

UNIVERSIDADE DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**ESTUDO DA ATIVIDADE GLIAL EM FUNÇÃO DO CONTEÚDO DE S100B,
GFAP E GLUTAMINA SINTETASE EM ASTROCITOMAS HUMANOS.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
RODRIGO MACIEL DE FREITAS

ORIENTADOR: PROF. CARLOS ALBERTO GONÇALVES
CO-ORIENTADORA: PROF^a. CARMEM GOTTFRIED

PORTO ALEGRE

2006

Quem conhece os outros é inteligente,
Quem conhece a si mesmo é iluminado.
Quem vence os outros é forte,
Quem vence a si mesmo é invencível.

Tao Te King, 33DC.

Agradecimentos

Aos Professores Carlos Alberto e Carmem, pela amizade e carinho durante todo o tempo em que convivemos. Muito obrigado!

Aos meus Professores, colegas e amigos Dr. Nelson Ferreira e Dr. Marcelo Ferreira, pessoas que me ensinaram que exercer medicina de uma forma ética e responsável era o caminho a ser tomado, além de terem me ensinado o ofício da neurocirurgia. Não existem palavras que possam mensurar a minha gratidão!

À Lúcia, minha conterrânea e amiga, que pacientemente recebeu todas as amostras, mesmo as de última hora. Colega a amiga sempre solícita!

À Fran, grande amiga e colega, primeira pessoa a me receber no Laboratório.

À Patrícia e Ana Carolina, grandes amigas e colaboradoras.

À Marina, que solícitamente ajudou na maior parte das dosagens de forma absolutamente gentil.

Aos demais colegas e amigos do Laboratório 33, todos importantes colaboradores deste trabalho.

À Professora Matilde, pela amizade e apoio.

À Andréia, secretária do PPG em Neurociências, pela atenção e disponibilidade em minhas solicitações.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre, instituições que tornaram esta minha conquista possível.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES).

Aos pacientes e seus familiares que participaram voluntariamente deste estudo o meu mais sincero voto de agradecimento e respeito.

À minha família, que torna esta e todas as minhas outras conquistas importantes.

Muito obrigado!

Resumo

Gliomas constituem um grupo heterogêneo de tumores cerebrais. Eles podem ser divididos em duas principais categorias: astrocíticos e oligodendrogliais. Os astrocíticos, objetos deste estudo, são classificados patologicamente em quatro subtipos baseado na presença ou ausência de atipia nuclear, mitose, neovascularização e necrose. Esta classificação é útil para definir tratamento e prognóstico. A origem glial é comumente confirmada pela detecção imunohistoquímica para GFAP. Neste trabalho nós investigamos o imunoc conteúdo das proteínas marcadoras astrocíticas GFAP e S100B por ELISA e a atividade da enzima glutamina sintetase (GS) em tumores gliais e tecidos peritumorais de sete pacientes submetidos à ressecção cirúrgica. Os resultados demonstram elevados níveis de S100B em tecidos peritumorais não correlacionados com o grau de malignidade do tumor. Esta elevação poderia contribuir para manifestações convulsivas observadas em alguns pacientes. Em contraste com os dados obtidos pela imunohistoquímica para filamentos gliais, encontrou-se uma aparente correlação positiva entre o conteúdo de GFAP e o grau de malignidade do glioma. É possível que este aumento no conteúdo de GFAP seja referente a GFAP total (frações solúvel e insolúvel), em contraste com o conteúdo insolúvel (fibrilar e granular) detectado pela imunohistoquímica. A alta taxa GFAP/S100B (GFAP elevada/S100B reduzida) está de acordo com a sua elevada atividade mitótica, que pela sua vez poderia ser inibida pela S100B. Além disso, houve uma correlação positiva entre a atividade da GS e o grau de malignidade do tumor.

Índice

Dedicatória	Página II
Agradecimentos	Página II
Resumo	Página IV
1. Introdução	Página 6
2. Objetivos	Página 13
3. Manuscrito	Página 14
4. Discussão	Página 40
5. Referências Bibliográficas	Página 44

1. INTRODUÇÃO

1.1. Tumores cerebrais

Os tumores cerebrais são uma das causas mais comuns de morbidade e mortalidade precoce em humanos. Aproximadamente vinte mil novos casos de tumores cerebrais são diagnosticados a cada ano nos EUA (LANDIS et al., 1999). Neoplasia primária do sistema nervoso central é a causa de morte em aproximadamente 13 mil pessoas por ano apenas nos Estados Unidos (POSNER, 1995). Inúmeras estatísticas têm mostrado um significativo aumento na incidência de gliomas malignos nos últimos anos (WERNER et al., 1995; LEGLER et al., 1999).

