

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Curso de Pós-Graduação em Medicina: Clínica Médica**

**O PAPEL DA APOPTOSE, DO ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO CELULAR, DO
bcl-2 E DO p53 NO PROGNÓSTICO DOS GLIOBLASTOMAS**

MARLISE DE CASTRO RIBEIRO

Orientador: Profa. Dra. Lígia Maria B. Coutinho

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre, 2003

R484p Ribeiro, Marlise de Castro

O papel da apoptose, da proliferação celular, do p 53 e do Bcl-2 no prognóstico dos glioblastomas / Marlise de Castro Ribeiro ; orient. Lígia M. Barbosa Coutinho. – 2003.

61 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina : Ciências Médicas. Porto Alegre – RS, 2003.

1. Glioblastoma : Diagnóstico 2. Apoptose 3. Proteína P53 4. Proteínas proto-oncogênicas c-bcl-2 I. Coutinho, Lígia M. Barbosa II. Título.

NLM: QZ 380

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Lígia Maria B. Coutinho, que se mostrou uma verdadeira mestra, além de grande amiga e exemplo profissional a ser seguido.

À Dra. Ana Maria C. Tsanaclis, por ter nos cedido de tão boa vontade seu laboratório de neuropatologia experimental.

À Rosalva, técnica do laboratório de patologia da Santa Casa, por ter nos ajudado na realização das técnicas imuno-histoquímicas.

Ao Programa de Pós-Graduação de Medicina: Clínica Médica pelo financiamento de parte da nossa pesquisa.

Ao Alexandre, meu marido e grande companheiro, pelo incentivo e pela força nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais, as primeiras pessoas a me incentivar e acreditar em mim, e sem as quais eu não chegaria até aqui.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS -----	III
LISTA DE FIGURAS -----	IV
LISTA DE TABELAS -----	V
INTRODUÇÃO -----	1
REVISÃO DE LITERATURA	
Histórico -----	3
Epidemiologia -----	3
Classificação -----	4
Diagnóstico -----	4
Disseminação e Metástases -----	6
Alterações Genéticas -----	6
Fatores de Proliferação e Morte Celular -----	8
Fatores Prognósticos -----	12
OBJETIVOS -----	14
BIBLIOGRAFIA DA REVISÃO DE LITERATURA -----	15
ARTIGO EM PORTUGUÊS -----	20
RESUMO -----	21
INTRODUÇÃO -----	22
MATERIAL E MÉTODOS	
População em Estudo -----	24
Imunoistoquímica -----	25
Análise Estatística -----	26
RESULTADOS -----	27
DISCUSSÃO -----	35
CONCLUSÃO -----	38
BIBLIOGRAFIA DO ARTIGO -----	39
ARTIGO EM INGLÊS -----	42

ABREVIATURAS

bcl-2: leucemia/ linfoma de células B

CDKN2: cinase dependente de ciclina

DAB: diaminobenzidina

DNA: ácido desoxirribonucléico

EGFR: receptor de fator de crescimento epitelial

GFAP: proteína ácida da fibra glial

H₂O₂: água oxigenada

IA: índice apoptótico

IM: índice mitótico

IgG: imunoglobulina G

OMS: Organização Mundial de Saúde

PBS: Solução tampão fosfato

SNC: sistema nervoso central

T1: tempo de relaxamento longitudinal

T2: tempo de relaxamento transversal

TdT: desoxinucleotidiltransferase

TUNEL: desoxinucleotidiltransferase terminal marcada

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1: Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier -----
- FIGURA 2: Gráficos das correlações entre tempo de sobrevivência e variáveis
imunohistoquímicas -----
- FIGURA 3: Gráficos representando as correlações entre a idade e as variáveis
imunohistoquímicas -----
- FIGURA 4: Gráficos representando as correlações entre as variáveis
imunohistoquímicas -----
- FIGURA 5: Anatomopatológico de glioblastoma com células positivas para
bcl-2 -----
- FIGURA 6: Anatomopatológico de glioblastoma com células em apoptose (TUNEL)

- FIGURA 7: Anatomopatológico de glioblastoma com células positivas para
p53 -----
- FIGURA 8: Anatomopatológico de glioblastoma com células em mitose
(MIB-1) -----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- variáveis demográficas da amostra.

TABELA 2- Comparação das variáveis pesquisadas dividindo os pacientes em 2 grupos: mortos e sobreviventes.

INTRODUÇÃO

O glioblastoma é a neoplasia maligna mais comum do sistema nervoso central, com um prognóstico de menos de 24 meses para a maioria dos pacientes. Poucos fatores prognósticos têm sido identificados nestes tumores, e, atualmente vários marcadores biológicos estão sendo pesquisados a fim de se observar fatores preditivos dos mesmos (Newcomb et al 1998, Korshunov et al 1999)

A apoptose, ou morte celular programada, tem um papel importante no controle da proliferação celular em condições fisiológicas e patológicas. É de especial interesse o seu papel no desenvolvimento e progressão dos tumores cerebrais. A desregulação das vias genéticas que controlam a apoptose pode favorecer o crescimento e desenvolvimento do tumor. A apoptose é ativada e regulada por inúmeros genes e proteínas como p53, bcl-2, bax, entre outros. Sabe-se que o índice apoptótico (IA) costuma ser maior nos glioblastomas que nos demais tumores astrocíticos, porém sua relação com o prognóstico ainda é incerta (Ellison et al 1995, Heesters et al 1999, Korshunov A, et al 1999, Shiffer D, et al 1995).

O p53, um gene regulador da proliferação celular e um pró-apoptótico que está alterado em aproximadamente metade de todos os astrocitomas tem papel controverso no prognóstico dos glioblastomas (Cunningham et al 1997, Sipos et al 1998).

O bcl-2 e a família de proteínas bcl-2 são considerados, em sua maioria, anti-apoptóticos, conferindo uma sobrevida maior às células por impedir a morte celular. A expressão de bcl-2 em certos tipos de tumores, como próstata, mama, colo-retal, tireóide e ovário, tem sido relacionada a um pior prognóstico dos mesmos (Newcomb EW, et al 1997). Entretanto, sua correlação prognóstica nos glioblastomas ainda é controversa (Ellison et al 1995, Nakasu et al 1994, Schffer et al 1996).

O índice mitótico (IM), avaliado através do MIB-1 (Ki-67) demonstra-se útil na graduação dos astrocitomas, porém seu papel preditivo na sobrevida dos pacientes

com glioblastoma não foi confirmado (Ang et al 1994; Coons et al 1993; Heesters et al 1999).

Neste estudo, pretendemos verificar a importância da realização de técnicas imunohistoquímicas nos glioblastomas, observando se a presença de genes alterados, como o p53 e o bcl-2, e a presença de apoptose podem, de alguma forma, contribuir para um melhor entendimento e, conseqüentemente, um melhor tratamento desta neoplasia.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. HISTÓRICO

Foi Virchow, em 1863, que identificou o glioblastoma como um tumor glial. Em 1926 Bailey e Cushing mudaram o nome de espongiblastoma multiforme, nomenclatura primeiramente usada por Mallory em 1914, para glioblastoma multiforme. Na primeira classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) o glioblastoma foi agrupado na categoria de tumores embrionários e pobremente diferenciados (Zülch, 1976). A introdução da imunohistoquímica e, particularmente a expressão para o GFAP, finalmente confirmou a origem glial do tumor (Eng et al, 1971, Eng e Rubinstein, 1978).

1.2. EPIDEMIOLOGIA

1.2.1. INCIDÊNCIA

Os glioblastomas podem ocorrer em qualquer idade, mas afetam preferencialmente adultos, com um pico de incidência entre 45 a 70 anos. É o tumor mais freqüente do cérebro, representando 15-20% das neoplasias intracranianas e 50-60% dos tumores astrocíticos, existindo uma preponderância pelo gênero masculino em uma proporção de 2:1 a 3:2. Na população em geral tem uma incidência de na população norte-americana de 2-3 casos novos por 100.000 habitantes/ano.

1.2.2. LOCALIZAÇÃO

Sua localização preferencial é a substância branca dos hemisférios cerebrais, em particular os lobos frontais, seguidos pelos temporais, com envolvimento freqüente do corpo caloso e do hemisfério contralateral. Os glioblastomas de tronco cerebral são menos freqüentes e ocorrem geralmente em crianças (Graham & Lantos, 1997; Russel & Rubinstein, 1989). A presença de glioblastomas multifocais foi documentada por Scherer (1940), que relatou esta ocorrência em 20% de seus casos. Em 1989, Russel

e Rubinstein observaram apenas 2,3% de glioblastomas multifocais em um grupo de 173 casos. Atualmente pode-se confirmar a origem policlonal dos tumores através de marcadores moleculares (Biernat et al, 1995).

1.3. CLASSIFICAÇÃO

Os glioblastomas são as neoplasias mais malignas de origem astrocítica, com um tempo de sobrevida de aproximadamente 12 meses, correspondendo ao grau IV de malignidade, de acordo com a última classificação da OMS feita em 1999, incluindo aqui as suas variantes histológicas: os gliossarcomas e o glioblastoma de células gigantes (Kleihues & Cavenee, 2000).

1.4. DIAGNÓSTICO

1.4.1. NEUROIMAGEM

Nos exames de imagem observa-se tipicamente uma neoplasia cortical que se estende da superfície das leptomeninges aos núcleos da base. A tomografia demonstra uma região central hipodensa correspondendo à necrose ou à formação de cistos, áreas de hiperdensidade podem ser vistas quando existem focos hemorrágicos intratumoral determinando um aspecto variegado às imagens. Após a administração do contraste uma impregnação anelar é bastante comum, podendo ser, entretanto, heterogênea e difusa. Na ressonância magnética observa-se em seqüência T 1 uma massa pobremente delimitada com necrose ou cistos com sinal misto e, em seqüência T 2 , uma massa com sinal alto ou misto e intensa e heterogênea impregnação quando da administração endovenosa de gadolínio, geralmente com mínimo edema periférico (Osborn, 1994).

1.4.2. MACROSCOPIA

Na macroscopia, quando apenas um lobo é envolvido, nota-se a presença de uma massa mais ou menos esférica e circunscrita. Já no envolvimento de mais de um

lobo observa-se um crescimento irregular da neoplasia, podendo formar a imagem da borboleta, vista em cortes coronais, que representa o crescimento tumoral nos dois hemisférios cerebrais separado pelo corpo caloso (Russel e Rubinstein,1989). A necrose central pode ocupar até 90% da massa tumoral e, quando existem cistos, seu interior contém um fluido que representa o tecido necrótico tumoral liquefeito. O tecido residual é geralmente acinzentado podendo apresentar áreas avermelhadas que representam hemorragias, usualmente pequenas (Graham e Lantos, 1997, Kleihues e Cavenee, 2000).

1.4.3. MICROSCOPIA

A histopatologia dos glioblastomas é extremamente variada necessitando para seu diagnóstico a presença de células gliais anaplásicas, alto índice mitótico e proliferação vascular e/ou necrose, entretanto a visualização de necrose e de hiper celularidade suscita o diagnóstico (Graham e Lantos, 1997, Russel e Rubintein,1989). O pleomorfismo celular inclui células gigantes e multinucleadas, granulares, indiferenciadas e lipidizadas. Um dos achados mais característicos é uma alta densidade de células pequenas e indiferenciadas acompanhadas de astrócitos neoplásicos fusiformes. As células fusiformes se dispõem lado a lado e direcionam seus prolongamentos para a área central da necrose formando a necrose em pseudo-paliçada, imagem típica dos glioblastomas. A presença das células fusiformes é diagnóstico de glioblastoma e sua prevalência nestes tumores é estimada em 83% (Russel & Rubinstein, 1998). As alterações vasculares são parte importante do diagnóstico microscópico (Barker et al, 1996). A proliferação endotelial, também chamada proliferação microvascular, comumente localizada nas proximidades da necrose, tem um papel na patogênese desta última através da trombose desses vasos neoformados e sua visualização justifica o diagnóstico de glioblastoma (Daumas-Duport et al, 1988, Kleihues et al, 1993). As mitoses, típicas ou atípicas, são

freqüentes e numerosas, apresentando-se geralmente em maior número ao redor do foco necrótico (Graham e Lantos, 1997).

1.5. DISSEMINAÇÃO E METÁSTASE

Os glioblastomas se caracterizam por apresentar uma rápida invasão às estruturas cerebrais adjacentes. O tumor pode estender-se do córtex até a cápsula interna, fórnix, comissura anterior e radiações ópticas tornando essas estruturas verdadeiras vias, permitindo a formação de novas massas tumorais no lado oposto do sítio primário. A extensão dentro e ao redor dos espaços perivasculares é bastante comum, porém a invasão do lúmen do vaso é infreqüente. Infiltração localizada de leptomeninges é seguida por uma firme união com a dura máter, resultando em uma pronunciada reação fibroblástica, que em algumas vezes, devido ao excesso de reticulina e fibras colágenas pode ser confundido com um fibrossarcoma, necessitando de estudo imunoistoquímico para sua diferenciação. A disseminação neoplásica através do epêndima dos ventrículos laterais e do terceiro ventrículo é infreqüente e é raro o desenvolvimento de metástases dentro do sistema ventricular e no espaço subaracnóide. A disseminação hematogênica a tecidos extraneurais, sem história de manipulação cirúrgica, é muito rara. Penetração da dura, seios venosos e osso é incomum (Berntein et al, 1995, Graham e Lantos, 2002, Hoffman, 1995, Kleihues e Cavenee, 2000;).

1.6. ALTERAÇÕES GENÉTICAS

Dentre todos os tumores de origem astrocítica o glioblastoma é o que contém o maior número de alterações genéticas. Achados comuns incluem a perda dos cromossomos 6, 10, 13 e Y e ganho de cromossomos 19 e 7, além de algumas anormalidades estruturais dos cromossomos 1 e 9 (Collins, 1998).

Diferentes vias genéticas levam o glioblastoma a um fenótipo final comum. A presença de subgrupos de glioblastoma tem sido postulada com base em diferentes combinações de mutações do P 53 , perda da heterozigidade dos cromossomos 17p e 10 e a amplificação do EGFR (Kleihues e Cavenee, 2000).

Glioblastomas Primários versus Secundários

De acordo com Von Deimling e colaboradores (1993), a amplificação do receptor de fator de crescimento epitelial (EGFR) ocorre geralmente em pacientes idosos, sem perda da heterozigidade do cromossomo 17p. Lang e colaboradores (1994), baseados em uma amostra de 65 tumores astrocísticos, caracterizaram os glioblastomas primários como tumores sem mutação do p53, mas apresentando amplificação do EGFR e perda da heterozigidade do cromossomo 10; e os glioblastomas secundários como neoplasias com mutação do p53 e perda da heterozigidade do cromossomo 17 p. Um estudo mais recente de Watanabe K. et al (1996) fortaleceu as afirmações acima, onde a mutação do p53 e a expressão do EGFR foram analisadas em biópsias de glioblastomas primários de pacientes com uma média de idade de 55 anos e história clínica menor que 3 meses, e em glioblastomas secundários com média de idade de 39 anos e evidência clínica e histológica de progressão de astrocitomas de baixo grau e anaplásicos. A análise do DNA seqüencial demonstrou que as mutações do p53 eram raras em glioblastomas primários (10%), mas freqüentes em glioblastomas secundários (71%). Em contraste, a imunorreatividade para EGFR predominou em glioblastomas primários (58%) e foi rara nos secundários (6%). Uma associação entre a amplificação do EGFR e a deleção do gene cinase dependente de ciclina N2a (CDKN2a) mapeado no cromossoma 9 p 21, também tem sido relatada (Hayashi et al,1999). Em suma, os glioblastomas primários ocorrem em pacientes mais velhos com aumento da expressão e amplificação do gene EGFR e também com mutações do gene supressor de tumor PTEN (MMAC1), localizado no cromossomo 10. Os glioblastomas secundários ocorrem em pacientes jovens e,

geralmente contém mutações do gene p53 como alteração mais precoce detectável (Kleihues et al, 1999).

1.7. FATORES DE PROLIFERAÇÃO E MORTE CELULAR

Proliferação

A atividade proliferativa é usualmente proeminente nos glioblastomas, verificando-se a presença de numerosas mitoses típicas e atípicas. A visualização das células em proliferação pode ser feita através de visualização morfológica das figuras mitóticas pela coloração usual da hematoxilina-eosina e também pela expressão de proteínas nucleares associadas à proliferação celular como o Ki-67 / MIB -1, através da técnica da imunohistoquímica (McCormick et al, 1993).

Ki-67/MIB-1

O anticorpo monoclonal Ki-67 foi desenvolvido durante estudos para reconhecer uma proteína nuclear nas células normais em proliferação e produzir um anticorpo nuclear específico para as células de Reed-Sternberg. O anticorpo, da classe IgG 1, encontra-se presente nos núcleos de células em proliferação durante todas as fases do ciclo celular (G1, G2, S e M) exceto na fase G0 (Burger et al, 1986)

A técnica imunohistoquímica para detecção do anticorpo Ki-67 é limitada pela necessidade de utilizar tecido congelado. O advento do anticorpo MIB-1 associado ao Ki-67 trouxe a vantagem de poder ser usado em tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina (McCormick, et al, 1993). Desde o desenvolvimento do anticorpo MIB-1, este tem sido bastante utilizado como marcador de proliferação celular em pacientes com tumores cerebrais (Grzybicki et al, 1999).

