e formação tumoral (Aboody et al., 2000., Heese et al., 2005). A angiogênese, através da secreção de elevados níveis de VEGF, é uma outra característica das células tronco gliais (Schichor et al., 2006). Estudo recente demonstrou que as células tronco neoplásicas derivadas do glioblastoma respondem à hipóxia com indução do HIF, que tem um papel importante no direcionamento da angiogênese, com pior prognóstico no GBM (Zhao et al., 2008). A tumorigênese e a angiogênese em células tronco neoplásicas são alvos atuais de estudos envolvendo gliomas, objetivando futuros alvos terapêuticos (Ehtesham et al., 2005; Ahmed et al., 2010).

1.3.4 Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)

O VEGF é uma glicoproteína homodimérica com peso molecular de aproximadamente 45 kDa, sendo um fator de permeabilidade vascular reconhecido como a mais potente proteína de ação angiogênica. Além do aumento da permeabilidade vascular, também apresenta importante papel na migração, proliferação, formação do vaso e sobrevivência da célula endotelial (Carmeliet, 2005).

A família VEGF é formada por seis glicoproteínas denominadas VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E e o fator de crescimento placentário (PLGF). O VEGF-A é reconhecido também como VEGF e existem quatro isoformas maduras que são denominadas de acordo com o número de aminoácidos em VEGF₁₆₅, VEGF₁₂₁, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆. Essas isoformas apresentam atividades biológicas semelhantes, mas com diferentes padrões de secreção. O VEGF₁₂₁ é secretado e totalmente difusível, sendo um isoforma predominantemente expressado em tumores sólidos (Pradeep et al., 2005; Fischer et al., 2005).

O VEGF está presente durante o desenvolvimento embrionário dos vasos sanguíneos. Já na vida adulta os níveis de VEGF são mínimos, exceto nos locais de atividade angiogênica fisiológica como no útero ou em processos cicatriciais. Nos tumores, o aumento da expressão do VEGF promove o aumento da vascularidade e da permeabilidade vascular (Breen, 2007).

1.3.4.1 Mecanismo de ação e regulação do VEGF

As ações do VEGF são mediadas através de três receptores tirosinoquinases, VEGFR1 (Flt-1), VEGFR2 (Flk-1/KDR) e VEGFR3, por dois receptores “neuropilins”, NRP-1 e NRP-2, que são co-receptores VEGFR. Os receptores VEGF são expressos primariamente no endotélio tumoral e o VEGF estimula a proliferação endotelial diretamente através da ativação do VEGFR2 que tem uma intensa atividade quinase. O VEGFR1 atua indiretamente através do recrutamento de macrófagos e mastócitos que irão secretar fatores angiogênicos. O papel do VEGFR3 está relacionado à linfangiogênese (Pradeep, 2005; Shibuya, 2009).

O VEGFR2 é o maior mediador de várias ações fisiológicas e patológicas do VEGF nas células endoteliais, incluindo sobrevivência, proliferação, migração e permeabilidade. Durante o processo angiogênico, os vasos sanguíneos inicialmente dilatam-se e tornam-se permeáveis como uma resposta inicial a secreção do VEGF pelas células tumorais e estromais. Angiopoetina 2 e algumas proteases mediam a dissolução da membrana basal e da matriz intersticial em conjunto com o VEGF. A neovascularização acontece com o depósito de inúmeras moléculas e fatores de crescimento, incluindo VEGF (McMahon et al., 2000; Distler et al., 2003).

Além da via HIF, a transcrição do VEGF também pode ser induzida por fatores de crescimento e citocinas, incluindo o PDGF, EGF, FGF, TGF- β 1, TNF (fator de necrose tumoral) e IL-1 (interleucina 1). Mutações

nos genes PTEN e ativação do EGFR também se relacionam com a elevação da expressão do VEGF (Carmeliet, 2005; Ferrara, 2000).

1.3.5 Fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF)

O PDGF é considerado o maior mitógeno de células de origem mesenquimal, como fibroblastos e células musculares lisas e de algumas células de origem neuroectodérmica. A família PDGF de fatores de crescimento é composta por quatro ligantes, PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C e PDGF-D e por dois receptores tirosinoquinases PDGFR α e PDGFR β . Todos os ligantes formam homodímeros. O PDGF-A e o PDGF-B podem também formar um heterodímero. O PDGF e o VEGF formam uma família de fatores de crescimento denominada PDGF/VEGF de domínio homólogo. Este domínio funcional compreende aproximadamente 80 a 90 resíduos de aminoácidos com um padrão de oito cisteínas que são fundamentais para a conformação da estrutura da proteína. O PDGF-C e o PDGF-D apresentam, respectivamente, quatro e dois resíduos extras de cisteínas (Fredriksson et al., 2004; Reigstad et al., 2005).

Embora o PDGF ative vias tumorigênicas, sua ativação e sinalização, tanto em tumores quanto em tecidos normais, permanecem pouco conhecidas. As células neoplásicas conjuntamente com suas alterações genéticas geram um ostensivo microambiente tumoral. As células endoteliais, os pericitos, os elementos do estroma como fibroblastos e células inflamatórias infiltrativas estão implicadas funcionalmente na

tumorigênese. Em tumores, a sinalização autócrina e parácrina é mediada pelo PDGF e pode acelerar o crescimento e a invasão de células tumorais ao redor do estroma, estimulando a angiogênese. Os PDGFs foram relacionados à modulação da expressão do VEGF em estudos com linhagens de células tumorais. Além disso, alterações gênicas como a mutação do TP53 e a amplificação do EGFR estão associadas ao aumento da expressão do PDGFR (Li et al., 2003; Pietras et al., 2008).

1.3.5.1 Mecanismo de ação e regulação do PDGF-C

O PDGF-C é um polipeptídeo com 345 aminoácidos. Em humanos seu gene está localizado no cromossomo 4q32. A função biológica do PDGF-C é pouco conhecida e explorada. A proteína PDGF-C é produzida e secretada como um homodímero e necessita ser proteoliticamente processada para ligar-se ao receptor PDGFR α , ativando-o. O PDGF-CC poderá ativar os receptores PDGFR α e PDGFR β se coexpressos numa mesma célula (Li e Eriksson, 2003).

O PDGF-C é expresso em tecidos humanos normais como coração, pâncreas, rim e fígado. Apresenta papel na embriogênese, na isquemia cerebral pela indução da permeabilidade da barreira hemato-encefálica, além de estar expresso nos olhos, onde induz à proliferação e migração do epitélio pigmentar da retina. Em tumores, o PDGF-C apresenta papel no recrutamento de fibroblastos e na hiperregulação de matriz

metaloprotease. Estudos recentes sugerem seu papel na angiogênese tumoral (Anderberg et al., 2009; Zhang et al., 2010).

1.4 Métodos moleculares para análise da angiogênese

1.4.1 Densidade microvascular (DMV) e proliferação celular

O uso de técnicas imunoistoquímicas permite verificar e quantificar a presença da microcirculação tumoral. A identificação da angiogênese em tumores pode ser realizada através de diversos métodos, sendo a identificação da densidade microvascular (DMV) uma das mais utilizadas. A DMV reflete a intensidade da angiogênese tumoral e vários estudos demonstram a sua correlação com a expressão da angiogênese, com o crescimento tumoral e com a ocorrência de metástase à distância (Vermeulen et al., 1996). Diversos anticorpos podem ser usados para a identificação da microvascularização, sendo que o anti-CD34 e o anti-CD105 estão entre os mais estudados (Vermeulen et al., 2002). Os vasos corados pelo método são contados em microscopia de grande aumento nas áreas de maior concentração vascular. Weidner et al., em 1991, estudando carcinoma de mama invasor, demonstraram que a contagem de microvasos foi significativamente maior no grupo de pacientes que desenvolveram doença metastática, sugerindo que a DMV poderia ser um fator preditivo independente para o desenvolvimento de metástases de

neoplasias malignas de mama. A partir desse relato, a angiogênese tem sido quantificada através da determinação da DMV.

O CD34 é uma glicoproteína de membrana com peso molecular de aproximadamente 110 kDa. É expresso em todas as células hematopoéticas, em células endoteliais, fibroblastos de embrião e em algumas células do tecido nervoso fetal e adulto (Krause et al., 1996). O CD34 funciona como fator de adesão celular, sendo que também atua mediando a ligação de células tronco hematopoéticas à matriz extracelular ou a células do estroma (Ribeiro e Dahl, 2010). Cavalcante et al., em 2010, demonstraram uma maior DMV pelo CD34 em astocitomas de alto grau comparados aos de baixo grau.

A endogлина (CD105) é uma glicoproteína de membrana com peso molecular de 180 kDa, sendo um importante componente do receptor do fator transformador de crescimento β (TGF- β). O CD105 apresenta um papel na morfogênese e no desenvolvimento do sistema vascular e, além disso, o gene endogлина é alvo de uma doença hereditária autossômica dominante chamada teleangectasia hemorrágica hereditária do tipo 1 caracterizada por malformações arteriovenosas em vários órgãos (Barresi et al., 2008). O anticorpo anti-CD105 liga-se preferencialmente a células endoteliais imaturas, ou seja, em ativa angiogênese (Yao et al., 2007). Netto et al., (2008) estudaram em oligodendrogliomas a DMV pelo CD105, CD34 e VEGF encontrando esses marcadores no endotélio vascular tumoral sugerindo um potencial envolvimento do receptor TGF- β na angiogênese tumoral.

A proliferação é um fator chave na progressão das neoplasias e, pode ser avaliada por imunohistoquímica através do antígeno nuclear KI-67. O KI-67 é uma proteína não histona que não é expressa em células na fase G0, mas que pode ser detectada nas fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2 e mitose), sendo apontado como um fator de proliferação e prognóstico em neoplasias (Preusser et al., 2008; Paulus, 2009).

1.4.2 Tissue microarray (TMA)

Kononen et al., em 1998, descreveram a técnica de “tissue microarray” (TMA) que se trata do arranjo em matriz de amostras teciduais. É uma técnica que se fundamenta basicamente na construção de um bloco de parafina contendo fragmentos cilíndricos de amostras teciduais ou tumorais obtidos de blocos de parafina originais. Os cilindros teciduais são colocados no bloco de parafina receptor dentro de posições pré determinadas. O bloco de parafina contendo centenas de amostras de forma ordenada torna-se um importante instrumento de pesquisa na patologia através do uso de métodos imunohistoquímicos, ou com a reação de hibridação cromogênica “in situ” (Cish) ou fluorescente (Fish) a partir de uma lâmina obtida do bloco de TMA (Simon e Sauter, 2003).

O TMA permite a pesquisa de um determinado marcador, amplificação ou translocação cromossômica em centenas de amostras a um custo de uma única reação. Isso permite a economia de reagentes e de tempo para a realização das reações, uniformizando-as e facilitando a

interpretação comparativa dos casos em pesquisa, além da possibilidade da utilização do bloco em mais de um projeto. A tecnologia do TMA permite a análise de alterações moleculares em um grande número de amostras teciduais, a exploração da progressão em tumores, a identificação de fatores prognósticos preditivos, a validação de novos genes, diagnósticos e a determinação de alvos terapêuticos (Kallioniemi et al., 2001).

Para a construção dos blocos de TMA devem ser seguidos vários passos: a seleção dos blocos doadores, a escolha da matriz adequada, a seleção da área a ser representada, a construção do bloco receptor, a obtenção das lâminas e por fim, a sua manutenção para estudos futuros (Cunha et al., 2009).

O método de TMA é utilizado na rotina de pesquisa de grandes amostragens de inúmeros cânceres, mesmo em tumores heterogêneos, permitindo a análise de áreas centrais e periféricas com alta densidade de células tumorais e diferentes aspectos morfológicos. Estudos utilizando este método têm proporcionado a identificação de centenas de genes com papel no câncer e em outras doenças (Dancau et al., 2010).

OBJETIVO

2 OBJETIVO

Analisar as expressões imunoistoquímicas dos marcadores HIF-1 α , VEGF e PDGF-C e correlacionar os resultados com a angiogênese e o prognóstico em glioblastomas.

MÉTODO

3 MÉTODO

3.1 Casuística

A casuística deste estudo foi de 322 pacientes com diagnóstico de GBM que foram tratados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) e no Hospital do Câncer de Barretos – Fundação Pio XII (HC-Barretos) no período de 2000 a 2008. Foram incluídos os casos que apresentavam lâminas e blocos de parafina adequados para a realização do TMA e com dados clínicos conhecidos como: idade maior que 15 anos, sexo, índice de Karnofsky, data da primeira cirurgia, localização do tumor, grau de ressecção cirúrgica, tratamento radioterápico e quimioterápico, data do último seguimento ou óbito.

3.1.1 Casuística do HC-FMUSP

Do Departamento de Patologia da FMUSP foram selecionados 145 casos com diagnóstico confirmado e revisado de GBM e previamente incluídos nos TMAs 0049 e 0051.

Foram excluídos 15 casos por descolamento das amostras da lâmina de TMA e 6 por dados clínicos incompletos. Portanto, foram incluídos no estudo 124 casos do HC-FMUSP. (Anexos A e B)

3.1.2 Casuística do HC-Barretos

No Departamento de Patologia do Hospital do Câncer de Barretos foram selecionados 177 casos com diagnóstico de GBM. Todos foram submetidos à revisão anatomopatológico no Departamento de Patologia do HC-FMUSP por dois patologistas independentes e as discordâncias foram resolvidas em conjunto. Após a revisão anatomopatológica, 25 casos foram reclassificados e excluídos da casuística (3 xantastrocitomas pleomórficos, 3 oligoastrocitomas grau III, 1 oligoastrocitoma grau II, 12 oligodendrogliomas grau III e 6 astrocitomas grau III). Também foram excluídos 13 casos com material considerado insuficiente para o diagnóstico, 35 casos com material insuficiente no bloco de parafina (bloco raso) e 14 casos com dados clínicos incompletos. Noventa casos foram representados no TMA 0180, sendo 6 casos excluídos por descolamento das amostras da lâmina de TMA. Portanto, foram incluídos no estudo 84 casos do HC-Barretos. (Anexos A e B).

3.2 Aprovação do Projeto de Estudo

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da Diretoria Clínica do HC-FMUSP (protocolo de pesquisa nº 0263/07) (Anexo C) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Pío XII (protocolo de pesquisa nº 065/2006) (Anexo D). Todos os casos apresentavam um termo de consentimento livre e esclarecido

institucional autorizando a natureza do projeto. Trata-se de um estudo retrospectivo e transversal.

3.3 Construção do TMA

A construção dos blocos de TMA teve início durante a revisão anatomopatológica de todos os casos selecionados. Três áreas representativas de tecido tumoral em cada caso foram marcadas nas lâminas de hematoxilina-eosina (H&E) e nos blocos de parafina originais ou doadores. Cada uma das três áreas marcadas com 0,6mm de diâmetro foram extraídas do bloco doador através do equipamento de “array” MTA-1, “Beecher Instruments Inc. Sun Prairie”, WI, EUA. As amostras foram inseridas em um bloco de TMA receptor em posições previamente mapeadas e determinadas. Cortes sequenciais de 3µm de espessura foram realizados nos blocos de TMA e fixados em lâminas. Lâminas representativas do TMA foram inicialmente coradas com H&E para avaliação da representação de cada amostra; as demais foram parafinizadas e armazenadas a menos 20°C. A construção dos TMAs foi realizada no Laboratório de Patologia LIM 14 da Faculdade de Medicina da USP.