Os gliomas malignos são tumores muito agressivos, usualmente associados com um rápido desfecho fatal, porém se tem reconhecido, mais recentemente, que mesmo os gliomas de baixo grau apresentam um prognóstico reservado. Contudo, existe uma tendência otimista sobre este assunto em função das tecnologias que atualmente contribuem para a detecção, avaliação e caracterização de tumores. Esta esperança de que o prognóstico destes tumores possa melhorar está baseado, pelo menos em parte, nas novas técnicas de neuroimagem, com a tomografia computadorizada e a ressonância nuclear magnética, e no desenvolvimento de marcadores biológicos, que contribuem para o diagnóstico da doença em estágio inicial, enquanto os tumores ainda estão pequenos e não sofreram malignização. O desenvolvimento de técnicas terapêuticas de sucesso para estas lesões requer esforços continuados de clínicos e pesquisadores.

Gliomas constituem um grupo heterogêneo de tumores cerebrais. Quanto ao tipo de célula, eles podem ser divididos em duas principais categorias: astrocíticos e

oligodendrogliais. Estes tumores exibem características biológicas únicas. A sua origem histológica precisa ainda permanece obscura. Em geral eles apresentam uma alta taxa de infiltração e crescimento invasivo no cérebro, porém raramente metastatizam para fora do sistema nervoso central. As células dos gliomas comprometem o mecanismo imunocelular de defesa. Estas células também são altamente resistentes à indução de morte celular programada (apoptose), tornando inútil todas as terapias atualmente usadas no tratamento do câncer. Os gliomas podem ser tanto de alto quanto de baixo grau de malignidade. Os de alto grau podem surgir sozinhos (por exemplo, glioblastoma primário) ou podem ser provenientes de um tumor de baixo grau preexistente (glioblastoma secundário). Desta forma, levando em conta o grau de malignidade, os tumores gliais são divididos patologicamente em quatro graus, de acordo com a área de maior malignidade encontrada, baseado no sistema da Organização Mundial de Saúde, que leva em conta a presença de atipia nuclear, mitose, proliferação microvascular e necrose (KLEIHUES et al., 2002). A classificação patológica precisa é essencial porque ela define o tratamento e prognóstico dos tumores. O mais comum dos tumores gliais de grau I de malignidade, o astrocitoma pilocítico, é uma lesão benigna e essencialmente um tumor que surge na infância e adolescência. Já os gliomas grau II, III e IV têm crescimento difuso, são infiltrativos e apresentam estágios distintos de malignização dentro desta família de tumores (gliomas), sendo o glioblastoma (grau IV) o mais maligno e a variante mais comum. Astrocitomas grau I são tumores circunscritos, com crescimento lento e com baixa densidade celular. Astrocitomas grau II são tumores bem diferenciados com um padrão de crescimento infiltrativo difuso. Astrocitomas anaplásicos (grau III) apresentam maior densidade celular e aumento de atipia nuclear e de atividade mitótica. Glioblastomas (grau IV) são

caracterizados por todos os achados descritos acima, além de proliferação vascular proeminente ou áreas de necrose (KLEIHUES et al., 2002).

As causas da origem da maioria dos gliomas ainda permanecem obscuras. Para a maioria dos gliomas os fatores genéticos não parecem ter importância. Similarmente, nenhum fator ambiental foi relacionado ao desenvolvimento de gliomas, exceto irradiação craniana, que parece aumentar a sua incidência (DEANGELIS, 2001).

2. Marcadores bioquímicos de tumores gliais

Em função da diversidade de gliomas e dos diferentes graus de malignidade encontrados, é necessário que se intensifique os estudos com proteínas que possam servir de marcadores bioquímicos para os diversos tipos de tumores gliais.