Nos glioblastomas o índice de proliferação celular determinado pelos anticorpos Ki-67/MIB-1, calculado pela divisão do número de células coradas pelo número de células totais, é bastante variável devido à heterogeneidade fenotípica deste tumor. Esta heterogeneidade resulta em uma enorme variabilidade intratumoral e intertumoral deste índice que pode ser de menos de 1% até 22% (Deckert et al, 1989, Kleihues e Cavenee, 2000)

Morte celular

Necrose

A necrose é considerada como produto final de uma injúria celular irreversível e é considerado um processo patológico passivo. Nos glioblastomas pode corresponder a mais de 80% da massa tumoral e sua origem correlaciona-se com um suprimento sanguíneo insuficiente. Ocasionalmente, vasos preservados com uma coroa de células viáveis são vistas no interior de extensas áreas necróticas, confirmando-se que esta necrose é de natureza isquêmica e está associada a um pior prognóstico (Burger, 1987, Kleihues e Cavenee, 2000).

Apoptose

A apoptose, ou morte celular programada, ao contrário da necrose, representa uma forma complexa e ativa de morte celular, onde células individuais são submetidas à auto-destruição sem, entretanto, danificar células vizinhas ou provocar qualquer reação inflamatória (Cummings et al, 1997; Soini et al, 1998).

Jonh Kerr em 1970 evidenciou este tipo de morte celular estudando fígado de ratos e a denominou necrose por contração. O termo apoptose foi sugerido por James Cormack, professor de grego clássico da Universidade de Aberdeen na Austrália, significando a queda de pétalas de flores ou das folhas de árvores no outono (Cummings et al, 1997, Kerr et al, 1972)

A apoptose ocorre em diferentes tecidos sob condições variadas. No SNC demonstram um importante papel durante o desenvolvimento embriológico, envolvendo um significativo número de células que varia de 20 até 80%, geralmente ocorrendo num estágio final da maturação neuronal (Oppenheim, 1991). Além de ocorrer em condições fisiológicas no período embrionário, a apoptose é vista em condições patológicas como doenças inflamatórias, degenerativas e está associada ao crescimento e progressão de neoplasias (Anderson et al, 1996; Linnik et al, 1996; Soini et al, 1998; Tews et al, 1999).

Três fases podem ser distinguidas na apoptose: fase de iniciação, fase efetora e fase de degradação (Susin et al, 1997). Na fase de iniciação há o recebimento do estímulo provocador do processo apoptótico. Um grande número de estímulos pode ser indutor de apoptose como agentes quimioterápicos, radiação γ e ultravioleta, calor, distúrbios osmóticos, altos níveis de cálcio, óxido nítrico (Thompson et al, 1995). A apoptose também é ativada e modulada por numerosos genes e suas proteínas como as caspases, Bax, Fas, Fas-L, p53 e fatores inibidores como Bcl-2. Todas estas proteínas e genes interagem entre si em um processo complexo que determina quais células irão viver ou morrer (Tews, 1999, Yin et al, 1997). A fase efetora representa o processo já ativado porém reversível e na fase de degradação não há mais um ponto de retorno havendo a destruição da célula (Soini et al, 1998, Susin et al, 1997).

A apoptose geralmente afeta uma célula ou um pequeno grupo de células de modo assincrônico. As mudanças microscopicamente detectáveis são a condensação da cromatina formando massas granulares dispostas ao longo da membrana nuclear das células, enrolamento dos contornos nuclear e celular e fragmentação do núcleo. Finalmente as células se desintegram em corpos apoptóticos delimitados por uma membrana que contém em seu interior restos nucleares. Histologicamente aparecem como massas ovaladas ou arredondadas, eosinofílicas e variam grandemente de tamanho. Após a formação dos corpos apoptóticos estes são rapidamente removidos por macrófagos circunvizinhos. A duração do processo de morte celular por apoptose depende do estímulo e do tipo de célula e usualmente é estimada variando de 12 a 24 horas. As mudanças morfológicas visíveis ocorrem nas últimas 2 a 3 horas e correspondem à fase de degradação (Cummins et al, 1997, Kerr et al, 1972, Schwartzman et al, 1993, Soini et al, 1998). Recentes avanços na biologia molecular levaram ao desenvolvimento de métodos enzimas-mediados de imunistoquímica que coram fragmentos finais de DNA em apoptose através do uso da DNA polimerase ou deoxinucleotidil terminal transferase (TUNEL) permitindo a visualização das células em

apoptose, mesmo em fases iniciais, que não seriam visualizadas pela hematoxilina-eosina (Moleur et al, 1998).

bcl-2

O gene de leucemia/linfoma de célula B, o bcl-2, foi primeiro identificado em estudos de patogênese do linfoma não- Hodgkin. Localizado no cromossomo 18 q 21, codifica uma proteína associada à membrana intracelular que confere uma maior sobrevivência aos linfócitos B por inibir a apoptose. Fisiologicamente, a proteína é expressa em linfócitos, tireóide e neurônios. Elevados níveis de proteínas expressadas pelo bcl-2 têm demonstrado conferir uma resistência celular a apoptose induzida por vários estímulos, incluindo apoptose induzida por proteínas do gene p53. Alguns membros desta família, entretanto, apresentam um papel pró- apoptótico, como o bax. O gene bcl-2 pode ser considerado uma barreira que delimita quais as células que irão viver ou morrer, inibindo a ação das caspases. Estas enzimas fazem parte da família das Enzimas Conversoras de Interleucina (ECI) e participam de todo o processo de apoptose ativando as DNases que levam à fragmentação cromossômica do DNA durante a apoptose (Ernari et al, 1998, Ellison et al, 1995, Han et al, 1996, Soini et al, 1998).

p53

O gene p53, localizado no cromossomo 17 p 13, tem funções como a produção do fator de ativação de transcrição e está envolvido no reparo de DNA, regulação do ciclo celular e iniciação de apoptose. Um papel central atribuído ao p53 é a regulação da expressão gênica de várias proteínas associadas à apoptose incluindo a ativação da Bax e Fas e a inibição do bcl-2. Anormalidades do gene p53 e suas proteínas anulam as ações acima descritas e podem levar a uma replicação de DNA alterado, promovendo a transformação neoplásica pela perpetuação do DNA danificado. Mutações de p53 estão presentes em uma variedade de tumores e muito tem-se pesquisado sobre o papel do p53 como um pró-oncogene ou um gene supressor do crescimento neoplásico (Ellison et al, 1992, Montenarh, 1992, Tews, 1999).

1.8. FATORES PROGNÓSTICOS

Os glioblastomas estão entre as neoplasias humanas mais malignas com uma média de sobrevida de menos de um ano. A presença e a extensão da necrose nos glioblastomas se correlacionam com o prognóstico e a área de necrose tende a ser menor em adultos jovens, refletindo um prognóstico mais favorável neste grupo de pacientes (Barker et al, 1996, Burger et al, 1987).

Os pacientes jovens, menores de 45 anos, têm um prognóstico melhor quando comparados aos idosos. Este fato pode ser explicado pela maior frequência de glioblastomas secundários em jovens (Burger et al, 1987). Shafqat et al (1999) sugerem que a progressão maligna é diretamente relacionada a uma idade mais avançada.

Há um consenso geral que o índice de proliferação celular MIB-1 e outros marcadores relacionados à proliferação são úteis para diferenciação entre os astrocitomas Grau II e III, mas têm pouco valor dentro da categoria dos glioblastomas para determinar, individualmente, prognósticos de pacientes (Heesters et al, 1999).

O índice de apoptose em glioblastomas como fator prognóstico ainda é controverso. Vários estudos demonstram que o índice apoptótico (IA) é maior nos glioblastomas que nos demais tumores astrocíticos, porém a presença do IA não influencia no prognóstico dos pacientes com glioblastoma (Carrol, 1997, Ellison et al, 1995, Heesters et al, 1999, Schiffer et al, 1995, Sipos et al, 1998).

O bcl-2 e proteínas da família bcl-2 são expressos em 40 a 100% de todos os tumores cerebrais. Nenhuma correlação definitiva, entretanto, entre o grau de apoptose, a presença de bcl-2 e a sobrevida de pacientes com glioblastoma têm sido comprovadas nos diversos estudos (Korshunov et al, 1999, Newcoomb et al, 1997, Newcoomb et al, 1998, Rieger et al, 1998, Rodriguez- Pereira et al, 2001).

O p53 é um dos oncogenes mais estudados. Análise de mutações ou aumento da expressão do p53 têm sido documentadas em tumores do SNC e são encontradas em até 75% de todas as neoplasias cerebrais. Os glioblastomas secundários são

geralmente positivos para mutações de p53, em contraste com os glioblastomas primários que são p53 negativos. Alguns estudos não observam correlação entre as mutações do p53 e a sobrevida dos pacientes (Cunninham, 1986, Newcoomb et al, 1998). Outros demonstram uma relação desfavorável entre as mutações do p53 e a sobrevida e existem ainda estudos sugerindo que as mutações do gene em tumores com alto grau de malignidade podem conferir um prognóstico mais favorável (Van Meyel et al, 1994).

Determinar a correlação entre apoptose, genes relacionados a este fenômeno como Bcl-2 e p53 e o prognóstico de pacientes com glioblastomas parece ser útil para o tratamento desta neoplasia quando utilizados agentes quimioterápicos, radioterápicos ou imunoterápicos, pois todas estas modalidades de tratamento incluem o fenômeno apoptose no seu mecanismo de ação (Deininger et al, 2000, Kaiser et al, 2000, Nieder, 2000).

OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é verificar algumas alterações genéticas dos glioblastomas através de análise imunoistoquímica e a presença de apoptose. Os objetivos específicos são:

- 1- Verificar a possível relação entre as alterações genéticas pesquisadas (bcl-2 e p53) e o índice proliferativo, através do MIB-1, com a presença de apoptose nos glioblastomas;
- 2- Verificar se existe um papel prognóstico e preditivo da apoptose, do índice mitótico através do MIB-1, da presença de bcl-2, p53 e idade nestes pacientes;
- 3- Verificar se existe uma relação entre as variáveis imunoistoquímicas pesquisadas e a idade dos pacientes.

BIBLIOGRAFIA

- 1- Anderson AJ, Su JH and Cotman C- DNA damage and apoptosis in Alzheimer disease: colocalization with c-Jun immunoreactivity, relationship to brain area, and effect of postmortem delay. *The Journal of Neuroscience* 1996, 16(5): 1710-1719.
- 2- Barker FG, Davis RL; Chang SM and Prados MD- Necrosis as a prognostic factor in glioblastoma multiforme. *Cancer* 1996, 77(6): 1161-66.
- 3- Bernstein JJ, Woodard CA- Glioblastomas cells do not intravasate into blood *Neurosurgery* 1995, 36: 124-32.
- 4- Bigner DD; McLendon R and Bruner MJ- Russel & Rubinstein- Pathology of tumours of the nervous system. 6th edition 1998 vol. 1 pag 427-451.
- 5- Burger PC; Shibata T and Kleihues P- The use of monoclonal antibody Ki-67 in the identification of proliferating cells. *Am J Surg Pathol* 1986, 10 (9): 611-616.
- 6- Burger PC and Green SB- Patient age, histologic features and length of survival in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer* 1987, 59: 1617-25.
- 7- Carrol R; Zhang J; ChautnceyB, et al- Apoptosis in astrocytic neoplasms. *Acta Neurochir* 1997, 139: 845-850.
- 8- Collins VP- Gliomas. *Cancer Surveys* 1998, 32: 37-51.
- 9- Cummings MC; Winterford CM and Walker NI- Apoptosis- *The American Journal of Surg Pathol* 1997, 21(1):88- 101.
- 10- Cunningham J; Kimmel D; Scheithauer B, et al- Analysis of proliferation markers and p53 expression in gliomas of astrocytic origin: relationships and prognostic value. *J Neurosurg* 1997, 86: 121-1.
- 11- Daumas-DuportC; Scheitauer B; O'Fallon J and Kelly F-Grading of astrocytomas. A simple and reproductive method. *Cancer* 1988, 62(10):2152-2165.

- 12- Deckert M; Reifenberger G and Wechler W- Determination of the proliferative potential of human brain tumors using the monoclonal antibody Ki-67. *J Cancer Res Clin Oncol* 1989; 115(2): 179-88.
- 13- Deininger MH; Grote E; Wickboldt J and Meyermann R- Distinct Radiochemotherapy protocols differentially influence cellular proliferation.... *Journal of Neuro-oncology* 2000, 48: 121-129.
- 14- Ellison DW; Gatter KC, et al- Expression of the p53 protein in a spectrum of astrocytic tumors. *Journal of Neuropathology* 1992, 168: 383-86.
- 15- Ellison DW; Steart PV; Gatter and Weller RO- Apoptosis in cerebral astrocytic tumours and its relation to expression of the Bcl-2, and p53 proteins. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 1995, 21:352-61.
- 16- Eng LJ; Vanderhaeghen JJ; Bignami A and Gestic B- An acid protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res* 1971; 28: 351-54.
- 17- Eng LJ and Rubinstein LJ- Contribution of immunohistochemistry to diagnostic problems of human cerebral tumors. *J Histochem Cytochem* 1978; 26: 513-522.
- 18- Ernari M; Sakarira H; Yokoyama H; Okawa K; Iwamatsu A and Nagata S. A caspase – activated Dnase that degrades DNA during apoptosis and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998, 391: 43-50.
- 19- Graham DI; Lantos PL- Greenfields Neuropathology, 6th edition, 1997. Vol 2 pag 606-15.
- 20- Graham, DI; Lantos PL- Greenfields Neuropathology 7th edition, 2002; vol 2 pag.
- 21- Grzybicki DM and Moore SA – Implications of prognostic markers in brain tumors. *Clinics in Laboratory Medicine* 1999; 19 (4): 833-47.
- 22- Han Z; Chatterjee D, et al- Isolation and characterization of an apoptosis resistant variant of human leukemia HL-60 cells that has switched expression from bcl-2 to bcl-xl. *Cancer Research* 1996, 56: 1621-8.

- 23- Hayashi y; Ueki K; Waha A; Wiestler OD; Louis DN; von Deiminling A. Association of E3GFR gene amplification and CDKN2 (p16/ MTS 1) gene deletion in glioblastoma. *Brain Pathology* 1997, 7:871-75.
- 24- Heesters MA; Koudstaal J; Go G and Moleenaar W- Analysis of proliferation and apoptosis in brain gliomas: prognostic and clinical value. *Journal of Neuro-oncology* 1999, 44: 255-66.
- 25- Kerr JFR; Wyllie AH and Currie AR- Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972, 26: 239-57.
- 26- Kaiser HE; Bodey B Jr; Siegel SE; Groger AM and Boley B- Spontaneous neoplastic regression: The significance of apoptosis. *In Vivo* 2000, 14: 773-88.
- 27- Kleihues P and Ohgari H- Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro-oncol* 1999, 1(1): 44-51.
- 28- Kleihues, P; Cavenee, WK- Pathology and genetics- Tumours of the Nervous System (International Agency for Research on Cancer- IARC). Lyon, 2000 pag. 29-39.
- 29- Korshunov A; GolanovA; Sycheva R and Pronin I- Prognostic value of tumor associated antigen immunoreactivity and apoptosis in cerebral glioblastomas : an analisys of 168 cases. *Journal of Clinical Pathology* 1999; 52:574-80.
- 26- Lang FF; Miller DC; Koslow M and Miller DC- Pathways leading to
- 30- Linnik MD- Role of apoptosis in acute neurodegenerativas disorders. *Restorative neurology and Neuroscience* 1996, 9:219-25.
- 31- Mc Cormick D; Chong H; Hobbs C, et al.- Detection of Ki-67 antigen in fixed and wax embedded sections with monoclonal antibody MIB-1. *Histopathology* 1993, 22: 355.
- 32- Montenarh M- Biochemical properties of growth suppressor/ oncoprotein p53. *Oncogene* 1992, 7: 1673-80.