3.4 Imunoistoquímica

O procedimento de imunoistoquímica (IQ) foi realizado em lâminas dos TMAs 0049, 0051 e 0180. Os anticorpos utilizados foram o HIF-1 α , VEGF, PDGF-C, CD34, CD105 (endogлина) e KI-67. Os clones, diluições e controles positivos das reações são apresentados na tabela abaixo.

Tabela 3 - Anticorpos, clones, diluições e controles positivos usados no procedimento de imunoistoquímica

Anticorpo	Clone	Diluição	Controle +
HIF-1α	HIF-1 α 67 Monoclonal Abcam - EUA	1:40	GBM OC 09-12185
VEGF	VG-1 Monoclonal Abcam - EUA	1:800	Angiossarcoma 09-4716A
PDGF-C *	Monoclonal (não comercial)	1:12.000	Linhagem GBM U87MG
CD34	QBend-10 Monoclonal Abcam - EUA	1:800	Amídala
CD105	SN6H Monoclonal Termoscientific/Dinamarca	1:50	Amídala
KI-67	MIB-1 Monoclonal Dako - EUA	pronto para uso	Amídala

*Cedido pelo Instituto Ludwig de Estocolmo, Suécia.

As reações foram realizadas seguindo-se os seguintes passos:

- a) Desparafinização dos cortes de 3 μ m de espessura do material incluído em parafina: incubação com xilol a 60°C por 15 minutos seguida de outra incubação com xilol à temperatura ambiente por 15 minutos.
- b) Hidratação dos cortes em concentrações de etanol a 100% com 3 banhos de 30 segundos cada, etanol a 95%, 80% e 70% por 30 segundos, lavagem em água corrente e água destilada.
- c) Recuperação antigênica mediante incubação das lâminas em solução de ácido cítrico 10 mM pH 6.0 (Merck, EUA) em panela a vapor; após a fervura da água da panela, as lâminas foram colocadas em uma cuba em solução de recuperação por 40 minutos. Esfriamento à temperatura ambiente. Lavagens em água corrente e água destilada.
- d) Bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada (H₂O₂) a 6% diluída v/v em metanol, em três banhos de 10 minutos cada. Lavagens em água corrente e água destilada. Lavagem com solução salina tamponada com fosfatos (PBS) 10 mM pH 7,4 por 5 minutos.
- e) Bloqueio de proteínas com Cas Block (Zymed) por 10 minutos a 37°C. Incubação com o anticorpo primário.
- f) Incubação das lâminas com anticorpo primário (específico para o antígeno), diluído em solução de albumina bovina (BSA) (Sigma, EUA) a 1,0% e azida sódica NaN₃ (Inlab, São Paulo) 0,1% em PBS, em câmara úmida: 30 minutos a 37°C e, em seguida, 18 horas (over night) a 4°C. Lavagens em tampão PBS com 3 trocas de 5 minutos cada.

- g) Incubação com Novo Link “Post Primary Block” por 30 minutos a 37°C. Lavagens com tampão PBS com 3 trocas de 3 a 5 minutos cada.
- h) Incubação com polímero Novo Link por 30 minutos a 37°C.
- i) Revelação com solução de substrato cromogênico contendo diaminobenzidina (Sigma, EUA) a 0,10%, peróxido de hidrogênio a 0,06%, dimetil sulfoxido (Labsynth) a 1% em PBS, em banho de 5 minutos, a 37°C. Lavagens em água corrente e água destilada.
- j) Contra-coloração com Hematoxilina de Harris por 1 minuto, lavagens em água corrente e água destilada. Imersão rápida em água amoniacal (solução de hidróxido de amônia 0,5%) seguida de lavagens em água corrente e água destilada.
- k) Desidratação dos cortes em banhos de etanol a 50%, 80%, 95% e etanol absoluto (3 trocas de 1 minuto cada), diafanização em banhos de xilol e montagem em meio permanente (Entellan Merck) com lamínula.

Os controles utilizados nas reações imunoistoquímicas compreenderam um controle sabidamente positivo para o anticorpo em estudo e um controle negativo com incubação em PBS e eliminação do anticorpo primário, seguindo-se os demais procedimentos imunoistoquímicos.

3.5 Análise por microscopia óptica

Todas as lâminas de TMA coradas com os anticorpos HIF-1 α , VEGF, PDGF-C, CD34, CD105 e KI-67 foram analisadas independentemente por dois investigadores em microscópio com magnificação de 400x. A variação interobservador foi menor que 10% e as discordâncias resolvidas em conjunto.

3.5.1 Avaliação da imunorreatividade das células tumorais

A avaliação da imunorreatividade das células tumorais foi realizada para os anticorpos HIF-1 α , VEGF e PDGF-C seguindo-se os seguintes passos:

- 1) contagem do número total de células tumorais da amostra.
- 2) contagem do número total de células tumorais imunorreativas.
- 3) contagem dos núcleos imunorreativos.
- 4) contagem dos citoplasmas imunorreativos.

A partir desses dados adotou-se uma classificação semi-quantitativa da expressão das proteínas obtidas por imunoistoquímica: (-) 0% nenhuma estrutura marcada, (+) menos de 10% de células imunorreativas, (++) 10-50% de células imunorreativas, (+++) mais que 50% de células imunorreativas. Os valores (-) e (+) foram considerados negativos, enquanto que os valores (++) e (+++) foram considerados positivos.

3.5.2 Avaliação da densidade microvascular (DMV)

A avaliação da DMV foi realizada para os anticorpos VEGF, PDGF-C, CD34 e CD105. Os vasos foram contados em números absolutos, cada lume distinto foi contado como um vaso.

3.6 Análise Estatística

Os dados das 3 amostras de cada caso, para cada um dos marcadores, foram inseridos em uma planilha Excel. A amostra selecionada de cada caso para a análise estatística foi sequencial, ou seja, a mesma para todos os marcadores e baseou-se a partir da amostra com a melhor marcação da imunorreatividade do HIF-1 α .

A análise estatística foi realizada através da plataforma R, versão 2.8.0 “Copyright © 2008 The R Foundation for Statistical Computing”. Para a análise de correlações utilizou-se o teste não paramétrico de Spearman. As diferenças entre medianas foram comparadas pelo teste de Mann Whitney. As comparações entre grupos pareados foram analisadas pelos testes de Friedman e Dunn. As análises de sobrevida foram realizadas pelo método de Kaplan Meyer e as diferenças entre curvas, estimadas pelo teste de “log rank”. As variáveis que apresentaram significância estatística pelo teste de “log rank” ou consideradas de importância foram submetidas à regressão de Cox. As diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Resultados demográficos

Dos 208 casos de GBM incluídos no estudo, 127 eram do sexo masculino (61%) e 81 do sexo feminino (39%). A idade variou de 16 a 78 anos, sendo a mediana de 56 anos. O índice de Karnofsky mediano pré cirúrgico foi 80. Quanto à localização do tumor, 59 casos eram do lobo frontal (28%), 35 do lobo temporal (17%), 36 do lobo parietal (17%), 6 do lobo occipital (3%), 20 insulares (10%), 46 multifocais (22%) e 6 estavam em outras localizações (3%). Quanto ao grau de ressecção cirúrgica referida pelo cirurgião, 71 casos (34%) tiveram ressecção total, 117 casos (56%) ressecção parcial e 20 casos (10%) biópsia. Cento e trinta e um pacientes (63%) foram tratados com radioterapia e 46 (22%) com quimioterapia com Carmustina. A sobrevida total variou de 1 semana a 68 meses e a sobrevida mediana foi de 7 meses.

A tabela 4 mostra os resultados demográficos do estudo.

Tabela 4 - Resultados demográficos do estudo

	FREQUÊNCIA	
	Nº de Pacientes	% de Pacientes
Total de casos	208	100
Idade mediana 56 anos		
Sexo		
Masculino	127	61
Feminino	81	39
Karnofsky mediano 80		
Localização		
Frontal	59	28
Temporal	35	17
Parietal	36	17
Occipital	6	3
Insula	20	10
Multifocal	46	22
Outros	6	3
Grau de ressecção		
Total	71	34
Parcial	117	56
Biópsia	20	10
Radioterapia		
Sim	131	63
Não	77	37
Quimioterapia		
Sim	46	22
Não	162	78
Sobrevida mediana		
7 meses		

4.2 Resultados imunoistoquímicos

4.2.1 Resultados da imunorreatividade tumoral do HIF-1 α , VEGF e PDGF-C

A imunorreatividade positiva pelo marcador HIF-1 α foi detectada em 184 casos (88,5%), sendo 10 e 12 casos positivos exclusivamente no núcleo e citoplasma, respectivamente. Cento e sessenta e dois casos foram positivos em ambos. (Tabela 5).

A imunorreatividade positiva pelo VEGF foi observada em 131 (63%) dos 208 casos estudados, sendo que todos apresentaram imunorreatividade citoplasmática, enquanto que 24 casos (11,5%) apresentaram também imunorreatividade nuclear. (Tabela 5)

A imunorreatividade positiva pelo PDGF-C foi observada em 160 casos (77%), 26 casos (12,5%) foram positivos no núcleo e 155 casos (74,5%) tiveram imunorreatividade positiva no citoplasma. (Tabela 5). Na maioria dos casos observou-se também imunorreação positiva no estroma.

Na Figura 6 podem ser observadas amostras seriadas do TMA apresentando um caso de GBM com imunorreatividade positiva pelo HIF-1 α , VEGF e PDGF-C e outro caso negativo para os três marcadores.

A tabela 5 apresenta a distribuição dos 208 casos de GBMs em relação à marcação semi-quantitativa da imunorreatividade tumoral, nuclear e citoplasmática dos marcadores HIF-1 α , VEGF e PDGF-C.

Tabela 5 - Distribuição dos resultados imunoistoquímicos da casuística

MARCADOR	(-)	(+)	(++)	(+++)	Número de casos positivos
HIF-1 α tumoral	21	3	93	91	184 (88,5%)
HIF-1 α nuclear	25	11	124	48	172 (82,7%)
HIF-1 α citoplasmático	25	9	101	73	174 (83,6%)
VEGF tumoral	51	26	78	53	131 (63%)
VEGF nuclear	150	34	20	4	24 (11,5%)
VEGF citoplasmático	56	21	71	60	131 (63%)
PDGF-C tumoral	30	18	80	80	160 (77%)
PDGF-C nuclear	120	62	24	2	26 (12,5%)
PDGF-C citoplasmático	32	21	73	82	155 (74,5%)

Figura 6 – Imunoistoquímica dos marcadores HIF-1α, PDGF-C e VEGF. Amostras seriadas do caso 177 apresentando imunorreação positiva pelo HIF-1α (A1), PDGF-C (A2) e VEGF (A3) e o caso 206 com imunorreatividade negativa para os 3 marcadores (B1, B2, B3). Detalhes das marcações são apresentados em magnificação de 600X.

4.2.2 Correlação entre a imunorreatividade tumoral dos marcadores HIF-1 α , PDGF-C e VEGF

A expressão positiva da imunorreatividade da célula tumoral pelo HIF-1 α teve correlação com a imunorreatividade tumoral marcada pelo PDGF-C ($r=0,32$, $p<0,001$). Também houve correlação entre a positividade da imunorreatividade tumoral pelos marcadores HIF-1 α e VEGF ($r=0,33$, $p<0,001$). (Figura 7) (Figura 8).

Figura 7- Gráfico da distribuição do número de casos com expressão positiva e negativa nas células tumorais pelos marcadores HIF-1 α , VEGF e PDGF-C

Figura 8 - Amostra seriada do caso 158 com expressão positiva nas células tumorais e endoteliais pelo HIF-1 α , VEGF e PDGF-C (magnificação de 200 e 600 X)

4.2.3 Resultados da densidade microvascular (DMV)

As DMVs medianas de acordo com a marcação das células endoteliais pelo VEGF, PDGF-C, CD34 e CD105 foram respectivamente, 5, 16, 20 e 6 ($p < 0,0001$) (Figura 9).

Figura 9 - DMV baseada na positividade da marcação das células endoteliais pelo CD34, PDGF-C, VEGF e CD105

A mediana da DMV pelo PDGF-C foi semelhante à mediana do CD34, sendo que a diferença não foi significativa ($p>0,05$).

O resultado da comparação entre as diferenças das medianas das DMVs do VEGF comparadas com as do PDGF-C e do CD34 foi significativo ($p<0,05$). Também foram significativas as diferenças entre as medianas das DMVs do CD105 comparadas com as do PDGF-C e do CD34 ($p<0,05$). Não houve diferença significativa entre as medianas das DMVs do CD105 e do VEGF.

Por sua vez, o estudo da correlação entre as DMVs do CD105 e do VEGF foi significativo ($r=0,15$, $p=0,031$). Houve também uma correlação entre a DMV do PDGF-C comparada com a do CD34 ($r=0,42$, $p<0,001$) e com a do CD105 ($r=0,31$, $p<0,001$).

A marcação do núcleo das células endoteliais pelo KI-67 foi positiva em 56% dos casos.

A figura 10 mostra a expressão imunoistoquímica na célula endotelial pelo CD34, PDGFC, VEGF e CD105. A figura 11 mostra a expressão imunoistoquímica do KI-67 no núcleo das células endoteliais.

Figura 10 - Amostra seriada do caso 200 apresentando marcações positivas nas paredes dos vasos pelos marcadores CD34 **(A)**, PDGF-C **(B)**, VEGF **(C)** e CD105 **(D)**.

Figura 11. Marcação nuclear das células endoteliais pelo Ki-67

4.2.4 Correlação entre HIF-1 α e a DMV

Os casos de GBM com imunorreatividade tumoral positiva para HIF-1 α apresentaram uma alta DMV determinada pelo CD34 com mediana de 30, enquanto que os casos com imunorreatividade negativa tiveram uma DMV mediana de 14 ($p<0,001$). (Figura 12).

Figura 12 - DMV baseada na positividade da marcação das células endoteliais pelo CD34 nos casos de GBM com imunorreatividade negativa e positiva pelo HIF-1 α

A imunorreatividade tumoral pelo HIF-1 α apresentou correlação com a DMV determinada pelo VEGF ($r=0,19$, $p=0,005$). Não foi observada correlação entre a imunorreatividade tumoral pelo HIF-1 α e a DMV determinada pelo PDGF-C ($r=0,06$, $p=0,3$).

A figura 13 apresenta uma amostra seriada de um caso de GBM com imunorreatividade positiva nas células tumorais pelo HIF-1 α com maior DMV pelo CD34 em relação ao VEGF. Outra amostra seriada é apresentada com imunorreatividade tumoral negativa pelo HIF-1 α com menor DMV pelo CD34 e negativa pelo VEGF.

Figura 13 - Amostra seriada do caso 194 com expressão positiva pelo HIF-1 α (A1), CD34 (A2) e VEGF (A3). Observa-se uma maior densidade microvascular pelo CD34 em relação ao VEGF. Amostra seriada do caso 203 com marcação negativa pelo HIF-1 α (B1), com menor DMV pelo CD34 (B2) e DMV negativa pelo VEGF (B3).