Glutamina sintetase

A Glutamina sintetase (GS) é uma enzima que medeia a conversão de glutamato em glutamina no citoplasma de astrócitos. Apesar da GS ser detectada em vários órgãos do corpo, no sistema nervoso central ela tem expressão específica nos astrócitos. Isto tem incitado seu uso como um marcador astrocítico e também como um indicador de atividade celular.

McCormick e colaboradores (1990) determinaram a atividade da GS em 224 tumores intracranianos primários e secundários e em 18 biópsias, nas quais não foi detectado tumor, mas havia gliose reativa significativa. Entre os tumores avaliados, os maiores níveis de GS foram encontrados entre os astrocitomas e oligodendrogliomas e não houve diferença significativa entre estes dois grupos. Entretanto, a atividade da GS foi duas vezes maior no

tecido que sofreu gliose reativa. Houve considerável similaridade entre os níveis de GS nos outros grupos de tumores estudados (ependimomas, meningiomas, neurinomas, carcinomas secundários e adenomas pituitários). A atividade da GS para diferentes graduações histológicas de astrocitomas também foi detectada em cada um dos grupos e os valores encontrados foram semelhantes, não apresentando diferenças significativas. Em contraste com os resultados descritos acima, Pilkington e Lantos (1982) demonstraram por imunocitoquímica, que os três oligodendrogliomas da série de neoplasias intracranianas foram negativos para GS. Eles ainda verificaram, neste mesmo estudo, uma diferença entre os níveis de GS (imunoconteúdo) em tumores astrocíticos e o grau de malignidade. Houve uma redução no imunoconteúdo com o aumento do grau de malignidade. Isto corrobora com o que foi encontrado no estudo de Akimoto (1993). Em tumores cerebrais primários, a imunorreatividade para GS apenas foi detectada nas células de astrocitomas e foi observada uma correlação inversa entre a malignidade histológica e a expressão de GS. Isto sugere que a expressão de GS em astrocitomas pode não apenas ser útil como um marcador diagnóstico para estes tumores, mas também na avaliação do seu potencial de malignidade.

Proteína ácida fibrilar glial

A proteína ácida fibrilar glial (GFAP) compõe os filamentos intermediários dos astrócitos, sendo portanto uma das proteínas marcadoras destas células. Pilkington e Lantos (1982) estudaram tecidos de tumores cerebrais obtidos de 17 casos de biópsias e 3 casos de autópsias. Todos os tumores astrocíticos foram positivos para GFAP e houve uma redução no número de células imunorreativas com o aumento do grau de malignidade.

McLendon e colaboradores (1986), avaliaram 71 tumores cerebrais, que consistiam de 18 glioblastomas multiformes, 4 astrocitomas anaplásicos, 7 astrocitomas, 6

oligodendrogliomas, 2 endimomas, 5 gangliogliomas, 4 schwannomas, 4 meningiomas, 2 papilomas de plexo coróide, 2 cordomas, 1 craniofaringioma, 2 meduloblastoma e 14 carcinomas metastáticos. O estudo imunoistoquímico localizou imunorreatividade para GFAP em 28 dos 29 astrocitomas e em todos os oligodendrogliomas, endimomas e gangliogliomas. GFAP não foi detectada nos demais tipos de tumores avaliados. Nos tumores astrocíticos, o número de células imunorreativas para GFAP está correlacionado com a queda da anaplasia celular.

Chen e Zhang (1989) estudaram 174 casos de tumores cerebrais, utilizando anticorpos monoclonais para demonstrar por imunoistoquímica, a GFAP nas preparações do tecido tumoral cerebral. Todos os tumores astrocíticos estudados (78 casos) foram GFAP imunorreativos (GFAP-ir). A intensidade da imunorreatividade e o número de células reativas variaram entre os tumores astrocíticos. Com o aumento da anaplasia menos células positivas foram identificadas e menos células foram intensamente coradas. Enquanto 20-40% das células foram GFAP-ir nos astrocitomas anaplásicos, alguns astrocitomas altamente anaplásicos tiveram poucas células marcadas. Já nos oligodendrogliomas, a GFAP-ir foi observada em 5-20% das células tumorais em 11 dos 13 casos examinados. Cinco dos 30 endimomas mostraram uma reação para anticorpos anti-GFAP. Em 4 dos 7 meduloblastomas alguns astrócitos apresentaram GFAP-ir, enquanto a maioria das células tumorais foi inteiramente negativa. A imunorreatividade foi negativa em todas as neoplasias metastáticas e em todos os outros tumores cerebrais primários examinados: meningioma, schwannoma, linfoma primário, hemangiopericitoma, adenoma pituitário e germinoma.