- 33- Newcomb EW; Bhalla SK, Parrish CL, et al- Bcl-2 protein expression in astrocytomas in relation to patient survival and p53 gene status. *Acta Neuropathol* 1997, 94: 36.
- 34- Newcomb EW; Cohen H, Lee SR, et al- Survival of patients with glioblastoma multiforme is not influenced by altered expression of p16, p53, EGFR, MDM2 or bcl-2 genes. *Brain Pathology* 1998, 8: 655-67.
- 35- Nieder C; Petersen S; Petersen C and Thames HD- The challenge of p53 as prognostic and predictive factor in gliomas. *Cancer Treatment Reviews* 2000, 26: 67-73.
- 36- Oppenheim RW- Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 1991, 14: 453-501.
- 37- Osborn A. Diagnostic Neuroradiology. Mosby-Year Book 1994; pag. 541-44.
- 38- Rieger L; Weller M; Bornemann A, et al- BCL-2 family protein expression in human malignant glioma: a clinical pathological correlative study. *Journal of Neurological Sciences* 1998, 155: 68-75.
- 39- Rodriguez-Pereira C; Suarez JM; Barros F, et al- Analysis of 2 antiapoptotic factors in gliomas. *Archives of pathology and Laboratory Medicine* 2001, 125(2): 218-23.
- 40- Russel DS and Rubinstein LJ- Pathology of tumours of nervous system. 5th edition Baltimore: Williams and Wilkins, 1989; 83- 350.
- 41- Schiffer D; Cavalla P; Migheli A, et al- Apoptosis and cell proliferation in human neuroepithelial tumors. *Neuroscience Letters* 1995, 195: 81-84.
- 42- Scherer HJ- The forms of growth in gliomas and their practical significance. *Brain* 1940, 63: 1-35.
- 43- Schwartzman RA and Cidlowski JA- Apoptosis: The biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine Reviews* 1993, 14(2): 133-150.

- 44- Shafqat S; Hedley-White T and Henson JW- Age- dependent rate of anaplastic transformation in low-grade astrocytoma. *Neurology* 1999, 52:867-870.
- 45- Sipos L; Szegedi Z; Fedorczac I; Afra D and Szende B- Apoptosis and p53 expression in human gliomas. *Pathology Oncology Research* 1998, 4(4): 267-270.
- 46- Soini Y; Paaklo P and Lehto VP- Histopathological evaluation of apoptosis in cancer. *The American Journal of Pathology* 1998, 153: 1041-53.
- 47- Susin SA; Zamzami N; Castedo M, et al- The central executioner of apoptosis: multiple connections between proteases activation and mitochondria in fas/AB-1/ cd-95 and ceramide-induced apoptosis. *Journal of Experimental Medicine* 1997, 186: 25-37.
- 48- Tews DS- Cell death and oxidative stress in gliomas. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 1999, 25: 272-84.
- 49- Thompson CB- Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995, 267: 1456-62.
- 50- Van Meyel D; Ransay D; Casson A, et al- p53 mutations, expression, and DNA ploidy in evolving gliomas: evidence for two pathways of progression. *J Natl Cancer Inst* 1994, 86: 1001.
- 51- Von Deimling A; von Ammon K; Louis DN; Seizinger BR- Subsets of glioblastoma defined by molecular genetic analysis. *Brain Pathology* 1993, 3: 19-26.
- 52- Watanabe K; Tashibana O; Sato K- Overexpression of the EGF receptor and P 53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastoma. *Brain Pathol*, 1996, 6: 217-24.
- 53- Yin C; Knudson CM; Korsmeyer SJ, et al- Bax suppress tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo. *Nature* 1997, 385:637-40.

**O Papel da Apoptose, do Índice de Proliferação Celular, bcl-2 e p53 no
Prognóstico dos Glioblastomas**

Marlise de Castro Ribeiro, Lígia M. Barbosa Coutinho

**Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre e Hospital
Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre**

Endereço para correspondência:

Dra. Lígia M. Barbosa Coutinho

Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre

Rua Sarmiento Leite, 245, Porto Alegre, RS ,Brasil, CEP: 90050170

Fones: (51) 32284346

e-mail mfcoutnh@terra.com.br

RESUMO

O glioblastoma é o tumor neuroectodérmico mais comum e também o mais maligno. Muitas são as alterações genéticas encontradas nos glioblastomas, entre elas, a presença de oncoproteínas p53 e bcl-2, além de um elevado índice mitótico e a presença de apoptose. A utilidade desses achados, através da imunohistoquímica, no prognóstico dos pacientes ainda permanece incerta. Nossos objetivos neste estudo foram verificar a presença de apoptose, bcl-2, p53 e o índice proliferativo (MIB-1), através de imunohistoquímica, em 30 glioblastomas obtidos através de ressecção cirúrgica entre agosto de 2000 e agosto de 2001 e também as correlações entre estas variáveis imunohistoquímicas e a idade dos pacientes e o tempo de sobrevida. Também pesquisamos as correlações entre as variáveis imunohistoquímicas entre si. Para os cálculos de correlação utilizamos Correlação de Pearson e Spearman e a sobrevida foi calculada através do método de Kaplan- Meier. Resultados: Não houve correlação entre as variáveis imunohistoquímicas e o tempo de sobrevida. Também não houve correlação entre estas variáveis e as idades dos pacientes. Encontramos uma correlação inversa de grau moderado entre o índice apoptótico (IA) e o índice mitótico (IM) ($p= 0,058$) e também uma correlação inversa entre bcl-2 e IM. Conclusão: Nosso estudo não demonstrou nenhum dos achados imunohistoquímicos pesquisados como tendo um valor preditivo no prognóstico dos glioblastomas. Houve uma correlação inversa entre IA e IM, já demonstrada em alguns estudos e também uma correlação inversa entre bcl-2 e IM, achado que pode demonstrar um papel pró-apoptótico do bcl-2 neste grupo de tumores.

INTRODUÇÃO

O glioblastoma é a neoplasia maligna mais comum do sistema nervoso central, com um prognóstico de menos de 24 meses para a maioria dos pacientes. Poucos fatores prognósticos têm sido identificados nestes tumores, e, atualmente vários marcadores biológicos estão sendo pesquisados a fim de se observar fatores preditivos dos mesmos (Newcomb EW, et al 1998; Korshunov A, et al 1999)

A apoptose, ou morte celular programada, tem um papel importante no controle da proliferação celular em condições fisiológicas e patológicas. É de especial interesse o seu papel no desenvolvimento e progressão dos tumores cerebrais. A desregulação das vias genéticas que controlam a apoptose pode favorecer o crescimento e desenvolvimento do tumor. A apoptose é ativada e regulada por inúmeros genes e proteínas como p53, bcl-2, bax, entre outros. Sabe-se que o índice apoptótico (IA) costuma ser maior nos glioblastomas que nos demais tumores astrocíticos, porém sua relação com o prognóstico ainda é incerta (Ellison et al 1995, Heesters et al 1999, Korshunov et al 1999, Shiffer et al 1995).

O p53, um gene regulador da proliferação celular e um pró-apoptótico que está alterado em aproximadamente metade de todos os astrocitomas tem papel controverso no prognóstico dos glioblastomas (Cunningham et al 1997, Sipos et al 1998).

O bcl-2 e a família de proteínas bcl-2 são considerados, em sua maioria, anti-apoptóticos, conferindo uma sobrevida maior às células por impedir a morte celular. A expressão de bcl-2 em certos tipos de tumores tem sido relacionada ao prognóstico dos mesmos (Newcomb EW, et al 1997). Entretanto sua correlação prognóstica nos glioblastomas ainda é controversa (Ellison et al 1995, Nakasu et al 1994, Schiffer et al 1996).

O índice mitótico (IM), avaliado através do MIB-1 (Ki-67) demonstra-se útil na graduação dos astrocitomas, porém seu papel preditivo na sobrevida dos pacientes

com glioblastoma não foi confirmado (Ang et al 1994, Coons et al 1993, Heesters et al 1999), pois varia amplamente de 1 a 22%.

Neste estudo, pretendemos verificar a importância da realização de técnicas imunohistoquímicas nos glioblastomas, observando se a presença de genes alterados, como o p53 e o bcl-2, e a apoptose podem, de alguma forma, contribuir para um melhor entendimento e, conseqüentemente, um melhor tratamento desta neoplasia.

MATERIAL E MÉTODOS

População em estudo

Foram estudados trinta pacientes com idade superior a 18 anos submetidos à ressecção cirúrgica total de tumor cerebral nos hospitais São José, Beneficência Portuguesa e São Lucas da PUC e com diagnóstico anatomo-patológico de glioblastoma, entre agosto de 2000 e agosto de 2001, sem história de radioterapia, quimioterapia e/ou ressecção tumoral prévias. O seguimento foi contado a partir do primeiro dia da cirurgia até 12 meses após o procedimento. O conhecimento das datas de óbitos se deu através do atestado de óbito fornecido pelo órgão público responsável.

Imunoistoquímica

Foram estudadas 30 peças ressecadas e fixadas em formol e incluídas em parafina. Após foram cortadas na espessura de 5µm, desparafinadas e reidratadas para realização da técnica imunoistoquímica usando o método da Estreptoavidina-Biotina-Peroxidase para visualização da presença de p53, bcl-2 e Ki-67- Mib1. O material foi levado ao forno de microondas, a fim de reverter o efeito da fixação pelo formol, em solução tampão de citrato (pH 6.0) até a solução entrar em ebulição, quando foi reduzido a moderadas temperaturas e mantido por mais 15 minutos para manter-se em ebulição com paradas para repor líquido perdido quando necessário. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com metanol contendo 0,3% H₂O₂ por 30 minutos. Os cortes foram lavados com PBS. O material foi então incubado com anticorpos monoclonais primários e deixados por uma noite no refrigerador. Os anticorpos primários usados foram os seguintes: para p53 (D07, Dako) um anticorpo monoclonal de rato diluído em 1:500; para bcl-2 (Clone 124; Dako) também um anticorpo monoclonal de rato diluído em 1:400 e para Ki-67-Mib1 (Dako) um anticorpo monoclonal de rato em uma diluição de 1:2000. Após lavagem com PBS os cortes foram incubados com anticorpo secundário anti-rato durante 30 minutos em

temperatura ambiente, o complexo estreptoavidina-biotina-peroxidase por 30 minutos, com lavagens com PBS entre as etapas. A ligação antígeno-anticorpo foi visualizada com o cromógeno DAB e contra-corada com hematoxilina. Como controle positivo foi usado câncer de mama previamente positivo para p53 e KI-67/MIB-1 e linfonodo para BCL-2. A apoptose foi determinada através da técnica de TUNEL utilizando-se o kit Apoptag *plus* peroxidase *in situ* (S7101, Intergen). O material foi incubado com proteinase K por 10 minutos a temperatura ambiente e após foi bloqueada a peroxidase endógena com H₂O₂ por 5 minutos. Os reagentes contidos neste kit são designados para marcar o DNA 3' OH terminal livre *in situ* com nucleotídeos marcados. Os nucleotídeos contidos na reação tampão são enzimaticamente ligados ao DNA pela deoxynucleotidil transferase (TdT). A incubação com TdT é feita a 37 graus Celsius por 60 minutos e a enzima catalisa uma adição de nucleotídeos trifosfatos ao 3' OH final do DNA de fita dupla ou única. A partir daí os nucleotídeos incorporados formam um oligômero composto de digoxigenina em uma seqüência randomizada. Após há uma lavagem com solução tampão por 10 minutos e então é aplicado o anticorpo anti-digoxigenina e incubado em ambiente úmido por 30 minutos em temperatura ambiente. A detecção da ligação antígeno-anticorpo se faz através da imunoperoxidase seguido pelo cromógeno DAB. Como controle positivo foi utilizada próstata de rato castrado. A omissão da enzima Tdt durante a técnica de TUNEL foi usada como controle negativo e resultou na não coloração da lâmina.

Para visualização das células tumorais foram observados 10 campos de grande aumento (x 500), selecionando-se regiões centrais dos tumores e evitando-se áreas de necrose, através do programa de imagens Sigma Scan Pro 5. Para o cálculo de todos os índices utilizou-se a fórmula: número de células coradas/1000 células totais. Os cortes corados através de imunistoquímica podem ser vistos nas figuras 5 a 8.

Análise estatística

Inicialmente os dados quantitativos foram descritos por média e desvio padrão e os qualitativos por frequências absolutas e percentuais. Nas situações de assimetria

utilizamos a mediana e a amplitude interquartil (P25 e P 75). A estimativa de sobrevida foi descrita utilizando-se o método de Kaplan-Meier. Comparações de características entre os dois grupos (mortos e sobreviventes) foram feitas pelo teste de Qui-Quadrado (proporções), Teste t de Student (variáveis quantitativas simétricas) e Teste U de Mann-Whitney (variáveis quantitativas assimétricas). Para avaliação das associações entre os marcadores imunoistoquímicos, sobrevida e idade utilizamos o Coeficiente de Correlação de Pearson. Devido às distribuições assimétricas observadas, procedeu-se a transformação logarítmica em diversas variáveis. O nível de significância adotado foi de $\alpha = 0,05$. Os dados foram analisados com o auxílio dos programas SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 10.0 e SigmaPlot versão 7.0.

RESULTADOS

Como pode ser visto na tabela 1 há uma predominância do sexo masculino (70%), sendo que a média de idade dos pacientes foi superior a 55 anos. Não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos de pacientes mortos e sobreviventes. Tanto o índice de apoptose, como os outros marcadores imunoistoquímicos bcl-2, MIB-1 e p53, apesar de apresentarem algumas oscilações entre os grupos, não foram encontradas diferenças de relevância estatística (ver tabela 2). A curva de mortalidade (figura 1) apresentou uma ocorrência de óbitos relativamente constante e regular, sendo que no final de 12 meses, atingiu uma probabilidade estimada de sobrevida de somente 25%. A grande maioria dos coeficientes de correlação entre as variáveis representadas nas figuras 2,3 e 4 apresentaram força de associação trivial ou muito pequena com exceção ao MIB-1 que apresentou correlação inversa de grau moderado com o índice de apoptose e bcl-2.

Tabela 1: Variáveis demográficas em pacientes com diagnóstico de glioblastoma (n=30)

Variável	Valor
Sexo masculino, f (%)	21 (70.0)
Idade, anos	57.5±11.9

Os dados são apresentados como frequência (percentual) e média±desvio padrão

Tabela 2: Comparação de variáveis demográficas e imunoistoquímicas em pacientes mortos e sobreviventes com diagnóstico de glioblastoma

Variável	Mortos	Sobreviventes	P
	n=22	n=8	
Sexo masculino, f (%)	15 (68,2)	6 (75,0)	0,999
Idade, anos	59,5±12,3	51,9±9,0	0,122
Apoptose, %	7.5 (4.2 a 36.0)	5.0 (2.5 a 26.4)	0.344
Bcl-2	0.0 (0.0 a 11.8)	3.0 (0.0 a 13.9)	0.662
p53	0.0 (0.0 a 25.2)	2.2 (0.0 a 49.6)	0.629
MIB-1	20.5 (13.9 a 28.7)	29.7 (15.6 a 33.4)	0.202

Os dados são apresentados como frequência (percentual) e mediana e amplitude interquartil (P25 a P75)

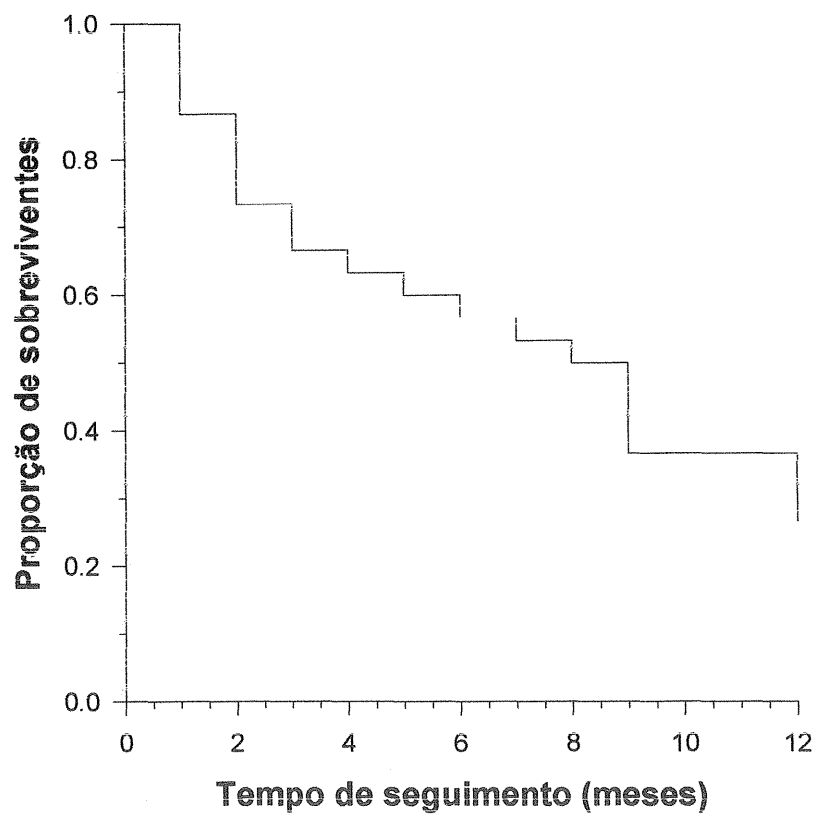


Figura 1: Curva de Kaplan-Meier representado a sobrevida de 30 pacientes com diagnóstico de glioblastoma.