4.2.5 Correlação entre a imunorreatividade nas células tumorais e endoteliais pelo PDGF-C e VEGF

Existiu uma correlação entre a DMV determinada pelo PDGF-C e pelo VEGF ($r=0,29$, $p<0,001$). (Figura 14).

Figura 14 – Gráfico representando o teste de correlação de Spearman entre a DMV do VEGF e do PDGF-C

Houve também uma correlação entre a imunorreatividade da célula tumoral marcada pelo PDGF-C e pelo VEGF ($r=0,21$, $p=0,001$). (Figura 15).

Figura 15 - Gráfico mostrando a distribuição dos casos com imunorreatividade positiva e negativa nas células tumorais para os marcadores VEGF e PDGF-C

Observou-se uma correlação entre a imunorreatividade tumoral e a DMV pelo VEGF ($r=0,39$, $p<0,001$). (Figura 16). Não houve correlação entre a imunorreatividade tumoral e a DMV pelo PDGF-C ($r=0,08$, $p=0,2$).

Figura 16 – Amostra do TMA do caso 173 apresentando positividade nas células tumorais e endoteliais pelo VEGF (**A**). Caso 201 com marcação negativa das células tumorais e endoteliais pelo VEGF (**B**)

4.3 Análise da sobrevida

A comparação das curvas de sobrevida dos casos com imunorreatividade nuclear positiva e negativa pelo VEGF, mostrou uma diferença significativa ($p=0,002$) com pior sobrevida no grupo com expressão nuclear positiva. (Figura 17 A). A comparação das sobrevidas nos casos com expressão nuclear negativa do HIF-1 α e do VEGF em relação aos casos onde a expressão nuclear de ambos foi positiva, mostrou uma diferença significativa ($p=0,005$) com pior sobrevida no grupo com expressão nuclear positiva. (Figura 17 B).

Figura 17 - Curvas de sobrevida comparando os casos de GBM com imunorreatividade nuclear positiva e negativa pelo VEGF (A). Casos de GBM com imunorreatividade nuclear positiva e negativa para os marcadores HIF-1 α e VEGF (B).

4.4 Regressão de Cox

O modelo de regressão de Cox foi construído com as principais variáveis consideradas pela literatura com importância prognóstica no GBM como o grau de ressecção cirúrgica, KPS e KI-67, acrescido do VEGF nuclear que neste estudo apresentou impacto na sobrevida. Nesta casuística, a idade não foi uma variável significativa. A regressão de Cox mostrou que as variáveis apresentaram impacto na sobrevida de forma independente. (Tabela 6).

Tabela 6 - Análise de regressão de Cox

VARIÁVEL	CATEGORIA	p	H.R.	I.C.	
				inferior	superior
GRAU DE RESSECÇÃO CIRÚRGICA	total	<0,001	-	-	-
	parcial	0,014	1,503	1,087	2,078
	biópsia	<0,001	3,928	2,246	6,6868
KI-67	negativo		-	-	-
	positivo	0,038	1,369	1,017	1,842
VEGF nuclear	negativo		-	-	-
	positivo	0,028	1,663	1,057	2,695
KPS*	-	0,002	0,987	0,978	0,995

* Variável quantitativa

I.C.: Intervalo de confiança

H.R.: "Hazard Ratio"

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

5.1 Dados demográficos da amostra de GBM

O GBM é o tumor mais frequente, agressivo e letal do SNC. O profundo conhecimento clínico e molecular de cada paciente portador de GBM será fundamental para o direcionamento de terapias alvo específicas no futuro, pois apesar dos grandes avanços tecnológicos e do conhecimento desses tumores nas últimas décadas, pouco foi efetivamente capaz de transformar a triste realidade dos portadores dessa doença.

Neste estudo, foram analisados 208 casos de GBM considerados primários, embora seja possível que algum caso de GBM secundário tenha sido incluído pela ausência de dados clínicos suficientes para esclarecer essa condição. Ocorrência similar foi descrita durante a caracterização do genoma do GBM e suas principais vias moleculares (Cancer Genome Atlas Research Network, 2008).

Com relação aos dados demográficos, a distribuição do gênero, idade, índice de Karnofsky e localização do tumor são semelhantes àqueles encontrados na literatura (Mineo et al., 2007; Li et al., 2009; Krex et al., 2007; Filippini et al., 2008). Quanto ao grau de ressecção cirúrgica, a literatura apresenta dados mais variados. Filippini et al., (2008) apresentaram 676 casos de GBM cujo grau de ressecção cirúrgica foi de 12% para biópsia exclusiva, ressecção total 7% , ressecção parcial 17% e

ressecção indefinida 62%. Já Bauchet et al., (2004) realizaram uma auditoria requisitada pelo governo da França nos GBMs registrados no Registro Francês de Tumores Cerebrais durante o ano de 2004 e encontraram 47% de biópsias, 30% de ressecções totais e 23% de ressecções parciais. No presente estudo foram encontrados 10% de biópsias, 34% de ressecções totais e 56% de ressecções parciais, o que se aproxima de outro dado francês publicado por Mineo et al., (2007) com 6% de biópsias, 42% de ressecções totais e 52% de ressecções parciais, e também com os dados publicados por Gorlia et al., (2008) com 16% de biópsias, 44% de ressecções totais e 39% de ressecções parciais. Esses resultados discrepantes podem ser explicados observando-se que o Registro Francês considerou dados de instituições de diversas linhas de trabalho e portanto, refletiu a epidemiologia do tratamento em todo o país. Já os dados de Mineo e Gorlia refletem a conduta em centros especializados onde as biópsias são indicadas apenas em casos especiais (KPS baixo, recusa do paciente em operar, tumor em área eloquente) como ocorreu nesta casuística.

Quanto aos tratamentos complementares, 63% dos pacientes estudados foram submetidos à radioterapia e 22% à quimioterapia. Atualmente, o tratamento considerado padrão para o GBM é a ressecção cirúrgica mais ampla e segura possível, seguida por tratamento complementar concomitante com radioterapia e quimioterapia com temozolamida, e mais seis meses de quimioterapia com temozolamida (Stupp et al., 2005). Entretanto, esse padrão não se aplica aos pacientes

idosos onde a recomendação é de cirurgia seguida de radioterapia (National Cancer Institute, 2010). Mineo et al., (2007) reportaram a realização de radioterapia em 73% e de quimioterapia em 62% dos casos, sendo que no período de 2000 a 2003, 24% dos pacientes receberam quimioterapia com temozolamida por pelo menos três meses.

Na casuística do presente estudo, julgou-se aceitável a proporção de pacientes que realizaram radioterapia, sobretudo se considerarmos o difícil e demorado acesso a esse tratamento no país, e também devido ao impedimento de tratamento para os pacientes com rápida progressão da doença e falta de condições clínicas. No entanto, o número de pacientes submetidos à quimioterapia é muito inferior aos relatados na literatura atual. Isso se deve, provavelmente, ao fato de os pacientes desta casuística serem originários de dois serviços públicos onde apenas recentemente, existe acesso a temozolamida. Quanto às outras modalidades de quimioterapia, embora disponíveis, foram pouco utilizadas devido provavelmente às dificuldades de administração das drogas e de sua maior toxicidade.

A mediana de sobrevida global da casuística deste estudo de sete meses incluiu desde os pacientes submetidos apenas à biópsia sem nenhum tipo de tratamento complementar até aqueles mais jovens submetidos a cirurgias com ressecções tumorais amplas seguidas de radioterapia e quimioterapia. Dresemann, (2010) relata que na era pré temozolamida a sobrevida mediana no GBM estava entre 9 e 12 meses.

5.2 A expressão do HIF-1 α nas células tumorais

No presente estudo foram encontrados 184 casos (88,5%) com imunorreatividade positiva para o HIF-1 α , em concordância com Sondergaard et al., (2002) e Korkolopoulou et al., (2007) que relataram 77% e 91%, respectivamente. Em 162 casos (77,8%) observou-se marcação tanto nuclear como citoplasmática. Em gliomas de alto grau e no câncer de cabeça e pescoço, a expressão do HIF-1 α também foi encontrada em ambos, núcleo e citoplasma (Giannopoulou et al., 2006; Koukourakis et al., 2008). Zagzag et al., (2000) demonstraram que o HIF-1 α é expresso em tumores cerebrais humanos, sendo que o GBM apresentou uma expressão significativamente maior quando comparado aos astrocitomas de baixo grau. Os oligodendrogliomas, ependimomas, meningiomas, tumores hipofisários e hemangioblastomas também estão entre os tumores do SNC relatados com elevada expressão do HIF-1 α . (Zagzag et al., 2000; Birner et al., 2001; Vidal et al., 2003; Preusser et al., 2005., Kim et al., 2005; Kaynar et al., 2008).

A expressão do HIF-1 α pode ser estimulada pela hipóxia ou dirigida por vias oncogênicas. No GBM, a expressão do HIF-1 α localiza-se nas células em pseudopaliçada ao redor de áreas necróticas e nas células tumorais infiltradas no tecido cerebral ao redor do tumor, sugerindo sua modulação e expressão em condições de baixa tensão de oxigênio (Sondergaard et al., 2002; Rong et al., 2006). Neste estudo, a seleção das áreas tumorais foi feita nas regiões de maior densidade celular, não se

privilegiando particularmente as células em paliçada de áreas perinecroticas, as quais, eventualmente, em alguns casos, podem ter sido incluídas. O HIF-1 α foi altamente expresso em todas as células neoplásicas independentemente da sua localização.

Em tumores sólidos, como no GBM, a hipóxia e a necrose promovem um fenótipo de maior malignidade e as células hipóxicas são mais resistentes aos tratamentos radioterápicos e quimioterápicos. Dessa forma, a angiogênese induzida pela hipóxia é um dos mais importantes fatores biológicos na sobrevivência da célula tumoral, sendo considerada na atualidade um importante alvo terapêutico (Zagzag et al., 2000; Kaynar et al., 2008).

5.3 A expressão do VEGF nas células tumorais

A imunorreatividade do VEGF foi predominantemente, citoplasmática em 63% dos casos. Em 24 casos (11,5%) foram detectados também imunorreatividade nuclear para o VEGF. No câncer o VEGF é classicamente descrito com marcação tumoral citoplasmática (Takano et al., 1996; Decaussin et al., 1999; Jebreel et al., 2007). No entanto, a observação da imunorreatividade nuclear também é possível (Lejbkiewicz et al., 2005). Altos níveis de expressão imunoistoquímica do VEGF têm sido demonstrados em GBMs (Nishikawa et al., 1998; Li et al., 2001; Johansson et al., 2002; Korkolopoulou et al., 2007), reforçando os resultados deste estudo.

O VEGF nuclear é um conceito que poderá ajudar no entendimento de outras funções apresentadas por essa molécula, incluindo a regulação de sua própria expressão. Lejbkowitz et al., (2005) demonstraram pela primeira vez que uma fração da proteína VEGF está localizada no núcleo sob condições de hipóxia, e que HuR, o maior regulador da estabilidade do VEGF, colocaliza-se com VEGF no núcleo, sugerindo um papel adicional para HuR no tráfego núcleo citoplasmático ou talvez na translação nuclear. Em estudo com linhagens celulares, uma isoforma longa do VEGF denominada L-VEGF foi encontrada no núcleo das células que expressavam VEGF (Rosenbaum-Dekel et al., 2005). Em outro estudo com cultura de células endoteliais, sugere-se que a presença de VEGF no núcleo pode estar envolvida na modulação dos níveis de proteínas da coagulação e vias da fibrinólise, podendo afetar a fisiologia vascular endotelial através de vias que são independentes das suas propriedades angiogênicas e de permeabilidade (Li e Keller, 2000).

5.4 A expressão do PDGF-C nas células tumorais

O PDGF-C é um dos membros da família PDGF com função biológica ainda pouco explorada, sobretudo no GBM. Na casuística deste estudo, foi observada uma imunorreatividade positiva do PDGF-C em 77% dos casos, predominando a marcação citoplasmática e no estroma, embora esta última não tenha sido objeto de quantificação. A expressão do PDGF-C em amostras de GBM foi identificada em 85% das 27 amostras

analisadas por di Tomaso et al., em 2009, que não encontraram marcação nas células do tecido cerebral normal. A patogênese dos astrocitomas tem sido correlacionada com as vias mitogênicas dependentes do PDGF, sendo que tanto o PDGF-A como o PDGF-B são descritos como expressos nesse tumor (Li et al., 2001). Em linhagens celulares de gliomas, o RNA mensageiro do PDGF-C tem sido encontrado e está relacionado à capacidade de induzir a diferenciação dos astrócitos (Li et al., 2000; Lokker et al., 2002). O PDGF-C também está relacionado à indução indireta da angiogênese via hiperregulação do VEGF e, diretamente, via ativação do PDGFR α e PDGFR $\alpha\beta$, que são receptores expressos em astrocitomas e nas células endoteliais gliais (Cao et al., 2002). Dessa forma, o PDGF-C tem um papel importante na angiogênese e na progressão de tumores cerebrais.

5.5 A correlação da expressão imunoistoquímica nas células tumorais entre HIF-1 α e VEGF

Este estudo demonstrou uma correlação entre a imunorreatividade tumoral do HIF-1 α e do VEGF ($p < 0,001$). Resultados semelhantes também foram demonstrados em vários tipos de câncer, além dos gliomas onde a hiperregulação da expressão do HIF-1 α e do VEGF estão correlacionados com a progressão de um tumor de baixo grau para um tumor de alto grau (Pietsch et al., 1997; Zhong et al., 1999; Zagzag et al., 2000; Korkolopoulou et al., 2004). Outro estudo em linhagem celular de

glioma demonstrou que a expressão do HIF-1 α e do VEGF aumentava sob hipóxia, e que a inibição do HIF-1 α resultou em inibição do VEGF (Jensen et al., 2006). Portanto, a expressão do HIF-1 α modula o VEGF o que pode implicar no crescimento e progressão dos astrocitomas.

5.6 A correlação da expressão imunoistoquímica nas células tumorais entre HIF-1 α e PDGF-C

No presente estudo foi encontrada uma correlação entre a imunorreatividade tumoral do HIF-1 α e do PDGF-C ($p < 0,001$). Anormalidades do sistema PDGF/PDGFR são descritas, tais como, a ativação constitutiva e mutações dos PDGFR quinases e a sinalização autócrina devida à superexpressão dos PDGFs e dos PDGFRs que contribuem especialmente com doenças malignas incluindo osteossarcomas, câncer de pulmão, gliomas e meduloblastomas (Antoniades et al., 1992; Andrae et al., 2002; Shi e Holland 2006). A transformação oncogênica mediada pela sinalização autócrina do PDGF ocorre através da ativação das vias RAS/MAPK que promovem o aumento da proliferação celular e da ativação da via PI3K/Akt promovendo a sobrevivência celular (Wang et al., 1999; Li et al., 2003). Pesquisa com linhagens celulares de GBM detectou o RNA mensageiro do PDGF-C, sendo que pouca ou nenhuma expressão foi detectada em tecidos cerebrais normais (Lokker et al., 2002). Outro estudo em linhagem celular de GBM demonstrou que o HIF-1 α hiperregula a

expressão do PDGF-B (Yoshida et al., 2006) que é conhecido como um dos mais potentes fatores de estimulação na patogênese da neovascularização. Resultado semelhante ainda não havia sido demonstrado entre o HIF-1 α e o PDGF-C. O resultado deste estudo demonstrou que o HIF-1 α teve correlação com o PDGF-C.