Muitos outros autores (DUFFY et al., 1980; TASCOS et al., 1982; SCHIFFER et al., 1983), também observaram uma relação inversa entre GFAP-IR e o grau de malignidade

nos tumores astrocíticos. Com o aumento na anaplasia nos astrocitomas, menos células reativas para GFAP são observadas. Este fenômeno pode estar relacionado à baixa concentração de GFAP e talvez ao desarranjo dos filamentos gliais nos astrócitos mais malignos.

O papel da GFAP no desenvolvimento e progressão de tumores astrocíticos é um pouco controverso. Vários estudos *in vitro* têm sugerido uma correlação negativa entre os níveis da expressão de GFAP e a diferenciação e transformação de astrócitos. Em células de astrocitomas humanos a supressão da expressão da GFAP leva a uma redução da diferenciação celular e a perda da capacidade de estender processos em resposta a estímulos neuronais (WEINSTEIN et al., 1991). A restauração da expressão da GFAP reverte este fenômeno (CHEN and LIEM, 1994). Em outro estudo, Wilhelmsson e colaboradores (2003), demonstraram que a expressão da GFAP não contribuiu para o desenvolvimento ou progressão dos astrocitomas.

Proteína S100B

A S100B é uma proteína ligante de cálcio, expressa no sistema nervoso central, particularmente por astrócitos. Esta proteína pertence à família S100 envolvida na regulação de proliferação e morfologia celular (DONATO, 2003; VAN ELDIK & WAINWRIGHT, 2003). A S100B tem sido um suposto alvo para muitos alvos intracelulares, tanto no citoplasma (por ex. a GFAP) quanto no núcleo (por ex. a proteína supressora de tumor p53). Além de uma função intracelular, a S100B é secretada e exerce um efeito regulatório sobre células vizinhas: astrócitos, neurônios e microglia. O efeito extracelular da S100B observado em cultura de células depende de sua concentração, sendo neurotrófica em níveis nanomolares e apoptótica a níveis macromolares. Existem muitas evidências para sugerir que, a concentrações nanomolares, a S100B estimula a proliferação

glial, a sobrevivência neuronal e protege neurônios contra a excitotoxicidade induzida pelo glutamato (AHLENMEYER et al., 2000; KOGEL et al., 2004). A expressão da S100B, particularmente S100B extracelular, é usada como um parâmetro de ativação glial ou comprometimento em várias situações de injúria cerebral.

Superóxido dismutase

A superóxido dismutase (SOD) é uma metaloenzima responsável pela dismutação do radical superóxido a H_2O_2 e O_2 (JHONSON & GIULIVI 2005). Em mamíferos, foram identificados três diferentes tipos de SOD: SOD1 ou SODCuZn, presente no citoplasma; SOD2 ou SODMn, encontrada exclusivamente na mitocôndria e SOD3 ou SODEC, direcionada para o espaço extracelular (ZELCO et al., 2002). A sua atividade tem sido utilizada como um marcador de susceptibilidade e/ou dano ao estresse oxidativo.

Baseado nos resultados descritos acima é possível entender que os estudos com marcadores biológicos propiciam conhecimento detalhado das alterações em gliomas e também assumem um importante papel no entendimento dos diferentes tipos de câncer. Este enfoque possibilita novas oportunidades terapêuticas e um melhor estabelecimento do prognóstico.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi voltar a atenção para a atividade e expressão de algumas proteínas gliais e correlacionar estes achados com o grau de malignidade dos gliomas astrocíticos em humanos. Para este propósito, quatro marcadores bioquímicos foram utilizados: GS, GFAP, S100B (especificamente gliais) e SOD.

2.2. Objetivos Específicos

1. Determinar o imunoconteúdo de S100B e GFAP e avaliar a atividade da enzima GS em fragmentos de tumores intracranianos de origem glial e em tecido peritumoral;
2. Comparar o imunoconteúdo de S100B e de GFAP entre astrocitomas com diferentes graus de malignidade;
3. Medir a atividade da SOD em astrocitomas e tecido peritumoral.