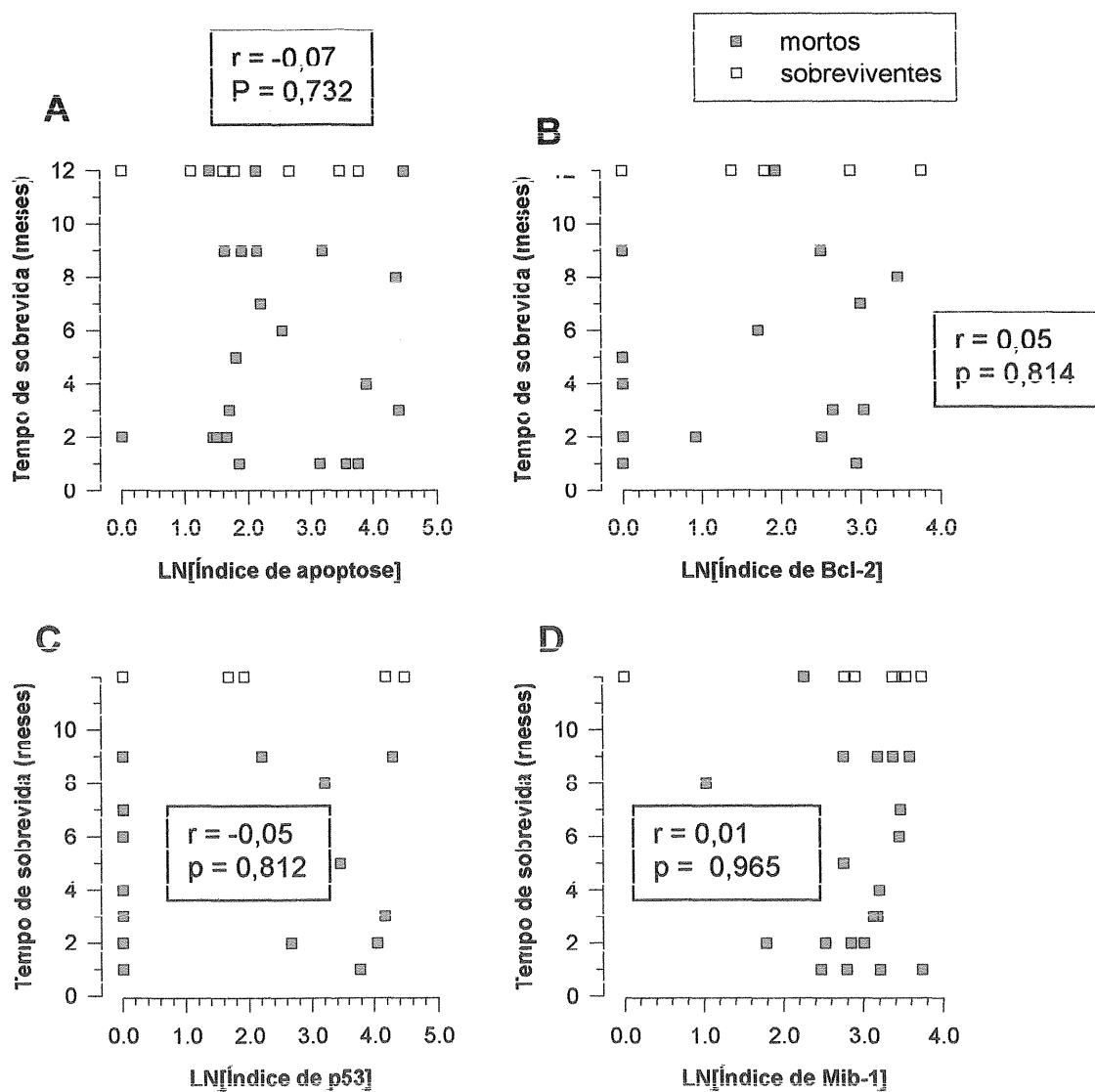


Figura 2: Gráficos de dispersão de pontos representando as correlações observadas entre o tempo de sobrevivida e variáveis imunohistoquímicas

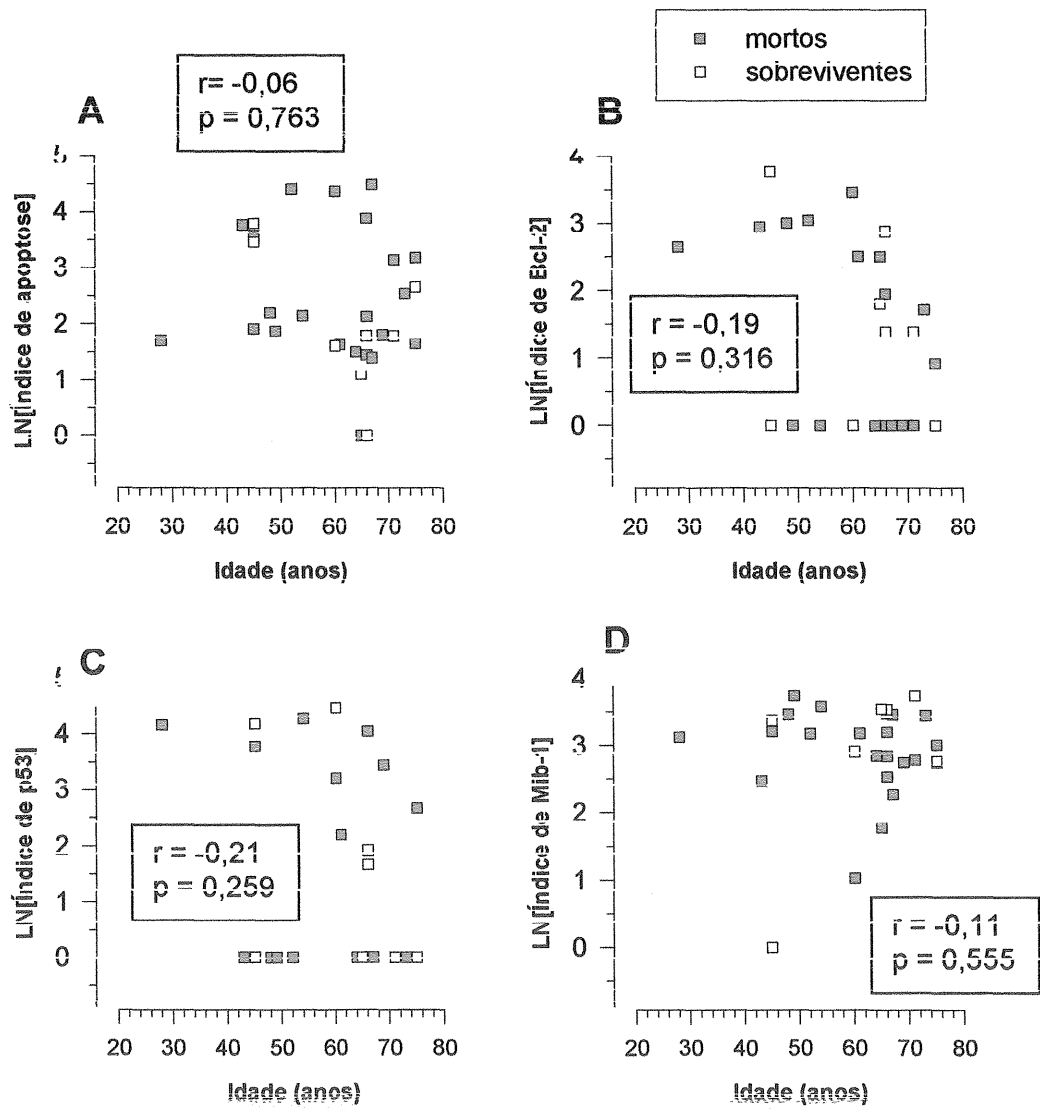


Figura 3: Gráficos de dispersão de pontos representando as correlações observadas entre a idade e variáveis imunoistoquímicas

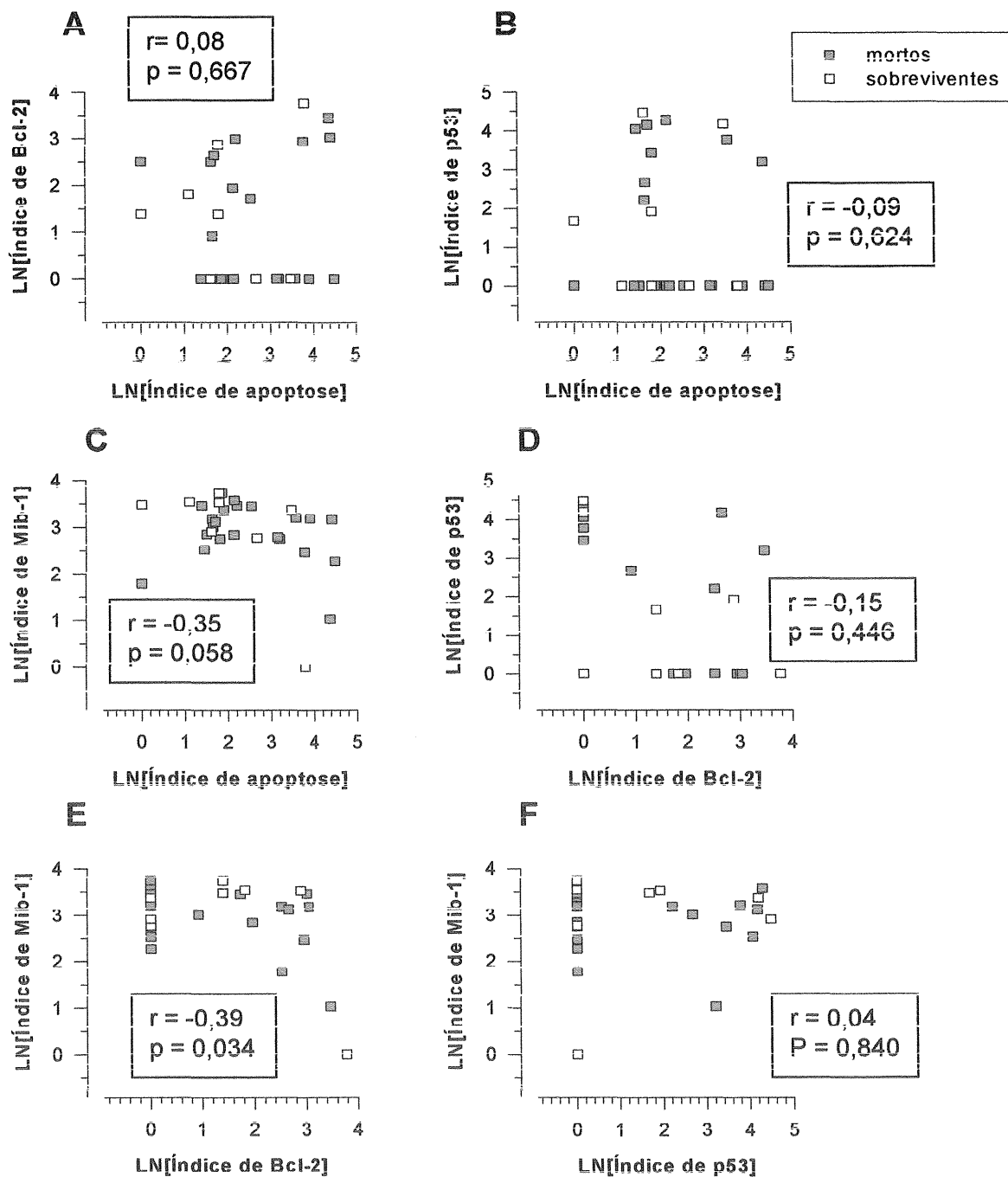


Figura 4: Gráficos de dispersão de pontos representando as correlações observadas entre as variáveis imunoistoquímicas entre si

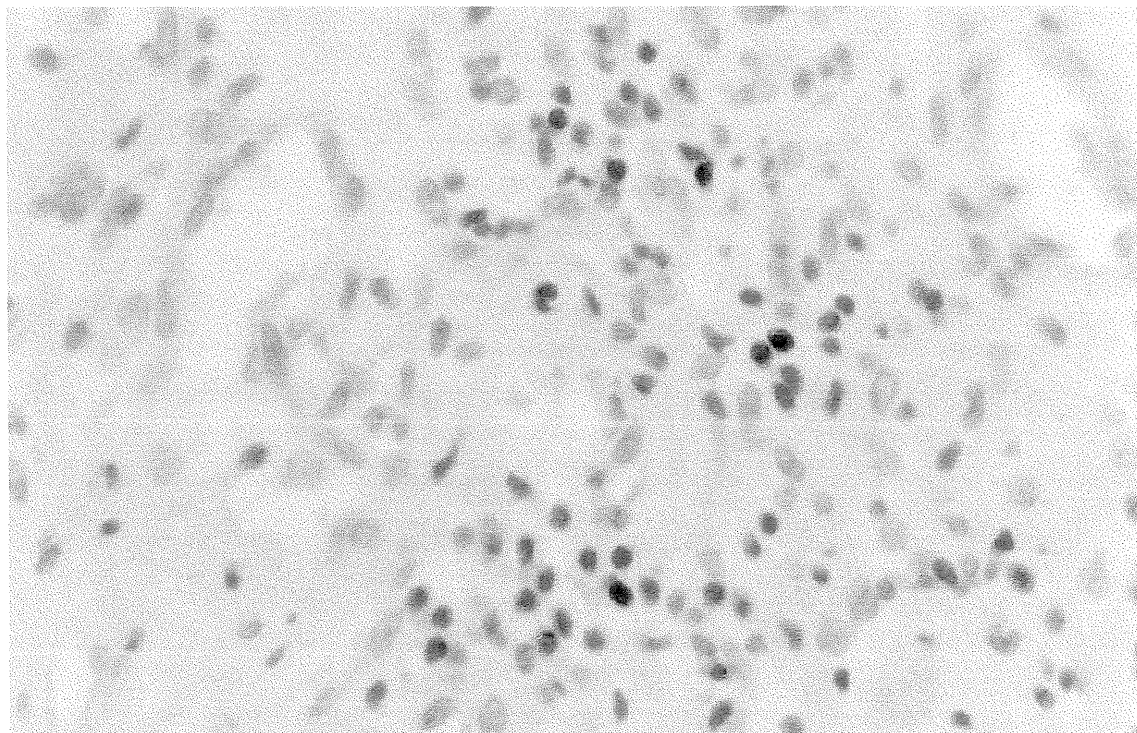


Figura 5 - Glioblastoma com imunohistoquímica positiva para BCL-2 (objetiva 20x)

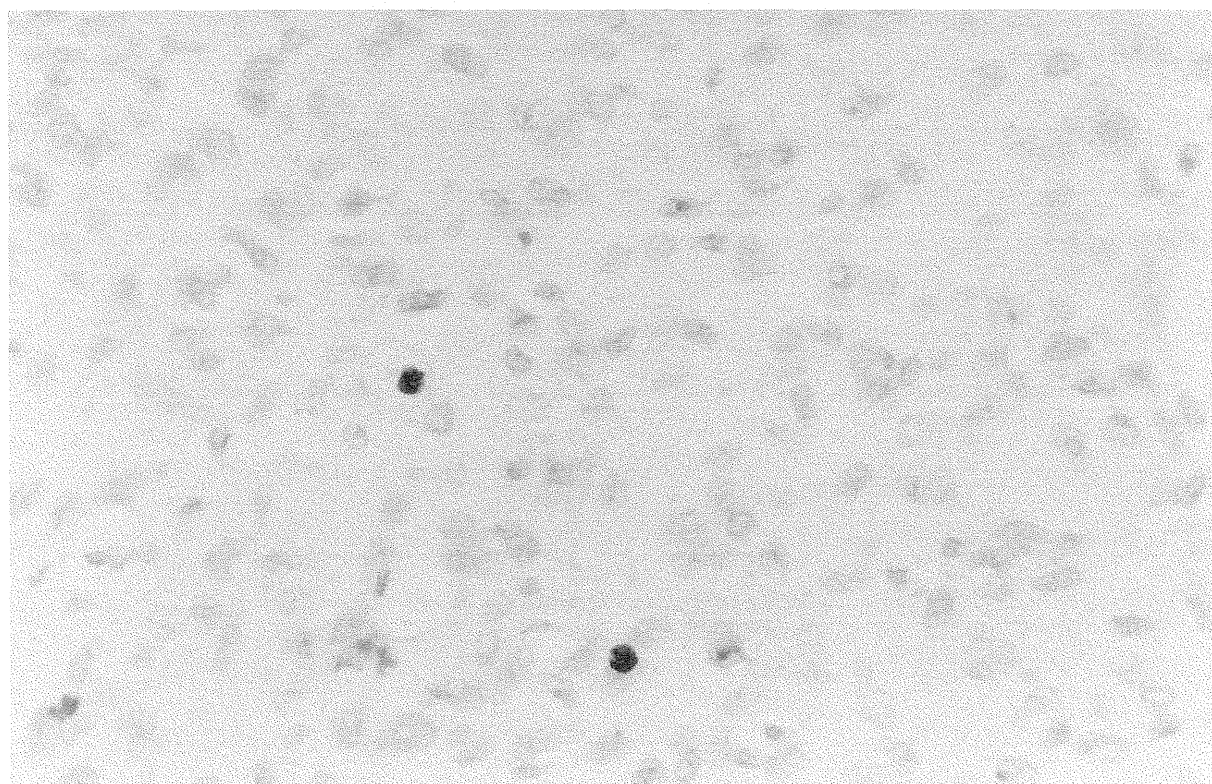


Figura 6 - Presença de células em apoptose em glioblastoma pela técnica de TUNEL (objetiva 20x)