5.7 A expressão do HIF-1 α e a DMV

Os resultados deste estudo sugerem a associação do HIF-1 α com a angiogênese dos GBMs, sendo que nos casos com marcação tumoral positiva para o HIF-1 α a mediana da DMV pelo CD34 foi 30, enquanto que nos casos HIF-1 α negativos a mediana foi 14 ($p < 0,001$). A alta expressão do HIF-1 α é descrita em GBM e está positivamente correlacionada com a vascularidade do tumor (Assimakopoulou et al., 1997). Estudo que envolveu a DMV marcada pelo CD34 entre astrocitomas de alto grau, demonstrou um maior grau de angiogênese no GBM quando comparado ao astrocitoma anaplásico, sendo também encontrada uma maior frequência de vasos com padrão glomerulóide indicando uma inadequada neoformação vascular. Os astrocitomas, especialmente os tumores de alto grau, estão associados a um grande potencial angiogênico e de agressividade, e a DMV tem sido descrita como fator preditor de crescimento e de alto risco para transformação maligna (Sharma et al., 2006).

5.8 A imunorreatividade nas células endoteliais pelo VEGF, PDGF-C, CD34 e CD105

Neste estudo, a DMV foi determinada pela contagem dos vasos marcados pelo CD34, PDGF-C, VEGF e CD105, sendo que as medianas das DMVs foram 20, 16, 5, e 6, respectivamente. A correlação positiva entre as DMVs do PDGF-C, CD34 e CD105 demonstrou que o PDGF-C foi expresso tanto nas células endoteliais maduras como nas imaturas. Por outro lado, a DMV do VEGF se correlacionou somente com a do CD105 indicando que as células endoteliais marcadas pelo VEGF eram preferencialmente, imaturas. Esses achados sugerem que as vias angiogênicas induzidas pelo PDGF-C e pelo VEGF podem ser, em parte, independentes. O PDGF-C tem papel na proliferação de células de origem mesenquimal como fibroblastos e células musculares lisas, e também no recrutamento de macrófagos. Assim, o PDGF-C atuaria como elemento de suporte para a ação do VEGF modificando o microambiente perivascular, preparando-o para o surgimento de novos vasos (Pietras et al., 2008; Roskoski et al., 2007). Os achados deste estudo associados à marcação nuclear das células endoteliais pelo KI-67 sugerem um padrão proliferativo neoangiogênico.

Em 2010, Wang et al. e Ricci-Vitiani et al., demonstraram que uma subpopulação de células endoteliais em GBMs, apresentam as mesmas mutações identificadas nas células tronco tumorais, como por exemplo, a amplificação do EGFR e do cromossomo 7. Essa habilidade das células

tronco tumorais em contribuir diretamente com a vasculogênese tumoral, por diferenciação endotelial, representa um novo mecanismo de angiogênese independente das vias clássicas do HIF-1 α /VEGF/PDGF.

5.9 A expressão tumoral do HIF-1 α correlacionada com a DMV medida pelo VEGF

A expressão do HIF-1 α teve correlação com a DMV determinada pelo VEGF ($p=0,005$). Resultados semelhantes foram descritos na literatura demonstrando o alto poder angiogênico da via HIF/VEGF em gliomas cerebrais (Korkolopoulou et al., 2004, 2007). O VEGF é considerado o maior fator pró-angiogênico e de permeabilidade. Uma consequência direta da angiogênese induzida via VEGF é o aumento da pressão do fluido intersticial, sendo este um fator crítico para o aumento do edema cerebral em neoplasias do SNC (Jain et al., 2007). O VEGF pode ser produzido pelas células tumorais, macrófagos e na parede dos vasos por células da musculatura lisa, ativando as células endoteliais através de uma via parácrina. A neovascularização nos gliomas é dirigida principalmente através da sinalização do receptor VEGFR-2, sendo este o principal mediador de vários efeitos fisiológicos e patológicos do VEGF nas células endoteliais, incluindo a sobrevivência, proliferação, migração e permeabilidade (Shibuya, 2009).

5.10 A relação entre as expressões do VEGF e PDGF-C na célula tumoral e na célula endotelial

Este estudo demonstrou um importante padrão angiogênico do PDGF-C, cuja DMV mediana foi 16, enquanto que a DMV mediana do VEGF foi 5. Houve correlação estatística entre VEGF e PDGF-C tanto no tumor ($p=0,001$) como no vaso ($p<0,001$).

A expressão do VEGF nas células endoteliais nos gliomas está relacionada à expressão do PDGF e de seus receptores. O PDGF pode apresentar um efeito direto nas células endoteliais levando à angiogênese, primeiro pela indução da expressão do VEGF por uma estimulação autócrina através dos receptores VEGF, segundo através de um estímulo direto para a proliferação das células endoteliais (Li et al., 2003; Shih e Holland 2006; Andrae et al., 2008). Em linhagens celulares de tumores foi demonstrada a hiperexpressão do PDGF e PDGFR. Além disso, o aumento de suas expressões foram correlacionadas com o aumento do grau de malignidade do tumor (Li et al., 2003).

A expressão autócrina do PDGF induz à autofosforilação do PDGFR, o qual cria sítios de interação física. Essas interações promovem a ativação de vias de sinalização intracelulares que são fundamentais para o processo oncogênico, incluindo a proliferação celular e a sobrevivência. Alterações genéticas comuns em GBMs incluem as mutações do PTEN que influenciam na sinalização do PDGFR através das vias de sinalização PIK3/MAPK (Lokker et al., 2002). O PDGF-C apresenta uma potente

atividade angiogênica que está ligada aos seus efeitos nas células progenitoras endoteliais, células medulares e vasculares maduras, promovendo seu recrutamento, proliferação, diferenciação e migração, além de efeitos no estroma pelo recrutamento, proliferação e migração de fibroblastos, e também com ação nos macrófagos (Li et al., 2010). Lokker et al., (2002) demonstraram um potencial papel autócrino da sinalização do PDGF-C nos gliomas. Estudo com linhagem celular de glioblastoma, utilizando terapia anti-VEGF demonstrou uma alta expressão do PDGF-C com alteração na morfologia e na permeabilidade dos vasos, proporcionando uma maior estabilidade e menor sensibilidade à inibição com anti-VEGFR2 (di Tomaso et al., 2009). Outro estudo recente envolvendo fibroblasto associado a tumor (TAF) concluiu que TAFs produzem PDGF-C para direcionar o processo de migração e angiogênese da célula endotelial, independente do VEGF (Crawford et al., 2009).

5.11 A correlação da expressão do VEGF nas células tumorais e nas células endoteliais

Houve uma correlação entre a imunorreatividade tumoral e vascular do VEGF ($p < 0,001$), em concordância com publicações anteriores (Jang et al., 2008; Ido et al., 2008). Os níveis intra-tumorais do VEGF e de seus receptores se correlacionam com o grau tumoral dos gliomas. A indução da angiogênese pelo VEGF leva ao surgimento de vasos imaturos e com

alterações funcionais e da permeabilidade com conseqüente edema cerebral vasogênico (Jain et al., 2007). Dessa forma, o VEGF e seus receptores são alvos moleculares na terapia anti-angiogênica do GBM.

5.12 A expressão do HIF-1 α e do VEGF correlacionada ao prognóstico

Neste estudo, os casos VEGF com imunorreatividade positiva no núcleo das células tumorais apresentaram pior sobrevida. Também tiveram impacto negativo na sobrevida, os casos com imunorreatividade nuclear positiva para o HIF-1 α e o VEGF. O modelo de regressão de Cox confirmou a independência do VEGF nuclear.

A literatura relata que em gliomas as expressões do HIF-1 α e do VEGF refletem um pior prognóstico, o que está de acordo com os resultados deste estudo (Varlet et al., 2000; Vordermark et al, 2002; Nam et al., 2004; Preusser et al., 2005; Korkolopoulo et al., 2007).

Os mecanismos pelos quais o HIF-1 α e o VEGF atuam como fatores prognósticos negativos ainda não estão completamente esclarecidos. Irie et al., (2004) atribuem à elevada expressão do HIF-1 α ao mau prognóstico e a resistência ao tratamento com radioterapia. A elevada expressão do HIF-1 α e do VEGF ativa fatores metabólicos e moleculares que atuam favorecendo a sobrevivência tumoral. Portanto, o pior prognóstico pode ser explicado pela intensa neovascularização.

Em relação ao pior prognóstico, nos casos com imunorreatividade nuclear do VEGF, os mecanismos são desconhecidos. A presença do VEGF no núcleo fere o paradigma bem estabelecido onde o VEGF, após sua produção citoplasmática, é secretado pela célula hipóxica para atuar por mecanismo parácrino estimulando a angiogênese. Não se sabe se o VEGF encontrado no núcleo é produzido por translação nuclear, ou se é transportado do citoplasma (Lejbkowitz et al., 2005).

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- O GBM apresentou elevada imunorreatividade tumoral pelos marcadores HIF-1 α , VEGF e PDGF-C.
- Os tumores HIF-1 α positivos apresentaram maior densidade microvascular.
- A expressão do HIF-1 α correlacionou-se positivamente com a expressão tumoral do PDGF-C e do VEGF.
- Houve associação entre as expressões na célula tumoral e na célula endotelial do PDGF-C e do VEGF. O PDGF-C marcou um maior número de vasos do que o VEGF.
- Houve associação entre as expressões tumorais e vasculares do VEGF.
- A marcação das células endoteliais pelo CD105 e de seus núcleos pelo KI-67 confirmou o padrão neoangiogênico e proliferativo das células endoteliais marcadas pelo PDGF-C e VEGF.
- Os casos VEGF com imunorreatividade nuclear positiva apresentaram impacto prognóstico negativo.

7 ANEXOS

Anexo A – Resultados imunoistoquímicos

Marcação Imunoistoquímica

positiva = 1
negativa = 0

KI-67

positivo = 1
negativo = 0

Nº CASO	HIF TUMORAL	HIF NUCLEO	HIF CITOPLASMA	VEGF TUMORAL	VEGF NUCLEO	VEGF CITOPLASMA	VEGF DMV	PDGFC TUMORAL	PDGFC NUCLEO	PDGFC CITOPLASMA	PDGFC DMV	CD34 DMV	CD105 DMV	KI67
1	1	1	1	0	0	0	4	0	0	0	5	10	4	1
2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	1
3	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	42	9	35	1
4	1	1	1	1	0	1	4	1	0	1	10	22	0	1
5	1	1	1	1	0	1	6	1	0	1	17	7	3	1
6	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	21	16	10	1
7	1	1	1	1	0	1	5	1	0	1	17	16	5	1
8	1	1	1	1	0	1	3	1	0	1	19	27	6	1
9	1	1	1	1	0	1	6	1	0	1	20	17	9	1
10	1	1	1	0	0	0	17	0	0	0	38	31	5	1
11	1	1	1	1	0	1	11	1	0	1	25	54	27	1
12	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	5	7	0	1
13	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	5	39	9	1
14	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	20	9	8	1
15	1	1	1	1	0	1	8	1	0	1	92	14	8	1
16	1	1	1	0	0	0	3	1	0	1	14	25	8	1
17	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	4	29	2	1
18	1	1	1	1	0	1	6	1	0	1	15	16	3	0
19	1	1	1	1	0	1	6	1	0	1	58	40	4	1

N° CASO	HIF TUMORAL	HIF NUCLEO	HIF CITOPLASMA	VEGF TUMORAL	VEGF NUCLEO	VEGF CITOPLASMA	VEGF DMV	PDGFC TUMORAL	PDGFC NUCLEO	PDGFC CITOPLASMA	PDGFC DMV	CD34 DMV	CD105 DMV	Ki67
20	1	1	1	0	0	0	11	0	0	0	42	33	2	1
21	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	20	0	2	0
22	1	1	1	1	0	1	3	1	0	1	47	53	2	1
23	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	23	32	18	0
24	1	1	1	1	1	0	11	1	0	1	45	28	1	0
25	1	1	1	1	0	1	3	1	0	1	38	30	0	1
26	1	1	1	1	0	1	5	1	1	0	5	15	1	1
27	1	1	1	1	0	1	8	1	0	1	20	21	0	1
28	1	1	1	1	0	1	8	1	0	1	21	21	12	1
29	1	1	1	1	0	1	2	1	0	1	7	6	2	0
30	1	1	1	1	0	1	4	1	0	1	7	25	4	0
31	1	1	1	1	0	1	19	1	0	1	41	38	1	1
32	1	1	1	1	0	1	19	0	0	0	43	50	0	1
33	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	3	1
34	1	1	1	1	0	1	6	1	0	1	10	23	0	0
35	1	1	1	1	0	1	9	1	0	1	15	10	5	1
36	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	5	8	3	1
37	1	1	1	0	0	0	2	1	0	1	14	27	0	1
38	1	1	1	1	0	1	2	1	0	1	33	35	14	1
39	1	1	1	1	0	1	3	1	0	1	2	5	3	1
40	1	1	1	1	0	1	2	1	0	1	18	11	10	1
41	1	1	1	1	0	1	11	0	0	0	15	22	1	0
42	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	7	14	3	0
43	1	1	1	0	0	0	10	0	0	0	32	48	39	1
44	1	1	1	0	0	0	4	0	0	0	19	43	17	1
45	1	1	1	1	0	1	5	0	0	0	6	7	4	0
46	1	1	1	1	0	1	5	1	1	1	3	7	3	0
47	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	44	33	7	1
48	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	18	6	4	1
49	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	13	17	8	0

N° CASO	HIF TUMORAL	HIF NUCLEO	HIF CITOPLASMA	VEGF TUMORAL	VEGF NUCLEO	VEGF CITOPLASMA	VEGF DMV	PDGFC TUMORAL	PDGFC NUCLEO	PDGFC CITOPLASMA	PDGFC DMV	CD34 DMV	CD105 DMV	Ki67
50	1	1	1	0	0	0	5	0	0	0	7	5	0	0
51	1	1	1	0	0	0	7	1	0	1	36	74	0	1
52	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	28	39	6	0
53	1	1	1	0	0	0	9	1	0	1	22	30	15	1
54	1	1	1	1	0	1	3	1	0	1	6	7	0	1
55	1	1	1	0	0	0	4	0	0	0	28	31	0	1
56	1	1	1	1	0	1	3	1	0	1	15	20	0	1
57	1	1	1	0	0	0	3	1	1	0	7	21	2	1
58	1	1	1	1	0	1	6	1	0	1	16	22	20	1
59	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	23	95	0	0
60	1	1	1	1	0	1	10	1	0	1	41	45	1	1
61	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	22	31	3	1
62	1	1	1	0	0	0	12	1	0	1	53	80	19	1
63	1	1	1	1	0	1	4	1	0	1	9	10	7	0
64	1	1	1	1	0	1	3	1	1	1	9	17	4	1
65	1	1	1	1	1	1	5	1	0	1	7	8	2	1
66	1	1	1	1	0	1	8	1	0	1	53	68	10	1
67	1	1	1	0	0	0	39	1	0	1	63	104	14	1
68	1	1	1	1	0	1	2	0	0	0	32	31	19	0
69	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	21	20	0	0
70	1	1	1	0	0	0	7	0	0	0	29	30	0	0
71	1	1	1	1	0	1	10	1	0	1	20	36	25	0
72	1	1	1	0	0	0	7	1	0	1	33	59	5	1
73	0	0	0	0	0	0	5	1	0	1	12	10	10	1
74	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	9	13	2	0
75	1	1	1	0	0	1	3	1	0	1	25	56	18	0
76	0	0	0	0	0	0	9	1	0	1	15	5	8	0
77	1	1	1	1	0	1	4	1	0	1	3	14	1	0
78	1	1	1	1	0	1	5	1	0	1	14	6	13	1
79	0	0	0	0	0	0	3	1	0	1	102	110	7	0

