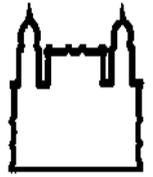




**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



UFBA

FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

TESE DE DOUTORADO

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE ESP12, UMA NOVA
LINHAGEM DE CÉLULAS TUMORAIS DE GLIOBLASTOMA
HUMANO, E DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO *IN VITRO*
PARA AVALIAR A RESISTÊNCIA DE GLIOMAS A
QUIMIOTERÁPICOS**

RUTE MARIA FERREIRA LIMA

Salvador – Bahia – Brasil

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE ESP12, UMA NOVA
LINHAGEM DE CÉLULAS TUMORAIS DE GLIOBLASTOMA
HUMANO, E DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO *IN VITRO*
PARA AVALIAR A RESISTÊNCIA DE GLIOMAS A
QUIMIOTERÁPICOS**

RUTE MARIA FERREIRA LIMA

Orientador: Dr. Ramon dos Santos El-Bachá

Tese apresentada ao colegiado do curso de Pós-Graduação em Patologia, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de doutora em Patologia Experimental.

Salvador – Bahia - Brasil

2013

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

L732c	<p>Lima, Rute Maria Ferreira</p> <p>Caracterização fenotípica de ESP12, uma nova linhagem de células tumorais de glioblastoma humano, e desenvolvimento de um modelo <i>in vitro</i> para avaliar a resistência de gliomas a quimioterápicos [manuscrito] / Rute Maria Ferreira Lima. - 2013.</p> <p>170 f. : il ; 30cm.</p> <p>Datilografado (fotocópia)</p> <p>Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. 2013.</p> <p>Orientador: Dr. Ramon dos Santos El-Bachá, Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular.</p> <p>1. Biologia celular. 2. Tumores cerebrais. 3. Glioblastoma humano. 4. Gliomas. 5. Resistência. I.Título.</p> <p>CDU 576:616-006</p>
-------	---

A meu primo Denivaldo Paim da Silva Junior, por “sentir orgulho da prima estudiosa”.

A Guilherme Guimarães Ferreira Lima por sorrir ao me ver.

*À minha pessoa por observar meu crescimento pessoal refletido nesse crescimento
profissional.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais por todo o sacrifício que fizeram para me oferecer a melhor educação possível.

A vocês que mesmo no momento de maior dor, medo e desespero conseguiram pensar no outro. Esse estudo certamente não teria existido sem o *sim* de vocês. Este *sim* representa mais uma peça colocada no “quebra-cabeça” para entendimento dessa doença.

G. C. C.

1958 – 2012

M. N. S.

1965-2011

C. S. C.

1952-2010

F. A. G. L.

1973-2011

M. G. S.

1939-2010

A. G.

1953-2010

O. M. A.

1943 – 2012

F. A. S.

1953

V. C. S.

1985

Certamente a realização desse trabalho só foi possível devido à participação de pessoas. Gostaria de lembrar que este agradecimento é mais do que um simples “elemento pré-textual”, e sim é o reconhecimento sincero pelo apoio, atenção, colaboração e encorajamentos recebidos. Faltam-me as palavras porque é difícil lidar com o que é puro sentimento. Agradeço a todos pelo suporte científico, psicológico, auxílio direto ou indireto importantes para a conclusão de mais esse trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ramon dos Santos El-Bachá por seu exemplo como cientista.

A professora Dr^a. Mirian Rocha Vásquez por me achar “diferente” e me encaminhar ao mundo da pesquisa científica.

Às prof^{as}. Dr^a. Maria de Fátima Dias Costa, Dr^a. Sílvia Lima Costa, Dr^a. Cátia Suse, Dr^a. Suzana Braga por apresentarem características próprias e tão importantes para condução de qualquer trabalho científico. Levarei além do conhecimento técnico, a empatia, a ousadia, a generosidade e a humildade que vocês possuem.

As equipes dos hospitais:

Hospital Geral Roberto Santos

Médicos neurocirurgiões: Dr. Adriano Donizeth Silva de Moraes, Dr. Thiago da Silva Santos, Dr. Eduardo Fusiki, Dr. Siegfried Pimenta Kuehnitzsch, Dr. Adroaldo Guimarães Rossetti Junior e Dr. Leonardo Miranda de Avelar.

Secretária: Srt^a. Aline

Instituto do Cérebro

Dr. Márcio Cesar de Mello Brandão

Hospital São Rafael

Médicos neurocirurgiões: Dr. José Roberto Tude de Melo, Dr. Paulo José Lima Cardoso e Dr. Wilson Faglioni Junior

Neuropatologista: Dr. Marco Almeida

Imunohistoquímica: Srt^a. Sulamita e Srt^a. Paula

Hospital Santa Isabel

Médicos neurocirurgiões: Dr. Adroaldo Guimarães Rossetti Junior e Dr. Lucival Silva dos Santos

Hospital Universitário Prof. Edgard Santos - HUPES

Médicos neurocirurgiões: Dr. Marco Pondé e Dr. Antônio de Souza Andrade Filho

Farmacêuticos (as): Daiane Silva Souza, Nívea Braga Gomes Negreiros e Genário Oliveira Santos Junior

Aos queridos alunos de iniciação científica: Luciana Nunes Cardoso, Cíntia Karilane Lima de Queiroz, Tamires Barbosa Bezerra e João Gabriel Oliveira Jagersbacher.

Ao apoio dos laboratórios de Neurociências, Virologia, Imunologia e Microbiologia do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia.

A toda equipe e colegas que escreveram e aqueles que ainda escrevem sua história do laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular (LabNq): Sr. Carlos, Camila, Lizandra, Gleide, Maria Socorro, Marco, Sandra, Ana Rita, Daniela, Rafael, Elisabeth, Edson, Martins, Breno, Victor, Bruno, Paulo, Mona, João, Keu, Érica Viana, Tereza Cristina, Noélio, Ana Paula, Érica Patrícia, Ravena, Gregori, Alex, Vanessa Freitas, Vanessa Pereira, Luã Tainã, Letícia, Maiara, Rosan, Lívia, Thiago, Milena, Ísis, Joana, Cleonice, Alessandra e Simone.

Agradecimentos especiais:

Ao agora Prof. Dr. Diêgo Madureira, mas simplesmente, meu amigo Di. Obrigada pelo imenso apoio técnico e amizade recebidos ao longo desses vários anos. Você é um exemplo de competências emocionais e cognitivas.

Ao Prof. Dr. George Emílio Sampaio por seu incentivo velado.

A Prof^a. Dr^a. Giselle Pinto Faria Lopes que foi um anjo recebido no finalzinho da jornada. Tenho certeza que fiz uma amiga. Também obrigada pelo imenso apoio técnico.

A minha amiga Eliana Souza Garcia por verdadeiramente expressar o significado da palavra amiga. Sempre ao meu lado, mesmo estando nós duas muitas vezes distantes fisicamente. Perdoe minhas ausências e obrigada por tudo.

A minha prima Janice, meu primo Ricardo e sua esposa Anne, meu primo Juninho, minha prima de segundo grau Gabi, minha tia Vel e meu tio Denivado por serem minha família. Adoro vocês!

A Viviane Ferreira de Souza e Taiana Rubim de Pinho Almeida pela orientação no caminho do autoconhecimento.

Aos meus professores de ensino de 1º e 2º graus. Obrigada pela dedicação, empenho e amor à esta profissão tão bela.

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

A Deus, por ter me concedido a honra de conhecer vocês, por me levantar quando caí, por enxugar minhas lágrimas quando chorei, por não me fazer desistir, por me mostrar todos os dias o quanto é maravilhoso viver e que sempre vale a pena sorrir.

Bem, ainda corro o risco de não ter incluído alguém nesse agradecimento seletivo. Peço-lhes perdão, e assim, aos amigos e pessoas que de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho, gostaria de expressar minha mais profunda gratidão.

"Se fosse ensinar a uma criança a beleza da música
não começaria com partituras, notas e pautas.
Ouviríamos juntos as melodias mais gostosas e lhe contaria
sobre os instrumentos que fazem a música.
Aí, encantada com a beleza da música, ela mesma me pediria
que lhe ensinasse o mistério daquelas bolinhas pretas escritas sobre cinco linhas.
Porque as bolinhas pretas e as cinco linhas são apenas ferramentas
para a produção da beleza musical. A experiência da beleza tem de vir antes".

Rubem Alves

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 OS TUMORES MALIGNOS CEREBRAIS.....	20
2.2 GLIOMAGÊNESE.....	21
2.3 ASTROCITOMAS.....	24
2.4 QUIMIORRESISTÊNCIA.....	35
2.5 MODELOS <i>IN VITRO</i> PARA AVALIAR A QUIMIORRESISTÊNCIA E A QUIMIOSENSIBILIDADE.....	46
2.6 CLASSIFICAÇÃO DOS GLIOMAS.....	47
2.7 CULTURA PRIMÁRIA DE GLIOMAS.....	54
2.8 IMPORTÂNCIA DO ESTABELECIMENTO, DA CARACTERIZAÇÃO DE UMA CULTURA PRIMÁRIA CELULAR E DE ESTUDOS DE QUIMIORRESISTÊNCIA <i>IN VITRO</i>	56
2.9 BIOPROSPECÇÃO DE NOVOS AGENTES QUIMIOSENSIBILIZANTES.....	59
3 JUSTIFICATIVA	62
4 OBJETIVOS	64
4.1 GERAL.....	64
4.2 ESPECÍFICOS.....	64
5 MATERIAL E MÉTODOS	65
5.1 REAGENTES.....	65
5.2 AMOSTRAS DE TECIDO TUMORAL / PACIENTES.....	66
5.3 SINTOMAS CLÍNICOS E CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS.....	67
5.4 CARACTERÍSTICAS DE IMAGEM DE ESP12 E ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS DE MALIGNIDADE.....	67
5.5 ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA.....	67
5.6 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DAS LINHAGENS ESP - CULTURAS PRIMÁRIA DE GLIOMAS HUMANOS.....	68
5.7 ANÁLISE MORFOLÓGICA.....	69
5.8 IMUNOFENOTIPAGEM POR IMUNOHISTOQUÍMICA.....	69
5.9 CARACTERIZAÇÃO DA LINHAGEM ESP12.....	70
5.9.1 Imunofenotipagem por imunocitoquímica.....	70
5.9.2 Imunofenotipagem por citometria de fluxo.....	71
5.9.3 Imunomarcção para detecção de células CD133 ⁺	72
5.9.4 Expressão de proteínas MDR - MRP1 e Pgp.....	73
5.9.5 Expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF).....	73
5.9.6 Padrão de crescimento - Tempo de duplicação da população celular (TDPC).....	74
5.9.7 Avaliação da resistência aos quimioterápicos.....	74
5.10 BIOPROSPECÇÃO DO 8-MOP ENQUANTO AGENTE QUIMIOSENSIBILIZANTE.....	75
5.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	76
6 RESULTADOS	77
7 DISCUSSÃO	104
8 CONCLUSÕES	122
9 REFERÊNCIAS	124

LIMA, Rute Maria Ferreira. Caracterização fenotípica de esp12, uma nova linhagem de células tumorais de glioblastoma humano, e desenvolvimento de um modelo *in vitro* para avaliar a resistência de gliomas a quimioterápicos. 167 f. Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2013.

RESUMO

O astrocitoma grau IV ou glioblastoma multiforme (GBM) é o mais maligno e com prognóstico ruim entre os gliomas. Esse prognóstico sombrio está associado, em parte, à quimiorresistência (QR). Ao lado disso, a classificação atual dos gliomas não consegue responder a heterogeneidade da resposta ao tratamento. Assim, parece existir subtipos de GBM com características distintas. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi caracterizar fenotipicamente uma nova linhagem, ESP12, e, desenvolver um modelo *in vitro* para a avaliação da QR. Amostras obtidas de glioma humano foram estudadas quanto aos achados característicos de malignidade e subtipadas quanto aos fenótipos proliferativo e pró-neural, imunohistoquimicamente. As culturas obtidas das amostras foram mantidas a 37 °C em atmosfera com 5% de CO₂. A caracterização de ESP12 incluiu: a) subtipagem por imunocitoquímica e por citometria de fluxo; b) investigação de um fenótipo de resistência, através da identificação de células CD133⁺ e de proteínas de resistência às múltiplas drogas, glicoproteína-P (Pgp) e MRP1; c) avaliação da cinética de crescimento, através da determinação do tempo de duplicação celular (TDPC); d) verificação da produção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF); e) avaliação da viabilidade celular, através do teste com MTT, quando exposta a carmustina (BCNU), a vimblastina (VIM) e a temozolomida (TMZ). Por fim, investigamos a atividade quimiossensibilizante do 8-metoxipsoraleno (8-MOP) utilizando o modelo estabelecido. Foram obtidos 6 casos de GBM e 3 casos de gliomas de graduação III, pela Organização Mundial de Saúde, com idade média de 52,6 ± 14,1 anos, a maioria homens. As manifestações clínicas mais frequentes foram crises convulsivas e cefaleia, e, a localização tumoral foi variada. Os achados de imagem se correlacionaram com os achados histoquímicos confirmando o diagnóstico. A sobrevida dos pacientes variou entre 11 dias e 24 meses, com mediana de 11,5 meses. As células formaram monocamadas e revelaram intenso pleomorfismo. A maior parte das amostras apresentou fenótipo proliferativo na imunohistoquímica. As proteínas que caracterizam os fenótipos pró-neural, proliferativo e mesenquimal foram detectadas tanto por imunohistoquímica quanto por imunocitoquímica, em ESP12. Quantitativamente, o fenótipo proliferativo foi mais evidente detectado por citometria de fluxo. Células CD133⁺ representaram menos que 1%. Além disso, 38,6% das células foram positivas para a Pgp. Não houve diferença entre a produção do

VEGF por ESP12 quando comparada a outras linhagens de GBM já estabelecidas. O TDPC de ESP12 foi de 31 h. ESP12 se mostrou mais sensível do que outras linhagens de GBM já estabelecidas a BCNU, a VIM e a TMZ. Por fim, o 8-MOP mostrou atividade quimiossensibilizante significativa.

Palavras-chave: astrocitoma, glioblastoma, gliomas humano, caracterização, quimiorresistência

LIMA, Rute Maria Ferreira. ESP12 phenotypic characterization, a new strain of human glioblastoma tumor cells, and development of an *in vitro* model to evaluate the resistance of gliomas to chemotherapy. 167 f. Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2013.