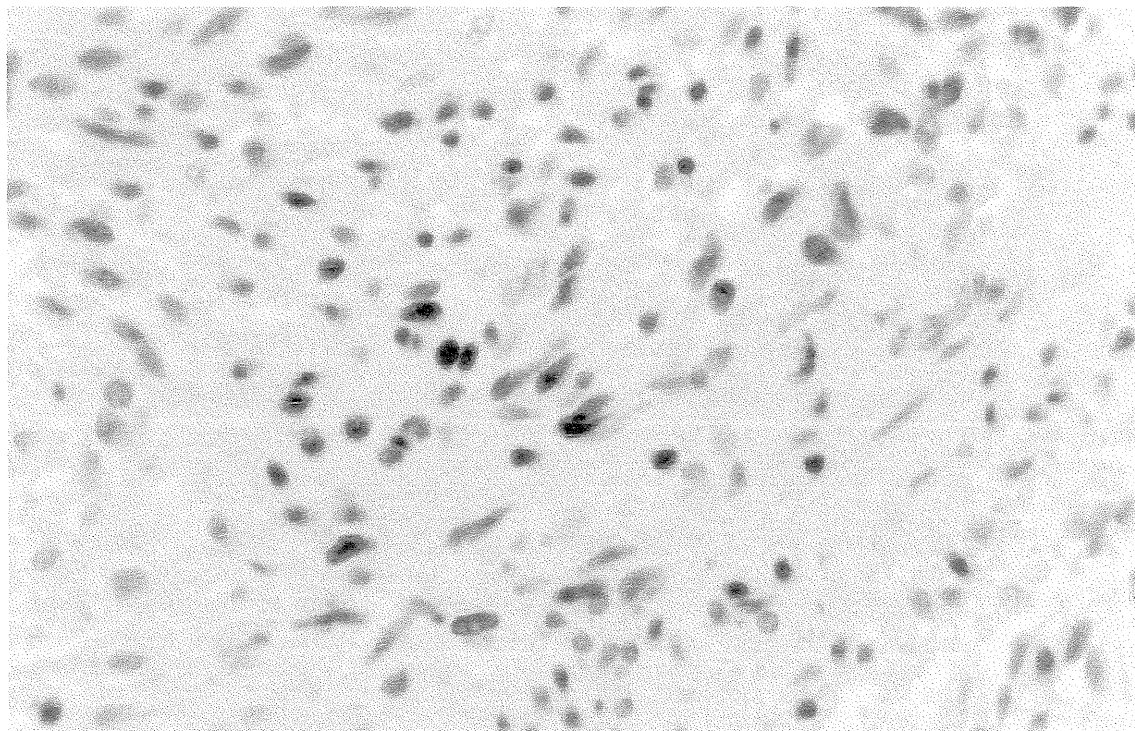


Figura 7 - Células positivas para p53 em glioblastoma, através da técnica de imunohistoquímica (objetiva 20x)

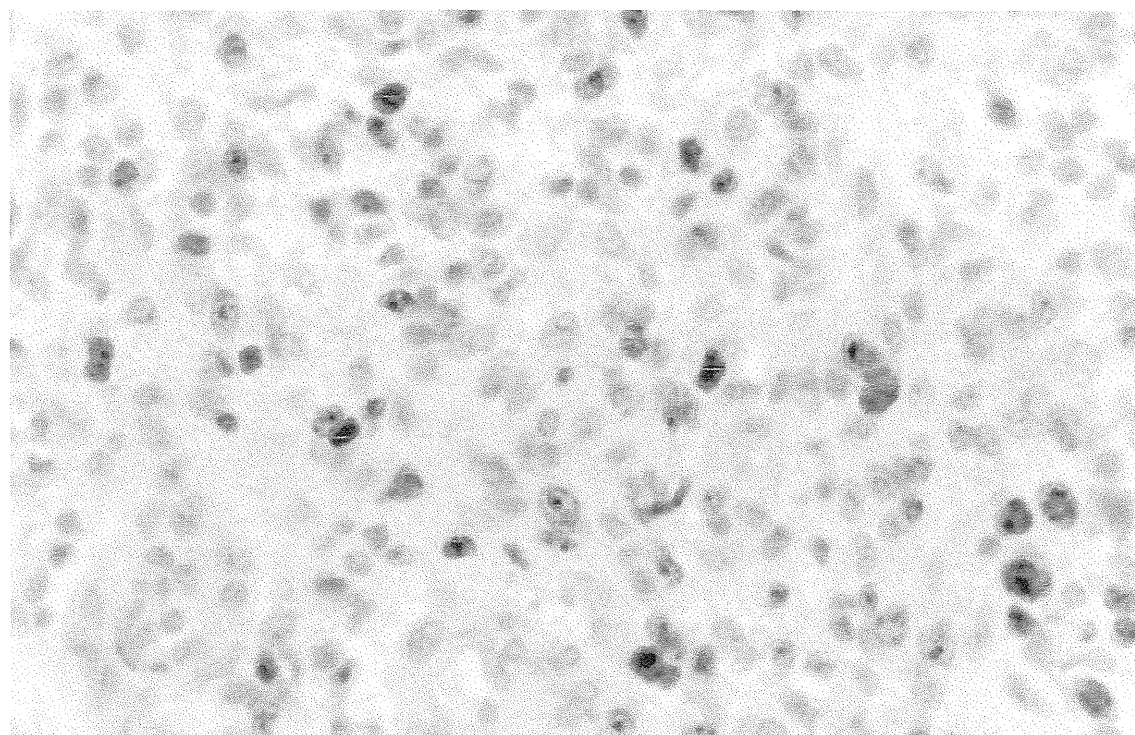


Figura 8 - Presença de células em proliferação celular MIB-1 (objetiva 20x)

DISCUSSÃO

Glioblastomas são um grupo de neoplasias que têm uma ampla variedade de achados histológicos e biológicos e, que no entanto, apresentam uma sobrevida homogênea de aproximadamente 1 ano. Até o presente, a idade no momento do diagnóstico (abaixo de 45 anos) é um dos poucos critérios de relevância para o prognóstico dos pacientes (Burger e Green, 1987, Salmon et al, 1994). No nosso estudo não houve diferença significativa entre as idades dos pacientes e o tempo de sobrevida (tabela 2). Notamos porém que houve uma tendência de os pacientes do grupo de óbitos apresentarem uma média de idade superior ao grupo dos sobreviventes (59,5 anos e 51,9 anos, respectivamente). Esta diferença provavelmente teria relevância estatística se o número amostral fosse maior. Também não notamos relação significativa entre a idade e as diferentes expressões das variáveis imunoistoquímicas, com já foi demonstrado em estudo prévio de Newcoomb et al, 1998 que não observaram relação entre a sobrevida de pacientes com glioblastoma e a expressão de p53, bcl-2, p16, EGFR e MDM2, os três últimos não estudados por nós. (figura 3).

A apoptose é uma forma ativa de morte celular que requer síntese de proteínas e macromoléculas e está associada com mudanças morfológicas distintas. A apoptose é um processo fisiológico importante para manter a homeostasia tecidual e eliminar células aberrantes (Reed et al, 1991, Carrol et al, 1997). Alguns estudos demonstram que o IA é maior nos glioblastomas que nos demais tumores astrocíticos. Ellison et al, 1995 observaram que o IA aumentava à medida que aumentava a anaplasia dos tumores astrocíticos, num total de 81 casos, sendo que 16 eram astrocitomas fibrilares, 19 anaplásicos e 46 glioblastomas. Carrol et al, 1997 estudaram um total de 59 casos de neoplasias astrocíticas e a presença de apoptose nestes tumores. Concluíram que os astrocitomas de baixo grau possuíam um IA menor que os astrocitomas anaplásicos e glioblastomas. Heesters et al (1999) também observaram

um maior IA nos glioblastomas que nos astrocitomas anaplásicos e não encontrou um papel prognóstico do IA na sobrevida destes pacientes. Tews (1999) estudando 46 gliomas, encontrou um IA maior nos glioblastomas que nos demais tumores astrocíticos e, assim como Heesters e colaboradores, não encontrou uma relação do IA com a sobrevida. Entretanto, Shiffer et al (1995) estudando 180 tumores neuroepiteliais humanos encontraram um IA menor em glioblastomas que nos demais gliomas mas, à semelhança de Heesters e Tews, não demonstraram um papel prognóstico da apoptose nestes tumores. Já Korshunov et al (1999) encontraram uma relação direta significativa entre o IA e a sobrevida de 168 casos de glioblastomas. Os nossos resultados não demonstraram correlação significativa entre apoptose e o tempo de sobrevida (figura 2).

A regulação da apoptose ocorre através de inúmeros mecanismos. Como parte deste complexo controle a proteína p53 é considerada pró-apoptótica. Entretanto, sua mutação, vista em processos neoplásicos, pode anular a sua condição de regulador de crescimento celular (Ellison et al, 1992, Symonds et al, 1994). Perda ou mutação do gene p53 têm sido detectadas em muitos gliomas e representam um evento precoce na origem dos astrocitomas (Van Meir et al, 1994). Cunningham et al (1997) analisaram 120 tumores gliais e observaram positividade para p53 em 85% dos casos, porém não encontraram relação entre a presença de p53 e o tempo de sobrevida. Kraus et al (2001) também não demonstraram uma relação entre a presença de p53 nos glioblastomas primários e o prognóstico dos pacientes. Jaros et al (1992) e Van Meyel et al (1994) demonstraram uma relação significativa entre a mutação do gene p53 e o acúmulo de sua proteína com um pior prognóstico em gliomas. Verificamos que não houve associação entre a presença de p53 e o tempo de sobrevida dos pacientes (figura 2), bem como relação entre p53 e a idade dos pacientes (figura 3), apesar de ser conhecida a associação entre p53 e uma idade menor de 45 anos nos chamados glioblastomas secundários (Kleihues e Ohgaki, 1999). Um número maior de estudos necessita ser feito para elucidar o papel das alterações gênicas do p53 nos

glioblastomas, estratificado por idade, pois sabemos que a presença do p53 é maior nos glioblastomas secundários, que são encontrados em pacientes mais jovens e, portanto, com prognóstico melhor.

Tem-se sugerido que o IM dos gliomas pode ter um valor preditivo no prognóstico dos mesmos (Cunningham et al, 1997, Kirkegaard et al, 1998). Ehrmann et al (1997), demonstrou uma relação entre a proliferação celular (medida pela expressão da proteína PCNA) e o prognóstico de 42 tumores astrocíticos. No estudo de Cunningham et al (1997), houve uma relação de prognóstico com os valores de MIB-1 e PCNA, que desapareceram após um ajuste para idade e graduação dos 120 tumores astrocíticos.

Outros estudos demonstram que, apesar de haver um aumento da proliferação celular com o aumento do grau de malignidade nos astrocitomas, não se demonstra claramente o valor prognóstico do IM nos glioblastomas (Heesters et al, 1999, Schiffer et al, 1997, Hsu et al, 1997). Observamos que não houve relação entre os índices de proliferação celular e o tempo de sobrevida, confirmando os achados dos estudos supracitados. Houve, no entanto, uma correlação inversa de moderada intensidade ($p= 0,058$) entre o IM e o IA também demonstrado por Heesters (1999). (figura 4)

O bcl-2, gene estabelecido com supressor de morte celular programada, não é encontrado em astrócitos normais dentro do córtex, substância branca ou cerebelo. Entretanto é detectado em mais da metade dos astrocitomas em adultos, como demonstrado por Ellison et al (1995) que encontraram a presença de bcl-2 em 44% dos astrocitomas fibrilares, 42% dos astrocitomas anaplásicos e 28% dos glioblastomas, por Rieger et al (1998), que em 20 glioblastomas acharam uma positividade de 70% para bcl-2 e por Newcomb et al (1997) que observaram 57% de positividade para bcl-2 em astrocitomas de 37 pacientes adultos e em 73% dos 21 casos pediátricos. O papel prognóstico da expressão do bcl-2 permanece incerto. Nós não conseguimos demonstrar uma relação significativa entre os índices de bcl-2 e a sobrevida, com já havia sido observado por Nakasu et al (1994), Newcomb et al

(1997) e Newcomb et al (1998) (figura 2). Verificamos, porém uma correlação inversa estatisticamente significativa ($p= 0,034$) entre o índice de bcl-2 e o índice de proliferação celular (figura 4) . Esse resultado pode indicar um papel maior do bax, integrante da família bcl-2 com função pró-apoptótica, neste grupo de tumores, porém necessitam-se estudos futuros para esclarecer esse achado.

Nosso estudo teve limitações no que se refere à verificação de fatores prognósticos importantes nos glioblastomas como a quantificação da massa tumoral ressecada por exame de imagem pré e pós-operatórios, a condição clínica do paciente no momento pré e pós cirúrgico através de exame clínico e neurológico e o tempo de evolução da doença até o momento diagnóstico, que é um dos critérios para classificação entre glioblastomas primários e secundários.

Conclusão

Podemos observar no nosso estudo a correlação inversa entre o IA e o IM sugerindo que a presença de apoptose pode impedir o crescimento tumoral, apesar de não haver sido demonstrado uma relação significativa entre a presença de apoptose e o tempo de sobrevida. Também vemos uma relação inversa entre o índice de bcl-2 e o IM. Não encontramos dados semelhantes na literatura, desta forma, estudos posteriores necessitam ser feitos para confirmar este achado. Em nosso estudo nenhum dos fatores pesquisados foi relevante para o prognóstico dos pacientes, porém como já foi discutido, houve uma tendência do grupo de pacientes com idade menor de 45 anos ter uma sobrevida maior. Além disso, podemos concluir que o fenômeno da apoptose nos glioblastomas depende de vias genéticas bastante complexas, independentes do p53 e bcl-2, já que não houve relação entre estes genes e a presença de apoptose.

BIBLIOGRAFIA

1. Burger PC and Green SB. Patient age, histological features and length of survival in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer* 1987; 59: 1617-25
2. Carroll RS, Zhang J, Chauncey BW, et al. Apoptosis in astrocytic neoplasms. *Acta Neurochir (Wien)* 1997; 139: 845-50
3. Cunningham JM, Kimmel DW, Schethauer BW et al. Analysis of proliferation markers and p53 expression in gliomas of astrocytic origin: relationships and prognostic value. *J Neurosurg* 1997; 86:121-30.
4. Ellison DW, Steart PV, Gatter KC and Weller RO. Apoptosis in cerebral astrocytic tumours and its relationship to expression of bcl-2 and p53 proteins. *Neuropathol Applied Neurobiol* 1995; 21: 352-61.
5. Erhmann J Jr, Kolar Z, Vojtesek B, et al. Prognostic factors in astrocytomas: relationship of p53, MDM-2, bcl-2 and PCNA immunohistochemical expression to tumor grade and overall patient survival. *Neoplasma* 1997; 44: 299-304.
6. Heesters MA, Koudstaal J, GO KG and Molenaar WM. Analysis of proliferation and apoptosis in brain gliomas: Prognostic and clinical value. *J Neuro Oncol* 1999; 44: 255-266.
7. Hsu DW, Louis DN, Efird JT, Hedley ET. Use of MIB-1 (Ki-67) immunoreactivity in differentiating grade II and grade III gliomas. *J Neuropathol Exp Neurobiol* 1997, 56-8: 857-865.
8. Jaros E, Perry RH, Adam L, et al. Prognostic implications of p53 protein, epidermal growth factor receptor and ki-67 labelling in brain tumors. *Cancer* 1992; 66: 373-85.
9. Kraus JA, Wengoefer M, Giesmann N, et al. TP53 gene mutations, nuclear p53 accumulation, expression of Waf/p21, bcl-2 and CD95 proteins are not prognostic factors in de novo glioblastoma. *J Neurooncol* 2001; 52(3): 263-72

10. Kirkegaard LJ, DeRose PB, Yao B, Cohen C. Image cytometric measurement of nuclear proliferation markers (MIB-1, PCNA) in astrocytomas. Prognostic significance. *Am J Clin Pathol* 1998; 109 (1): 69-74
11. Kleihues P, Ohgaki H. Primary and secondary glioblastoma: from concept to clinical diagnosis. *Neuro- Oncol* 1999; 1: 44-51.
12. Korshunov A, Golanov A, Sycheva R, et al. Prognostic value of tumor associated antigen immunoreactivity and apoptosis in cerebral glioblastomas: an analysis of 168 cases. *J Clin Pathol* 1999; 52: 574-80.
13. Nakasu S, Nakasu Y, Nioka H, et al. bcl-2 protein expression in tumors of central nervous system. *Acta Neuropathol* 1994; 88: 520-26.
14. Newcomb EW, Bhalla SK, Parrish CL, et al. bcl-2 protein expression in astrocytomas in relation to patient survival and p53 gene status. *Acta Neuropathol* 1997; 94: 369-375.
15. Newcomb EW, Cohen H, Lee SR, et al. Survival of patients with glioblastoma is not influenced by altered expression of p16, p53, EGFR, MDM2 or bcl-2 genes. *Brain Pathol* 1998; 8: 655-667.
16. Reed JC, Meister L, Tanaka S, et al. Differential expression of bcl-2 protooncogene in neuroblastomas and others tumor cells lines of neural origin. *Cancer Res* 1991; 51: 6529-6538.
17. Rieger L, Weiler M, Bornemann A, et al. bcl-2 family protein expression in human malignant glioma: a clinical pathological correlative study. *J Neurol Sci* 1998; 155: 68-75
18. Salmon I, Dewitte O, Pasteels JL, et al. Prognostic scoring in adult astrocytic tumors using patient age, histopathological grade and DNA histogram type. *J Neurosurg* 1994; 80: 877-883.
19. Schiffer D, Cavalla A, Migheli A, et al. Apoptosis and cell proliferation in humans neuroepithelial tumor. *Neurosc Letters* 1995; 195: 81-84.