N° CASO	HIF TUMORAL	HIF NUCLEO	HIF CITOPLASMA	VEGF TUMORAL	VEGF NUCLEO	VEGF CITOPLASMA	VEGF DMV	PDGFC TUMORAL	PDGFC NUCLEO	PDGFC CITOPLASMA	PDGFC DMV	CD34 DMV	CD105 DMV	Ki67
80	1	1	1	1	0	1	12	1	0	1	10	25	0	0
81	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	11	20	34	1
82	1	1	1	1	0	1	6	0	0	0	13	60	0	1
83	1	1	1	0	0	0	5	1	0	1	22	120	6	0
84	1	0	1	1	0	1	16	1	0	1	10	11	9	0
85	1	0	1	1	0	1	16	1	0	1	109	37	37	1
86	0	0	0	0	0	0	67	1	0	1	59	14	10	1
87	1	1	1	0	0	0	14	0	0	0	12	7	5	0
88	1	1	1	1	0	1	24	1	0	1	22	32	13	0
89	1	1	1	1	0	1	5	1	1	1	7	20	3	1
90	1	1	1	1	0	1	3	1	0	1	20	20	43	1
91	1	1	1	1	0	1	14	1	0	1	56	25	1	1
92	1	1	1	0	0	0	4	1	0	1	7	28	8	0
93	1	1	1	1	0	1	5	1	0	1	21	26	0	1
94	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	40	102	9	0
95	1	1	1	1	0	1	10	1	0	1	4	72	4	0
96	1	1	1	1	0	1	8	1	1	1	9	11	11	1
97	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	10	20	16	1
98	1	1	1	1	0	1	16	0	0	0	0	56	6	0
99	1	1	1	1	0	1	16	1	0	1	25	12	12	0
100	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	25	20	15	0
101	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	29	2	0
102	1	1	1	1	0	1	9	1	0	1	31	20	63	1
103	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	11	20	18	1
104	1	1	1	1	0	1	7	1	0	1	24	23	16	0
105	1	1	1	0	0	0	4	1	0	1	14	49	17	1
106	1	1	1	1	0	1	12	0	0	0	23	11	21	0
107	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	7	49	7	1
108	1	1	0	1	0	1	3	1	0	1	38	6	10	1
109	1	1	1	1	0	1	10	1	0	1	35	9	21	1

N° CASO	HIF TUMORAL	HIF NUCLEO	HIF CITOPLASMA	VEGF TUMORAL	VEGF NUCLEO	VEGF CITOPLASMA	VEGF DMV	PDGFC TUMORAL	PDGFC NUCLEO	PDGFC CITOPLASMA	PDGFC DMV	CD34 DMV	CD105 DMV	Ki67
110	1	1	1	1	0	1	5	1	0	1	7	47	13	1
111	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	20	0	1
112	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	36	20	62	0
113	1	1	0	0	0	0	6	1	1	1	74	8	5	0
114	1	1	1	1	0	1	6	1	1	1	74	14	18	1
115	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	49	76	8	0
116	1	1	1	0	0	0	5	1	0	1	7	28	1	0
117	1	1	1	1	0	1	5	1	1	1	7	28	6	1
118	1	1	1	1	0	1	10	1	0	1	43	28	20	0
119	1	1	1	0	0	0	16	1	0	1	103	20	1	1
120	1	1	1	1	0	1	33	1	1	0	26	54	83	0
121	1	1	1	0	0	0	6	1	0	1	51	7	34	0
122	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	16	10	10	1
123	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	52	12	1
124	1	1	1	0	0	0	2	1	0	1	6	20	15	0
125	0	0	0	1	0	1	24	1	0	1	6	7	3	0
126	1	1	1	1	1	1	4	1	0	1	7	5	3	0
127	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	22	16	5	0
128	0	0	0	1	1	1	17	1	0	1	21	13	12	0
129	1	1	1	1	1	1	3	0	0	0	7	3	2	0
130	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	10	4	1	1
131	1	1	0	1	0	1	14	1	1	1	7	31	4	1
132	1	1	1	1	1	1	10	1	0	1	12	29	5	0
133	1	1	0	1	1	1	13	1	0	1	19	14	7	0
134	0	0	0	1	1	0	10	0	0	0	24	20	0	0
135	1	1	1	1	1	1	5	0	0	0	7	8	4	0
136	1	1	1	1	0	1	4	1	0	1	29	18	5	0
137	1	1	1	1	0	1	4	1	0	1	4	11	5	1
138	1	1	1	1	0	1	16	1	1	1	15	14	6	0
139	1	1	1	1	1	1	4	1	0	1	21	13	3	1

N° CASO	HIF TUMORAL	HIF NUCLEO	HIF CITOPLASMA	VEGF TUMORAL	VEGF NUCLEO	VEGF CITOPLASMA	VEGF DMV	PDGFC TUMORAL	PDGFC NUCLEO	PDGFC CITOPLASMA	PDGFC DMV	CD34 DMV	CD105 DMV	Ki67
140	1	1	1	1	0	1	4	1	0	1	8	24	9	0
141	1	0	1	1	1	1	56	1	0	1	28	13	7	0
142	1	1	1	1	0	1	41	1	0	1	26	22	5	0
143	1	1	1	1	0	1	13	1	0	1	13	17	7	0
144	1	1	1	1	0	1	5	1	0	1	9	10	2	1
145	1	1	0	1	0	1	4	0	0	0	5	10	3	0
146	1	1	1	1	0	1	4	0	0	0	7	8	3	0
147	1	1	1	1	0	1	9	1	1	1	10	4	4	0
148	1	1	1	1	1	1	7	1	0	1	3	15	3	0
149	1	1	1	1	1	1	4	1	0	1	3	5	2	1
150	1	1	1	1	1	1	9	1	0	1	8	14	2	1
151	1	1	1	1	1	1	15	0	0	0	12	23	6	0
152	1	1	1	1	0	1	3	1	0	1	8	5	3	1
153	1	1	1	1	0	1	3	1	0	1	16	10	10	0
154	1	1	1	1	0	1	62	1	0	1	21	33	10	1
155	0	0	0	1	0	1	9	1	0	1	20	16	12	1
156	1	1	1	1	0	1	12	1	0	1	14	23	10	0
157	1	1	1	1	1	1	4	1	0	1	30	18	35	0
158	1	1	1	1	0	1	15	1	0	1	20	20	18	1
159	1	1	1	1	1	1	10	1	1	0	11	33	6	0
160	1	1	1	1	1	1	10	1	0	1	38	39	15	1
161	1	1	1	1	1	1	11	1	0	1	4	17	17	0
162	1	1	1	1	1	1	15	1	1	1	31	30	18	1
163	1	1	1	1	1	1	4	1	0	1	9	4	2	0
164	1	1	1	0	0	1	4	1	0	1	24	17	30	1
165	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
166	1	1	1	1	0	1	4	1	0	1	10	10	7	1
167	1	1	1	1	0	1	4	0	0	0	23	9	7	1
168	1	0	1	1	0	1	14	1	0	1	24	19	5	0
169	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	15	10	3	0

Nº CASO	HIF TUMORAL	HIF NUCLEO	HIF CITOPLASMA	VEGF TUMORAL	VEGF NUCLEO	VEGF CITOPLASMA	VEGF DMV	PDGFC TUMORAL	PDGFC NUCLEO	PDGFC CITOPLASMA	PDGFC DMV	CD34 DMV	CD105 DMV	K167
170	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	14	20	4	1
171	1	1	1	1	0	1	22	1	0	1	39	27	17	1
172	0	0	0	1	0	1	12	0	0	0	7	14	12	1
173	1	1	1	1	0	1	18	1	0	1	18	17	10	1
174	1	1	1	0	0	0	16	1	1	1	16	22	0	0
175	0	0	0	1	0	1	5	1	1	1	26	52	7	0
176	1	1	1	1	0	1	2	1	0	1	16	5	7	1
177	1	1	1	1	1	1	6	1	1	1	12	6	7	1
178	1	1	1	1	0	1	3	0	0	0	10	6	7	1
179	0	0	0	1	0	1	12	0	0	0	15	13	2	0
180	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	5	4	7	0
181	1	1	1	1	0	1	25	1	0	1	27	13	10	0
182	0	0	0	1	0	1	24	0	0	0	36	27	14	1
183	1	1	1	1	0	1	11	1	0	1	19	14	5	1
184	1	1	1	1	1	1	14	1	1	1	25	18	3	1
185	1	1	1	1	0	1	16	1	0	1	22	33	7	1
186	1	1	1	1	0	1	18	1	0	1	45	25	9	0
187	0	0	0	1	0	1	2	1	0	1	20	10	4	1
188	0	0	0	0	0	0	13	1	0	1	20	29	4	0
189	0	0	0	1	0	1	4	1	1	1	4	11	0	1
190	1	0	1	1	0	1	6	1	0	1	4	12	10	1
191	1	0	1	1	0	1	6	1	0	1	24	25	6	1
192	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	13	16	7	0
193	1	1	1	0	0	0	9	1	0	1	15	20	11	1
194	1	1	1	1	0	1	9	1	0	1	17	30	20	1
195	1	1	1	1	0	1	5	1	0	1	13	13	4	0
196	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	4	3	1
197	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	20	34	3	1
198	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	6	20	2	0
199	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	14	32	13	1

Nº CASO	HIF TUMORAL	HIF NUCLEO	HIF CITOPLASMA	VEGF TUMORAL	VEGF NUCLEO	VEGF CITOPLASMA	VEGF DMV	PDGFC TUMORAL	PDGFC NUCLEO	PDGFC CITOPLASMA	PDGFC DMV	CD34 DMV	CD105 DMV	Ki67
200	1	1	1	0	0	0	5	1	0	1	32	30	12	1
201	1	1	1	0	0	0	2	0	0	0	33	50	15	1
202	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	8	6	6	1
203	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14	8	12	1
204	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	32	22	5	0
205	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	21	11	9	0
206	1	0	1	0	0	0	9	0	0	0	24	22	2	1
207	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	22	32	0	1
208	1	1	1	0	0	0	4	1	0	1	30	32	12	0

Anexo B – Dados demográficos da casuística

Sexo

masculino = 1
feminino = 2

Grau de ressecção cirúrgica

total = 1
parcial = 2
biópsia = 3

Radioterapia (RT)

sim = 1
não = 2

Quimioterapia (QT)

sim = 1
não = 2

Nº CASO	IDADE	SEXO	GRAU RESSECÇÃO	KPS	RT	QT	SOBREVIDA (Meses)	CENSURA
1	66	1	1	60	1	1	7	1
2	55	2	1	80	1	2	11	1
3	55	1	1	80	1	1	22	1
4	41	2	1	100	1	1	73	0
5	56	2	1	70	2	2	3	1
6	45	1	1	90	1	1	10	1
7	58	1	1	60	1	1	9	1
8	51	1	1	90	2	2	6	1
9	49	2	2	60	1	1	14	1
10	35	1	2	40	2	2	5	1
11	28	1	2	50	1	2	11	1
12	44	1	2	70	1	1	32	1
13	53	2	2	80	1	2	9	1
14	63	2	1	80	1	2	12	1
15	40	1	1	90	1	2	11	1
16	64	2	2	60	2	2	1	0
17	64	1	2	80	2	2	5	1
18	60	1	2	80	2	2	13	1
19	46	1	2	100	1	1	64	0
20	35	1	2	40	2	2	1	1
21	61	1	1	70	1	1	3	1
22	49	1	2	50	2	2	4	1
23	52	2	1	90	1	1	24	1
24	59	2	1	70	2	2	10	1

Nº CASO	IDADE	SEXO	GRAU RESSECÇÃO	KPS	RT	QT	SOBREVIDA (Meses)	CENSURA
25	67	1	2	90	1	2	7	1
26	46	1	2	80	2	2	6	1
27	16	1	2	100	2	2	2	1
28	55	1	1	100	1	2	22	1
29	59	1	2	80	2	2	1	1
30	55	1	1	100	1	2	22	1
31	40	1	1	100	2	2	12	1
32	26	1	2	100	1	2	31	1
33	64	1	2	100	1	1	13	1
34	65	2	1	90	2	2	5	1
35	49	2	2	90	1	2	5	1
36	67	1	2	90	1	2	7	1
37	68	2	2	70	2	2	4	1
38	40	1	2	100	1	1	2	1
39	28	2	2	100	2	2	3	1
40	38	2	2	50	1	2	7	1
41	59	1	2	80	1	2	13	1
42	55	1	1	100	1	2	22	1
43	32	1	1	100	1	1	58	0
44	41	2	1	90	2	2	3	1
45	63	1	2	100	1	2	13	1
46	68	2	2	80	1	2	59	0
47	54	1	2	100	1	1	5	1
48	55	1	2	50	1	2	7	1

Nº CASO	IDADE	SEXO	GRAU RESSECÇÃO	KPS	RT	QT	SOBREVIDA (Meses)	CENSURA
49	61	1	2	70	2	2	3	0
50	63	2	2	80	2	2	3	1
51	30	1	2	100	1	1	11	1
52	54	1	2	100	1	1	4	1
53	58	2	2	80	1	1	17	1
54	68	1	2	70	1	2	3	1
55	51	1	2	80	1	2	11	1
56	65	2	2	80	1	2	7	1
57	52	1	2	90	2	2	5	1
58	72	1	1	80	1	2	12	1
59	63	1	2	50	2	2	4	1
60	64	1	1	90	1	2	8	1
61	53	1	1	80	1	1	45	1
62	74	1	2	40	1	1	17	1
63	49	2	2	70	1	1	37	1
64	55	1	1	40	2	2	2	1
65	58	2	1	100	2	2	5	1
66	51	1	1	80	1	2	6	1
67	16	1	2	100	2	2	2	1
68	64	2	2	80	2	2	1	1
69	54	2	2	70	1	1	27	1
70	61	2	2	70	2	2	2	1
71	68	1	2	100	2	2	5	1
72	53	1	2	100	1	1	11	1

Nº CASO	IDADE	SEXO	GRAU RESSECÇÃO	KPS	RT	QT	SOBREVIDA (Meses)	CENSURA
73	76	1	2	100	2	2	2	1
74	56	2	2	60	2	2	5	1
75	71	1	1	80	1	1	22	1
76	49	2	1	60	1	1	30	1
77	70	2	2	60	1	1	7	1
78	62	1	1	80	1	1	6	1
79	67	2	2	40	1	2	4	1
80	41	1	2	80	2	2	2	1
81	65	2	1	80	2	2	0	1
82	35	1	1	80	2	2	65	1
83	47	2	1	90	1	2	17	1
84	52	1	2	70	2	2	3	1
85	60	1	1	60	1	2	14	1
86	78	2	1	60	1	2	11	1
87	56	1	2	60	2	2	0	1
88	36	2	2	100	1	1	16	1
89	71	2	1	50	2	2	2	1
90	63	1	2	60	1	1	15	1
91	74	1	1	70	1	2	11	1
92	45	1	2	100	1	2	13	1
93	41	1	2	100	1	2	4	1
94	45	2	1	80	1	1	16	1
95	45	1	2	50	1	1	4	1
96	58	2	2	90	1	2	5	1