4. DISCUSSÃO

Atualmente, baseado em estudos imunoistoquímicos, existe um consenso de que o conteúdo da GFAP tem uma relação inversa com o grau de malignidade dos gliomas (KAJIWARA et al., 1992; PEKONY et al., 1998; MURPHY et al., 1998; TODA et al., 1999). Entretanto, a presença de uma população de células não imunorreativas para GFAP não é indicativo de um tumor com alto grau de anaplasia (KORSHUNOV & SYCHEVA, 1995). Além disso, ainda não foi observada diferença estatisticamente significativa entre astrocitomas e astrocitomas anaplásicos com relação a imunocitoquímica para GFAP (CAMBY et al., 2000). Nesse mesmo estudo, a vimentina foi útil para distinguir estes dois tipos de tumores. *Western blotting* e ELISA têm sido utilizados com culturas de células de gliomas (e.g. ITO et al., 1989; MERETTO et al., 1997), mas a imunocitoquímica é o método mais comum para avaliar a expressão de GFAP.

Neste trabalho nos usamos, pela primeira vez dentro do nosso conhecimento, um ELISA para determinar o conteúdo de GFAP e S100B em tumores de origem glial de humanos após a ressecção cirúrgica. Surpreendentemente, achamos uma aparente correlação positiva ($p = 0.098$) entre o conteúdo de GFAP e o grau de malignidade. Algumas considerações devem ser entendidas para explicar esta contradição. Primeiro, estudos imunoistoquímicos para GFAP descrevem, em adição à redução da marcação, um arranjo diferente dos filamentos intermediários (CHEN & ZHANG, 1998) que vão do fibrilar (insolúvel) para o granular homogêneo (menos insolúvel) distribuídos pelo citoplasma. Segundo, o reconhecimento de GFAP por anticorpo pode ser afetado por proteínas vizinhas (O'CALLAGHAN et al., 1999). Terceiro, não existem estudos suficientes sobre as possíveis interferências das alterações pós-tradução, particularmente fosforilação, no

imunorreconhecimento da GFAP. De fato, em células mitóticas, os filamentos gliais são despolimerizados por um processo modulado pela fosforilação e pela proteína S100B (INAGAKI et al., 1990; FRIZZO et al., 2004). Desta forma, é possível que o aumento de GFAP que nós encontramos represente a quantidade total de GFAP (frações solúvel e insolúvel), em contraste com o conteúdo insolúvel (fibrilar e granular) detectado pela imunocito/istoquímico por outros autores já citados. Entretanto, esta questão permanecerá aberta até que se faça um estudo em larga escala usando ELISA para medir GFAP. Além disso, usando hibridização *in situ*, foram encontrados níveis mais elevados de mRNA da GFAP em gliomas com alto grau de malignidade do que nos de baixo grau, baseados nas figuras mitóticas, necrose e neovascularização (INAGAKI et al., 1990; FRIZZO et al., 2004). É importante enfatizar que os nossos dados sobre o conteúdo de GFAP não contrapõem os resultados prévios ou o valor da caracterização imunohistoquímica dos tumores cerebrais.

Com relação à S100B, os dados parecem confirmar sua pouca utilidade para discriminar os diferentes tipos de gliomas (CAMBY et al., 1999), diferentemente de outras proteínas da família S100 tais como S100A1, A3 e A6. Além disso, a S100B (serica) não parece ser um marcador útil para astrocitomas em crianças (RAJENDRA et al., 2004), mas pode ser utilizado no acompanhamento da evolução destes tumores (ORTIZ-MUNOZ et al., 2003) e na evolução das lesões expansivas intracranianas (DE VRIES et al., 2001).

Entretanto, um aspecto muito interessante foi identificado em tecidos peritumorais: níveis elevados de S100B. E ainda um aumento não significativo do conteúdo de GFAP peritumoral. Estas modificações podem ser reflexos de uma reatividade glial na volta do tecido tumoral. Um aumento de S100B (sem um aumento da GFAP correspondente) foi identificado em algumas lesões epileptogênicas do lobo temporal (GRIFFIN et al., 1995).