20. Schiffer D, Dutto A, Cavala P, et al. Prognostic factor in oligodendroglioma. *Can J Neurol Sci* 1997; 24-4: 313-17.
21. Symonds H, Drall L, Remington L, et al. p53 dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression in vivo. *Cell* 1994; 78:703-11.
22. Tews DS. Cell death and oxidative stress in gliomas. *Neuropathol Applied Neurobiol* 1999; 25: 272-84.
23. van Meyel DJ, Ramsay DA, Casson AG, et al. Pattern of mutant p53 expression and DNA ploidy in evolving gliomas. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 1011-1017.
24. Van Meir EG, Kikuchi T, Tada M, et al. Análisis of the p53 gene and its expression in human glioblastomas cell. *Cancer Res* 1004; 54: 649-52

The Role of Apoptosis, Cell Proliferation Index, bcl-2, and p53 in Glioblastoma Prognosis

Marlise de Castro Ribeiro, Lígia M. Barbosa Coutinho

**Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre and Hospital Santa Casa de
Misericórdia de Porto Alegre**

Mailing Address:

Dr. Lígia M. Barbosa Coutinho

**Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre
Rua Sarmiento Leite, 245, Porto Alegre, RS, Brazil, ZIP CODE: 90050170**

Phone #: (51) 32284346

e-mail: mfcouth@terra.com.br

ABSTRACT

Glioblastoma is the most common neuroectodermic tumor. It is also the most malignant. Many genetic changes are found in glioblastomas, among them, the presence of oncoproteins p53 and bcl-2, as well as a high mitotic level and the presence of apoptosis. The utility of such findings through immunohistochemistry for the prognosis of patients remains uncertain. Our objectives in this study were to verify the presence of apoptosis, bcl-2, p53, and the proliferative index (MIB-1), through immunohistochemistry, in 30 glioblastomas obtained by surgical resection between August, 2000 and August, 2001, as well as correlations between those immunohistochemical variables and the patient's age and survival time. Correlations between immunohistochemical variables themselves were also examined. For correlation calculations, Pearson's and Spearman's correlations were used and the time of survival was calculated with the Kaplan-Meier method. Results: No correlation was found between immunohistochemical variables and survival time. There was also no correlation between those variables and the patients' age. A moderate inverse correlation was found between the apoptotic index (AI) and the mitotic index (MI) ($p = 0.058$), besides a inverse correlation between bcl-2 and MI. Conclusion: Our study has not demonstrated any of the examined immunohistochemical findings as having a predictive value in the prognosis of glioblastomas. A reverse correlation was found between AI and MI, which has already been demonstrated by a few studies, as well as a inverse correlation between bcl-2 and MI. This finding can demonstrate bcl-2 as having a pro-apoptotic role in this group of tumors.

INTRODUCTION

Glioblastoma is the most common malignant neoplasia of the central nervous system, with a prognosis of less than 24 months for most patients. Few prognostic factors have been identified in such tumors. Several biological markers are currently under research, in order to verify their predictive factors (Newcomb EW, et al 1998; Korshunov A, et al 1999).

Apoptosis, or programmed cell death, plays an important role in cell proliferation control in physiological and pathological conditions. Such role has special interest for brain tumor development and progression. The deregulation of genetic pathways controlling apoptosis can favor growth and development of a tumor. Apoptosis is activated and regulated by a number of genes and proteins, such as p53, bcl-2, and bax, among others. The apoptotic index (AI) is known to usually be higher in glioblastomas than in other astrocytic tumors, but its relationship with prognosis is still uncertain (Ellison et al 1995, Heesters et al 1999, Korshunov et al 1999 Shiffer et al 1995).

P53, a cell proliferation regulating gene, and a pro-apoptotic which is altered in as much as half of all astrocytomas, has a controversial role in glioblastoma prognosis (Cunningham et al 1997, Sipos et al 1998).

Bcl-2 and the bcl-2 protein family are mostly considered anti-apoptotics, providing cells with a longer time of survival by preventing cell death. bcl-2 expression in some tumors has been related to their own prognosis (Newcomb EW, et al 1997). However, its prognostic correlation in glioblastomas is still controversial (Ellison et al 1995, Nakasu et al 1994, Shiffer et al 1996).

The mitotic index (MI), assessed through MIB-1 (Ki-67), has proven useful in astrocytoma gradation, though its predictive role in glioblastoma patient survival has not

been confirmed (Ang et al 1994, Coons et al 1993, Heesters et al 1999), as it exceeding ranges from 1 to 22%.

In this study, it was intended to verify the importance of conducting immunohistochemical techniques on glioblastomas, noting if the presence of altered genes, such as p53 and bcl-2, as well as apoptosis, can, in any way, contribute to a better understanding and, consequently, a better treatment for such neoplasia.

MATERIAL AND METHODS

Study Population

Thirty patients with ages above 18 were studied. They had all received an anatomic-pathological diagnosis of glioblastoma, and were submitted to total surgical resection of the brain tumor at São José, Beneficência Portuguesa, and PUC's São Lucas hospitals between August, 2000 and August, 2001. Neither patient presented a history of radiotherapy, chemotherapy, and/or previous tumor resection. The time of survival was counted from day one – surgery – until 12 months after the procedure had taken place. Death dates were known through death certificates supplied by the responsible state agency.

Imunohistochemistry

Thirty dried-up, buffered in formalin, and embedded in paraffin-set pieces were studied. They were cut to 5 μ m, deparaffined, and rehydrated for the immunohistochemical technique, by using the Estreptoavidin-Biotin-Peroxidase method for visualizing the presence of p53, bcl-2 and Ki-67-Mib1. The material was placed in a microwave oven, in order to revert the effect of formaldehyde fixation, within a citrate buffer solution (pH 6.0)

until boiling, when the temperature was reduced and kept moderately boiling for another 15 minutes, with stops for replenishing the lost liquid if necessary. The endogenous peroxidase activity was blocked with methanol containing 0.3% H₂O₂ for 30 minutes. The tissue were rinsed with PBS. The material was then incubated with primary monoclonal antibodies and rested overnight in the fridge. Primary antibodies used were: for p53 (D07, Dako), a 1:500-diluted mouse monoclonal antibody; for bcl-2 (Clone 124, Dako), also a mouse monoclonal antibody, diluted as 1:400, and for Ki-67-Mib1 (Dako), a mouse monoclonal antibody diluted as 1:2000. After rinsing with PBS, cuts were incubated with a secondary mice antibody for 30 minutes at room temperature, the estreptoavidin-biotin-peroxidase complex for 30 minutes, undertaking a PBS rinsing between each step. The antigen-antibody complexe was visualized with the cromogen DAB and counterstained with hematoxylin. As a positive control, previously positive breast cancer was used for p53 and Ki-67/MIB-1 and lymph node for bcl-2. Apoptosis was determined through the TUNEL technique, using the Apoptag *plus* peroxidase *in situ* kit (S7101, Intergen). The material was incubated with K proteinase for 10 minutes at room temperature and after that, endogenous peroxidase was blocked with H₂O₂ for 5 minutes. The reagents in this kit are designated to mark the free DNA 3' OH terminal *in situ* with marked nucleotides. Nucleotides contained in the buffer reaction are enzymately connected to DNA by deoxynucleotidil transferase (TdT). Incubation with TdT is conducted at 37° Celsius for 60 minutes and the enzyme catalyzes an addition of triphosphate nucleotides to the final 3' OH of the double- or single-helix DNA. Thereafter, incorporated nucleotides form an oligomer formed randomly by digoxigenin. After that, rinsing with buffer solution is conducted for 10 minutes and then the anti-digoxigenin antibody is applied and incubated in a damp environment for 30 minutes at room temperature. Detection of the antigen-antibody link is made through imunoperoxidase followed by DAB cromogen. As a positive

control, castrated mice prostate was used. The omission of TdT enzyme during the TUNEL technique was used as a negative control and resulted in the non-coloring of the plate.

For visualizing the tumor cells, 10 fields were used with high-magnification (x 500), selecting central tumor regions, and avoiding necrosis areas, through the Sigma Scan Pro 5 imaging program. For calculating all the indexes, the following formula was used: number of stained cells/1000 total cells. Immunohistochemistry-stained cuts can be seen in Figures 5 to 8.

Statistical Analysis

Initially, quantitative data were described by using mean and standard deviation, and qualitative ones through absolute and percent frequencies. In asymmetry cases, median and interquartile amplitude (P25 and P75) were used. The survival estimate was described by using the Kaplan-Meier method. Feature comparison between both groups (dead and surviving patients) was conducted through chi-square (proportions), t-Student (symmetrical quantitative variables), and Mann-Whitney's U (asymmetrical quantitative variables) tests. For assessing the associations between immunohistochemical markers, survival time, and age, the Pearson's Correlation Coefficient was used. Due to the observed asymmetrical distributions, the logarithmic transformation was conducted for several variables. The adopted significance level was $\alpha = 0.05$. Data were analyzed with the help of SPSS 10.0 (Statistical Package for the Social Sciences) and SigmaPlot 7.0 programs.

RESULTS

As it can be seen in Table 1, there is a predominance of males (70%), the patient average age being over 55. Significant differences between groups of dead and surviving patients were not detected. The apoptosis index, as well as the other immunohistochemical markers, bcl-2, MIB-1, and p53, in spite of presenting some oscillation between both groups, did not present statistically relevant differences (see Table 2). The death curve (Figure 1) showed a relatively constant and regular death occurrence. After 12 months, it reached a survival estimated probability of only 25%. Most correlation coefficients between variables represented in Figures 2, 3, and 4 presented a trivial or very small association power, except for MIB-1, which presented a moderately reverse correlation with the apoptosis index and bcl-2.

DISCUSSION

Glioblastomas are a group of neoplasias which show a broad range of histological and biological findings and, in spite of that, present a homogeneous survival of approximately 1 year. So far, the age at the time of diagnosis (below 45 years) is one of the few relevant criteria for patient prognosis (Burger and Green, 1987, Salmon et al, 1994). In our study, no significant difference was found between patient age and survival time (Table 2). We did note, however, a tendency of the dead patient group for presenting a higher age average than the survival group (59.5 and 51.9 years, respectively). Such difference would probably have statistical relevance if the sample were larger. A significant relationship between age and the different expressions in histochemical variables was not verified either, as already demonstrated in a previous study by Newcomb et al, 1998, who did not observe a relationship between glioblastoma patient survival and p53, bcl-2, p16, EGFR, and MDM2 expression, the last three not having been studied by us (Figure 3).

Apoptosis is an active form of cell death, requiring protein and macromolecule synthesis. It is associated with distinct morphological changes. Apoptosis is an important physiological process for maintaining tissue homeostasis and eliminating aberrant cells (Reed et al, 1991, Carrol et al, 1997). Some studies have demonstrated that the AI is higher in glioblastomas than in other astrocytic tumors. Ellison et al, 1995 observed that the AI increased with an increase in astrocytic tumor anaplasia in 81 cases, of which 16 were fibrillary astrocytomas, 19 were anaplastic astrocytomas, and 46 were glioblastomas. Carrol et al, 1997 studied a total of 59 cases of astrocytic neoplasias and the presence of apoptosis in those tumors. They concluded that low-graded astrocytomas possessed a lower AI than anaplastic ones and glioblastomas. Heesters et al (1999) also observed a higher AI in glioblastomas than in anaplastic astrocytomas, and did not find a prognostic role of AI in those patients' survival. Tews (1999), studying 46 gliomas, found a higher

AI in glioblastomas than in other astrocytic tumors, and, like Heesters and collaborators, did not find a relationship between AI and time of survival. However, Shiffer et al (1995), studying 180 human neuroepithelial tumors, found a lower AI in glioblastomas than in other gliomas. But, as Heesters and Tews, could not demonstrate a prognostic role of apoptosis in such tumors. Yet, Korshunov et al (1999) found a significant direct relationship between AI and survival in 168 cases of glioblastomas. Our results have not demonstrated a significant correlation between apoptosis and survival time (Figure 2).

The regulation of apoptosis takes place through a number of mechanisms. As a part of such a complex control, the p53 protein is considered pro-apoptotic. However, its mutation, verified in neoplastic processes, can nullify its cell-growth-regulating condition (Ellison et al, 1992, Symonds et al, 1994). Loss or mutation in the p53 gene has been detected in many gliomas and represent an early event in the origin of astrocytomas (Van Meir et al, 1994) Cunningham et al (1997) analyzed 120 glial tumors and observed p53 positivity in 85% of the cases, but have not found a relationship between the presence of p53 and survival time. Kraus et al (2001) have also not demonstrated a relationship between the presence of p53 in primary glioblastomas and the prognosis of the patients. Jaros et al (1992) and Van Meyel et al (1994) have demonstrated a significant relationship of the mutation of p53 gene and the accumulation of its protein to a worse prognosis in gliomas. We verified that there was no association between the presence of p53 and patients' survival time (Figure 2), as well as a relationship between p53 and the patients' age (Figure 3), though the association between p53 and an age lower than 45 is known in so-called secondary glioblastomas (Kleihues & Ohgaki, 1999). A greater number of studies need to be conducted in order to clarify the age-stratified role of p53 gene alterations in glioblastomas, as it is known that the presence of p53 is greater in secondary glioblastomas, which are found in younger, and therefore, better-prognosis patients.

It has been suggested that the MI of gliomas can have a predictive value in their own prognosis (Cunningham et al, 1997, Kirkegaard et al, 1998). Ehrmann et al (1997) demonstrated a relationship between cell proliferation (as measured by the PCNA protein expression) and the prognosis of 42 astrocytic tumors. In the study by Cunningham et al (1997), there was a prognostic relationship with MIB-1 and PCNA values, which disappeared after an adjustment was made for age and gradation of the 120 astrocytic tumors.

Other studies have demonstrated that, in spite of an increase in cell proliferation along with the increase in the malignancy degree of the astrocytomas, the prognostic value of MI is not clearly demonstrated in glioblastomas (Heesters et al, 1999, Schiffer et al, 1997, Hsu et al, 1997). It has been observed that there was no relationship between the indexes of cell proliferation and the time of survival, confirming findings from previously mentioned studies. There was, however, a moderate reverse correlation ($p = 0.058$) between MI and AI, as also demonstrated by Heesters (1999) (Figure 4).

bcl-2, a gene established as programmed cell death suppressor, is not found in normal astrocytes within the cortex, white matter or cerebellum. However, it is found in more than half of all astrocytomas in adults, as demonstrated by Ellison et al (1995), who found the presence of bcl-2 in 44% of the fibrillary astrocytomas, 42% of the anaplastic astrocytomas, and 28% of the glioblastomas; by Rieger et al (1998), who found a 70% bcl-2 positivity in 20 glioblastomas; and by Newcomb et al (1997), who observed 57% of positivity for bcl-2 in astrocytomas in 37 adult patients and in 73% of 21 pediatric cases. The prognostic role of the bcl-2 expression remains uncertain. We could not demonstrate a significant relationship between indexes of bcl-2 and survival, as had already been observed by Nakasu et al (1994), Newcomb et al (1997), and Newcomb et al (1998) (Figure 2). We did verify, however, a statistically significant reverse correlation ($p = 0.034$) between the bcl-2 index and the cell proliferation index (Figure 4). Such

finding can indicate a greater role for bax, a member of the bcl-2 family with a pro-apoptotic function, in this group of tumors. However, further studies are needed for clarifying such finding.

Our study had limitations regarding the verification of important prognostic factors in glioblastomas, such as the quantification of the dried up tumor mass by the pre- and post-operative imaging examinations, the clinical condition of the patient at the pre- and post-surgical time through clinical and neurological examination, and the time of evolution of the disease until diagnosis, which is one of the criteria for classifying between primary and secondary glioblastomas.