Nº CASO	IDADE	SEXO	GRAU RESSECÇÃO	KPS	RT	QT	SOBREVIDA (Meses)	CENSURA
97	54	1	2	50	1	1	4	1
98	45	1	2	100	1	2	13	1
99	62	2	1	90	1	1	12	1
100	51	2	1	80	2	2	5	1
101	34	1	2	80	1	1	11	1
102	50	1	1	80	2	2	4	1
103	68	1	2	50	2	2	4	1
104	57	1	2	90	1	1	23	1
105	62	1	1	40	2	2	3	1
106	58	1	2	90	2	2	2	1
107	67	1	1	60	1	1	6	1
108	58	2	2	70	1	1	9	1
109	57	2	2	70	2	2	8	1
110	17	2	2	30	2	1	4	1
111	63	1	2	100	2	2	2	1
112	56	1	1	50	1	1	23	1
113	39	1	2	40	1	2	4	1
114	48	1	1	100	1	1	24	1
115	59	2	2	90	1	2	8	1
116	71	2	1	90	1	1	7	1
117	71	1	2	100	1	1	13	1
118	51	2	3	80	1	2	9	1
119	40	2	1	80	1	1	45	0
120	50	1	1	80	1	1	9	1

Nº CASO	IDADE	SEXO	GRAU RESSECÇÃO	KPS	RT	QT	SOBREVIDA (Meses)	CENSURA
121	42	1	3	80	1	2	17	1
122	67	2	3	90	2	2	2	0
123	66	2	1	90	2	2	4	1
124	68	1	2	40	1	2	16	1
125	62	2	1	90	2	2	0	1
126	42	1	3	70	1	2	3	1
127	42	2	2	70	1	2	10	1
128	58	2	2	60	1	2	21	1
129	36	2	2	90	1	2	2	1
130	62	1	2	80	2	2	2	1
131	19	1	2	70	2	2	4	1
132	59	1	3	50	2	2	0	1
133	59	2	2	50	2	2	0	1
134	34	1	2	80	1	2	3	1
135	66	2	2	70	1	2	19	1
136	58	1	1	60	1	2	6	1
137	45	2	3	80	1	2	5	1
138	54	2	2	80	1	2	19	1
139	62	2	2	60	2	2	4	1
140	71	1	2	70	2	2	0	1
141	48	2	3	70	1	2	4	1
142	53	1	2	70	1	2	9	1
143	66	1	1	90	1	2	6	1
144	58	1	2	80	2	2	1	1

Nº CASO	IDADE	SEXO	GRAU RESSECÇÃO	KPS	RT	QT	SOBREVIDA (Meses)	CENSURA
145	47	2	2	70	1	2	14	1
146	53	2	1	80	1	2	12	1
147	69	1	2	80	2	2	0	1
148	71	1	2	70	1	2	16	1
149	71	1	2	90	2	2	1	1
150	71	1	3	60	1	2	2	1
151	62	2	2	60	1	2	5	1
152	57	2	2	70	2	2	2	1
153	43	1	1	80	2	2	1	1
154	64	2	1	70	1	2	14	1
155	36	2	2	90	1	2	20	1
156	54	2	1	90	1	2	23	1
157	47	1	2	90	2	2	0	1
158	47	1	2	90	1	2	9	1
159	53	1	2	100	1	2	11	1
160	72	2	3	40	2	2	0	1
161	48	1	1	50	2	2	0	1
162	63	1	2	70	1	2	6	1
163	50	1	1	80	1	2	8	1
164	56	1	1	80	1	2	14	1
165	46	2	1	60	1	2	0	1
166	45	1	3	90	2	2	1	1
167	71	1	3	50	2	2	1	1
168	61	1	1	80	1	2	18	1

Nº CASO	IDADE	SEXO	GRAU RESSECÇÃO	KPS	RT	QT	SOBREVIDA (Meses)	CENSURA
169	64	2	1	90	1	2	33	0
170	75	2	3	80	1	2	3	1
171	48	1	1	70	2	2	0	1
172	57	1	1	90	1	2	5	1
173	35	1	2	60	2	2	0	1
174	69	2	3	90	1	2	4	1
175	47	2	2	90	1	2	13	1
176	54	1	1	70	1	2	7	1
177	75	1	3	30	2	2	1	1
178	67	2	2	50	2	2	1	1
179	60	2	2	70	2	2	9	1
180	61	1	1	70	1	2	19	1
181	56	2	2	70	1	2	5	1
182	57	2	2	60	1	2	15	1
183	63	2	2	90	2	2	3	1
184	69	1	2	100	2	2	2	1
185	57	1	2	60	1	2	6	1
186	56	2	3	50	1	2	2	1
187	35	2	3	90	1	2	1	1
188	53	2	3	70	2	2	1	1
189	67	1	3	50	2	2	3	1
190	55	1	2	60	1	2	5	1
191	55	1	2	60	1	2	5	1
192	38	2	3	70	2	2	0	1

Nº CASO	IDADE	SEXO	GRAU RESSECÇÃO	KPS	RT	QT	SOBREVIDA (Meses)	CENSURA
193	26	1	2	80	1	2	12	1
194	54	1	2	50	2	2	12	1
195	68	1	1	70	1	2	14	1
196	59	1	2	50	2	2	5	1
197	55	1	2	80	1	2	6	1
198	39	1	1	90	1	1	12	0
199	47	1	1	70	1	2	12	0
200	66	1	3	60	2	2	0	1
201	34	1	1	90	2	2	0	1
202	17	2	1	90	1	1	9	0
203	58	2	1	90	1	1	16	0
204	64	1	2	70	1	2	6	1
205	60	1	2	50	2	2	9	1
206	32	1	2	60	1	2	0	1
207	41	2	2	100	1	2	7	0
208	65	1	2	60	1	2	6	0

Anexo C – Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa FMUSP

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 30.05.07, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0263/07**, intitulado: **ESTUDO DAS EXPRESSÕES IMUNOHISTOQUÍMICAS DOS GENES RELACIONADOS COM A VIA DA HIPÓXIA/HIF-1 E SUA RELAÇÃO BIOLÓGICA COM O PROCESSO DE MALIGNIZAÇÃO DOS ASTROCITOMAS DIFUSOS**, apresentado pelo Departamento de **Patologia**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX, 2, letra "c")

Pesquisador (a) Responsável: **Prof. Dr. Sérgio Rosemberg**

Pesquisador (a) Executante: **Carlos Afonso Clara**

CAPPesq, 30 de maio de 2007

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP
Fone: 011 - 30696442 fax: 011 - 3069 6492 - e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br
sol

Anexo D – Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos

HOSPITAL DE CÂNCER DE BARRETOS

Reg. no C.N.S.S. 242.299/76
Unidade Pública Federal Decreto N.º 30.025/50
Unidade Pública Estadual Lei N.º 2.224/75
Unidade Pública Municipal Decreto N.º 3.156/79
Inscrição no C.N.P.J. 06.146.002/0001-42
Inscrição Estadual 204.034.000-116

Barretos, 29 de março de 2007.

Prezado (a) Sr.(a). Investigador (a)
Carlos Clara

Protocolo 065/2006: "Estudo das expressões imunohistoquímicas dos genes relacionados com a via da hipóxia/HIF-1 e sua relação biológica com o processo de malignização dos astrocitomas difusos"

Foram analisadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Pio XII, em reunião ordinária realizada no dia 08/03/07, as pendências do protocolo citado acima, com a seguinte decisão do Comitê: está enquadrado na categoria **APROVADO**, de acordo com a Resolução CNS 196/96, do Conselho Nacional de Saúde, 10/10/96.

Atenciosamente,

Dr. Renato José Affonso Junior
Coordenador do CEP
Fundação Pio XII

REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

Aboody KS, Brown A, Rainov NG, Bower KA, Liu S, Yang W, et al. Neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: evidence from intracranial gliomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000; 7;97(23):12846-51.

Ahmed AU, Alexiades NG, Lesniak MS. The use of neural stem cells in cancer gene therapy: predicting the path to the clinic. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2010;12(5):546-52.

Anderberg C, Li H, Fredriksson L, Andrae J, Betsholtz C, Li X, Eriksson U, Pietras K. Paracrine signaling by platelet-derived growth factor-CC promotes tumor growth by recruitment of cancer-associated fibroblasts. *Cancer Res.* 2009;69(1):369-78.

Andrae J, Molander C, Smits A, Funa K, Nistér M. Platelet-derived growth factor-B and -C and active alpha-receptors in medulloblastoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002;296(3):604-11.

Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev.* 2008;22(10):1276-312.

Anderson JC, McFarland BC, Gladson CL. New molecular targets in angiogenic vessels of glioblastoma tumours. *Expert Rev Mol Med.* 2008;10:e23.

Antoniades HN, Galanopoulos T, Neville-Golden J, O'Hara CJ. Malignant epithelial cells in primary human lung carcinomas coexpress in vivo platelet-derived growth factor (PDGF) and PDGF receptor mRNAs and their protein products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1992;89(9):3942-46.

Assimakopoulou M, Sotiropoulou-Bonikou G, Maraziotis T, Papadakis N, Varakis I. Microvessel density in brain tumors. *Anticancer Res.* 1997;17(6D):4747-53.

Bailey P, Cushing H. A classification of tumours of the glioma group on a histogenetic basis with a correlated study of prognosis. Philadelphia:Lippincott,1926.

Barresi V, Grosso M, Vitarelli E, Granese R, Barresi G. Endoglin (CD105) immuno-expression in human foetal and neonatal lungs. *Histol Histopathol.* 2008;23(6):701-8.

Bauchet L, Mathieu-Daudé H, Fabbro-Peray P, Rigau V, Fabbro M, Chinot O, et al. Oncological patterns of care and outcome for 952 patients with

newly diagnosed glioblastoma in 2004. *Neuro Oncol* [Internet]. 2010 Abr 2 [citado 2010 Nov 20];Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20364023>

Beaumont TL, Kupsy WJ, Barger GR, Sloan AE. Gliosarcoma with multiple extracranial metastases: case report and review of the literature. *J. Neurooncol.* 2007;83(1):39-46.

Bellail AC, Hunter SB, Brat DJ, Tan C, Van Meir EG. Microregional extracellular matrix heterogeneity in brain modulates glioma cell invasion. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2004;36(6):1046-69.

Belda-Iniesta C, de Castro Carpeño J, Sereno M, González-Barón M, Perona R. Epidermal growth factor receptor and glioblastoma multiforme: molecular basis for a new approach. *Clin Transl Oncol.* 2008;10(2):73-7.

Bello MJ, Rey JA. The p53/Mdm2/p14ARF cell cycle control pathway genes may be inactivated by genetic and epigenetic mechanisms in gliomas. *Cancer Genet. Cytogenet.* 2006;164(2):172-73.

Biernat W, Huang H, Yokoo H, Kleihues P, Ohgaki H. Predominant expression of mutant EGFR (EGFRvIII) is rare in primary glioblastomas. *Brain Pathol.* 2004;14(2):131-36.

Birner P, Gatterbauer B, Oberhuber G, Schindl M, Rössler K, Proding A, Budka H, Hainfellner JA. Expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha in oligodendrogliomas: its impact on prognosis and on neoangiogenesis. *Cancer.* 2001;92(1):165-71.

Brat DJ, Parisi JE, Kleinschmidt-DeMasters BK, Yachnis AT, Montine TJ, Boyer PJ, Powell SZ, Prayson RA, McLendon RE. Surgical neuropathology update: a review of changes introduced by the WHO classification of tumours of the central nervous system, 4th edition. *Arch Pathol Lab Med.* 2008;132(6):993-1007.

Breen EC. VEGF in biological control. *J Cell Biochem.* 2007;102(6):1358-67.

Buckner JC, Brown PD, O'Neill BP, Meyer FB, Wetmore CJ, Uhm JH. Central nervous system tumors. *Mayo Clin. Proc.* 2007;82(10):1271-1286.

Buolamwini JK, Addo J, Kamath S, Patil S, Mason D, Ores M. Small molecule antagonists of the MDM2 oncoprotein as anticancer agents. *Curr Cancer Drug Targets.* 2005;5(1):57-68.

Burger PC, Vogel FS, Green SB, Strike TA. Glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma. Pathologic criteria and prognostic implications. *Cancer.* 1985;56(5):1106-1111.

Cao R, Bråkenhielm E, Li X, Pietras K, Widenfalk J, Ostman A, Eriksson U, Cao Y. Angiogenesis stimulated by PDGF-CC, a novel member in the PDGF family, involves activation of PDGFR- α and - β receptors. *FASEB J*. 2002;16(12):1575-1583

CBTRUS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2004-2006. [Internet]. [citado 10 out 2010]. Available from: <http://www.cbtrus.org/2010-NPCR-SEER/CBTRUS-WEBREPORT-Final-3-2-10.pdf>

Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*. 2008;455(7216):1061-1068.

Carmeliet P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology*. 2005;69 Suppl 3:4-10.

Cavalcante SP, Almeida JRW de, Clara CA, Scapulatempo Neto C, Peres SV, Moriguchi SM, Santos MJ, Rocha ET. Evaluation of the microvascular density in astrocytomas in adults correlated using SPECT-MIBI. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2010;2(1):293-300.

Chandana SR, Movva S, Arora M, Singh T. Primary brain tumors in adults. *Am Fam Physician*. 2008;77(10):1423-430.

Chen L, Endler A, Shibasaki F. Hypoxia and angiogenesis: regulation of hypoxia-inducible factors via novel binding factors. *Exp. Mol. Med*. 2009;41(12):849-857.

Crawford Y, Kasman I, Yu L, Zhong C, Wu X, Modrusan Z, et al. PDGF-C mediates the angiogenic and tumorigenic properties of fibroblasts associated with tumors refractory to anti-VEGF treatment. *Cancer Cell*. 2009;15(1):21-34.

Cunha KSG, Caruso AC, Gonçalves AS, Bernardo VG, Pires ARC, da Fonseca EC, de Faria PA, da Silva LE, Geller M, de Moura-Neto RS, Lopes VS. Validation of tissue microarray technology in malignant peripheral nerve sheath tumours. *J. Clin. Pathol*. 2009;62(7):629-33.

Dancau A, Simon R, Mirlacher M, Sauter G. Tissue microarrays. *Methods Mol. Biol*. 2010;576:49-60.

Daumas-Duport C, Scheithauer B, O'Fallon J, Kelly P. Grading of astrocytomas. A simple and reproducible method. *Cancer*. 1988;62(10):2152-2165.