ABSTRACT

The astrocytoma grade IV also known as glioblastoma multiforme (GBM) is the most malignant and has a poor prognosis among gliomas. This poor prognosis is associated, in part, to chemoresistance (QR). Furthermore, the current classification of gliomas cannot answer the heterogeneity of treatment response. Therefore, it seems to exist GBM subtypes with distinct characteristics. The aim of this study was to characterize phenotypically a new cell line, ESP12, and to develop an *in vitro* model for the assessment of QR. Human glioma samples were studied by immunohistochemistry for the characteristic findings of malignancy and subtyped as to proliferative and proneural phenotypes. Primary cultures were obtained from samples and maintained at 37 °C in an atmosphere with 5% CO₂. The characterization of ESP12 included: a) subtyping by immunocytochemistry and flow cytometry; b) investigation of a resistance phenotype by identifying CD133⁺ cells and the multidrug resistance proteins, P-glycoprotein (Pgp) and MRP1; c) evaluation of the growth kinetics, by determining the cell doubling time (TDPC); d) assaying of vascular endothelial growth factor (VEGF) production; e) the assessment of cell viability by the MTT test after exposure to carmustine (BCNU), vinblastine (VIM), and temozolomide (TMZ). Finally, we investigated the chemosensibilizing activity of 8-methoxypsoralen (8-MOP) using the established model. Six cases of GBM and 3 cases of grade III gliomas were obtained, with a mean age of 52.6 ± 14.1 years, mostly men. The most common clinical manifestations were seizures and headache, and the tumor location was varied. Imaging findings were correlated with the histochemical findings confirming the diagnosis. The median survival was 11.5 months (range: 11 days to 24 months). The cells formed monolayers and showed intense pleomorphism. Most samples showed proliferative phenotype in immunohistochemistry. Proteins that characterize the proneural, proliferative and mesenchymal phenotypes were detected both by immunohistochemistry and by immunocytochemistry on ESP12. The proliferative phenotype was more quantitatively evident by flow cytometry. CD133⁺ cells represented less than 1%. Moreover, 38.6 % of cells were positive for Pgp. There was no difference between the production of VEGF between ESP12 and other GBM cell lines already established. The TDPC of ESP12 was 31 h. ESP12 was more sensitive than other cell lines already established of GBM to BCNU, TMZ and VIM. Finally, the 8-MOP showed significant chemosensibilizing activity.

Keys word: astrocytoma, glioblastoma, human glioma, characterization, chemoresistance

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Variantes de GBM. _____	26
Figura 2. Mecanismo de toxicidade da TMZ. _____	33
Figura 3. Fenótipo MDR. _____	40
Figura 4. Representação esquemática da transição epitélio-mesenquimal _____	52
Figura 5. Incidência de glioma de alto grau em diversas faixas etárias. _____	77
Figura 6. Casos de glioma, por diagnóstico anatomopatológico, em percentual. _____	78
Figura 7. Características de imagem de ESP12, GBM (OMS). _____	80
Figura 8. Características diagnósticas histopatológicas de ESP3. _____	81
Figura 9. Características diagnósticas histopatológicas de ESP4. _____	82
Figura 10. Características diagnósticas histopatológicas de ESP6. GBM (OMS). _____	83
Figura 11. Características diagnósticas histopatológicas de ESP7 e ESP9. GBM (OMS). ____	84
Figura 12. Características diagnósticas histopatológicas de ESP10 e ESP11. GBM (OMS). _____	84
Figura 13. GBM (OMS). ESP11. _____	85
Figura 14. Gliomas de alto grau. _____	85
Figura 15. Curva de sobrevida dos pacientes. _____	86
Figura 16. Expressão de GFAP em gliomas de alto grau. _____	87
Figura 17. Expressão de PCNA em gliomas de alto grau. _____	88
Figura 18. Expressão de OLIG-2 em gliomas de alto grau. _____	89
Figura 19. Morfologia de células de culturas primárias de gliomas isoladas de tumor. ____	90
Figura 20. ESP12. _____	91
Figura 21. Expressão de GFAP em ES12 e em linhagens estabelecidas. _____	92
Figura 22. Caracterização imunocitoquímica para a proteína PCNA. _____	93
Figura 23. Caracterização imunocitoquímica para a proteína Gp-39 . _____	94
Figura 24. Caracterização imunocitoquímica para a proteína OLIG-2. _____	95
Figura 25. Expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em linhagens estabelecidas de GBM, em ESP12 e ESP13. _____	98
Figura 26. Coloração com H&E em gliomas de alto grau. _____	98
Figura 27. Toxicidade da TMZ, do 8-MOP e da associação TMZ e 8-MOP em células de cultivo primário (ESP12). _____	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação de algumas formas de como a célula tumoral se capacita para evitar a exposição à concentração tóxica do quimioterápico.	37
Tabela 2. Sumário das principais características dos subtipos pró- neural, mesenquimal e proliferativo	54
Tabela 3. Reagentes usados na pesquisa e seus respectivos fornecedores.	65
Tabela 4. Faixa de concentrações dos quimioterápicos utilizados nos testes de citotoxicidade	75
Tabela 5. Características clínicas dos pacientes envolvidos no estudo.	78
Tabela 6. Informações dos doadores.	79
Tabela 7. Percentual de células positivas para PCNA, OLIG-2 e Gp 39 em ESP12.	96
Tabela 8. Percentual de células positivas para Pgp e MRP1, em células de GBM humano. ...	97
Tabela 9. TDPC, em horas, de linhagens humanas e murina (C6) de gliomas de alto grau. ...	99
Tabela 10. Efeito, após 72h de tratamento, com TMZ, em células de GBM humano e glioma de rato.	100
Tabela 11. Efeito, após 72h de tratamento, com BCNU, em células de GBM humano e glioma de rato.	101
Tabela 12. Efeito, de após 72h de tratamento, com VIM, em células de GBM humano e glioma de rato.	101
Tabela 13. Tempo de duplicação celular (TDPC), em horas (h), de diferentes linhagens estabelecidas a partir de GBM.	118

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	proteínas transportadoras ABC (do inglês - ATP Binding Cassete)
BCNU	carmustina
CCNU	lomustina
CSC	<i>cancer stem cells</i> (células tronco tumorais)
CMC	concentração mínima citotóxica
DMSO	dimetil sulfóxido
EGRF	<i>epidermal growth factor receptor</i> (receptor do fator de crescimento epidermal)
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
ETO	etoposídeo
FITC	fluoresceína-5-isotiocianato
GBM	glioblastoma multiforme
GBMs	glioblastomas multiforme
GBMO	glioblastoma com componente oligodendrogial
GFAP	proteína ácida fibrilar glial
Gp-39	glicoproteína de cartilagem-39
GST	glutation S- transferase
IC ₅₀	concentração inibitória para 50 % de células
<i>IDH1</i>	gene da isocitrato desidrogenase 1
IDH1	isocitrato desidrogenase 1
MAPK	proteína quinase ativada por mitógeno
MDR	quimiorresistência ou resistência às múltiplas drogas
MGMT	O ⁶ -metilguanina-DNA metiltransferase
MRP	proteína associada à multirresistência
MRPs	proteínas associadas à multirresistência
MRP1	proteína associada à multirresistência 1
MTT	brometo <i>de</i> 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
MTIC	monometil-triaceno-imidazol-carboxamida
OLIG- 2	fator de transcrição oligodendrocitário 2
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	solução salina tamponada com fosfato
PCNA	antígeno nuclear de proliferação celular
<i>PDGFR</i>	gene do receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas
PDGFR- α	receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas tipo alfa
PET	tomografia por emissão de pósitrons
Pgp	glicoproteína P transportadora
<i>PTEN</i>	gene supressor de tumor fosfatase e homólogo tensina
QT	quimioterapia
RM	ressonância magnética
RT	radioterapia
SDS	dodecil sulfato de sódio
SFB	soro fetal bovino

SNC	sistema nervoso central
SSBH	solução salina balanceada de Hanks
TA	temperatura ambiente
TC	tomografia computadorizada de crânio
TDPC	tempo de duplicação da população celular
<i>TP53</i>	gene da proteína supressora tumoral 53
TGF	fator de crescimento transformante
TMZ	temozolomida
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular
VIM	vimblastina
8-MOP	8-metoxipsoraleno

1 INTRODUÇÃO

O diagnóstico de câncer está associado a incertezas no tratamento, dor e principalmente nos coloca frente a frente com um dos maiores temores do ser humano - a consciência da finitude da vida. A doença - especialmente uma grave – como o câncer, destrói a ilusão da invulnerabilidade (ROTARESCU e CIUREA, 2009). Esses temores se tornam ainda maiores quando o diagnóstico é de câncer cerebral, e, certamente é um dos diagnósticos que mais atemorizam enquanto entidade patológica (LUCAS, 2010). Isso porque o cérebro é um órgão que ainda é desconhecido sob alguns aspectos, e, porque é ele que define em última instância o que somos. Qualquer anormalidade que possa danificá-lo ou comprometê-lo terá repercussões na vida do indivíduo (MOLASSIOTIS e col., 2010). Entre os tumores cerebrais, os gliomas são os mais comuns no indivíduo adulto e embora haja tratamento em todas as suas possibilidades, os gliomas de alto grau ainda permanecem com prognóstico ruim (WANG e JIANG, 2013).

Uma das principais medidas terapêuticas adotadas para o tratamento dos gliomas é a quimioterapia acompanhada ou não da radioterapia. Apesar dos diversos avanços na busca por quimioterápicos mais efetivos, a sobrevivência de pacientes portadores de astrocitoma grau IV ou glioblastoma multiforme (GBM), por exemplo, ainda não ultrapassa dois anos após o diagnóstico (TANAKA e col., 2013). Diversos fatores influenciam no prognóstico do paciente com GBM entre eles: a idade, a performance ou o status de Karnofsky, a extensão da remoção tumoral, a realização de radioterapia e o volume tumoral (WELLING e col., 2010). Entretanto, um dos principais problemas que afetam a eficácia do tratamento é a resistência à quimioterapia aplicada (SUN e col., 2012b). A resistência se instala na maior parte das vezes porque o quimioterápico não consegue atingir nas concentrações efetivas a célula tumoral alvo. Isso porque a célula tumoral consegue através de diversos mecanismos, expulsar parte dele. O tumor também apresenta todo um cenário que favorece o seu crescimento e proliferação como a angiogênese e a presença de uma subpopulação de células tronco tumorais.

A caracterização de novas linhagens derivadas de gliomas permite o estudo de diversos aspectos da biologia do GBM (BAKIR e col., 1998). Como exemplo, podemos estudar a cinética celular, o perfil de proteínas e de genes que constituem essas linhagens e que em última análise podem ser correlacionados com aspectos clínicos. O estabelecimento de um modelo *in vitro* para testar a resistência aos quimioterápicos serve como ferramenta para reconhecimento de quais destes poderiam ser mais efetivos no tratamento, tornando-os mais

individualizados e específicos para cada caso e reduzindo a incidência de efeitos colaterais. Por fim, esse modelo também permite bioprospectar novos agentes quimiossensibilizantes.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 OS TUMORES MALIGNOS CEREBRAIS

A palavra câncer tem origem latina e significa “caranguejo”. Tal analogia se deve ao fato dos primeiros estudiosos observarem o comportamento infiltrativo de alguns tumores comparando-o às patas do crustáceo adentrando na areia. Atualmente, definimos cientificamente o termo neoplasias como uma proliferação celular anormal, descontrolada e autônoma, na qual as células reduzem ou perdem a capacidade de se diferenciar (FILHO, PEREIRA e GUIMARÃES, 2004). Existem quase 200 tipos de células neoplásicas que correspondem aos vários sistemas de células do corpo, os quais se diferenciam pela capacidade de invadir tecidos e órgãos, vizinhos ou distantes (ALMEIDA e col., 2005). De acordo com dados obtidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer foi uma das principais causas de morte no mundo com cerca de 7,6 milhões de mortes (algo em torno de 13 % do total de óbitos) em 2008 (GLOBOCAN, 2008). Atualmente, é a segunda causa de mortes por doença no Brasil, estimando-se que em 2002, houve 11 milhões de casos novos e que alcançará mais de 15 milhões em 2020 (FERNANDES e col., 2004; BRASIL, Instituto Nacional de Câncer, INCA, 2006).

Os tumores malignos cerebrais ou neoplasias cerebrais são todas as lesões ou massas expansivas dentro do crânio que surgem devido à multiplicação desordenada ou anormal de células gliais ou neuronais transformadas. As lesões originadas dentro do próprio cérebro são denominadas tumores cerebrais primários. Já os tumores cerebrais secundários são aqueles originários de outros sítios anatômicos - os chamados tumores metastáticos. A medula espinhal também faz parte do sistema nervoso central (SNC) e, portanto, pode apresentar o mesmo tipo de tumores descritos para o cérebro. Em relação ao câncer do SNC, representa, na população mundial, aproximadamente 2 % de todas as neoplasias malignas. No ano passado, foram esperados 4.820 casos novos em homens e 4.450 em mulheres, no Brasil. Esses valores correspondem a um risco estimado de 5 casos novos a cada 100 mil homens e 4 a cada 100 mil mulheres (INCA, 2011). Os tumores malignos cerebrais são raros, mas sua incidência e mortalidade vêm aumentando ao longo das últimas décadas em vários países, inclusive no Brasil, particularmente entre idosos (MONTEIRO e KOIFMAN, 2003). Mesmo não sendo muito frequente, esse câncer contribui significativamente para a morbidade global, apresentando altas taxas de morbi-mortalidade (MCNAMARA, 2012). Dos tumores malignos cerebrais os gliomas são os mais comuns e como o nome sugere, são derivados de células da

glia. Fazem parte dos chamados tumores neuroepiteliais e representam 31 % dos tumores primários e 80 % dos tumores malignos do SNC (PAVON e col., 2012). Incluem os astrocitomas, os oligodendrogliomas (10-30 %), oligoastrocitomas e os ependimomas (menos de 10 %) (ALELÚ-PAZ e col., 2012). Os astrocitomas correspondem entre 70-76 % dos gliomas e o astrocitoma grau IV ou GBM representa 53,7 % sendo a forma mais comum e mais maligna (BALIK e col., 2009; ALELÚ-PAZ e col., 2012; PAVON e col., 2012).

2.2 GLIOMAGÊNESE

Embora se conheça relativamente pouco sobre a etiologia dos tumores cerebrais, particularmente os gliomas, acredita-se que fatores genéticos, hormonais e ambientais estejam envolvidos na gliomatogênese (BOHNEN e KURLAND, 1995; GOLD, DIENER e SZKLO, 1982). Tais fatores podem promover a transformação de células saudáveis em células neoplásicas. Também, condições relacionadas com antecedentes patológicos pessoais como traumatismo craniano, epilepsia, viroses (DZIURZYNSKI e col., 2012; COBBS, 2011) e outras infecções, padrão de dieta, contato com animais, exposição domiciliar a pesticidas e exposição à radiação eletromagnética (ionizante e não ionizante), têm sido associadas ao aumento do risco para câncer de cérebro (GOLD, DIENER e SZKLO, 1982; PRESTON-MARTIN, 1996; FISHER e col., 2007). Sendo assim, em relação aos tumores primários cerebrais, não há uma causa única, mas um elenco de possibilidades para o surgimento dessa doença.

2.2.1 Aspectos ambientais

Parece que a urbanização, principalmente por estar relacionada ao processo de industrialização, e conseqüentemente a poluição, aumenta a exposição a possíveis agentes carcinogênicos. A exposição ocupacional a derivados do petróleo, a produção de borracha e agroquímicos estão relacionados a um maior risco de desenvolvimento de cânceres do SNC, entre eles gliomas (THOMAS e WAXWEILER, 1986; BREM, ROZENTAL e MOSKAL, 1995; GOMES, AL ZAYADI e GUZMAN, 2011; WU e col., 2012). O aumento da expectativa de vida, a má alimentação e o excesso de peso são considerados aspectos etiológicos importantes, embora os estudos muitas vezes apresentem vieses e fatores de confundimento que devem ser levados em consideração nas interpretações (NELSON e col., 2012; OHGAKI e KHEIHULES, 2005a; CHANDANA e col., 2008; BOOKBINDER e

MCHUGH, 2010; DUARTE e REGO, 2007). Os registros de câncer de base populacional no Brasil revelam um aumento das taxas dos tumores malignos de cérebro, especialmente na população idosa (MONTEIRO e KOIFMAN, 2003). As radiações usadas na radioterapia ou mesmo às usadas nas radiografias ou tomografia e substâncias químicas podem ser também prováveis indutoras de tumores cerebrais (NAVAS-ACIÉN, 2002a; 2002b).