CONCLUSION

The reverse correlation between AI and MI can be seen in our study, suggesting that the presence of apoptosis can prevent tumor growth, though a significant relationship between the presence of apoptosis and time of survival was not demonstrated. A reverse relationship between the bcl-2 index and MI is also seen. Similar data could not be found in the literature. Thus, further studies need to be conducted to confirm such finding. In our study, none of the examined factors was relevant for patient prognosis, but, as already discussed, there was a tendency in the patient group with age below 45 for having a longer time of survival. Moreover, we can conclude that the apoptosis phenomenon in glioblastomas depends upon highly complex genetic pathways, independently from p53 and bcl-2, since no relationship was established between such genes and the presence of apoptosis.

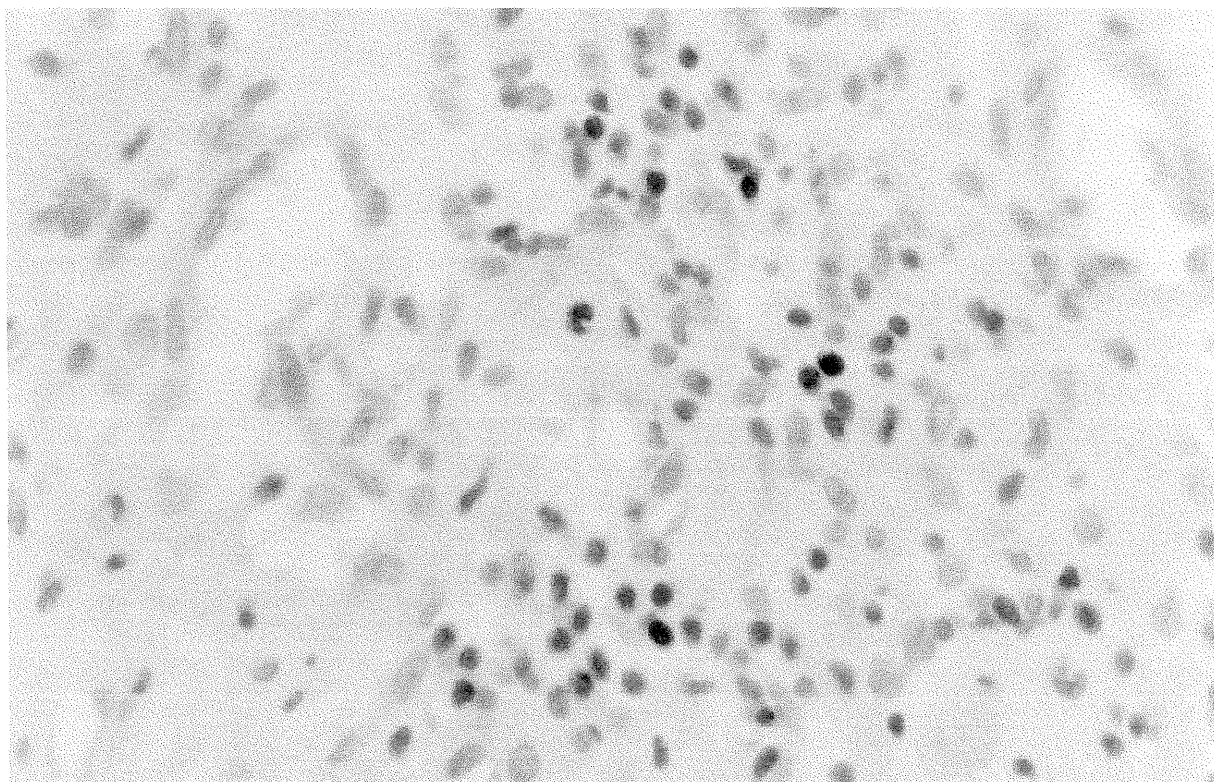


Fig. 5 - Glioblastoma with immunohistochemistry for bcl-2. (20X)

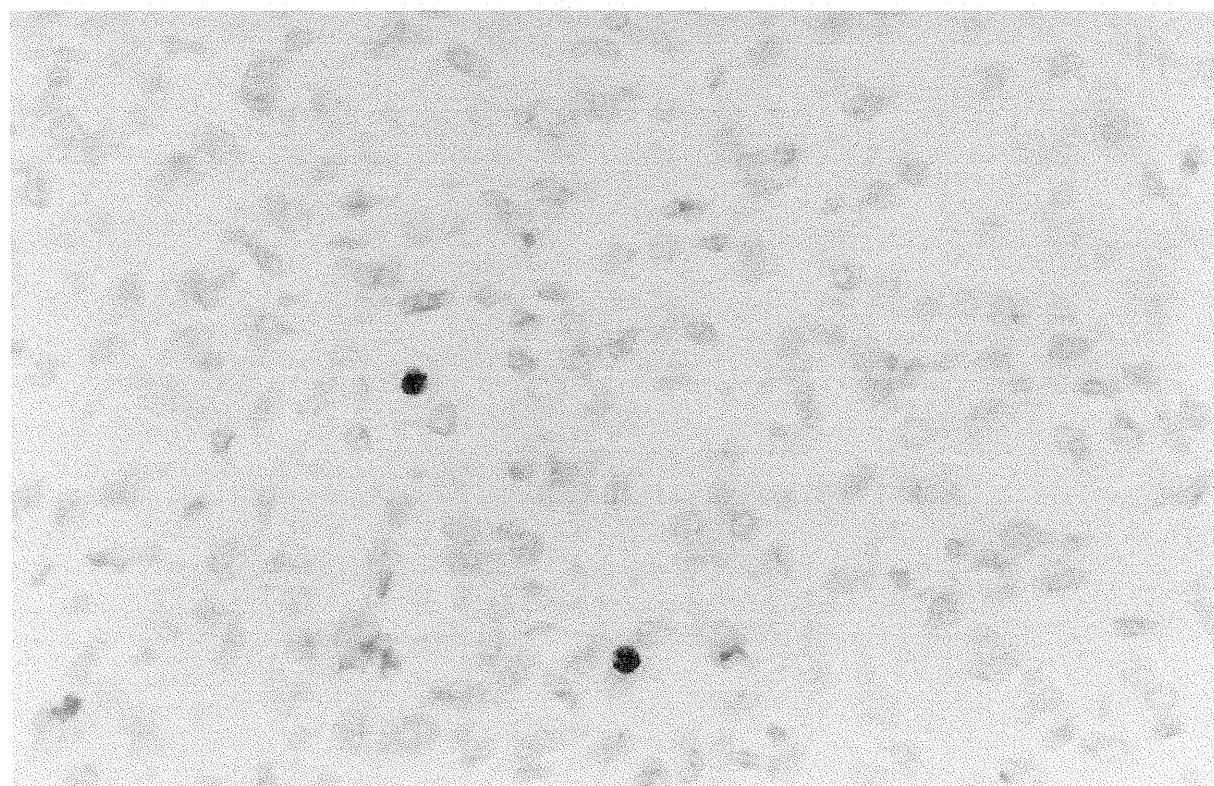


Fig. 6 - Glioblastoma with immunohistochemistry for apoptosis (TUNEL). (20X)

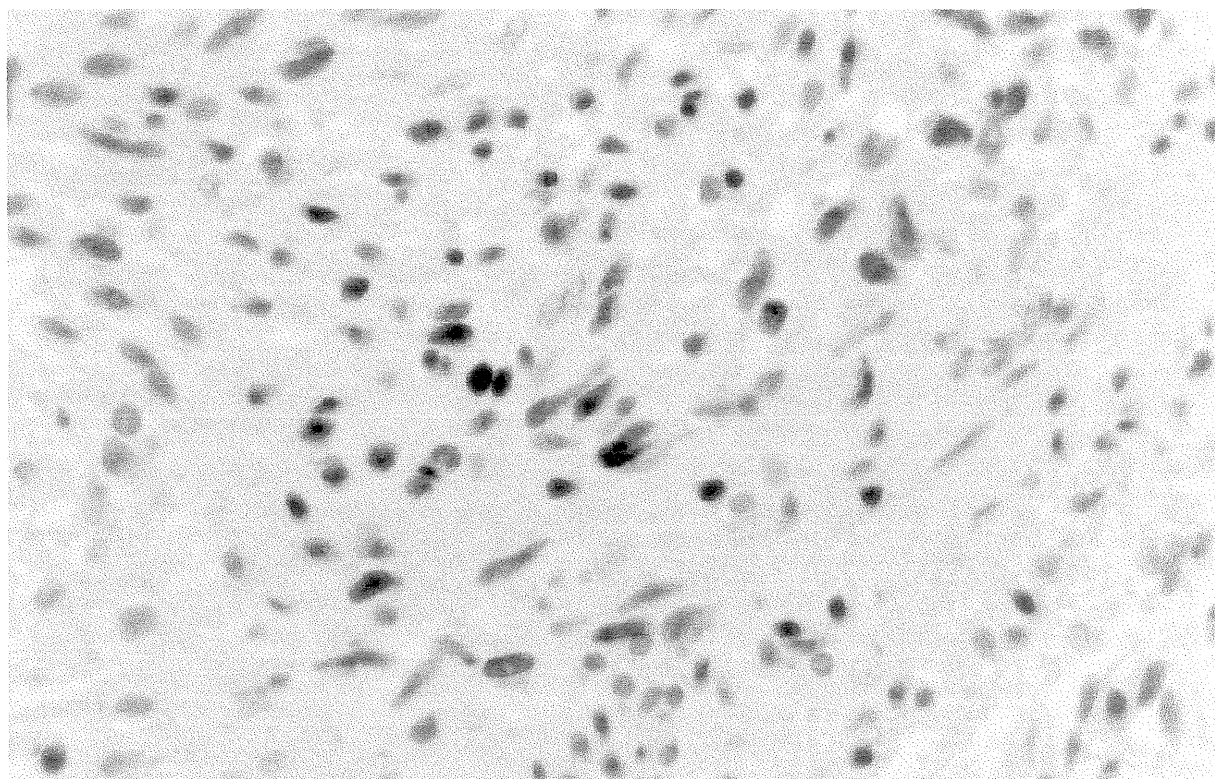


Fig. 7 - Glioblastoma with immunohistochemistry for p53. (20X)

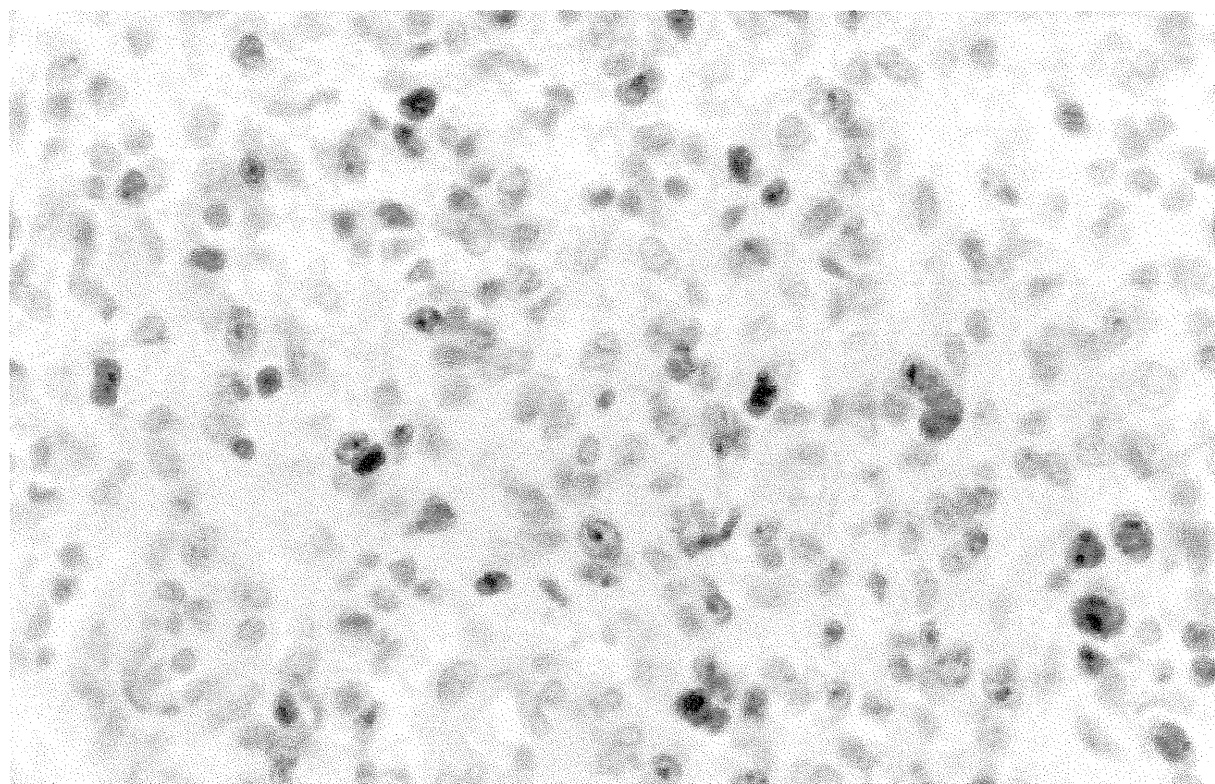


Fig. 8 - Glioblastoma with immunohistochemistry for MIB-1. (20X)

Table 1: Demographic Variables in patients diagnosed with glioblastoma (n=30)

Variable	Value
Male, f (%)	21 (70.0)
Age, years	57.5±11.9

Data are presented as frequency (percentile) and mean ± standard deviation

Table 2: Comparison of demographic and immunohistochemical variables between dead and surviving patients diagnosed with glioblastoma

Variable	Dead	Survivors	P
	n=22	n=8	
Male, f (%)	15 (68.2)	6 (75.0)	0.999
Age, years	59.5±12.3	51.9±9.0	0.122
Apoptosis, %	7.5 (4.2 a 36.0)	5.0 (2.5 a 26.4)	0.344
Bcl-2	0.0 (0.0 a 11.8)	3.0 (0.0 a 13.9)	0.662
p53	0.0 (0.0 a 25.2)	2.2 (0.0 a 49.6)	0.629
MIB-1	20.5 (13.9 a 28.7)	29.7 (15.6 a 33.4)	0.202

Data are presented as frequency (percentile) and median and interquartile amplitude (P25 to P75)

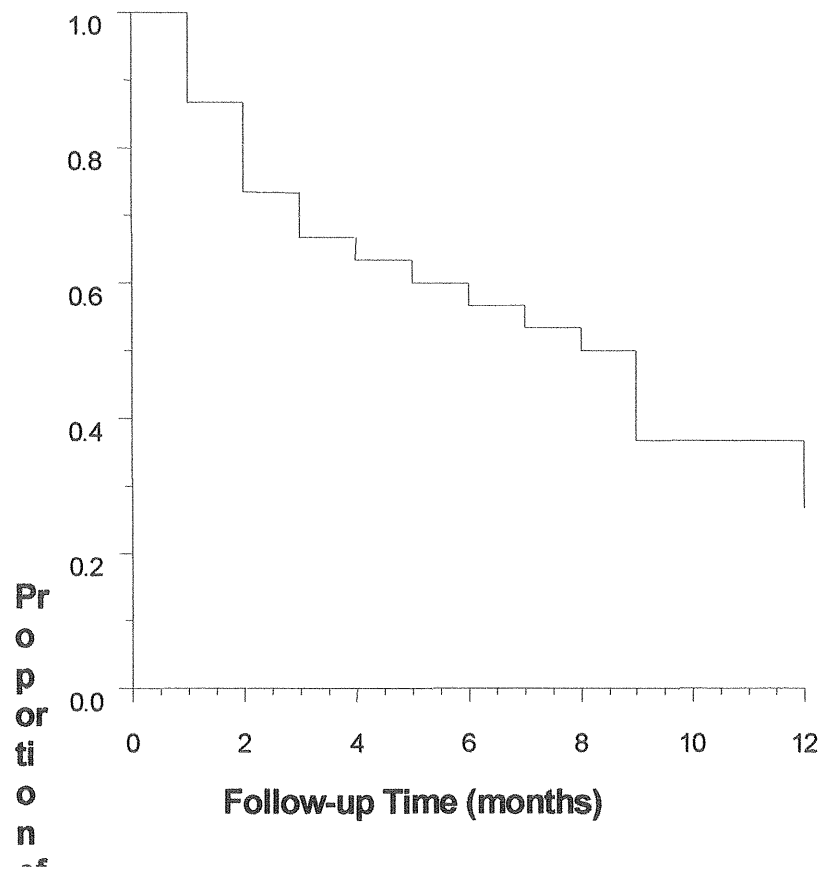


Figure 1: Kaplan-Meier's curve, representing survival time for 30 patients diagnosed with glioblastoma.