Decaussin M, Sartelet H, Robert C, Moro D, Claraz C, Brambilla C,

Brambilla E. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its two receptors (VEGF-R1-Flt1 and VEGF-R2-Flk1/KDR) in non-small cell lung carcinomas (NSCLCs): correlation with angiogenesis and survival. *J. Pathol.* 1999;188(4):369-77.

de Groot JF, Gilbert MR. New molecular targets in malignant gliomas. *Curr. Opin. Neurol.* 2007;20(6):712-18.

Distler JHW, Hirth A, Kurowska-Stolarska M, Gay RE, Gay S, Distler O. Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *Q J Nucl Med.* 2003;47(3):149-61.

di Tomaso E, London N, Fuja D, Logie J, Tyrrell JA, Kamoun W, Munn LL, Jain RK. PDGF-C induces maturation of blood vessels in a model of glioblastoma and attenuates the response to anti-VEGF treatment. *PLoS ONE.* 2009;4(4):e5123.

Doolittle ND. State of the science in brain tumor classification. *Semin Oncol Nurs.* 2004;20(4):224-230.

Dresemann G. Temozolomide in malignant glioma. *Onco Targets Ther.* 2010;3:139-46.

Dunn IF, Heese O, Black PM. Growth factors in glioma angiogenesis: FGFs, PDGF, EGF, and TGFs. *J. Neurooncol.* 2000;50(1-2):121-137.

Dvorak HF. Angiogenesis: update 2005. *J Thromb Haemost.* 2005;3(8):1835-42.

Eichhorn ME, Kleespies A, Angele MK, Jauch K, Bruns CJ. Angiogenesis in cancer: molecular mechanisms, clinical impact. *Langenbecks Arch Surg.* 2007;392(3):371-9.

Endersby R, Baker SJ. PTEN signaling in brain: neuropathology and tumorigenesis. *Oncogene.* 2008;27(41):5416-430.

Ehtesham M, Stevenson CB, Thompson RC. Stem cell therapies for malignant glioma. *Neurosurg Focus.* 2005;19(3):E5.

Ferrara N. Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. *Recent Prog Horm Res.* 2000;55:15-35; discussion 35-6.

Ferrara N. Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy. *Oncologist.* 2004;9 Suppl 1:2-10.

Figarella-Branger D, Bouvier C, Moroch J, Michalak S, F Burel-Vandenbos. Morphological classification of glioblastomas. *Neurochirurgie.* 2010;56(6):459-63

Filippini G, Falcone C, Boiardi A, Broggi G, Bruzzone MG, Caldiroli D, Farina R, Farinotti M, Fariselli L, Finocchiaro G, Giombini S, Pollo B, Savoiaro M, Solero CL, Valsecchi MG. Prognostic factors for survival in 676 consecutive patients with newly diagnosed primary glioblastoma. *Neuro-oncology*. 2008 ;10(1):79-87.

Fillmore HL, VanMeter TE, Broaddus WC. Membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs): expression and function during glioma invasion. *J. Neurooncol*. 2001;53(2):187-202.

Fischer I, Gagner J, Law M, Newcomb EW, Zagzag D. Angiogenesis in gliomas: biology and molecular pathophysiology. *Brain Pathol*. 2005;15(4):297-310.

Folkman J. Tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res*. 1974;19(0):331-58.

Franco-Hernández, C., Martínez-Glez, V., Rey, J.A. Biología molecular de los glioblastomas. *Neurocirugía (Asturias, Spain)*. 2007;18:373-82.

Fredriksson L, Li H, Eriksson U. The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004;15(4):197-204.

Fukuda ME, Iwadate Y, Machida T, Hiwasa T, Nimura Y, Nagai Y, Takiguchi M, Tanzawa H, Yamaura A, Seki N. Cathepsin D is a potential serum marker for poor prognosis in glioma patients. *Cancer Res*. 2005;65(12):5190-4.

Gaiser T, Becker MR, Meyer J, Habel A, Siegelin MD. p53-mediated inhibition of angiogenesis in diffuse low-grade astrocytomas. *Neurochem. Int*. 2009;54(7):458-463.

Gan HK, Kaye AH, Luwor RB. The EGFRvIII variant in glioblastoma multiforme. *J Clin Neurosci*. 2009;16(6):748-754.

Giannini C, Burger PC, Berkey BA, Cairncross JG, Jenkins RB, Mehta M, Curran WJ, Aldape K. Anaplastic oligodendroglial tumors: refining the correlation among histopathology, 1p 19q deletion and clinical outcome in Intergroup Radiation Therapy Oncology Group Trial 9402. *Brain Pathol*. 2008;18(3):360-369.

Giannopoulou E, Ravazoula P, Kalofonos H, Makatsoris T, Kardamakis D. Expression of HIF-1alpha and iNOS in astrocytic gliomas: a clinicopathological study. *In Vivo*. 2006;20(3):421-425.

Gorlia T, van den Bent MJ, Hegi ME, Mirimanoff RO, Weller M, Cairncross JG, , Eisenhauer E, Belanger K, Brandes AA, Allgeier A, Lacombe D, Stupp R. Nomograms for predicting survival of patients with newly diagnosed glioblastoma: prognostic factor analysis of EORTC and NCIC trial 26981-22981/CE.3. *Lancet Oncol.* 2008;9(1):29-38.

Gu J, Liu Y, Kyritsis AP, Bondy ML. Molecular epidemiology of primary brain tumors. *Neurotherapeutics.* 2009;6(3):427-435.

Hartmann C, von Deimling A. Molecular pathology of oligodendroglial tumors. *Recent Results Cancer Res.* 2009;171:25-49.

Heese O, Disko A, Zirkel D, Westphal M, Lamszus K. Neural stem cell migration toward gliomas in vitro. *Neuro-oncology.* 2005;7(4):476-484.

Ido K, Nakagawa T, Sakuma T, Takeuchi H, Sato K, Kubota T. Expression of vascular endothelial growth factor-A and mRNA stability factor HuR in human astrocytic tumors. *Neuropathology.* 2008;28(6):604-611.

Ino Y, Silver JS, Blazejewski L, Nishikawa R, Matsutani M, von Deimling A, Louis DN. Common regions of deletion on chromosome 22q12.3-q13.1 and 22q13.2 in human astrocytomas appear related to malignancy grade. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1999;58(8):881-885.

Irie N, Matsuo T, Nagata I. Protocol of radiotherapy for glioblastoma according to the expression of HIF-1. *Brain Tumor Pathol.* 2004;21(1):1-6.

Jain RK, di Tomaso E, Duda DG, Loeffler JS, Sorensen AG, Batchelor TT. Angiogenesis in brain tumours. *Nat Rev Neurosci.* 2007;8(8):610-22.

Jang FF, Wei W, De WM. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor expression positively correlates with angiogenesis and peritumoural brain oedema in astrocytoma. *J Ayub Med Coll Abbottabad.* 2008;20(2):105-109.

Jebreel A, England J, Bedford K, Murphy J, Karsai L, Atkin S. Vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptors expression and microvascular density in benign and malignant thyroid diseases. *Int J Exp Pathol.* 2007;88(4):271-277.

Jensen RL, Ragel BT, Whang K, Gillespie D. Inhibition of hypoxia inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) decreases vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion and tumor growth in malignant gliomas. *J. Neurooncol.* 2006;78(3):233-247.

Johansson M, Brännström T, Bergenheim AT, Henriksson R. Spatial expression of VEGF-A in human glioma. *J. Neurooncol.* 2002;59(1):1-6.

Kallioniemi OP, Wagner U, Kononen J, Sauter G. Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. *Hum. Mol. Genet.* 2001;10(7):657-662.

Karpel-Massler G, Schmidt U, Unterberg A, Halatsch M. Therapeutic inhibition of the epidermal growth factor receptor in high-grade gliomas: where do we stand? *Mol. Cancer Res.* 2009;7(7):1000-1012.

Kaur B, Tan C, Brat DJ, Post DE, Van Meir EG. Genetic and hypoxic regulation of angiogenesis in gliomas. *J Neurooncol.* 2004;70(2):229-43

Kaynar MY, Sanus GZ, Hnimoglu H, Kacira T, Kemerdere R, Atukeren P, Gumustas K, Canbaz B, Tanriverdi T. Expression of hypoxia inducible factor-1alpha in tumors of patients with glioblastoma multiforme and transitional meningioma. *J Clin Neurosci.* 2008;15(9):1036-42.

Ke Q, Costa M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol. Pharmacol.* 2006;70(5):1469-1480.

Kettenmann H, Ransom BR. *Neuroglia*. 2nd ed. New York: Oxford; 2005.

Khromova NV, Kopnin PB, Stepanova EV, Agapova LS, Kopnin BP. p53 hot-spot mutants increase tumor vascularization via ROS-mediated activation of the HIF1/VEGF-A pathway. *Cancer Lett.* 2009;276(2):143-51.

Kim K, Yoshida D, Teramoto A. Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha and vascular endothelial growth factor in pituitary adenomas. *Endocr. Pathol.* 2005;16(2):115-21.

Kimmelman AC, Ross DA, Liang BC. Loss of heterozygosity of chromosome 10p in human gliomas. *Genomics.* 1996;34(2):250-54.

Kitange GJ, Templeton KL, Jenkins RB. Recent advances in the molecular genetics of primary gliomas. *Curr Opin Oncol.* 2003;15(3):197-203.

Knobbe CB, Merlo A, Reifenberger G. Pten signaling in gliomas. *Neuro-oncology.* 2002;4(3):196-211.

Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärklund M, Schraml P, Leighton S, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat. Med.* 1998;4(7):844-47.

Korkolopoulou P, Patsouris E, Konstantinidou AE, Pavlopoulos PM, Kavantzias N, Boviatsis E, Thymara I, Perdiki M, Thomas-Tsagli E, Angelidakis D, Rologis D, Sakkas D. Hypoxia-inducible factor 1alpha/vascular endothelial growth factor axis in astrocytomas. Associations with microvessel morphometry, proliferation and prognosis.

Neuropathol. Appl. Neurobiol. 2004;30(3):267-78.

Korkolopoulou P, Perdiki M, Thymara I, Boviatsis E, Agrogiannis G, Kotsiakakis X, Angelidakis D, Rologis D, Diamantopoulou K, Thomas-Tsagli E, Kaklamanis L, Gatter K, Patsouris E. Expression of hypoxia-related tissue factors in astrocytic gliomas. A multivariate survival study with emphasis upon carbonic anhydrase IX. *Hum. Pathol.* 2007;38(4):629-38.

Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Danielidis V, Sivridis E. Hypoxia inducible factor (Hif1alpha and HIF2alpha) and carbonic anhydrase 9 (CA9) expression and response of head-neck cancer to hypofractionated and accelerated radiotherapy. *Int. J. Radiat. Biol.* 2008;84(1):47-52.

Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood.* 1996;87(1):1-13.

Krex D, Klink B, Hartmann C, von Deimling A, Pietsch T, Simon M, et al. Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain.* 2007;130(Pt 10):2596-2606.

Lee M, Stephenson DA. Recent developments in neurofibromatosis type 1. *Curr. Opin. Neurol.* 2007;20(2):135-41.

Lejbnkowicz F, Goldberg-Cohen I, Levy AP. New horizons for VEGF. Is there a role for nuclear localization? *Acta Histochem.* 2005;106(6):405-11.

Levicar N, Nuttall RK, Lah TT, Nuttall RK. Proteases in brain tumour progression. *Acta Neurochir (Wien).* 2003;145(9):825-38.

Li C, Guo B, Bernabeu C, Kumar S. Angiogenesis in breast cancer: the role of transforming growth factor beta and CD105. *Microsc. Res. Tech.* 2001;52(4):437-449.

Li C, Gardy R, Seon BK, Duff SE, Abdalla S, Renehan A, O'Dwyer ST, Haboubi N, Kumar S. Both high intratumoral microvessel density determined using CD105 antibody and elevated plasma levels of CD105 in colorectal cancer patients correlate with poor prognosis. *Br. J. Cancer.* 2003;88(9):1424-1431.

Li H, Fredriksson L, Li X, Eriksson U. PDGF-D is a potent transforming and angiogenic growth factor. *Oncogene.* 2003;22(10):1501-510.

Li J, Perry A, James CD, Gutmann DH. Cancer-related gene expression profiles in NF1-associated pilocytic astrocytomas. *Neurology.* 2001;56(7):885-90.

Li S, Qiu X, Chen B, Zhang W, Ren H, Wang Z, Jiang T. Prognostic factors influencing clinical outcomes of glioblastoma multiforme. *Chin.*

Med. J. 2009;122(11):1245-1249.

Li X, Ponten A, Aase K, Karlsson L, Abramsson A, Uutela M, Bäckström G, Hellström M, Boström H, Li H, Soriano P, Betsholtz C, Heldin CH, Alitalo K, Ostman A, Eriksson U. PDGF-C is a new protease-activated ligand for the PDGF alpha-receptor. *Nat Cell Biol.* 2000;2(5):302-309.

Li X, Eriksson U. Novel PDGF family members: PDGF-C and PDGF-D. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003;14(2):91-98.

Li X, Kumar A, Zhang F, Lee C, Li Y, Tang Z, Arjunan P. VEGF-independent angiogenic pathways induced by PDGF-C. *Oncotarget.* 2010;1(4):309-314.

Li W, Keller G. VEGF nuclear accumulation correlates with phenotypical changes in endothelial cells. *J. Cell. Sci.* 2000;113 (Pt 9):1525-1534.

Liao D, Johnson RS. Hypoxia: a key regulator of angiogenesis in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2007;26(2):281-290.

Lokker NA, Sullivan CM, Hollenbach SJ, Israel MA, Giese NA. Platelet-derived growth factor (PDGF) autocrine signaling regulates survival and mitogenic pathways in glioblastoma cells: evidence that the novel PDGF-C and PDGF-D ligands may play a role in the development of brain tumors. *Cancer Res.* 2002;62(13):3729-3735

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 2007;114(2):97-109.

Macaluso M, Montanari M, Cinti C, Giordano A. Modulation of cell cycle components by epigenetic and genetic events. *Semin. Oncol.* 2005;32(5):452-457.

Maeda D, Miyazawa T, Toyooka T, Shima K. Temporal gliosarcoma with extraneural metastasis: case report. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo).* 2010;50(4):343-345.

Maluf, F.C., Katz, A. K, Corrêa, S. *Câncer do sistema nervoso central: tratamento multidisciplinar.* São Paulo: Dendrix; 2009.

Mark Bernstein M, Mitchel S. Berger. *Neuro-oncology: the essentials.* 2 nd ed. Thieme; 2008.

McMahon G. VEGF receptor signaling in tumor angiogenesis. *Oncologist.* 2000;5 Suppl 1:3-10.

Mellinghoff IK, Wang MY, Vivanco I, Haas-Kogan DA, Zhu S, Dia EQ, et

al. Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors. *N. Engl. J. Med.* 2005;353(19):2012-024.

Mercer RW, Tyler MA, Ulasov IV, Lesniak MS. Targeted therapies for malignant glioma: progress and potential. *BioDrugs.* 2009;23(1):25-35.

Miller CR, Perry A. Glioblastoma. *Arch Pathol Lab Med.* 2007;131(3):397-406.

Mineo J, Bordron A, Baroncini M, Ramirez C, Maurage C, Blond S, et al. Prognosis factors of survival time in patients with glioblastoma multiforme: a multivariate analysis of 340 patients. *Acta Neurochir (Wien).* 2007;149(3):245-52.