2.2.2 Aspectos genéticos

Os aspectos genéticos talvez sejam os mais estudados quanto à origem dos gliomas. A determinação de um perfil gênico e/ou uma classificação gênica e seus respectivos comportamentos frente aos tratamentos ou prognóstico também têm sido investigados por diversos grupos (FREIJE e col., 2004; SHIRAHATA e col., 2009; VAN MEIR e col., 2010). Os aspectos genéticos estão relacionados às mutações nos proto-oncogenes, a inativação de genes supressores de tumor ou a mudanças na programação genética celular.

Algumas lesões genéticas como mutação no gene da proteína supressora tumoral 53 (*TP53*), deleção ou mutação no gene da neurofibrina e amplificação no gene do receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano são muito comuns no GBM (PUROW e SCHIFF, 2009). O gene *TP53* está mutado ou deletado em aproximadamente 50 % dos cânceres humanos. A mutação ou deleção desse gene tem sido associada como fator principal e desencadeante de neoplasias astrocitárias (ISOLAN e col., 2005). Ainda, modelos animais têm demonstrado que a inativação de p53 contribui para a formação de astrocitoma (REILLY e col., 2000). As mutações nos genes da isocitrato desidrogenase 1 (*IDH1*) e isocitrato desidrogenase 2 (*IDH2*) também são frequentemente descritas (PUROW e SCHIFF, 2009). A mutação em *IDH* aumenta a produção de 2-hidroxiglutarato, um potencial oncometabólito (ISOLAN e col., 2005).

Um grande percentual de amostras de GBM (35-40 %) também revelou uma desregulação (mutações, amplificação ou superexpressão) no receptor do fator de crescimento epidérmico (PUROW e SCHIFF, 2009). A mutação ou deleção do gene supressor de tumor fosfatase e homólogo tensina (*PTEN*) está presente em gliomas de graduação II ao IV (PUROW e SCHIFF, 2009; JONES e col., 2012). O gene *PTEN* mutado ou excluído está presente em uma porcentagem alta de glioblastomas multiformes (GBMs) (35-40 %). O gene *PTEN* é um potente inibidor da via Akt oncogênica e a inativação de *PTEN* causa

hiperativação da via Akt. Isso resulta em aumento da divisão celular, da migração, da angiogênese e da resistência a quimioterapia (PUROW e SCHIFF, 2009).

A amplificação do gene do receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (*PDGFR*) também é vista em torno de 13 % nos GBMs. A desregulação gênica do *PDGFR* estimula a proliferação celular, a migração e a sobrevivência (MENG e col., 2012).

A deleção do gene *RBI*, que codifica a proteína associada ao retinoblastoma, é menos frequente nos GBMs, com uma frequência aproximada de 11-14 %. A amplificação de *CDK4*, que ocorre em torno de 14-18 % dos casos é outro meio pelo qual o ciclo celular pode estar alterado ou suprarregulado nos GBMs (PUROW e SCHIFF, 2009).

Observa-se então que várias cascatas de sinalização celular reguladas em última análise por expressão gênica podem estar alteradas e serem descritas como possíveis causas do desenvolvimento de GBMs. A desregulação dessas vias é coordenada por mutações, amplificações ou superexpressões de múltiplos genes.

Algumas doenças hereditárias, como a doença de Ollier e a síndrome de Mafucci são responsáveis por casos esporádicos de gliomas. Contudo, a associação de tumores cerebrais é nitidamente reconhecida na síndrome de Turcot ou polipose adenomatosa familiar. A síndrome de Turcot é síndrome genética rara que se caracteriza clinicamente pela ocorrência de pólipos intestinais, tumor cerebral primário e de múltiplos adenomas colorretais (GALIATSATOS e FOULKES, 2006). Dessa forma, alguns tumores cerebrais podem ser o resultado de uma manifestação extracolônica maligna. A síndrome de Li-Fraumeni parece também estar relacionada a casos de glioma familiar. Nessa doença ocorre mutação no gene *TP53* e no gene *CHEK2* (que codifica a proteína *checkpoint* cinase 2) (PUROW e SCHIFF, 2009).

2.2.3 O papel das células tronco tumorais

Uma pequena população de células da massa tumoral é capaz de se proliferar e formar novos tumores quando enxertada em animais imunodeficientes (THIAGO, 2006). As células com essa habilidade são denominadas de células tronco-tumorais - do inglês - *cancer stem cells* (CSC). O modelo de CSC sugere que eventos epigenéticos modifiquem características das células tronco normais ou de células progenitoras e que esse evento seja o iniciador da tumorigênese (ALELÚ-PAZ e col., 2012).

2.3 ASTROCITOMAS

Os astrocitomas são o principal tipo histológico representativos dos gliomas. Nos adultos, a sobrevida média após cinco anos do diagnóstico desses tumores varia de 27,2 a 32 % (WELLER, 2011; FARIA; DO PATROCÍNIO e RABENHORST, 2006), constituindo a terceira e a quarta causa de mortalidade por câncer entre homens e mulheres, respectivamente (FARIA; DO PATROCÍNIO e RABENHORST, 2006). Os tumores da linhagem astrocística podem ser graduados de I a IV, dependendo de sua malignidade. A malignidade é determinada a partir da presença critérios histopatológicos como atipia nuclear, mitoses atípicas, proliferação endotelial e necrose. O astrocitoma grau I (pilocítico) é benigno, ocorre principalmente na infância e apresenta células bifásicas, alongadas e paralelas, com núcleos não-mitóticos. Está presente células com filamentos gliais, fibras de Rosenthal e áreas com estruturas microcísticas mucóides. Esses tumores se apresentam no hemisfério cerebral, encéfalo, nervo óptico, tronco cerebral e cerebelo (BRAGA, 2008). Em resumo, além da ausência de anaplasia franca têm sua gradação sugerida por dados clínicos como idade do paciente, localização tumoral, aspecto radiológico (FARIA, DO PATROCÍNIO e RABENHORST, 2006). O astrocitoma grau II possui baixa malignidade e são classificados como: fibrilar, protoplasmático, misto e gemistocítico, tendo, este último, tendência à malignidade. O fibrilar ocorre em 80% deste grau e há um predomínio de localização na substância branca. O exame histopatológico mostra hiper celularidade, grande suporte fibrilar, fibras neurogliais, e não se observam mitoses. O protoplásmico encontra-se no córtex cerebral com características de astrócitos protoplásmicos e não há mitose (BRAGA, 2008). Geralmente esses tumores apresentam um critério de malignidade – atipia nuclear. Embora apresentem apenas um critério de malignidade são caracterizados por um alto grau de diferenciação celular, crescimento lento e infiltração difusa das estruturas cerebrais vizinhas. Estas lesões afetam adultos jovens e têm uma tendência à progressão maligna para astrocitoma anaplásico e, finalmente, GBM (ROMÃO, 2007). O astrocitoma grau III (anaplásico) é considerado maligno e apresenta dois critérios histopatológicos: presença notória de mitose e atipia nuclear, podendo ou não haver proliferação vascular (BRAGA, 2008). O astrocitoma grau IV (GBM) é altamente maligno, observando 3 ou 4 critérios: mitose, atipia nuclear, proliferação endotelial e necrose (BRAGA, 2008).

2.3.1 Astrocitoma grau IV (glioblastoma multiforme – GBM)

O GBM é um tumor de ocorrência frequente, constituindo cerca de 50-60 % de todos os gliomas e 12-15 % dos tumores intracranianos em adultos (LUCENA e col., 2006). A designação de multiforme se deve ao fato da grande variedade na morfologia e na arquitetura das células. GBMs podem ser originados de um astrocitoma de menor grau de malignidade (glioblastoma secundário) ou, mais frequentemente, sem evidências de neoplasia precursora (glioblastoma primário ou de novo) (OLIVEIRA e col., 2009). Os secundários são provavelmente responsáveis pela maioria dos GBMs de longa evolução. Algumas mutações são comuns aos dois tipos enquanto outras são específicas de cada um, mostrando que estes dois subtipos desenvolvem-se através de vias genéticas distintas (Figura 1). Por exemplo, existe uma tendência dos GBMs primários acometerem indivíduos mais idosos, ter deleções em *INK4A* (um locus no cromossomo 9 onde mutações estão frequentemente associadas a diversos tipos de cânceres), apresentarem células diploides ou pseudodiploides. Ainda, esse tipo, revela mutações e ampliações no receptor do fator de crescimento epidermal – do inglês – *epidermal growth factor receptor* (EGFR). Em oposto, os GBMs secundários acometem frequentemente indivíduos mais jovens, tem mutações em *P53* e são aneuploides. Estes GBMs tendem a adquirir amplificação em *CDK4* (gene que codifica a cinase 4 dependente de ciclina) ou deleções em *RB* (gene do retinoblastoma) e geralmente não apresentam alterações no EGFR. Tanto GBMs primários quanto secundários mostram perda da expressão de *PTEN* (HOLLAND, 2001).

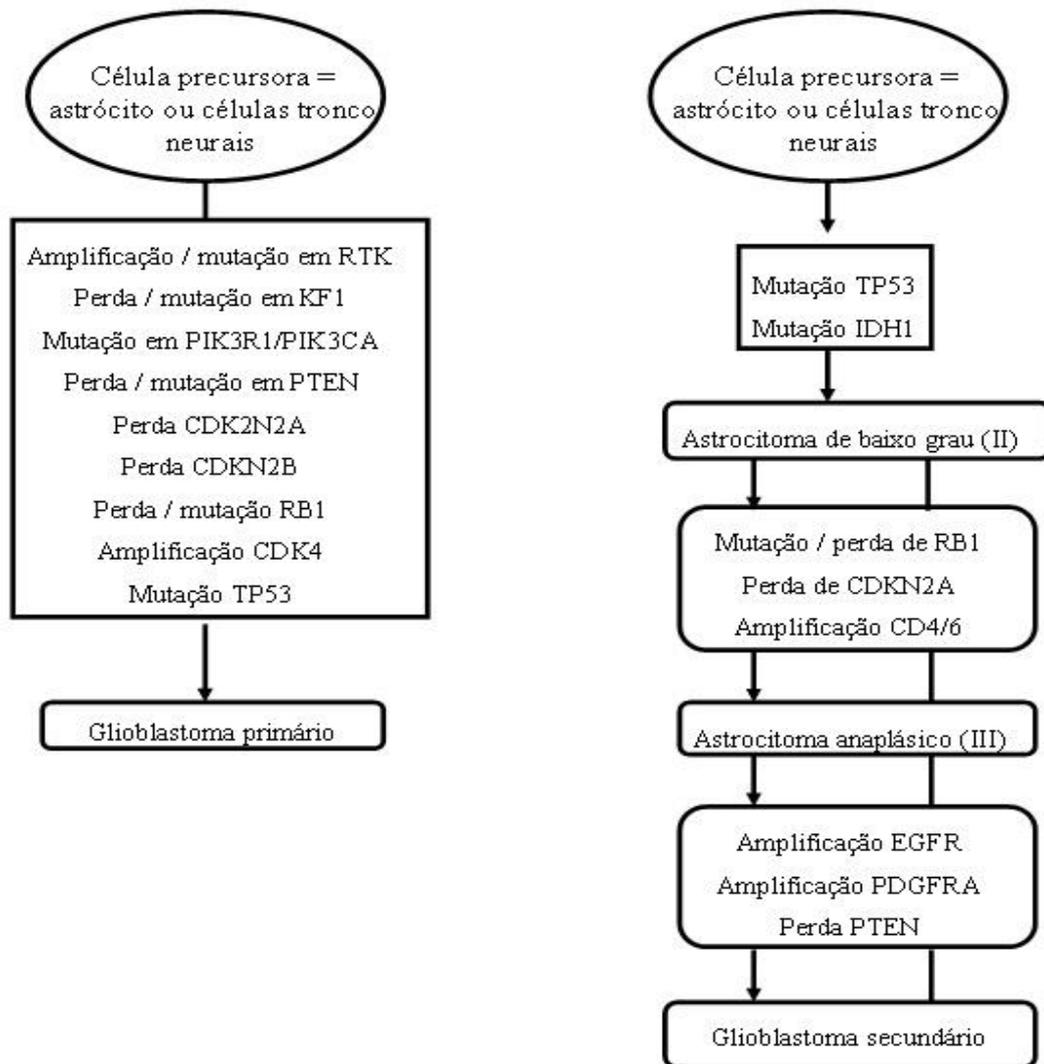


Figura 1. Variantes de GBM. A formação do GBM primário ou do secundário é consequente a aquisição de um conjunto de modificações genéticas. As mutações, amplificações e deleções listadas tem correlação com o grau de astrocitoma e o tipo de GBM. Modificado de HOLLAND, 2001. RTK- do inglês - receptor tyrosine kinase (receptor tirosina cinase); mutação em KIF1 – do inglês - gene Kynurenine formamidase 1 (gene kinurenina formidase 1); perda CDK – do inglês - Cyclin-dependent kinase 4 (cinase 4 dependente de ciclina)

Os GBMs macroscopicamente, originam-se na substância branca, apresentam-se como uma massa expansiva mal delimitada hemisférica, com áreas sólidas, císticas, necróticas e hemorrágicas. Em alguns casos o tumor infiltra o corpo caloso, passando para o hemisfério contralateral. Até hoje não há características morfológicas inequívocas que permitam distinguir os dois subtipos de GBM. Assim, os GBMs, microscopicamente, caracterizam-se pela presença de astrócitos neoplásicos pobremente diferenciados com áreas de proliferação vascular e/ou necrose. Dentre os achados microscópicos mais importantes destacam-se hiperplasticidade, caráter infiltrativo, pleomorfismos celular e nuclear, mitose,

necrose de coagulação e proliferação endotelial capilar (LUCENA e col., 2006). Portanto, além dos critérios de atipia definidos para as graduações II e III, a presença de evidente necrose tumoral, acompanhada ou não por hiperplasia endotelial, delimita o grau IV.

A progressão do astrocitoma grau II para GBM varia de 1 a 10 anos com intervalo médio de 4 a 5 anos e a taxa de sobrevivência é cerca de 7,8 meses para o GBM secundário e de 4,7 meses para o primário (OHGAKI e KLEIHUES, 2005b). A expectativa média de vida para aqueles pacientes que optam por não se submeter ao tratamento é de 17 semanas. Aqueles que seguem aos tratamentos indicados sobrevivem em média por 62 semanas (BALIK e col., 2009). O prognóstico ruim associado ao GBM é explicado por alguns aspectos: (1) capacidade infiltrativa das células de glioma no parênquima cerebral (LE MERCIER e col., 2009; ALELÚ-PAZ e col., 2012; SEOL e col., 2012); (2) as células apresentam níveis diminuídos de apoptose e resistência a drogas citotóxicas (LE MERCIER e col., 2008); (3) as células de glioma podem migrar através da aquisição de um fenótipo polarizado e assimétrico (SEOL e col., 2012). As células conseguem migrar através dos estreitos espaços extracelulares do cérebro, muitas vezes alcançando longas distâncias, tornando difícil o tratamento cirúrgico; (4) em mais de 90 % dos casos, lesão podem dar origem a um tumor recorrente (LE MERCIER e col., 2009; BINDA e col., 2012; SOTTORIVA e col., 2013); (5) por fim, o alto índice de mortalidade apresentado é devido ao tratamento convencional não apresentar grande eficácia uma vez que as células desse tumor apresentam grande heterogeneidade em relação à resistência (BINDA e col., 2012; SOTTORIVA e col., 2013). A apresentação clínica, o prognóstico e a resposta ao tratamento podem variar entre os tipos de GBM (primário ou secundário) (OHGAKI e KLEIHUES, 1999), mas o diagnóstico e tratamento são similares para ambos os tipos. Nesse referencial teórico serão apresentados a evolução clínica de GBMs primários, uma vez que estes representam em torno de 80-90% dos GBMs encontrados (OHGAKI e KLEIHUES, 1999; BRAT e col., 2007), e, porque essa foi a população que constituiu o projeto de pesquisa. Será também apresentada a terapia padrão para glioblastomas primários e secundários.