De fato, dois pacientes com elevados níveis de S100B peritumoral (um deles com o tumor de localização temporal) apresentaram crises convulsivas. Entretanto, uma correlação direta não pode ser estabelecida até o presente momento.

GS tem sido apontada como um marcador adicional para tumores astrocíticos, porém a sua presença não permite concluir uma origem astrocítica do tumor (PILKINGTON & LANTOS, 1982). Foi identificada uma correlação inversa nos astrocitomas entre o imunocnteúdo de GS e o grau de malignidade destes tumores (AKIMOTO, 1993), indicando que a atividade da GS pode ser útil para indicar atividade celular e proliferação em tumores gliais (McCORMICK et al., 1990; MORETTO et al., 1997). Além disso, foi encontrado um aumento na razão glutamina/glutamato em gliomas (BATEMAN et al., 1988; PEELING et al., 1992). De fato, biópsia em humanos indicou aumentada atividade da GS em gliomas, porém não foi possível correlacionar com o grau de malignidade (McCORMICK et al., 1990). Neste trabalho nós achamos uma correlação direta e significativa entre a atividade da GS e o grau de malignidade dos tumores estudados. Além disso, é importante mencionar que, devido à importância da glutamina para proliferação, alguns tumores (e.g. hepatomas e carcinoma de mama) são independentes deste substrato e eles podem ter uma supra-regulação da GS induzida pela privação de glutamina (COLLINS et al., 1997). Portanto, tamanho e vascularização podem afetar a atividade da GS em gliomas também. Entretanto, não foi possível estabelecer a correlação entre tamanho do tumor e atividade da GS com estes dados ($R = 0.604$, $p = 0.151$).

Em concordância com outros autores nós encontramos um decréscimo da atividade de SOD em gliomas (PY et al., 1996; POPOV et al., 2003). Esse decréscimo da atividade de SOD pode resultar em um decréscimo da atividade da GS, devido a sua sensibilidade ao estresse oxidativo (LEVINE, 1983). Por outro lado, a excitotoxicidade do glioma

secundária a liberação de glutamato (ZU-CHENG et al., 1999) pode induzir a um aumento da atividade da GS (DAVENPORT et al., 1998). Ambos estes fatores estariam contribuindo para a resultante atividade da GS em gliomas.

É importante considerar algumas limitações deste estudo. Primeiro, este foi um estudo preliminar envolvendo um pequeno número de pacientes. Segundo, os valores obtidos não foram pareados com os de indivíduos sadios do mesmo sexo, idade e regiões do cérebro.

Não existem valores de referência para estes parâmetros e isto seria importante para discutir gliose ou reatividade glial em cada caso, secundária a heterogeneidade glial regional. Estas limitações demandam estudos futuros. Investigações em larga escala nos permitirão examinar possíveis relações entre parâmetros astrocíticos específicos avaliados em função da heterogeneidade glial em diferentes regiões do cérebro e em diferentes tipos de tumores.

Em resumo, estes dados preliminares fomentam a discussão sobre alguns aspectos dos gliomas humanos: (i) sobre o existente consenso da correlação inversa entre GFAP e o grau de malignidade dos astrocitomas. Talvez seja mais prudente estabelecer a existência de uma correlação inversa entre os filamentos de GFAP e o grau de malignidade do astrocitoma; (ii), a correlação positiva e significativa encontrada entre a atividade da GS e o grau de malignidade dos astrocitomas; (iii) o conteúdo elevado de S100B encontrado em tecidos peritumorais, que poderia contribuir para manifestações convulsivas observadas em alguns pacientes; (iv) o aumento da razão GFAP/S100B em gliomas que está de acordo com a sua elevada atividade mitótica, porque a despolimerização de GFAP é induzida pela fosforilação durante a mitose, que por sua vez poderia ser inibida pela S100B.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chen Y, Zhang YX. Use of monoclonal antibodies to glial fibrillary acidic protein in the cytologic diagnosis of brain tumors. *Acta Cytol*, 33:922-28; 1989.
2. Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, Rorke LB, Reifenberger G, Burger PC, Cavenee WK. The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol*, 61:215-25; 2002.
3. Murphy KG, Hatton JD, U HS. Role of glial fibrillary acidic protein expression in the biology of human glioblastoma U-373MG cells. *J Neurosurg*, 89:997-1006; 1998.
4. Pekny M, Eliasson C, Chien CL, Kindblom LG, Liem R, Hamberger A, Betsholtz C. GFAP-deficient astrocytes are capable of stellation in vitro when cocultured with neurons and exhibit a reduced amount of intermediate filaments and an increased cell saturation density. *Exp Cell Res*, 239:332-43; 1998.
5. Toda M, Miura M, Asou H, Sugiyama I, Kawase T, Uyemura K. Suppression of glial tumor growth by expression of glial fibrillary acidic protein. *Neurochem Res*, 24:339-43; 1999.