Mischel PS, Cloughesy TF. Targeted molecular therapy of GBM. *Brain Pathol.* 2003;13(1):52-61.

Miyakawa A, Ichimura K, Schmidt EE, Varmeh-Ziaie S, Collins VP. Multiple deleted regions on the long arm of chromosome 6 in astrocytic tumours. *Br. J. Cancer.* 2000;82(3):543-49.

Mladkova N, Chakravarti A. Molecular profiling in glioblastoma: prelude to personalized treatment. *Curr Oncol Rep.* 2009;11(1):53-61.

Nakada M, Okada Y, Yamashita J. The role of matrix metalloproteinases in glioma invasion. *Front Biosci.* 2003;8:e261-9

Nakada M, Nakada S, Demuth T, Tran NL, Hoelzinger DB, Berens ME. Molecular targets of glioma invasion. *Cell. Mol. Life Sci.* 2007;64(4):458-478.

Nakamura M, Yang F, Fujisawa H, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Loss of heterozygosity on chromosome 19 in secondary glioblastomas. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2000;59(6):539-543.

Nakamura M, Ishida E, Shimada K, Kishi M, Nakase H, Sakaki T, Konishi N. Frequent LOH on 22q12.3 and TIMP-3 inactivation occur in the progression to secondary glioblastomas. *Lab. Invest.* 2005;85(2):165-175

Nam D, Park K, Suh YL, Kim J. Expression of VEGF and brain specific angiogenesis inhibitor-1 in glioblastoma: prognostic significance. *Oncol Rep.* 2004;11(4):863-9.

National Cancer Institute. Adult Brain Tumors Treatment - National Cancer Institute [Internet]. [citado 2010 Nov 21];Available from: <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/adultbrain/HealthProfessional/page>

Netto GC, Bleil CB, Hilbig A, Coutinho LM. Immunohistochemical evaluation of the microvascular density through the expression of TGF-beta (CD 105/endoglin) and CD 34 receptors and expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) in oligodendrogliomas. *Neuropathology*. 2008;28(1):17-23

Ney DE, Lassman AB. Molecular profiling of oligodendrogliomas: impact on prognosis, treatment, and future directions. *Curr Oncol Rep*. 2009; 11(1):62-67.

Nishikawa R, Cheng SY, Nagashima R, Huang HJ, Cavenee WK, Matsutani M. Expression of vascular endothelial growth factor in human brain tumors. *Acta Neuropathol*. 1998;96(5):453-62.

Nozaki M, Tada M, Kobayashi H, Zhang CL, Sawamura Y, Abe H, Ishii N, Van Meir EG. Roles of the functional loss of p53 and other genes in astrocytoma tumorigenesis and progression. *Neuro-oncology*. 1999;1(2):124-37.

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

Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am. J. Pathol*. 2007;170(5):1445-1453.

Ohgaki H, Kleihues P. Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer Sci*. 2009;100(12):2235-2241.

Ono Y, Tamiya T, Ichikawa T, Matsumoto K, Furuta T, Ohmoto T, Akiyama K, Seki S, Ueki K, Louis DN. Accumulation of wild-type p53 in astrocytomas is associated with increased p21 expression. *Acta Neuropathol*. 1997;94(1):21-27.

Pang RWC, Poon RTP. Clinical implications of angiogenesis in cancers. *Vasc Health Risk Manag*. 2006;2(2):97-108.

Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu IM, Gallia GL, Olivi A, McLendon R, Rasheed BA, Keir S, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Busam DA, Tekleab H, Diaz LA Jr, Hartigan J, Smith DR, Strausberg RL, Marie SK, Shinjo SM, Yan H, Riggins GJ, Bigner DD, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE, Kinzler KW. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*. 2008;321(5897):1807-812.

Paulus W. GFAP, Ki67 and IDH1: perhaps the golden triad of glioma immunohistochemistry. *Acta Neuropathol*. 2009;118(5):603-4.

Pfister S, Witt O. Pediatric gliomas. *Recent Results Cancer Res*.

2009;171:67-81.

Pietras K, Pahler J, Bergers G, Hanahan D. Functions of paracrine PDGF signaling in the proangiogenic tumor stroma revealed by pharmacological targeting. *PLoS Med.* 2008;5(1):e19.

Pietsch T, Valter MM, Wolf HK, von Deimling A, Huang HJ, Cavenee WK, Wiestler OD. Expression and distribution of vascular endothelial growth factor protein in human brain tumors. *Acta Neuropathol.* 1997;93(2):109-117.

Pouratian N, Mut M, Jagannathan J, Lopes MB, Shaffrey ME, Schiff D. Low-grade gliomas in older patients: a retrospective analysis of prognostic factors. *J. Neurooncol.* 2008;90(3):341-350.

Pradeep CR, Sunila ES, Kuttan G. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in tumor angiogenesis and malignancies. *Integr Cancer Ther.* 2005;4(4):315-21.

Preusser M, Wolfsberger S, Haberler C, Breitschopf H, Czech T, Slavc I, Harris AL, Acker T, Budka H, Hainfellner JA. Vascularization and expression of hypoxia-related tissue factors in intracranial ependymoma and their impact on patient survival. *Acta Neuropathol.* 2005;109(2):211-216.

Preusser M, Heinzl H, Gelpi E, Höftberger R, Fischer I, Pipp I, Milenkovic I, Wöhrer A, Popovici F, Wolfsberger S, Hainfellner JA. Ki67 index in intracranial ependymoma: a promising histopathological candidate biomarker. *Histopathology.* 2008;53(1):39-47

Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat. Med.* 2003;9(6):677-684.

Rankin EB, Giaccia AJ. The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. *Cell Death Differ.* 2008;15(4):678-85.

Reigstad LJ, Varhaug JE, Lillehaug JR. Structural and functional specificities of PDGF-C and PDGF-D, the novel members of the platelet-derived growth factors family. *FEBS J.* 2005;272(22):5723-5741.

Ribeiro AS, Dahl KN. The nucleus as a central structure in defining the mechanical properties of stem cells. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 2010;1:831-4.

Ricci-Vitiani L, Pallini R, Biffoni M, Todaro M, Invernici G, Cenci T, Maira G, Parati EA, Stassi G, Larocca LM, De Maria R. Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature.* 2010;468(7325):824-8

Rong Y, Durden DL, Van Meir EG, Brat DJ. 'Pseudopalisading' necrosis in glioblastoma: a familiar morphologic feature that links vascular pathology, hypoxia, and angiogenesis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2006;65(6):529-539.

Rosenbaum-Dekel Y, Fuchs A, Yakirevich E, Azriel A, Mazareb S, Resnick MB, et al. Nuclear localization of long-VEGF is associated with hypoxia and tumor angiogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005;332(1):271-278.

Rosenberg S, Fujiwara D. Epidemiology of pediatric tumors of the nervous system according to the WHO 2000 classification: a report of 1,195 cases from a single institution. *Childs Nerv Syst.* 2005;21(11):940-4.

Roskoski R Jr. Sunitinib: a VEGF and PDGF receptor protein kinase and angiogenesis inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;356(2):323-8.

Sanai N, Alvarez-Buylla A, Berger MS. Neural stem cells and the origin of gliomas. *N. Engl. J. Med.* 2005;353(8):811-822.

Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer.* 2003;3(10):721-732.

Semenza GL. Regulation of vascularization by hypoxia-inducible factor 1. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2009;1177:2-8.

Semenza GL. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2010;20(1):51-56.

Scheithauer BW, Fuller GN, VandenBerg SR. The 2007 WHO classification of tumors of the nervous system: controversies in surgical neuropathology. *Brain Pathol.* 2008;18(3):307-316.

Schichor C, Birnbaum T, Etminan N, Schnell O, Grau S, Miebach S, Aboody K, Padovan C, Straube A, Tonn JC, Goldbrunner R. Vascular endothelial growth factor A contributes to glioma-induced migration of human marrow stromal cells (hMSC). *Exp. Neurol.* 2006;199(2):301-10.

Schmid T, Zhou J, Köhl R, Brüne B. p300 relieves p53-evoked transcriptional repression of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Biochem. J.* 2004;380(Pt 1):289-95.

Schmid T, Zhou J, Brüne B. HIF-1 and p53: communication of transcription factors under hypoxia. *J. Cell. Mol. Med.* 2004;8(4):423-431.

Sharma S, Sharma MC, Gupta DK, Sarkar C. Angiogenic patterns and

their quantitation in high grade astrocytic tumors. *J Neurooncol.* 2006;79(1):19-30.

Shibuya M. Brain angiogenesis in developmental and pathological processes: therapeutic aspects of vascular endothelial growth factor. *FEBS J.* 2009;276(17):4636-4643.

Shih AH, Holland EC. Platelet-derived growth factor (PDGF) and glial tumorigenesis. *Cancer Lett.* 2006;232(2):139-147.

Simon R, Sauter G. Tissue microarray (TMA) applications: implications for molecular medicine. *Expert Rev Mol Med.* 2003;5(26):1-12.

Solomon DA, Kim J, Cronin JC, Sibenaller Z, Ryken T, Rosenberg SA, Ransom H, Jean W, Bigner D, Yan H, Samuels Y, Waldman T. Mutational inactivation of PTPRD in glioblastoma multiforme and malignant melanoma. *Cancer Res.* 2008;68(24):10300-10306.

Søndergaard KL, Hilton DA, Penney M, Ollerenshaw M, Demaine AG. Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in tumours of patients with glioblastoma. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2002;28(3):210-217.

Stieber VW. Low-grade gliomas. *Curr Treat Options Oncol.* 2001;2(6):495-506.

Stiver SI. Angiogenesis and its role in the behavior of astrocytic brain tumors. *Front Biosci.* 2004;9:3105-23.

Stummer W, Reulen H, Meinel T, Pichlmeier U, Schumacher W, Tonn J, Rohde V, Oppel F, Turowski B, Woiciechowsky C, Franz K, Pietsch T. Extent of resection and survival in glioblastoma multiforme: identification of and adjustment for bias. *Neurosurgery.* 2008;62(3):564-576; discussion 564-576.

Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 2005;352(10):987-996.

Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJB, Janzer RC, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* 2009;10(5):459-466.

Svien HJ, Mabon RF, Kernohan JW. Astrocytomas. *Mayo Clin Proc.* 1949;24(3):54-64.

Takano S, Yoshii Y, Kondo S, Suzuki H, Maruno T, Shirai S, Nose T.

Concentration of vascular endothelial growth factor in the serum and tumor tissue of brain tumor patients. *Cancer Res.* 1996;56(9):2185-2190.

VanMeter TE, Rooprai HK, Kibble MM, Fillmore HL, Broaddus WC, Pilkington GJ. The role of matrix metalloproteinase genes in glioma invasion: co-dependent and interactive proteolysis. *J Neurooncol.* 2001;53(2):21

Varga I, Hutóczki G, Petrás M, Scholtz B, Mikó E, Kenyeres A, Tóth J, Zahuczky G, Bognár L, Hanzély Z, Klekner A. Expression of invasion-related extracellular matrix molecules in human glioblastoma versus intracerebral lung adenocarcinoma metastasis. *Cen Eur Neurosurg.* 2010;71(4):173-80.

Varlet P, Guillamo JS, Nataf F, Koziak M, Beuvon F, Daumas-Duport C. Vascular endothelial growth factor expression in oligodendrogliomas: a correlative study with Sainte-Anne malignancy grade, growth fraction and patient survival. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2000;26(4):379-89.

Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Toi M, Martin L, McCulloch P, Pezzella F, Viale G, Weidner N, Harris AL, Dirix LY. Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cancer.* 1996;32A(14):2474-84.

Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Colpaert C, Marson LP, Gion M, Beliën JA, de Waal RM, Van Marck E, Magnani E, Weidner N, Harris AL, Dirix LY. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours. *Eur J Cancer.* 2002;38(12):1564-79.

Vidal S, Horvath E, Kovacs K, Kuroki T, Lloyd RV, Scheithauer BW. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) in pituitary tumours. *Histol. Histopathol.* 2003;18(3):679-686.

Vordermark D. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha in oligodendrogliomas: its impact on prognosis and on neoangiogenesis. *Cancer.* 2002;94(8):2317-2318.

Vu BT, Vassilev LT. Small-Molecule Inhibitors of the p53-MDM2 Interaction. *Curr Top Microbiol Immunol* [Internet]. 2010 Nov 3 [citado 2010 Nov 18]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21046355>

Wang D, Huang HJ, Kazlauskas A, Caveness WK. Induction of vascular endothelial growth factor expression in endothelial cells by platelet-derived growth factor through the activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *Cancer Res.* 1999;59(7):1464-1472.

Wang R, Chadalavada K, Wilshire J, Kowalik U, Hovinga KE, Geber A, Fligelman B, Leversha M, Brennan C, Tabar V. Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. *Nature*. 2010;468(7325):829-33.

Watanabe T, Katayama Y, Yoshino A, Komine C, Yokoyama T. Deregulation of the TP53/p14ARF tumor suppressor pathway in low-grade diffuse astrocytomas and its influence on clinical course. *Clin. Cancer Res*. 2003;9(13):4884-4890.

Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med*. 1991;324(1):1-8

Wrensch M, Fisher JL, Schwartzbaum JA, Bondy M, Berger M, Aldape KD. The molecular epidemiology of gliomas in adults. *Neurosurg Focus*. 2005;19(5):E5.

Yao Y, Pan Y, Chen J, Sun X, Qiu Y, Ding Y. Endoglin (CD105) expression in angiogenesis of primary hepatocellular carcinomas: analysis using tissue microarrays and comparisons with CD34 and VEGF. *Ann Clin Lab Sci*. 2007;37(1):39-48

Yoshida D, Kim K, Noha M, Teramoto A. Hypoxia inducible factor 1-alpha regulates of platelet derived growth factor-B in human glioblastoma cells. *J. Neurooncol*. 2006;76(1):13-21.

Zagzag D, Zhong H, Scalzitti JM, Laughner E, Simons JW, Semenza GL. Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in brain tumors: association with angiogenesis, invasion, and progression. *Cancer*. 2000;88(11):2606-18.

Zawrocki A, Biernat W. Epidermal growth factor receptor in glioblastoma. *Folia Neuropathol*. 2005;43(3):123-132.

Zhang F, Zhang S, Wardega P, Chakrabarty S, Liu B, Wu Z, Colosi P, Fariss RN, Lennartsson J, Nussenblatt R, Gutkind JS, Cao Y, Li X. PDGF-CC blockade inhibits pathological angiogenesis by acting on multiple cellular and molecular targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010; 107(27):12216-12221.

Zhao D, Najbauer J, Garcia E, Metz MZ, Gutova M, Glackin CA, Kim SU, Aboody KS. Neural stem cell tropism to glioma: critical role of tumor hypoxia. *Mol. Cancer Res*. 2008;6(12):1819-1829.

Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, Buechler P, Isaacs WB, Semenza GL, Simons JW. Overexpression of

hypoxia-inducible factor 1 α in common human cancers and their metastases. *Cancer Res.* 1999 15;59(22):5830-835.

Zundel W, Schindler C, Haas-Kogan D, Koong A, Kaper F, Chen E, Gottschalk AR, Ryan HE, Johnson RS, Jefferson AB, Stokoe D, Giaccia AJ. Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. *Genes Dev.* 2000;14(4):391-396.