2.3.2 Apresentação clínica

O GBM apresenta maior incidência em homens em relação às mulheres numa proporção de 3:2, principalmente na faixa entre 45 e 70 anos. É considerado uma neoplasia rara em pacientes com menos de 30 anos e, quando ocorre na infância, comumente atinge crianças na primeira década de vida (RONDINELLI e MARTINEZ, 2002). A história clínica da doença é geralmente curta, menos de 3 meses, em mais de 50 % dos casos (LUCENA e col., 2006). As manifestações clínicas da presença de GBM devem-se predominantemente aos efeitos compressivos decorrentes do crescimento rápido do tumor e do edema peritumoral. Assim, a hipertensão intracraniana, atribuível à ação direta do tumor, ou o efeito tóxico de produtos necróticos liberados da massa tumoral produzem os principais sinais clínicos (LUCENA e col., 2006). O quadro clínico dos gliomas malignos depende da topografia da neoplasia e da sua proximidade com estruturas vitais. Dessa forma, os pacientes apresentam sinais e sintomas focais ou gerais, dependendo do tamanho, da localização e da taxa de crescimento do tumor. Nos estágios iniciais da doença (tumores de baixo grau) a maior parte dos sintomas é focal. Os sintomas focais incluem: sinais neurológicos focais (afasia, parestesia, hemiparesia e distúrbios da visão) (PREUSSER e col., 2011). À medida que a doença progride ou com o aumento do tumor os sintomas tornam-se gerais. Os sintomas gerais mais comuns incluem: cefaleia persistente, náuseas, vômitos, convulsão, confusão mental ou desorientação, e em alguns casos mudanças de personalidade (CHANDANA e col., 2008). As mudanças de personalidade ou de comportamento são comuns quando o tumor está localizado na região frontal (YAMANAKA e SAYA, 2009). A região supratentorial é a mais acometida, tendo prevalência pelo hemisfério esquerdo, principalmente nos lobos frontal e temporal, podendo ainda acometer mais de um hemisfério cerebral (LUCENA e col., 2006). A cefaleia é o primeiro sintoma em 35 % dos pacientes e ocorre posteriormente em 70 % deles. Algumas características levantam a suspeita de um tumor primário: cefaleias matinais ou aquelas que acordam o paciente, melhorando posteriormente durante o dia. Os pacientes com glioma sentem dores de cabeça indistinguíveis de cefaleia tensional. Quando severas, podem estar associadas a náusea e vômitos (38 % dos casos), convulsões (50 % dos casos) e distúrbios visuais (40 % dos casos) (CHANDANA e col., 2008; WEN e KESARI, 2008). As crises convulsivas estão presentes em até 70 % dos pacientes em algum momento. A frequência das crises varia com o tipo histológico do tumor: 30-60 % dos pacientes com

gliomas de alto grau (CAMPBELL, BUCKINGHAM e SONTHEIMER, 2012) e 65-90 % dos pacientes com gliomas de baixo grau (YOU e col., 2012).

2.3.3 Diagnóstico

O diagnóstico dos tumores encefálicos exige a correlação de dados histológicos, com achados clínicos (idade, sexo, sinais e sintomas) e dados de imagem. As ferramentas da imagiologia mais utilizadas são a tomografia computadorizada de crânio (TC) e a ressonância magnética (RM), e, frequentemente o diagnóstico de gliomas malignos é sugerido por estas. A TC e a RM permitem visualizar a localização e características próprias das lesões, além de propor o tamanho e os limites para a ressecção cirúrgica e seleção de amostras de tecidos para diagnóstico histológico. A RM é superior à TC convencional porque produz imagens com melhor resolução e permite avaliar lesões na fossa posterior e na medula espinhal. O risco de reação alérgica ao contraste também é menor (CHANDANA e col., 2008). Nas imagens tanto em TC quanto em RM, os GBMs frequentemente se apresentam como lesões de formato irregular, com áreas centrais de necrose e de edema cerebral circundante mais extenso do que os gliomas anaplásicos (WEN e KESARI, 2008). Devido ao tamanho do tumor e localização pode haver efeito de massa com consecutiva compressão de ventrículos e desvio da linha média. A área central de necrose acaba por delimitar uma zona periférica em anel que capta contraste. Outras variantes da RM (como tractografias e imagem de tensor de difusão), ressonância magnética funcional, angiografia pela ressonância magnética, espectroscopia de ressonância magnética nuclear e tomografia por emissão de pósitrons (PET) podem ser utilizadas na investigação da doença (CHANDANA e col., 2008). Muitas dessas técnicas revelam a atividade biológica do tumor. A PET, por exemplo, revela áreas de hipermetabolismo associadas às alterações malignas, permite diferenciar recorrência de alterações induzida pelo tratamento (como necrose por radiação) (CHEN e SILVERMAN, 2008), localiza regiões corticais funcionais e prediz o prognóstico e a sobrevida do paciente. Além disso, técnicas avançadas de RM, são úteis na determinação das áreas tumorais mais agressivas, alvos preferenciais para biópsia estereotáxica e terapêutica (GRAÇA e col., 2003).

As características de imagem, entretanto, não permitem um diagnóstico de certeza, tampouco o grau de malignidade, embora alguns autores já proponham o uso de espectroscopia de massa ou de técnicas avançadas de RM, por exemplo, como uma ferramenta para classificação de tumores cerebrais (GRAÇA e col., 2003; EBERLIN e col.,

2012). O que se preconiza na prática clínica atual é que a confirmação do diagnóstico deve ser baseada no exame histológico ou anatomopatológico, uma vez que, nenhum exame de imagem permite o diagnóstico definitivo. O exame histopatológico leva em conta uma série de critérios de atipias determinados pela OMS para classificar os astrocitomas. Nos estados de graduação II predomina um aumento de anaplasia nuclear e nos estados de graduação III além da anaplasia nuclear soma-se o aumento da capacidade mitótica. O GBM se distingue histologicamente de outros tumores de baixo grau através da presença de necrose e de hiperplasia microvascular (RONG e col., 2006). As células endoteliais empilham-se umas sobre as outras formando pequenos novelos, conhecidos como pseudoglomerulos. A luz vascular desses vasos anômalos pode ser reduzida ou obliterada, causando áreas de necrose isquêmica com contorno serpiginoso ou geográfico, conhecidas como necroses em pseudopaliçada – uma configuração típica de glioma maligno de alto grau. O termo 'pseudopaliçada' refere-se, portanto, à disposição mais concentrada e perpendicular dos núcleos neoplásicos em volta de áreas hipóxicas que resultam em necrose (RONG e col., 2006). GBMs primários são diagnosticados a partir da história clínica curta e das características histopatológicas de GBM presentes na primeira biópsia. O diagnóstico de GBM secundário requer ao menos duas biópsias tomadas em um intervalo de tempo acima de 6 meses a fim de prevenir erros, assim como a fim de observar a evidência de progressão de um astrocitoma de baixo grau para GBM (OHGAKI e KLEIHUES, 1999).

Recentemente, com o avanço no conhecimento da genética desses tumores, uma classificação ou diagnóstico molecular também tem sido proposta por diversos autores no sentido de identificar subgrupos, caracterizá-los e propor estratégias terapêuticas mais direcionadas de acordo com cada perfil (NIKIFOROVA e HAMILTON, 2011).

2.3.4 Terapêutica

Os principais tipos de tratamentos aplicados aos gliomas malignos são: remoção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia. Existe a possibilidade de associação de terapias com o intuito de ampliar a sobrevida, muito embora, a despeito da utilização de todas as estratégias possíveis, apenas melhorias modestas na sobrevivência foram alcançadas em pacientes com glioma maligno de alto grau.

2.3.4.1 Remoção cirúrgica

A decisão pela ressecção cirúrgica completa é baseada na localização e na extensão do tumor, no laudo histopatológico e nas comorbidades que o paciente porventura apresente. Em pacientes com gliomas de alto grau como GBM, uma ressecção cirúrgica máxima é importante a fim de reduzir o tamanho tumoral, aliviar a pressão intracraniana e melhorar a sobrevida (CHANDANA e col., 2008). A abordagem terapêutica é planejada com o intuito de preservar funções neurológicas, de maximizar a qualidade de vida e prolongar a expectativa de vida do doente. Para atingir estes objetivos, a ressecção cirúrgica é efetuada com o intuito de remover a maior quantidade possível de tumor, com o mínimo de lesão do tecido cerebral saudável (GRAÇA e col., 2003). Muitas vezes, entretanto, a natureza infiltrativa dos gliomas de alto grau e a ausência de limites microscópicos entre o tecido sadio e o tecido tumoral tornam a ressecção completa da lesão impossível, sendo a recorrência inevitável.

Avanços nas técnicas cirúrgicas, como craniotomia estereotáxica imagem-dirigida ou imagem-guiada (SENFY e col., 2010), ressecção guiada por fluorescência (VAN MEIR e col., 2010) e a estimulação intraoperatória possibilitaram uma maior excisão marginal do tumor e têm sido recomendadas em alguns casos (SANAI e BERGER, 2010). No entanto, essas novas técnicas ainda não alcançam a maior parte dos pacientes, os estudos randomizados são escassos (STUMMER e KAMP, 2009) e o seu valor prognóstico não tem recebido tanta atenção (EYÜPOGLU , BUCHFELDER e SAVASKAN, 2013). O que se conclui é que até o presente momento a cirurgia é realizada no intuito de diagnóstico histológico (biópsia) e alívio dos sintomas.

2.3.4.2 Radioterapia

O uso de radiação pós-cirúrgica nos gliomas de alto grau já é considerado um padrão de tratamento. A radiação pode ser administrada internamente e externamente. Os principais tipos de radiações externas são a convencional e a radiocirurgia estereotáxica. O uso de radiação externa convencional consiste de 25 a 35 tratamentos administrados entre cinco e sete semanas. A dose total depende da histologia, da graduação, da localização do tumor e da extensão da ressecção. A radiocirurgia estereotáxica frequentemente oferta altas doses de radiação em uma única sessão, mas pode ser também ofertada em duas ou três

grandes doses. A radioterapia intersticial (braquiterapia) envolve o implante cirúrgico de material radioativo diretamente dentro do tumor (CHANDANA e col., 2008). A braquiterapia utiliza o iodo 125 e pode aumentar a sobrevida; em um estudo conduzido por FRENAY e colaboradores (2000) os benefícios da braquiterapia mostraram aumento na sobrevida média de 28 para 41 semanas nos GBMs.

2.3.4.3 Quimioterapia

As principais drogas utilizadas em esquemas contra os gliomas constam de nitrosoureas tais como: a nimustina, a carmustina (BCNU) e a lomustina (CCNU); alcaloides da vinca tais como: vincristina e vimblastina (VIM); inibidores da topoisomerase I, tais como: topotecano e irinotecano e inibidores da topoisomerase II, tais como o etoposídeo (ETO) (FARIA, DO PATROCÍNIO e RABENHORST, 2006; MUSELLA FOUNDATION, 2007). A combinação terapêutica mais comumente utilizada é procarbazina, CCNU e vincristina (terapia ou esquema PCV). Mais recentemente, a temozolomida (TMZ) tem sido utilizada como primeira linha no tratamento de gliomas de alto grau, associada ou não a BCNU (GARSIDE e col., 2007).

A TMZ é um agente alquilante e essa classe de antineoplásicos é a mais estudada (DA SILVA e col., 2012). Os agentes alquilantes são fortes reagentes eletrofílicos e formam ligações covalentes por reação de alquilação com centros nucleofílicos do DNA, principalmente as bases purínicas e pirimidínicas. Assim, por interagirem diretamente com o DNA formam adutos de alquilação com este, impedindo a replicação celular (OLIVEIRA e ALVES, 2002). A TMZ no pH fisiológico é hidrolisada e convertida ao seu metabólito ativo monometil-triaceno-imidazol-carboxamida (MTIC) (MA e col., 2002). A molécula da TMZ é estável em pH ácido (<5). Isto significa que ela pode ser ingerida via oral e seu composto ativo ser absorvido através da via gastrointestinal. Outros antineoplásicos como a dacarbazina também produzem MTIC, mas estes dependem de conversão enzimática no fígado o que pode conduzir a efeitos tóxicos ou colaterais tornando impraticável a biodisponibilidade do composto ativo (GARSIDE e col., 2007). O MTIC é espontaneamente hidrolisado em 5-amino-imidazol-4-carboxamida, um conhecido intermediário na biossíntese de purina e ácido nucleico, e em metilhidrazina, que parece ser uma espécie ativa alquilante. O MTIC metila o oxigênio do carbono 6 da guanina e produz o aduto de DNA *O*⁶-metilguanina (Figura 2). A citotoxicidade do MTIC se deve principalmente à alquilação do DNA majoritariamente nas

posições *O*⁶ e *N*⁷ da guanina (MA e col., 2002). A TMZ também induz a produção de espécies reativas de oxigênio em gliomas como o resultado do dano ao DNA (OLIVA e col., 2011). A TMZ é uma substância de baixo peso molecular e devido a sua natureza lipofílica, atravessa a barreira hematoencefálica, o que a torna um importante agente para o tratamento de tumores cerebrais (AGARWALA e KIRKWOOD, 2000; NAJMAN e GADELHA, 2002). É considerada o padrão terapêutico adotado para o tratamento de gliomas de alto grau, incluindo GBMs (AGARWALA e KIRKWOOD, 2000; PÉDEBOSCQ e col., 2007; BRANDES e col., 2008; SUN e col., 2012b) e quando associada com radiação parece melhorar a sobrevida desses pacientes (CHANDANA e col., 2008). Em um estudo de fase III, conduzido por STUPP e colaboradores (2005), com pacientes recém-diagnosticados com GBM, foi observado que a administração de baixas doses de TMZ conjuntamente com radiação padrão seguida posteriormente da administração de TMZ em doses padrão melhorava a sobrevivência comparada com os grupos que receberam apenas radiação padrão como tratamento único (mediana de sobrevivência de 14,6 versus 12,1 meses).