6. Velasco ME, Dahl D, Roessmann U, Gambetti P. Immunohistochemical localization of glial fibrillary acidic protein in human glial neoplasms. *Cancer*, 45:484-94; 1980.
7. Kajiwara K, Orita T, Nishizaki T, Kamiryo T, Nakayama H, Ito H. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression and nucleolar organizer regions (NORs) in human gliomas. *Brain Res*, 572:314-18; 1992.
8. Wilhelmsson U, Eliasson C, Bjerkvig R, Pekny M. Loss of GFAP expression in high-grade astrocytomas does not contribute to tumor development or progression. *Oncogene*, 22:3407-11; 2003.
9. Koperek O, Gelpi E, Birner P, Haberler C, Budka H, Hainfellner JA. Value and limits of immunohistochemistry in differential diagnosis of clear cell primary brain tumors. *Acta Neuropathol*, 108:24-30; 2004.
10. Korshunov A, Golanov A, Sycheva R. Immunohistochemical markers for prognosis of cerebral glioblastomas. *J Neurooncol*, 58:217-36; 2002.
11. Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol*, 33:637-68; 2001.

12. Marenholz I, Heizmann CW, Fritz G. S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochem Biophys Res Commun*, 322:1111-22; 2004.
13. Griffin WS, Yeralan O, Sheng JG, Boop FA, Mrak RE, Rovnaghi CR, Burnett BA, Feoktistova A, Van Eldik LJ. Overexpression of the neurotrophic cytokine S100 beta in human temporal lobe epilepsy. *J Neurochem*, 65:228-33; 1995.
14. Ortiz-Munoz B, Menendez-Lopez A, Yaya-Tur R, Arribas-Alpuente L, Maiquez-Richart J, Bordes-Monmeneu M. S100 protein in tumours of the central nervous system. *Rev Neurol*, 36:1011-15; 2003.
15. Camby I, Nagy N, Lopes MB, Schafer BW, Maurage CA, Ruchoux MM, Murmann P, Pochet R, Heizmann CW, Brotchi J, Salmon I, Kiss R, Decaestecker C. Supratentorial pilocytic astrocytomas, astrocytomas, anaplastic astrocytomas and glioblastomas are characterized by a differential expression of S100 proteins. *Brain Pathol*, 9:1-19; 1999.
16. Pilkington GJ, Lantos PL. The role of glutamine synthetase in the diagnosis of cerebral tumours. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 8:227-36; 1982.
17. McCormick D, McQuaid S, McCusker C, Allen IV. A study of glutamine synthetase in normal human brain and intracranial tumours. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 16:205-11; 1990.

18. Moretto G, Brutti N, De Angelis V, Arcuri C, Bocchini V. A time-dependent increase in glial fibrillary acidic protein expression and glutamine synthetase activity in long-term subculture of the GL15 glioma cell line. *Cell Mol Neurobiol*, 17:509-19; 1997.
19. Hertz L, Zielke HR. Astrocytic control of glutamatergic activity: astrocytes as stars of the show. *Trends Neurosci*, 27:735-43; 2004.
20. Popov B, Gadjeva V, Valkanov P, Popova S, Tolekova A. Lipid peroxidation, superoxide dismutase and catalase activities in brain tumor tissues. *Arch Physiol Biochem*, 111:455-59; 2003.
21. Tramontina F, Karl J, Gottfried C, Mendez A, Goncalves D, Portela LV, Goncalves CA. Digitonin-permeabilization of astrocytes in culture monitored by trypan blue exclusion and loss of S100B by ELISA. *Brain Res Protoc*, 6:86-90; 2000.
22. Petit CK, Chung MC, Verkhovsky LM, Cooper AJ. Brain glutamine synthetase increases following cerebral ischemia in the rat. *Brain Res*, 569:275-80; 1992.
23. Netto CB, Siqueira IR, Fochesatto C, Portela LV, da Purificacao Tavares M, Souza DO, Giugliani R, Goncalves CA. S100B content and SOD activity in amniotic fluid of pregnancies with Down syndrome. *Clin Biochem*, 37:134-7; 2004.