Vertical Axis: Proportion of survivors

Horizontal Axis: Follow-up Time (months)

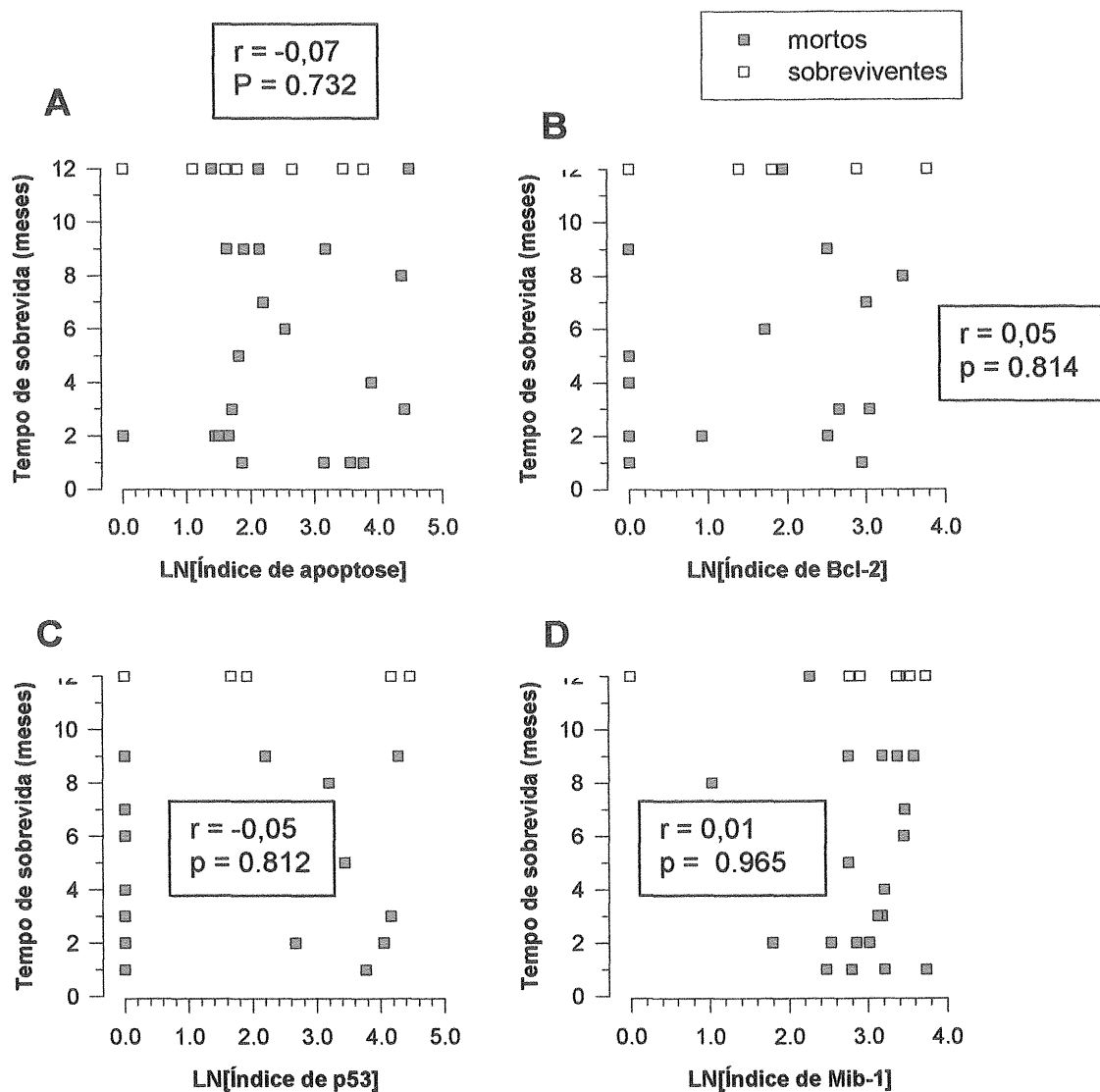


Figure 2: Scatterplots representing correlations found between time of survival and immunohistochemical variables

A Vertical: Survival Time (months) Horiz.: Apoptosis Index

B Vertical: Survival Time (months) Horiz.: bcl-2 Index

C Vertical: Survival Time (months) Horiz.: p53 Index

D Vertical: Survival Time (months) Horiz.: Mib-1 Index

Legend: Dead Patients Surviving Patients

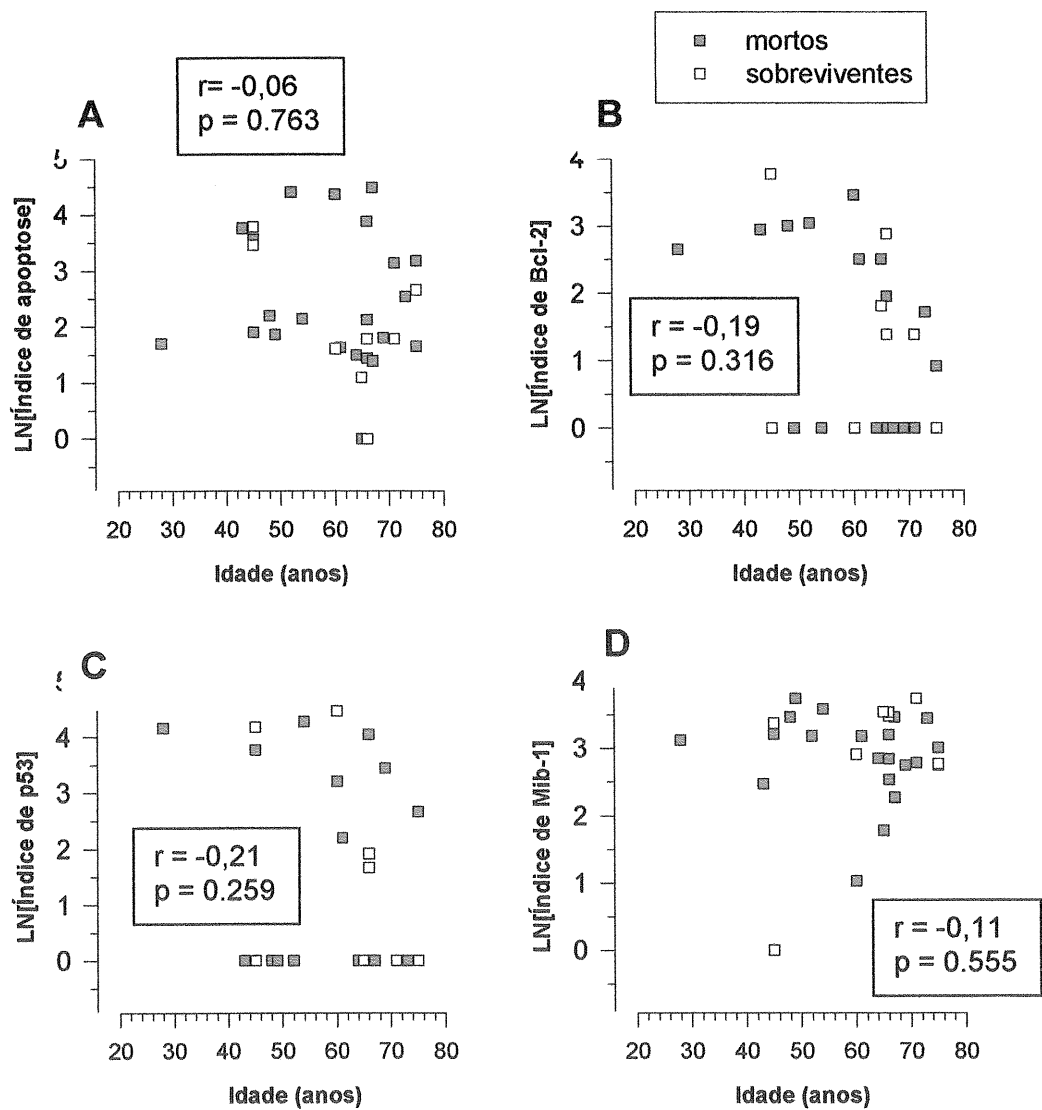


Figure 3: Scatterplots representing correlations found between age and imunohistochemical variables

A Vertical: Apoptosis Index Horiz.: Age (years)

B Vertical: bcl-2 Index Horiz.: Age (years)

C Vertical: p-53 Index Horiz.: Age (years)

D Vertical: Mib-1 Index Horiz.: Age (years)

Legend: Dead Patients Surviving Patients

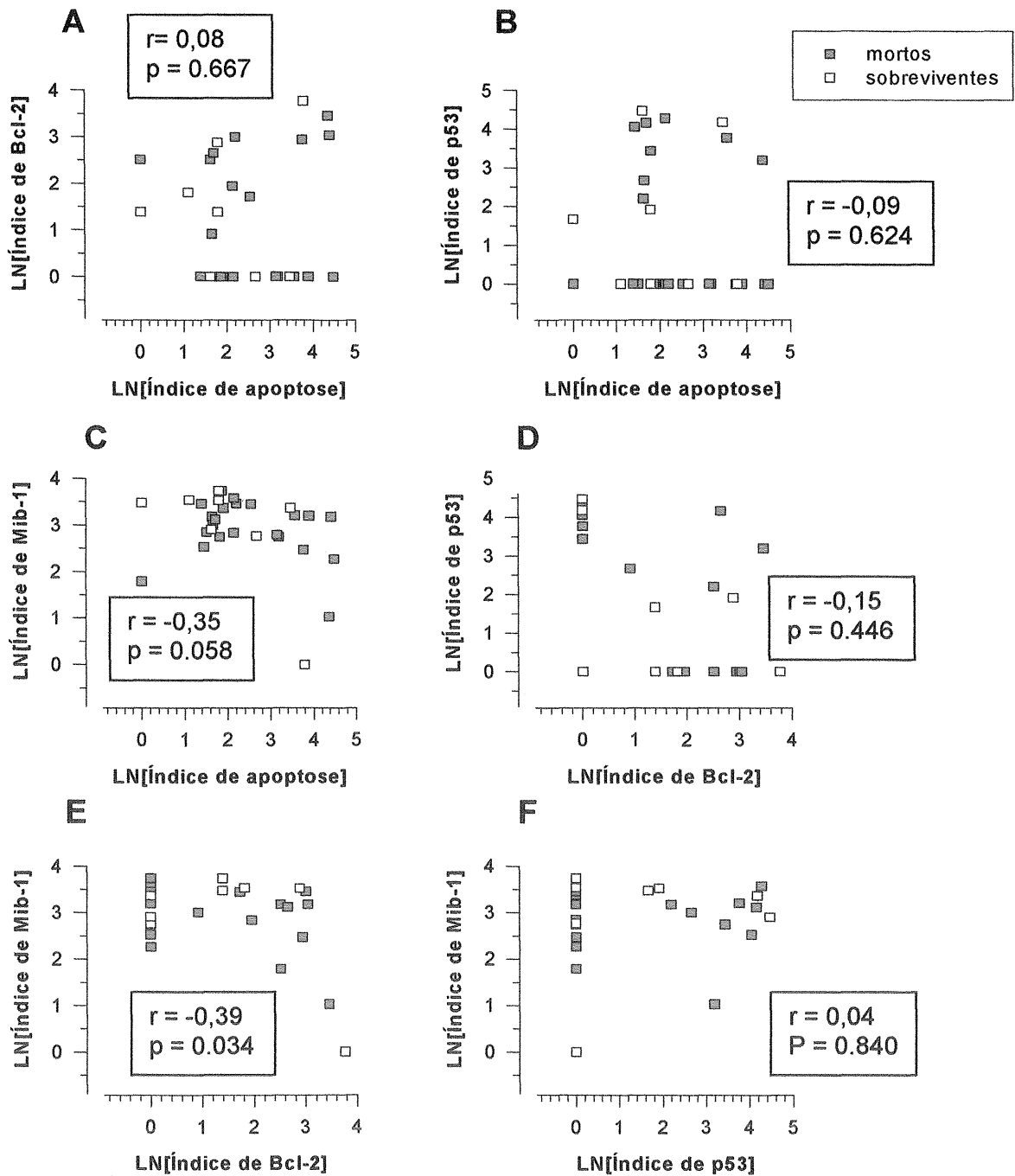


Figure 4: Scatterplots representing correlations found between immunohistochemical variables
 A Vertical: Bcl-2 Index Horiz.: Apoptosis Index
 B Vertical: p-53 Index Horiz.: Apoptosis Index
 C Vertical: Mib-1 Index Horiz.: Apoptosis Index
 D Vertical: p-53 Index Horiz.: bcl-2 Index
 E Vertical: Mib-1 Index Horiz.: bcl-2 Index
 F Vertical: Mib-1 Index Horiz.: p53 Index
 Legend: Dead Patients Surviving Patients

REFERENCES

1. Burger PC and Green SB. Patient age, histological features and length of survival in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer* 1987; 59: 1617-25
2. Carroll RS, Zhang J, Chauncey BW, et al. Apoptosis in astrocytic neoplasms. *Acta Neurochir (Wien)* 1997; 139: 845-50
3. Cunningham JM, Kimmel DW, Schethauer BW et al. Analysis of proliferation markers and p53 expression in gliomas of astrocytic origin: relationships and prognostic value. *J Neurosurg* 1997; 86:121-30.
4. Ellison DW, Steart PV, Gatter KC and Weller RO. Apoptosis in cerebral astrocytic tumours and its relationship to expression of bcl-2 and p53 proteins. *Neuropathol Applied Neurobiol* 1995; 21: 352-61.
5. Erhmann J Jr, Kolar Z, Vojtesek B, et al. Prognostic factors in astrocytomas: relationship of p53, MDM-2, bcl-2 and PCNA immunohistochemical expression to tumor grade and overall patient survival. *Neoplasma* 1997; 44: 299-304.
6. Heesters MA, Koudstaal J, GO KG and Molenaar WM. Analysis of proliferation and apoptosis in brain gliomas: Prognostic and clinical value. *J Neuro Oncol* 1999; 44: 255-266.
7. Hsu DW, Louis DN, Efird JT, Hedley ET. Use of MIB-1 (Ki-67) immunoreactivity in differentiating grade II and grade III gliomas. *J Neuropathol Exp Neurobiol* 1997, 56-8: 857-865.
8. Jaros E, Perry RH, Adam L, et al. Prognostic implications of p53 protein, epidermal growth factor receptor and ki-67 labelling in brain tumors. *Cancer* 1992; 66: 373-85.
9. Kraus JA, Wengoefer M, Glesmann N, et al. TP53 gene mutations, nuclear p53 accumulation, expression of Waf/p21, bcl-2 and CD95 proteins are not prognostic factors in de novo glioblastoma. *J Neurooncol* 2001; 52(3): 263-72

10. Kirkegaard LJ, DeRose PB, Yao B, Cohen C. Image cytometric measurement of nuclear proliferation markers (MIB-1, PCNA) in astrocytomas. Prognostic significance. *Am J Clin Pathol* 1998; 109 (1): 69-74
11. Kleihues P, Ohgaki H. Primary and secondary glioblastoma: from concept to clinical diagnosis. *Neuro- Oncol* 1999; 1: 44-51.
12. Korshunov A, Golanov A, Sycheva R, et al. Prognostic value of tumor associated antigen immunoreactivity and apoptosis in cerebral glioblastomas: an analysis of 168 cases. *J Clin Pathol* 1999; 52: 574-80.
13. Nakasu S, Nakasu Y, Nioka H, et al. bcl-2 protein expression in tumors of central nervous system. *Acta Neuropathol* 1994; 88: 520-26.
14. Newcomb EW, Bhalla SK, Parrish CL, et al. bcl-2 protein expression in astrocytomas in relation to patient survival and p53 gene status. *Acta Neuropathol* 1997; 94: 369-375.
15. Newcomb EW, Cohen H, Lee SR, et al. Survival of patients with glioblastoma is not influenced by altered expression of p16, p53, EGFR, MDM2 or bcl-2 genes. *Brain Pathol* 1998; 8: 655-667.
16. Reed JC, Meister L, Tanaka S, et al. Differential expression of bcl-2 protooncogene in neuroblastomas and others tumor cells lines of neural origin. *Cancer Res* 1991; 51: 6529-6538.
17. Rieger L, Weller M, Bornemann A, et al. bcl-2 family protein expression in human malignant glioma: a clinical pathological correlative study. *J Neurol Sci* 1998; 155: 68-75
18. Salmon I, Dewitte O, Pasteels JL, et al. Prognostic scoring in adult astrocytic tumors using patient age, histopathological grade and DNA histogram type. *J Neurosurg* 1994; 80: 877-883.
19. Schiffer D, Cavalla A, Migheli A, et al. Apoptosis and cell proliferation in humans neuroepithelial tumor. *Neurosc Letters* 1995; 195: 81-84.

20. Schiffer D, Dutto A, Cavala P, et al. Prognostic factor in oligodendroglioma. *Can J Neurol Sci* 1997; 24-4: 313-17.
21. Symonds H, Drall L, Remington L, et al. p53 dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression in vivo. *Cell* 1994; 78:703-11.
22. Tews DS. Cell death and oxidative stress in gliomas. *Neuropathol Applied Neurobiol* 1999; 25: 272-84.
23. van Meyel DJ, Ramsay DA, Casson AG, et al. Pattern of mutant p53 expression and DNA ploidy in evolving gliomas. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 1011-1017.
24. Van Meir EG, Kikuchi T, Tada M, et al. Análisis of the p53 gene and its expression in human glioblastomas cell. *Cancer Res* 1004; 54: 649-52