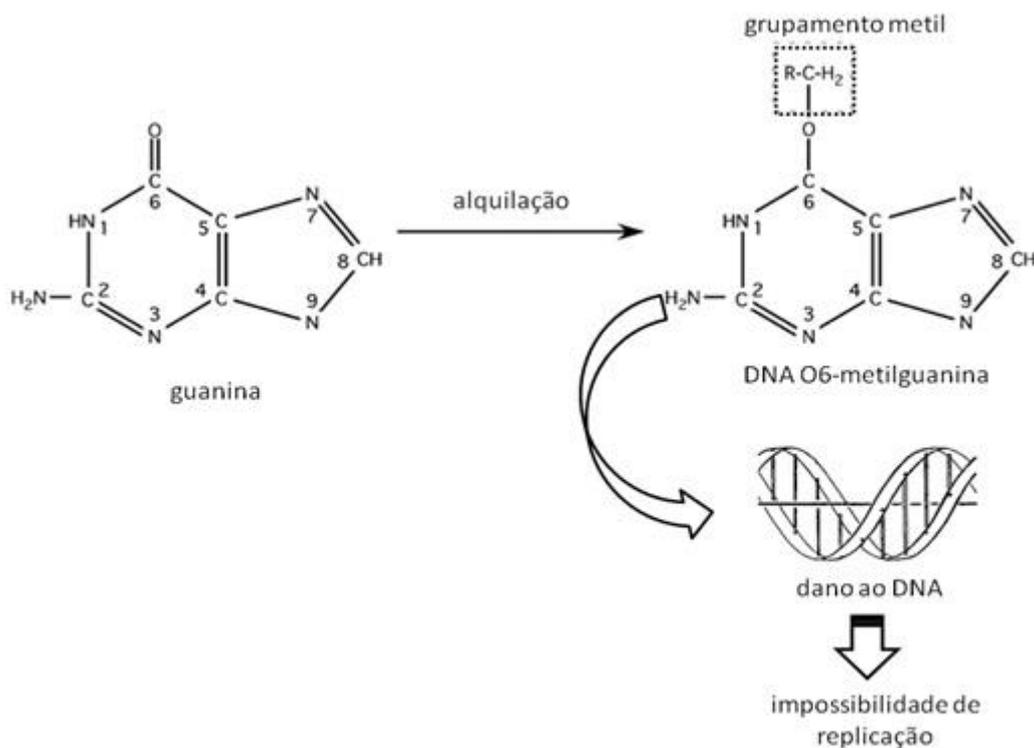


Figura 2. Mecanismo de toxicidade da TMZ. A metilação do DNA na posição O6 da guanina parece ser o principal mecanismo responsável pela ação citotóxica da TMZ. Modificado de ZABOIKIN, SRINIVASAKUMAR e SCHUENING, 2006.

A BCNU além de formar diferentes adutos de alquilação com o DNA também alquila o RNA e inibe a autorreparação do DNA (OLIVEIRA e ALVES, 2002). Além disso, as nitrosoureas também são quimicamente solúveis em lipídeos, o que favorece a escolha destas no tratamento de tumores cerebrais (KOUKOURAKIS e col. 2009). A introdução das nitrosoureas na década de 70 é o mais antigo e ainda o mais significativo tratamento de gliomas malignos de alto grau até o presente momento (GALANIS e BUCKNER, 2000). Quando GALANIS e BUCKNER afirmaram isso ainda não havia o advento da TMZ na terapêutica, fato que só ocorreu em 2005 (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2013). Entretanto, parece que o uso da TMZ trouxe benefícios reais apenas em termos de qualidade de vida como veremos mais adiante. GALANIS e BUCKNER (2000) após revisarem uma série de trabalhos concluíram que esquemas contendo nitrosoureas durante e após a radioterapia parecem produzir uma modesta sobrevida em pacientes jovens (< 60 anos) com astrocitoma anaplásico.

A TMZ foi incorporada no arsenal terapêutico a partir da publicação do estudo de STUPP e colaboradores em 2005, mesmo sem um estudo comparativo entre essa droga e os esquemas já estabelecidos. É importante que análises comparativas sejam feitas, mas parece evidente que um esquema não se sobrepõe a outro em termos de ganho de sobrevida ou de sobrevida livre de doença. Alguns trabalhos mostram que não há diferenças significativas em termos de sobrevida global, sobrevida livre de doença e efeitos adversos entre o uso da TMZ e nitrosoureas, entre elas a BCNU (GARSIDE e col., 2007). Certamente a maior vantagem na escolha da TMZ está relacionada à maior qualidade de vida ao paciente. Embora os dois agentes (BCNU e TMZ) atuem de forma similar, a TMZ produz menos efeitos colaterais que as nitrosoureas. Devido a sua rápida eliminação e ao seu mecanismo de ação, a TMZ é pouco tóxica para a medula óssea, sem efeitos hematológicos cumulativos (AGARWALA e KIRKWOOD, 2000; NAJMAN e GADELHA, 2002). A frequência de efeitos adversos decorrentes da administração da TMZ é menor que 10 % e seu perfil farmacocinético não é idade-dependente (NISHIKAWA, 2010).

Os alcaloides da vinca (*Catharantus roseus*) representados pela VIM, vincristina e vindesina são usualmente empregados no tratamento de leucemias agudas, linfomas e alguns tumores sólidos, como mama e pulmão (VAN DER HEIJDEN e col., 2004). Em relação ao tratamento de gliomas, são mais frequentemente aplicados em gliomas de baixo grau ou pediátricos (LAFAY-COUSIN e col., 2005; JAKACKI e col., 2011), embora possam ser eventualmente ser usados isoladamente ou em combinação com outros agentes no

tratamento de GBM. Os alcaloides da vinca inibem o fuso mitótico, ligando-se às proteínas microtubulares e, conseqüentemente, interrompem a divisão celular na metáfase. São, portanto, agentes desestabilizadores dos microtúbulos (KITCHENS e col., 2011).

Um dos grandes desafios da quimioterapia para o tratamento de GBM é fazer com que a concentração efetiva da droga alcance o tumor. A barreira hematoencefálica, embora se apresente frequentemente falha em algumas áreas de tumores extensos, ainda atua impedindo o alcance do quimioterápico, principalmente na periferia do tumor. Dessa forma, alternativas vêm sendo desenvolvidas no intuito de pôr a medicação *in loco*. Uma dessas alternativas é a colocação intraoperatória de *wafers* impregnados com BCNU, associada a radioterapia e quimioterapia com TMZ (CLARKE; BUTOWSKI e CHANG, 2010). GARSIDE e colaboradores (2007), entretanto, mostraram que *wafers* contendo BCNU (BCNU-W) não conferiam uma vantagem significativa na sobrevivência de doentes com tumores de grau III, quando tratados com a droga, em comparação com placebo. Parece também não haver vantagem na sobrevida para pacientes com tumores grau IV e nenhum aumento na sobrevida livre da doença foi observado. Esses autores acreditam que num futuro próximo o uso da genética e biomarcadores poderia ajudar a identificar subtipos que responderiam melhor a esquemas terapêuticos específicos.

2.3.4.5 Perspectivas terapêuticas

O uso de inibidores de moléculas alvo, que atuam basicamente em seus receptores (CHANDANA e col., 2008; YAMANAKA e SAYA, 2009), assim como o uso de anticorpos monoclonais (imunoterapia) (THOMAS; ERNSTOFF e FADUL, 2012) apontam como perspectivas terapêuticas promissoras.

2.4 QUIMIORRESISTÊNCIA

A quimiorresistência é responsável pelo fracasso no tratamento em mais de 90 % dos doentes com doença metastática (WILSON, LONGLEY e JOHNSTON, 2006). A quimiorresistência torna as células tumorais insensíveis à quimioterapia e consiste no menor acúmulo de drogas quimioterápicas em células resistentes quando comparadas a células sensíveis. Esse fenômeno constitui um dos mais importantes desafios no tratamento dos pacientes com câncer. De forma geral, a resistência, em si, resulta em um decréscimo do acúmulo intracelular da substância antitumoral, fazendo com que ela atue de forma subtóxica.

Ou ainda, mesmo não interferindo na concentração do quimioterápico, a resistência se estabelece através de vias de reparo. Por exemplo, no caso de agentes alquilantes, como a TMZ, as enzimas que desmetilam a guanina não diminuem o acúmulo intracelular do quimioterápico. Elas reparam o dano causado ao DNA. Os mecanismos que conduzem as células tumorais resistirem a um espectro de drogas citotóxicas estruturalmente não relacionadas, portanto, são complexos e multifatoriais (Tabela 1).

Tabela 1. Relação de algumas formas de como a célula tumoral se capacita para evitar a exposição á concentração tóxica do quimioterápico.

Mecanismo proposto de quimiorresistência	Referência (s)
Aumento da expressão de galectina-1	LE MERCIER e col., 2008
Superexpressão de GRP78	PYRKO e col., 2007
Resistência às drogas mediada por modificações na capacidade de adesão – formando esferas via interação célula-célula	WESTHOFF e col., 2008
Superexpressão da subunidade $\alpha 1$ da Na^+/K^+ -ATPase	LEFRANC e KISS, 2008
Aumento dos níveis de expressão de O^6 -metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT)	SAFDAR e col., 2013
Expressão de <i>p53</i> mutante	SAFDAR e col., 2013; WANG e col., 2012
Suprarregulação da isoforma p47ING1a	TALLEN e col., 2008
Deficiência do mecanismo de reparo de mau pareamento do DNA em gliomas	HEGI e col., 2008; JOHANNESSEN, BJERKVIG e TYSEN, 2008
Elevação da atividade APE1-mediada	MONTALDI e SAKAMOTO-HOJO, 2012
Elevação dos níveis de expressão da PARP-1	CHIARUGI, 2012; YOOH e col., 2012
Elevada expressão de EGFR	HUANG e col., 2007; MRUGALA e col., 2008
Aumento da expressão de isoenzimas da proteína cinase C	CHEN e col., 1999
Superexpressão do canal de cloro intracelular 1 (CLIC1)	KANG e KANG, 2008
Atuação das angiopietinas	MORENO-GARCIA e col., 2012
Ativação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)	SALMAGGI e col., 2006
Presença de uma subpopulação de CSC	BEIER, SCHULZ e BEIER, 2011
Superexpressão da glicoproteína-P (Pgp)	CHOU e col., 2012

Assim, as células tumorais tornam-se insensíveis ao tratamento:

- a) aumentando o reparo ao DNA (principal alvo dos agentes antineoplásicos).
- b) alterando a regulação de seu ciclo celular ou regulando os genes envolvidos na apoptose (FERNANDES e col., 2004). A maior parte das drogas quimioterápicas induz apoptose (SCHMITT e col., 2002). Portanto, uma das atividades mais cruciais das medicações quimioterápicas, além de indução de dano ao DNA da célula neoplásica é, em consequência a este dano, a promoção da apoptose de células malignas, promovendo assim a sua eliminação. Desta maneira, se durante o tratamento quimioterápico ocorrer a seleção de clones resistentes à indução de apoptose pelas drogas quimioterápicas, instalar-se-ia um mecanismo adicional de resistência à quimioterapia. Da mesma forma, mutações em genes como *p53*, *Bcl-2*, *bax*, *FAS* entre outras moléculas sinalizadoras de apoptose, poderiam induzir uma resistência a atuação de medicações quimioterápicas dependentes do processo apoptótico para sua eficácia antitumoral (FERREIRA; TOLIS e GIACCONE, 1999; MCGILL e FISCHER, 1999);
- c) alterando as moléculas alvo que vão se complexar com as drogas quimioterápicas, diminuindo, assim, a sua afinidade pela droga quimioterápica. Ou ainda, aumentando a inativação dos agentes antineoplásicos (WILSON, LONGLEY e JOHNSTON, 2006).

Outros mecanismos de quimiorresistência podem ser agrupados didaticamente em: atuação de ATPases de efluxo (BRONGER e col., 2005; CALATOZZOLO e col., 2005), atividade de enzimas detoxificantes (DI LLIO e col., 1985; DE MELO, 1991; WILSON, LONGLEY e JOHNSTON, 2006), alteração em genes supressores de tumor (FERREIRA; TOLIS e GIACCONE, 1999; MCGILL e FISCHER, 1999) e genes responsáveis pelo processo de reparo do DNA, elevação da expressão de moléculas e de seus receptores envolvidos na manutenção de um ambiente promotor de resistência (SALMAGGI e col., 2006; WESTHOFF e col., 2008; LE MERCIER e col., 2008), presença de uma subpopulação de células tronco tumorais (CSC) (LU e SHERVINGTON, 2008). A presença de CSC não é um mecanismo de resistência propriamente dito, mas expressar essa subpopulação confere um fenótipo de resistência às múltiplas drogas (do inglês – Multiple Drug Resistance - MDR) ao tumor.

2.4.1 Resistência às múltiplas drogas (MDR) - Proteínas transportadoras associadas à multirresistência

A quimiorresistência a citotóxicos é um fenômeno multifatorial (tabela 1) enquanto a MDR isoladamente é um fenômeno específico (DE MELO, 1991). A MDR é o mais significativa e prevalente mecanismo de resistência e está relacionado à habilidade que as células tumorais adquirem em “expulsar” agentes terapêuticos para fora das células através de proteínas transportadoras (Figura 3). Essas proteínas utilizam energia oriunda da hidrólise de ATP para realizar esse mecanismo de ejeção. São, portanto, ATPases de efluxo e pertencem a uma subfamília de transportadores ABC (do inglês - *ATP Binding Cassette*) (JANUCHOWSKI e col., 2013). Assim, o fenótipo MDR consiste no menor acúmulo de drogas quimioterápicas, ocorrendo a redução na concentração intracelular desses fármacos para níveis subletais (FERNANDES e col., 2004). Esse tipo de resistência pode afetar uma variedade de quimioterápicos com mecanismos de ação distintos e estruturalmente não relacionados (BREDEL e ZENTNER, 2002; WILSON, LONGLEY e JOHNSTON, 2006). O fenótipo MDR pode estar presente antes do tratamento antitumoral (resistência intrínseca) ou surgir durante o tratamento (resistência adquirida). Ambas conduzem a falência no tratamento e progressão da doença (BREDEL e ZENTNER, 2002). Os fármacos citotóxicos que são mais frequentemente afetados pela MDR são drogas hidrofóbicas, produtos naturais anfipáticos, tais como taxanos, alcaloides da vinca, antraciclinas e mitomicina C (WILSON, LONGLEY e JOHNSTON, 2006).