24. Korshunov AG, Sycheva RV. Expression of glial fibrillary acidic protein and protein S-100 in cerebral astrocytic gliomas of varying degrees of malignancy: immunohistochemical study. *Arkh Patol*, 57:30-8; 1995.
25. Camby I, Lefranc F, Titeca G, Neuci S, Fastrez M, Dedecken L, Schafer BW, Brotchi J, Heizmann CW, Pochet R, Salmon I, Kiss R, Decaestecker C. Differential expression of S100 calcium-binding proteins characterizes distinct clinical entities in both WHO grade II and III astrocytic tumours. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 26:76-90; 2000.
26. Ito M, Nagashima T, Hoshino T. Quantitation and distribution analysis of glial fibrillary acidic protein in human glioma cells in culture. *J Neuropathol Exp Neurol*, 48:560-7; 1989.
27. O'Callaghan JP, Imai H, Miller DB, Minter A. Quantitative immunoblots of proteins resolved from brain homogenates: underestimation of specific protein concentration and of treatment effects. *Anal Biochem*, 274:18-26; 1999.
28. Inagaki M, Nakamura Y, Takeda M, Nishimura T, Inagaki N. Glial fibrillary acidic protein: dynamic property and regulation by phosphorylation. *Brain Pathol*, 4:239-43; 1994.

29. Frizzo JK, Tramontina F, Bortoli E, Gottfried C, Leal RB, Lengyel I, Donato R, Dunkley PR, Goncalves CA. S100B-mediated inhibition of the phosphorylation of GFAP is prevented by TRTK-12. *Neurochem Res*, 29:735-40; 2004.
30. Theurillat JP, Hainfellner J, Maddalena A, Weissenberger J, Aguzzi A. Early induction of angiogenetic signals in gliomas of GFAP-v-src transgenic mice. *Am J Pathol*, 154:581-90; 1999.
31. Rajendra A, Spinella PC, Drott HR, Dominguez TE, Sutton L, Helfaer M. S-100beta protein--serum levels in children with brain neoplasms and its potential as a tumor marker. *J Neurooncol*, 67:345-49; 2004.
32. de Vries J, Thijssen WA, Snels SE, Menovsky T, Peer NG, Lamers KJ. Intraoperative values of S-100 protein, myelin basic protein, lactate, and albumin in the CSF and serum of neurosurgical patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 71:671-74; 2001.
33. Bateman DE, Hardy JA, McDermott JR, Parker DS, Edwardson JA. Amino acid neurotransmitter levels in gliomas and their relationship to the incidence of epilepsy. *Neurol Res*, 10:112-14; 1988.
34. Peeling J, Sutherland G. High-resolution ¹H NMR spectroscopy studies of extracts of human cerebral neoplasms. *Magn Reson Med*, 24:123-36; 1992.

35. Collins CL, Wasa M, Souba WW, Abcouwer SF. Regulation of glutamine synthetase in human breast carcinoma cells and experimental tumors. *Surgery*, 122:451-63; 1997.
36. Pu PY, Lan J, Shan SB, Huang EQ, Bai Y, Guo Y, Jiang DH. Study of the antioxidant enzymes in human brain tumors. *J Neurooncol*, 29:121-8; 1996.
37. Levine RL. Oxidative modification of glutamine synthetase. I. Inactivation is due to loss of one histidine residue. *J Biol Chem*, 258:11823-7; 1983.
38. Ye ZC, Sontheimer H. Glioma cells release excitotoxic concentrations of glutamate. *Cancer Res*, 59:4383-91; 1999.
39. Davenport Jones JE, Fox RM, Atterwill CK. NMDA-induced increases in rat brain glutamine synthetase but not glial fibrillary acidic protein are mediated by free radicals. *Neurosci Lett*, 247:37-40; 1998.
40. DeAngelis LM. Brain Tumors. *N Engl J Med*, 344(2):114-23; 2001.