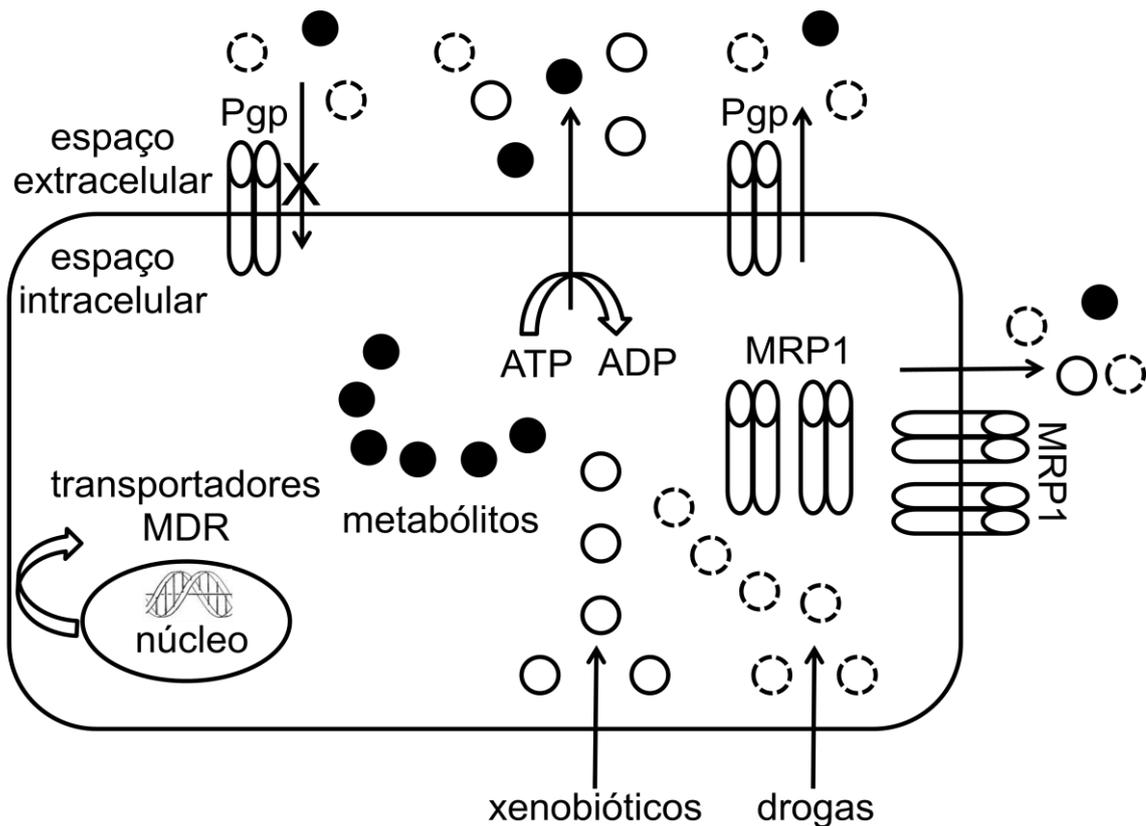


Figura 3. Fenótipo MDR. A função fisiológica primordial dos transportadores associados a ATP (ABC) é proteger as células de diversos insultos tóxicos como moléculas endógenas ou exógenas que entrem na célula por difusão ou transporte ativo. O mecanismo de proteção conferido pelos transportadores ABC é mediado por extrusão de tais moléculas tóxicas, sejam elas produtos metabólicos, xenobióticos, assim como diversos agentes quimioterápicos. Dessa maneira, as células tumorais podem se tornar resistentes aos efeitos citotóxicos uma vez que estão expostas a quantidades subtóxicas das drogas. Pgp – glicoproteína P; MRP1 – proteína associada à multirresistência 1. Modificado de FLETCHER e col., 2010.

As proteínas transportadoras que constituem o fenótipo MDR incluem: a Pgp, a proteína relacionada à resistência à mitoxantrona (MXR, também conhecida como BCRP ou ABCP1) e as proteínas associadas à multirresistência (MRPs).

2.4.1.1 Proteína associada à multirresistência 1 - MRP1 (ABCC1)

Em várias linhagens de tumores cerebrais resistentes à quimioterapia, a aquisição do fenótipo MDR estava associada com a superexpressão de genes MRPs localizados em diferentes cromossomos. Esses genes codificam até o presente momento, 9 proteínas (MRP 1–9) (KUO, 2009), que por sua vez pertencem a uma subfamília de

transportadores ABC. Elas diferem em termos de estrutura, substrato, distribuição tecidual e localização na membrana (BREDEL e ZENTNER, 2002). O gene *ABCC1*, foi o primeiro a ser mapeado no cromossomo 16 (16p13.1). Ele codifica uma proteína de 190 kDa, a qual funciona como bomba de ânions hidrofílicos *N*-glicosilados. A MRP1 ou ABCC1 está localizada tanto em membranas plasmáticas como intracitoplasmáticas, incluindo o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi (CURTA, 2010).

Em oposto à atuação da Pgp, a MRP1 diminui o acúmulo intracelular preferencialmente de forma unidirecional – através da exportação dos agentes antineoplásicos (figura 2). A MRP1, assim como a Pgp, é expressa por praticamente todas as células normais, incluindo astrócitos (SPIEGL-KREINECKER e col., 2002; CALATOZZOLO e col., 2005). Foram detectadas em tecidos importantes para a absorção (pulmão e intestino) e metabolismo (fígado e rim). Ainda, esses transportadores desempenham um papel importante na manutenção da barreira hematoencefálica (LESLIE; DEELEY e COLE, 2005). Isso sugere um o papel na excreção e/ou transporte de xenobióticos citotóxicos (Figura 2). A superexpressão de MRP1 já foi identificada nos tumores de mama, neuroblastomas, cânceres hematológicos e gliomas. Não há diferenças significativas em relação à expressão de MRP1 em gliomas primários e recorrentes, dessa maneira, acredita-se que a resistência de células de glioma à quimioterapia seja intrínseca (LU e SHERVINGTON, 2008). Apesar de também ter sido encontrada nos capilares, a MRP1 também é expressa na membrana das células endoteliais dos gliomas de alto grau, limitando assim a oferta de drogas citotóxicas e prevenindo que a droga atinja uma concentração citotóxica. É capaz de transportar uma variedade de diversos substratos como ânions orgânicos, cisteinil leucotrieno C4, assim como uma diversidade de agentes quimioterápicos, incluindo doxorrubicina, ETO, daunorrubicina, vincristina e colchicinas. O mecanismo de resistência, usando as MRP1, é mais evidente no tratamento com alcaloides da vinca, epipodofilotoxinas e antraciclina (BREDEL e ZENTNER, 2002). Parece que a MRP1 também mostra alta afinidade pelo glutatión e seus conjugados (MATSUMOTO; TAMIYA e NAGAO, 2005). Gliomas expressam altos níveis de subclasses de MRPs (BRONGER e col., 2005; ABE e col., 1998). Usando PCR quantitativa em tempo real e citometria de fluxo, CALATOZZOLO e colaboradores (2005), analisaram 48 amostras de gliomas, a maior parte graus III e IV. Os autores verificaram altos níveis de MRP1 e 5, tanto nas amostras tumorais quanto em células endoteliais.

A MRP1 parece também ter habilidade em exportar GSH (glutatión reduzido) e seus conjugados. Dessa forma, a MRP1 poderia influenciar o balanço celular de

GSH-GSSG e exercer um papel importante na resposta celular ao estresse oxidativo induzido por drogas ou associado a diversos estados patológicos (MUNOZ e col., 2007). Um aumento no número de evidências sugere que a expressão de MRPs pode ser um fator envolvido na resistência intrínseca ou adquirida em um grupo de tumores cerebrais, particularmente os gliomas. O aumento da expressão de proteínas MRP no tumor é um marcador de prognóstico negativo para os pacientes (MUNOZ e col., 2007). Por fim, a MRP1 e a Pgp têm grandes similaridades quanto à estrutura e à resistência às drogas (JANUCHOWSKI e col., 2013).

2.4.1.2 Glicoproteína P transportadora – Pgp

O fenótipo MDR também se correlaciona com a presença de uma proteína de 170 kd, produto do gene *MDR1 (ABCB1)*, denominada glicoproteína P transportadora (Pgp) (Figura 2). A Pgp está localizada na superfície da célula, na membrana luminal dos vasos sanguíneos do tumor, na membrana plasmática das células tumorais, ou de ambos. Esta proteína é hábil em remover aproximadamente 20 drogas citostáticas do interior das células (JANUCHOWSKI e col., 2013). Os alcaloides da vinca, epipodofilotoxinas, antraciclina e taxanos são particularmente vulneráveis a esse mecanismo (BREDEL e ZENTNER, 2002). A Pgp diminui a concentração intracelular do quimioterápico de forma bidirecional, tanto diminuindo a captação da droga (prevenindo a acumulação intracelular e impedindo a absorção transmembrana) quanto aumentando o efluxo (BREDEL e ZENTNER, 2002) (Figura 2).

A Pgp é muito estudada na literatura científica e frequentemente está superexpressa em células tumorais humanas resistentes a múltiplas drogas, incluindo a maior parte dos tumores cerebrais, como os GBMs. A expressão de Pgp é alta em tumores derivados de tecidos que normalmente expressam Pgp. Entretanto, em outros tipos tumorais a expressão de Pgp parece ser induzida pela quimioterapia. Algumas evidências apontam para a associação entre a expressão e prognóstico, particularmente em GBM e meduloblastoma (BREDEL e ZENTNER, 2002). Por outro lado, FRUEHAUF e colaboradores (2006) mostraram que apenas 7 % dos 125 casos de gliomas estudados por eles apresentaram expressão de Pgp, sugerindo que esse não era o principal contribuinte para a resistência à quimioterapia. Corroborando com os dados obtidos por esses últimos autores a expressão de Pgp foi considerada relativamente rara em 18 espécimes de glioma (SPIEGL-KREINECKER e col., 2002).

Inibidores para essa glicoproteína foram propostos. Os de primeira linha como a ciclosporina A apresentaram efeitos tóxicos elevados. A segunda geração de inibidores, representada pelo Valspodar, um derivado da ciclosporina D, embora com melhor perfil farmacológico (inibição de 10 a 20 vezes maior que de compostos de primeira geração) apresentavam-se inespecíficos, inibindo outras proteínas transportadoras ABC, e também apresentavam interações farmacocinéticas imprevisíveis. Já a terceira geração de inibidores da Pgp, representados pelo Taquidar, são mais específicos e não afeta a farmacocinética de agentes citotóxicos coadministrados (WILSON, LONGLEY e JOHNSTON, 2006). A investigação de inibidores deve ser cuidadosa e levar em conta o fato de que a Pgp também é expressa em tecidos normais como adrenal, útero gravídico, fígado, rim, cólon e células endoteliais capilares no cérebro (TSURUO e col., 2002).

2.4.2 Atuação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)

Sobre a participação do VEGF como um dos mecanismos de resistência à quimioterapia, é importante lembrarmos alguns conceitos. Uma das principais características que distinguem as células sadias das tumorais é a multiplicação descontrolada. Inicialmente as células tumorais fazem uso de vasos sanguíneos cerebrais normais. Entretanto, com a constante multiplicação celular, há a necessidade de que novos vasos sanguíneos sejam formados a fim de nutrir e oxigenar essas novas células, em um processo denominado angiogênese.

A angiogênese tumoral é um evento de extrema importância para o desenvolvimento de tumores sólidos. Vários fatores angiogênicos como o fator de crescimento epidérmico básico e VEGF participam no desenvolvimento da vasculatura tumoral (KOGA e col., 2001). Existem pelo menos 6 isoformas de VEGF, sendo que a forma 165 é a mais estudada e expressa em altas concentrações em um grande número de tumores cerebrais. Atua através da ligação a receptores tirosina cinase específicos, estimulando a proliferação, a migração e a sobrevivência das células endoteliais, sendo, portanto, um importante mediador da angiogênese e da permeabilidade vascular. Essa mediação se dá, por exemplo, através da indução da expressão de angiopoietina-2. A angiopoietina-2 promove a desestruturação/desestabilização, brotamento e proliferação das células endoteliais. Por sua vez, gliomas malignos como astrocitoma anaplásico e GBM são caracterizados pela proliferação endotelial e presença de vasculatura proeminente. O VEGF tem um papel crucial

na neovascularização de gliomas e outros fatores angiogênicos são comumente expressos por células desses tumores (KOGA e col., 2001).

O aumento da expressão do VEGF e de seus receptores tem sido associado à progressão, metastatização e pior prognóstico em diversos tumores malignos (BAO e col., 2012; JIANG e col., 2012; KANG e col., 2013; MIN e col., 2012). Mas, como o VEGF estaria relacionado com a quimiorresistência? A quimiorresistência associada a tumores cerebrais pode ter sua origem na situação especial em que o cérebro se encontra – dentro de uma “caixa fechada” sem nenhuma oportunidade de expansão. Esta é uma das principais razões porque tumores cerebrais estão associados a edema cerebral. Como descrito anteriormente, a permeabilidade aumentada mediada pelo VEGF, eleva a pressão intracraniana, que por sua vez resulta em um aumento da pressão intratumoral. O aumento da pressão intratumoral comprime vasos sanguíneos imaturos do tumor. O baixo fluxo de sangue resultante, em última análise, prejudica a difusão de agentes quimioterápicos no tecido tumoral de forma homogênea e, portanto, as drogas não são capazes de alcançar o local de ação.

Dessa forma, para alguns pesquisadores parece haver “santuários farmacológicos” protegendo as células tumorais de agentes quimioterápicos por meio de uma barreira de difusão que desempenha um papel importante na MDR (CHOU e col., 2012). Devido à limitação de penetração das drogas nos tumores sólidos, por atuação do VEGF em última análise, as regiões de hipóxia crônica são frequentemente “protegidas” dos efeitos citotóxicos dos agentes quimioterápicos, reduzindo ainda mais a eficácia da droga. Consequentemente, a fraca penetração, além da expulsão das drogas através do tecido do tumor, são os principais mecanismos de MDR mediado pela hipóxia crônica em tumores sólidos.

2.4.3 Expressão de células CD133⁺

O GBM contém subpopulações de CSC que apresentam resistência intrínseca à terapia e que são capazes de repovoar o tumor após o tratamento quimioterápico (KANG e KANG, 2008). A população de células que apresentam essas características é pequena – algo em torno de 1 % (SALCIDO e col., 2010). Um aspecto importante na terapia antitumoral é identificar essa população de células. As CSC possuem proteínas e vários marcadores genéticos que as distinguem de outras células do mesmo tumor. Um desses

marcadores proteicos é o CD133, (do inglês - *Cluster of Differentiation*), que é uma glicoproteína também conhecida em humanos como prominina1. Essa proteína é expressa em células de tumores diversos (colorectal, hepatocelular, pancreático, pulmão, endometrial, ovário e próstata), incluindo GBM (LEHNUS e col., 2013), e identifica a presença de CSC. O CD 133 é expresso normalmente em células tronco neurais (SYKES e HUTTNER, 2013) e subpopulações dentro dos gliomas partilham características de células-tronco neurais (CHEN e col., 2010), por isso também identificam a presença de células tumorais progenitoras.

As CSC são altamente resistentes à radioterapia e a quimioterapia. Sabe-se que a positividade ou a presença de uma subpopulação de células expressando CD133 está relacionada a um fenótipo de resistência. Células CD133⁺ isoladas de 3 GBMs exibiram altos níveis de mRNA para BCRP1, bcl-2 e Bax com significativa resistência a quatro quimioterápicos: TMZ, carboplatina, paclitaxel e ETO comparado com as células não CD133⁺ (LIU e col., 2006). Essa resistência seria mediada pela capacidade de quiescência, reparo ao DNA e expressão de transportadores ABC por essas células (MAUGERI-SACCÀ, DI MARTINO e DE MARIA, 2013). Corroborando a afirmação anterior, BAO e colaboradores (2006a) mostraram que CSC se tornavam radiorresistentes devido à ativação preferencial da resposta a danos no DNA ser maior nessas células do que nas não CD133⁺. Também FU e colaboradores (2009) observaram que a presença de CSC em GBM promove resistência do tumor à TMZ. Para determinar se células de glioma CD133⁺ são quimiorresistentes, subpopulações CD133⁺ têm sido isoladas de cultura primária de GBM e expostas à TMZ *in vitro*. Essas células CD133⁺ contribuem para essa resistência diminuindo a expressão de proteínas relacionadas a autofagia induzida pela TMZ. Além disso, as CSC expressam constitutivamente a MGMT. Fatores extrínsecos podem contribuir para a resistência das CSCs à TMZ. Estes podem incluir: concentração da TMZ no parênquima cerebral, esquema quimioterápico aplicado e microambiente hipóxico. Outra hipótese que tenta explicar a menor sensibilidade aos esquemas radio e quimioterápicos postula que as CSC são mais resistentes porque proliferam mais rápido que as células progenitoras e células tumorais diferenciadas (BEIER, SCHULZ e BEIER, 2011). Por fim, além da capacidade de reparar o DNA modificado pelos agentes alquilantes usados no tratamento, as CSC expressam proteínas transportadoras associadas à multirresistência como as proteínas ABC. Também, como vimos anteriormente, os gliomas malignos são cânceres dependentes de angiogênese. BAO e colaboradores (2006b) examinaram a possibilidade de células de glioma tipo tronco ou similares a células tronco apoiarem a angiogênese tumoral. Essas células, isoladas a partir de

biópsias de GBM foram implantadas em camundongos imunocomprometidos. Conjuntamente, células tumorais que não se assemelhavam a células tronco foram implantadas em outro grupo de camundongos. Os tumores originados de células gliais semelhantes a células tronco apresentaram angiogênese tumoral disseminada, necrose e hemorragia. Ainda, as células derivadas desse tumor secretaram uma série de fatores angiogênicos, incluindo o VEGF. Dessa forma, células CD133⁺ parecem ter um papel importante no recrutamento de vasos sanguíneos. A forma como o VEGF induz quimiorresistência foi descrita anteriormente.

2.5 MODELOS *IN VITRO* PARA AVALIAR A QUIMIORRESISTÊNCIA E A QUIMIOSENSIBILIDADE

Os ensaios de quimiorresistência e de quimiossensibilidade *in vitro* são inestimáveis para a compreensão dos efeitos de agentes quimioterápicos nas células tumorais. São desenvolvidos com o objetivo de prever a resposta clínica à terapia. Em estudos retrospectivos, os ensaios corretamente predisseram a resposta clínica à quimioterapia em torno de 50 % a 70 % dos pacientes e a resistência próximo de 100 % dos pacientes. Um ensaio *in vitro* para avaliar as drogas quimioterápicas deve ser preditivo, fácil de padronizar, barato, rápido, aplicável a uma grande variedade de tumores e levar em consideração a maior parte dos mecanismos de ação de uma droga. Modelos *in vitro* também podem ser úteis na determinação das concentrações ótimas das drogas, combinações de drogas eficazes, e da combinação adequada do sequenciamento dos agentes quimioterápicos (KIMMEL, SHAPIRO e SHAPIRO, 1987). Os testes de quimiorresistência são importantes para *screening* de novos agentes terapêuticos, para a identificação de padrões de quimiossensibilidade em diferentes tipos de tumores, para o estabelecimento de padrões de resistência cruzada e sensibilidade nos tumores sem tratamento prévio e recidivantes, para a identificação de perfis de genoma e proteoma associados com sensibilidade. Além disso, nos permite correlacionar a resposta *in vitro* com resultados pré-clínicos e clínicos associados com um determinado agente terapêutico, e adaptar os regimes de quimioterapia de forma individualizada. Também, esses testes permitem estudar possíveis vias envolvidas na resistência a determinado quimioterápico que podem estar ou não relacionadas com o processo de tumorigênese. Além de selecionar novos agentes terapêuticos, esses modelos conduzem a pensar em novas estratégias terapêuticas associadas aos tratamentos em uso. Por

exemplo, SUN e colaboradores (2012a) observaram que a exposição de células de GBM à hiperóxia aumentava a toxicidade induzida pela TMZ. Obviamente não podemos desconsiderar que essa metodologia apresenta alguns entraves como a pressão exercida por um ambiente artificial, possibilidade de efeitos citotóxicos dos metabólitos, heterogeneidade na quimiossensibilidade e interpretação equivocada dos resultados (BALIK e col., 2009). Ainda, os tumores humanos exibem um grau considerável de heterogeneidade, havendo diferentes subpopulações clonais no interior do mesmo tumor. Dessa forma, é aceitável que a quimiossensibilidade de uma linhagem celular obtida a partir de um tumor possa não ser representativa do tumor como um todo. Por outro lado, a observação da quimiorresistência em linhagens celulares tumorais humanas pode proporcionar um racional ou paralelos com a resistência observada clinicamente (MERRY, KAYE e FRESHNEY, 1984). Existem diversos ensaios disponíveis para atingir esses objetivos: ensaios clonogênicos e de proliferação, ensaios de atividade metabólica celular, ensaios moleculares para monitorar a expressão de marcadores de resposta ao tratamento, ensaios de desenvolvimento de resistência de drogas e de indução de apoptose.

Diversas pesquisas têm sido feitas com o intuito de desenvolver métodos *in vitro* que sejam hábeis em predizer a quimiossensibilidade e quimiorresistência de tumores humanos *in vivo* e fornecer dados pré-clínicos (NIKKHAH e col., 1992; O'TOOLE e col., 2003; SCHULER e col., 2010; WEISWALD e col., 2013). As vantagens e desvantagens desses métodos têm sido extensamente revisadas (WEISENTHAL e LIPPMAN, 1985; BROWN e MARKMAN, 1996; SUMANTRAN, 2011).

2.6 CLASSIFICAÇÃO DOS GLIOMAS

Os gliomas são tumores neuroepiteliais primários e representam aproximadamente 50 % das neoplasias do SNC (MACHADO, 2004; YOU e col., 2012). A classificação dos gliomas humanos é feita com base em critérios histopatológicos determinados pela OMS. É a mais utilizada e gradua os gliomas humanos em astrocitomas (graus I - IV), oligodendrogliomas (anaplásicos e de grau II) e oligodendroastrocitomas (graus I - IV) (HOLLAND, 2001). Essa graduação resulta da investigação de achados histopatológicos específicos (como o tipo de célula normal de origem) ou indicadores de anaplasia (atipia nuclear, pleomorfismo, elevada atividade mitótica ou mitoses atípicas), hiperplasia endotelial e necrose, típicos de cada variante tumoral. Embora a classificação da OMS seja a mais utilizada, DAUMAS-DUPORT e colaboradores (2000) propuseram outra

classificação para os gliomas de adultos. Segundo eles, a classificação da OMS não permite reprodutibilidade diagnóstica entre oligoastrocitomas e oligodendrogliomas anaplásicos e pelo fato de basear-se apenas no tipo citológico predominante. Além disso, a classificação puramente histológica não consegue responder como alguns pacientes com GBM, por exemplo, respondem de maneiras diferentes ao tratamento. Assim, uma classificação molecular tem sido proposta com o objetivo de refinar o diagnóstico, tornar o tratamento mais efetivo e melhorar o prognóstico.

2.6.1 Classificação molecular do GBM

A importância de detectar subtipos de GBM, a partir da expressão de determinados marcadores moleculares, reside nas diferentes abordagens terapêuticas que esses subtipos podem exigir. Além disso, é possível que subtipos específicos de GBMs tenham se desenvolvido como resultado de causas diferentes ou de células de origem diferentes, assim a fenotipagem de gliomas contribui para uma melhor compreensão dos mecanismos de tumorigênese. Também é importante para a seleção e inclusão de pacientes para estudos clínicos. Ainda e atualmente, um dos assuntos mais estudados em pesquisa são as correlações entre marcadores tumorais e resultados ou evolução cirúrgica (YOU e col., 2012). Por fim, a classificação molecular dos GBMs pode vir a resultar em terapias personalizadas para esses grupos de pacientes. Os primeiros a propor uma classificação molecular foram PHILLIPS e colaboradores (2006). Eles subclassificaram os astrocitomas em 3 grupos baseando-se na expressão de um conjunto de marcadores determinantes de gliomas. Eles observaram que alguns grupos de GBMs apresentavam a expressão maior de um ou mais marcadores. Os GBMs foram subclassificados em: pró-neural, proliferativo ou mesenquimal, tendo estes dois últimos um pior prognóstico. Células de GBM que apresentavam a expressão do fator de transcrição oligodendrocitário 2 (OLIG-2) caracterizavam o fenótipo pró-neural. Já aquelas que apresentavam uma expressão mais acentuada da glicoproteína de cartilagem-39 (Gp-39) caracterizavam o fenótipo mesenquimal e por fim aquelas que expressavam o antígeno de proliferação nuclear (PCNA) determinavam o fenótipo proliferativo. As características desses subtipos têm sido consolidadas por investigações a nível transcricional (PHILLIPS e col., 2007; NOUSHMEHR e col., 2010), proteômico (BRENNAN e col., 2009) e genômico (VERHAACK e col., 2010) utilizando a expressão de outros marcadores. Mais recentemente, ROBERTSON, KOSZYCA e GONZALES (2011) apresentaram em uma

revisão a proposta de uma subclassificação dos glioblastomas em: clássicos, mesenquimal, pró-neural e neural. Nesse trabalho nos detemos à classificação proposta por PHILLIPS e colaboradores (2007).

2.6.1.1 Fenótipo proliferativo

O fenótipo proliferativo está associado à expressão do antígeno nuclear de proliferação celular do inglês *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (PCNA). O PCNA, também chamado de ciclina, é descrito como um marcador da atividade proliferativa. O grau em que uma célula se prolifera tem forte correlação nas neoplasias com a intensidade da carcinogênese. Assim, quanto mais alta for a atividade proliferativa de um tumor, maior será o potencial de malignidade e pior o prognóstico. O PCNA é uma proteína importante para a atividade da DNA polimerase delta e, portanto, necessária para a replicação do DNA (MAITI e col., 2008). Está presente em todas as fases do ciclo celular principalmente na fase G1/S. Sua expressão indica que a célula está em processo ativo de divisão ou em processo de reparo do DNA, sendo por esta razão hoje investigada para tentar caracterizar o grau e o comportamento de alguns tumores (MORISAK e col., 1995; MAITI e col., 2008). O padrão de positividade é nuclear, podendo ocorrer diferenças na intensidade de marcação em decorrência da expressão distinta nas diferentes fases do ciclo celular, portanto, maior positividade nuclear para as células que se encontram na fase S do ciclo celular (MCMORMICK e HALL, 1992). A marcação para PCNA muitas vezes é mais proeminente do que a marcação para Ki-67. Isto porque o PCNA tem uma meia-vida mais longa e também marca células em repouso (KAYASELCUK e col., 2002; MAITI e col., 2008). A investigação para PCNA é realizada em uma variedade de tumores cerebrais e parece haver uma correlação positiva entre a marcação e o grau histológico de astrocitomas. Assim, esse marcador pode ser usado na avaliação da graduação tumoral, no estudo das recorrências e na malignidade tumoral. Neste contexto, inclusive, DEL GIGLIO e colaboradores (1993) já demonstravam que altos níveis de PCNA em células leucêmicas de pacientes com leucemia linfóide crônica se correlacionaram com uma maior resistência à droga Fludarabina. Adicionalmente, esses pesquisadores em 1995, reportaram que altos níveis de PCNA nos blastos de pacientes portadores de leucemia mieloide aguda se associaram a uma menor taxa de remissão após quimioterapia ministrada para esta doença (DEL GIGLIO e col., 1995).

2.6.1.2 Fenótipo pró-neural

OLIG-2 é uma proteína codificada pelo gene *OLIG-2* e sua expressão é prioritariamente restrita ao SNC. A diferenciação normal dos oligodendrócitos requer a expressão dos fatores de transcrição OLIG-1 e OLIG-2. Portanto, OLIG-2 atua como um fator de transcrição envolvido na especificação oligodendroglial. Uma pequena fração de GBMs, entretanto, pode apresentar células tumorais diferenciadas tipo oligodendrogliomas. Esse tipo de GBM, descrito como GBM com componente oligodendroglial (GBMO), foi recentemente reconhecido pela OMS em 2007 (APPIN e col., 2013). Os fenótipos GBMO correspondem entre 4 % a 17 % de todos os GBMs. O componente oligodendroglial e a perda do braço cromossômico 1p e 19q em GBM são indicadores de aumento da sobrevida (NAGASAKA e col., 2007). Correlacionando com a clínica, os pacientes que apresentam esse fenótipo são em geral mais jovens e respondem melhor ao tratamento. As duas características importantes que compõem o fenótipo pró-neural são alterações no receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas tipo alfa ($PDGFR\alpha$) e mutações em IDH1. Também, mutações em TP53 e perda da heterogossidase são eventos frequentes nesse fenótipo (VERHAAK e col., 2010). O subtipo pró-neural mostrou uma alta expressão de genes relacionados ao desenvolvimento como o *PDGFR\alpha*, o *NKX2-2*, além do próprio gene para *OLIG-2*. Outra característica desse subtipo é apresentar um fenótipo metilador (NOUSHMEHR e col., 2010). Por fim, astrocitomas pilocíticos além de expressar uma série de marcadores característicos como o receptor $PDGF\alpha$, o proteoglicano NG2 e Sox10, expressam também OLIG-2 (JONES e col., 2012).

2.6.1.3 Fenótipo mesenquimal

O fenótipo mesenquimal é determinado pela expressão de Gp-39, ou como é denominada mais recentemente, YKL-40. Gp-39 é um membro de uma família de glicoproteínas tipo quitinase, embora essa proteína por si só não tenha função quitinase. A Gp-39 foi identificada primeiramente no meio de cultura de uma linhagem humana (MG-63) de osteossarcoma (FRANCESONE e col., 2011) e é expressa por vários tipos de tumores sólidos (mama, intestino, pulmão, rim, ovário, próstata, útero, pâncreas, tireoide, oligodendrogliomas e GBMs). A expressão dessa proteína parece ser induzida por modificações no ambiente da matriz extracelular, o que nos faz pensar em um papel importante durante o desenvolvimento, na remodelação tecidual e na inflamação. É um

importante marcador de progressão de doenças inflamatórias. Por exemplo, os níveis séricos de Gp-39 estão aumentados em pacientes com artrite reumatoide, osteoartrite, fibrose hepática e asma. Corrobora, assim, que sua função patológica esteja associada com a remodelação da matriz extracelular. Embora as funções biológicas da Gp-39 ainda não estejam completamente esclarecidas, os estudos sugerem uma participação positiva dessa proteína na sobrevivência e diferenciação de células tumorais, na proliferação do tecido conectivo, proteção contra a apoptose e estimulação da angiogênese (FRANCESONE e col., 2011) e migração celular. O mecanismo molecular envolvendo a indução da angiogênese pela Gp-39 envolve a coativação de um receptor de membrana sindecan-1(S1), uma integrina $\alpha v\beta 3$ e a regulação de efetores de sinalização, como a cinase de adesão focal (FAK) e MAP cinase (SHAO e col., 2009). A Gp-39 afeta a migração celular através da regulação da metaloproteinase 2, da adesão à matriz extracelular, do rearranjo do citoesqueleto e do estímulo à contratilidade (KU e col., 2011). Além disso, observou-se radiorresistência e aumento da capacidade invasiva em células expressando Gp-39 (NIGRO e col., 2005). Por esta razão, a alta expressão de Gp-39 está relacionada à redução na sobrevida (NAKADAA e col., 2007). Altos níveis séricos de Gp-39 são encontrados no GBM (FRANCESONE e col., 2011). Os GBMs têm 3 a 62 vezes mais elevação dos níveis de Gp-39 do que no cérebro normal. Existem evidências de que os níveis de Gp-39 correlacionam-se com a graduação de gliomas malignos (NAKADAA e col., 2007). Uma vez que não existe nenhum estudo *in situ* para documentar a expressão de Gp-39 em gliomas, a localização celular da expressão de Gp-39 permanece desconhecida. FRANCESONE e colaboradores (2011) mostram que a sobrevivência das células tumorais induzida pela expressão de GP-39 pode ser mediada pelas vias MAPk e AKT. CARRO e colaboradores (2010) também mostraram que dois fatores de transcrição, C/EBPbeta e STAT3, podem ser principais reguladores da sinalização mesenquimal, numa tentativa de esclarecer o porquê ou que vias fazem o fenótipo mesenquimal ser tão agressivo. A combinação do aumento da atividade de marcadores mesenquimais (entre eles Gp-39) e astrocitários é uma reminiscência de uma transição epitélio-mesenquimal a que tem sido associada tumores desdiferenciados e transdiferenciados (VERHAAK e col., 2010). Essa transição epitélio-mesenquimal é um processo celular complexo que reflete um alto nível de plasticidade fenotípica. Durante a transição, uma série de eventos bioquímicos e de sinalização culmina no aumento da motilidade, invasividade e síntese elevada de componentes da matriz extracelular hábeis em degradar a membrana basal (figura 4). Esse fenômeno também parece estar relacionado com uma progressão tumoral mais rápida e com

um aumento na resistência a quimioterapia convencional (KRASNAPOLSKI, TODARO e DE KIER, 2011). Daí o prognóstico desfavorável associado aos GBMs que apresentam componente mesenquimal.

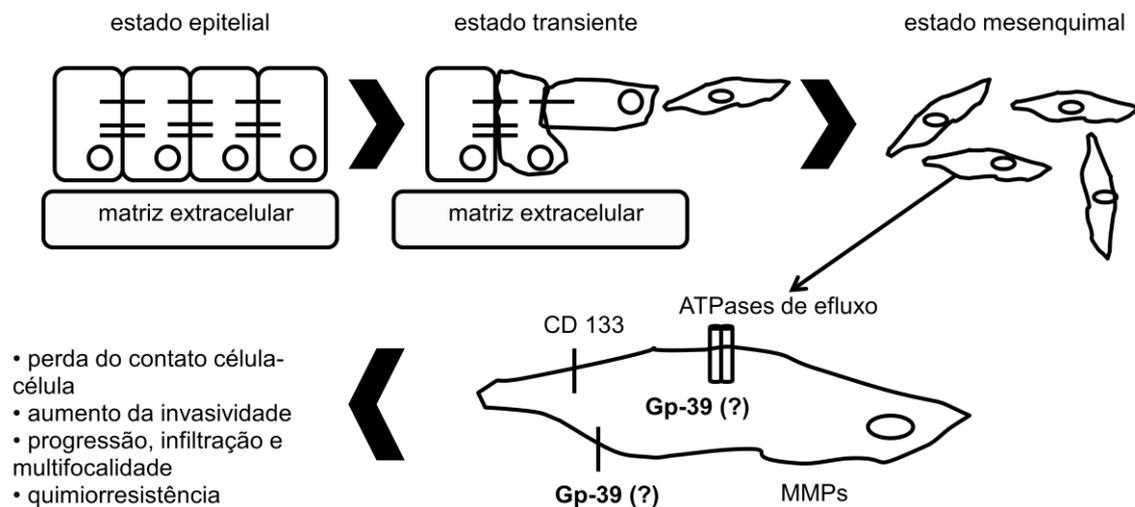


Figura 4. Representação esquemática da transição epitélio-mesenquimal e sua relação com a agressividade tumoral. Uma célula epitelial polarizada apresentando suas junções bem estabelecidas adquire um fenótipo mesenquimal a partir de alterações no citoesqueleto e por perdas do contato célula-célula caracterizando o estado transitente. No estado mesenquimal ocorre perda da membrana basal, descolamento, invasão e migração para o tecido adjacente. A célula com fenótipo mesenquimal apresenta marcadores que identificam a presença de CSC (CD133⁺), marcadores de resistência à quimioterapia (Pgp, MRPs), metaloproteinases (MMPs), entre outros. Gp-39 está expressa nesse subtipo. A localização dessa proteína ainda não está determinada. Modificado de KAHLERT, NIKKHAH e MACIACZYK (2013).

2.6.1.4 Proteína ácida fibrilar glial (GFAP)

Além dos marcadores descritos anteriormente, esse trabalho também investigou a expressão de GFAP ou do inglês *Glial fibrillary acidic protein* - proteína ácida fibrilar glial. A GFAP é uma proteína filamentosas intracitoplasmática específica do citoesqueleto de astrócitos (PÉDEBOSCQ e col., 2007). A origem astrocitária de uma linhagem celular pode, portanto, ser determinada por esse filamento intermediário tanto em estados normais quanto em estado patológicos (PAETAU e col., 1979; RUTKA e col., 1998). Esta proteína, portanto, define a ontogenia celular, apresentando papel importante também na manutenção da plasticidade e na modulação do crescimento astrocitário.

A quantidade de GFAP produzida pelas células é regulada por vários mecanismos, tais como a presença de citocinas e hormônios (GEHLEN, 2009; STICOZZI e col., 2013). O aumento da expressão de GFAP é observado em algumas situações conhecidas como "ativação astrocitária" (STICOZZI e col., 2013). Durante o desenvolvimento, a vimentina (outra proteína de citoesqueleto) está presente conjuntamente com a GFAP em células gliais imaturas, assim como em astrócitos tumorais, mas não em astrócitos maduros (BONGCAM-RUDLOFF e col., 1991). A GFAP é expressa no SNC, nos astrócitos, e, portanto é um marcador de origem astrocitária. Entretanto, esta proteína pode ser encontrada em oligodendrogliomas, ependimomas, tumores neuroectodermas primitivos e papilomas do plexo coroide. Além disso, a GFAP pode ser encontrada fora do sistema nervoso, como no cristalino, glândulas salivares e seus derivados neoplásicos (GARCEZ, 2004). É responsável por muitos processos funcionais da célula como manutenção da estrutura, movimento e comunicação celular, e funcionamento da barreira hematoencefálica. A GFAP ajusta a rede de filamentos presentes na célula de forma a permitir a mitose. Durante a mitose existe um aumento da quantidade de GFAP fosforilada durante o plano de divisão celular. A imunorreatividade para GFAP é extremamente variável nos GBMs e sua expressão tende a diminuir durante a progressão do glioma ou aumento da anaplasia (ROMÃO, 2007). Nesse sentido, a investigação da presença dessa proteína foi usada para confirmar a origem glial do tumor e investigar possíveis estados de desdiferenciação após as passagens (PÉDEBOSCQ e col., 2007).

Por fim, PHILLIPS e colaboradores (2006) observaram que a expressão de GFAP foi mais intensa nos GBMs com fenótipo mesenquimal e pró-neural quando comparada com tumores com fenótipo proliferativo. Na tabela 2, abaixo, apresentamos um resumo das principais características dos subtipos pró-neural, mesenquimal e proliferativo.

Tabela 2. Sumário das principais características dos subtipos pró-neural, mesenquimal e proliferativo estudados por PHILLIPS e col., 2006. DLL – proteína delta like 3; TOP2A - topoisomerase II α ; BCAN – brevican (sulfato de condroitina proteoglicano).

Subtipo	Pró-neural	Proliferativo	Mesenquimal
gradação histológica	grau III ou grau IV (OMS) com ou sem necrose	grau IV com necrose (OMS)	grau IV com necrose (OMS)
morfologia	astrocítica ou oligodendroglial	astrocítica	astrocítica
idade dos pacientes	jovens (40 anos)	idosos (50 anos)	idosos (50 anos)
prognóstico	sobrevida maior	sobrevida curta	sobrevida curta
marcadores histológicos	OLIG-2, DLL3, BCAN	PCNA, TOP2A	Gp-39, CD44, VEGF
similaridade tecidual	cérebro adulto e fetal	células tronco hematopoiéticas, linfoblastos	osso, cartilagem, células endoteliais, musculatura lisa, células dendríticas
processo biológico relacionado	neurogênese	proliferação	angiogênese

2.7 CULTURA PRIMÁRIA DE GLIOMAS

No início do século XX, Harrison e Carrel deram início a uma das metodologias mais utilizadas para estudar o comportamento de células animais fora do organismo – a cultura de células.

O modelo de cultura de células apresenta vantagens e desvantagens. As células em cultivo expressam a fisiologia de modo muito contraditório devido à perda de características, principalmente fenotípicas, que ocorrem durante o seu desenvolvimento em cultura. A proliferação *in vitro* difere daquela *in vivo*. Assim, por mais próximo que esse modelo esteja da realidade, o processo *in vitro* ainda pode atrelar fatores que influenciem o desenvolvimento celular, e, que não estejam presente *in vivo*. A adesão célula-célula e célula-matriz está reduzida, ocorre perda das características como heterogeneidade e arquitetura tridimensional de um tecido *in vivo* (ALVES e GUIMARÃES, 2010). Entretanto, o modelo de cultura de células tanto sadias quanto tumorais é uma preciosa tecnologia que permite o desenvolvimento de diversos protocolos experimentais (farmacológicos, de ação de compostos de origem vegetal, de interação celular). Por exemplo, a utilização da linhagem VERO (oriunda de rim de macaco-verde africano *Cercopithecus aethiops*) é um modelo experimental para o desenvolvimento de novas vacinas aprovado pela OMS. A linhagem

MRC-5, oriunda de tecido de pulmão de feto humano, é utilizada na produção da vacina de rubéola. As células HELa (oriundas de tumor de cérvix uterino humano) são muito utilizadas em ensaios de citotoxicidade (ALVES e GUIMARÃES, 2010). Além disso, tais modelos podem ser empregados para avaliar condições metabólicas, patológicas e fisiológicas as mais diversas, e também na investigação dos mecanismos de resistência às drogas e no desenvolvimento de novos agentes antitumorais. Os modelos utilizando culturas de células permitem a realização de estudos a nível molecular, as condições ambientais podem ser bem manipuladas e existe a facilidade em criopreservação. Além disso, apresentam baixo custo e economia de tempo para a obtenção de resultados, uma vez que diversas hipóteses podem ser testadas empregando-se uma infinidade de linhagens celulares. Esta técnica de prospecção representa uma alternativa à pressão imposta pela sociedade e por comitês de ética contra o uso indiscriminado de animais em pesquisas científicas (LIMA, 2008).

A obtenção de células a partir de um fragmento de tecido dá origem à chamada cultura primária. A manutenção das características fenotípicas e genotípicas torna essa forma de cultivo a mais utilizada para estudar o comportamento de determinada célula *in vitro* (ALVES e GUIMARÃES, 2010). As células que conseguem sobreviver ao processo de desagregação e aderirem ao plástico formarão a primeira monocamada de células daquele tecido. Essas células possuem as características do tecido de origem, podem crescer em cultura por um determinado período de tempo e são denominadas células primárias.

A cultura primária de gliomas representa um modelo útil para o estudo das variáveis envolvidas na patogênese dos astrocitomas. Por exemplo, é possível estudar as interações glioma-macrófago e purificar macrófagos dessas culturas. Com isso, os mecanismos imunológicos que possam conduzir a uma imunoterapia ou como o tumor “escapa” ao controle do sistema imune podem ser compreendidos (PARNEY, WALDRON e PARSA, 2009). Além disso, a utilização de cultura de células derivadas de GBM humano em curto prazo proporciona o estudo das características biológicas desses tumores. Como observado no estudo de JUNG e colaboradores (2006) onde eles avaliaram o papel de um gene supressor de metástase (*Nm23*) na migração e invasão de células de glioma. O comportamento celular também pode ser estudado como fizeram HUANG e colaboradores (2008). Esses pesquisadores concluíram que células tronco de gliomas são mais agressivas em tumores recorrentes (SU-2, denominados por eles) do que no tumor primário (SU-1). Além disso, destacaram a possibilidade da manutenção dessas culturas por longos períodos *in vitro*, 44 e 38 meses respectivamente. Desse trabalho podemos também concluir que a partir de

culturas primárias podemos obter células tronco tumorais. Já CLAVREUL e colaboradores (2012) com o objetivo de estudar a recorrência de GBM destacam a importância de compreender a zona de tecido cerebral circundante ao tumor. Parece que o compartimento do estroma não neoplásico da maior parte dos tumores sólidos tem um papel ativo na proliferação celular, invasão e metástase. Os autores então isolaram uma população de células estromais circundante ao GBM, ou seja, realizaram uma cultura primária de células periféricas de GBM.

Com a metodologia de cultura primária, também é possível avaliar a eficácia de agentes antitumorais. PÉDEBOSCQ e colaboradores (2007) descreveram um procedimento padrão de obtenção de cultura primária de pacientes com GBM, a fim de investigar a toxicidade de drogas antitumorais. Por fim, esses autores argumentam que seria de grande interesse a determinação da eficácia dos agentes antitumorais na cultura de células obtida de cada indivíduo a fim de correlacionar esse dado com a evolução clínica do paciente (PÉDEBOSCQ e col., 2007).

2.8 IMPORTÂNCIA DO ESTABELECIMENTO, DA CARACTERIZAÇÃO DE UMA CULTURA PRIMÁRIA CELULAR E DE ESTUDOS DE QUIMIORRESISTÊNCIA *IN VITRO*

A tumorigênese glial é complexa. Por essa razão, a resposta clínica varia consideravelmente dependendo do perfil gênico do paciente. Portanto, o uso de cultura primária de células derivadas de GBM humano proporciona um bom modelo *in vitro* para investigar as propriedades biológicas desses tumores e avaliar a eficácia de agentes antitumorais. Muitos estudos *in vitro* têm sido feitos em linhagens de GBM, entretanto, ao fornecer um perfil geral da toxicidade de drogas, eles não levam em conta a capacidade de resposta variável dos pacientes. Dessa forma, parece ser de grande interesse a determinação da eficácia do fármaco em culturas de células individuais obtidas a partir dos pacientes – ou seja, cultura primária. Além disso, esses resultados podem ser correlacionados com dados clínicos e patológicos. Culturas primárias de GBM têm sido feitas, mas com objetivos distintos (BOCK e col., 2012; GUO e col., 2012; OH e col., 2012). Em relação à quimiorresistência existem poucos dados em cultura primária de GBM. Apenas 8 trabalhos nos últimos dez anos, na base de dados do PUBMED usando os descritores “*primary cultured glioblastoma chemoresistance*”.

A caracterização de linhagens derivadas de tumores representa uma importante ferramenta para o estudo detalhado de vários aspectos da biologia tumoral. Nesse sentido, a patologia celular e molecular podem ser desmembradas e relacionadas a aspectos de diagnóstico, assim como de terapia. Muitos estudos estabeleceram e caracterizaram diferentes linhagens de glioma, inclusive derivadas de GBM (WANG e col., 2008; LOJA e col., 2009; ISHIWATA e col., 2005). Algumas dessas linhagens são amplamente utilizadas nas investigações da biologia tumoral cerebral - U87MG, A172, U373MG e U251MG. Assim, uma descrição detalhada de uma linhagem recém-obtida é um pré-requisito para sua utilização na pesquisa experimental.

Do ponto de vista experimental, uma cultura primária pode servir para preencher lacunas na biologia. Por exemplo, de um modo geral as células do SNC são bem estudadas *in vitro*, porém, as células gliais periféricas são pouco investigadas apesar da sua importância etiológica em doenças inflamatórias e neurodegenerativas. Tendo em vista essa lacuna, DE ALMEIDA-LEITE e ARANTES (2010) padronizaram e caracterizaram morfolologicamente uma cultura primária de células gliais ganglionares cervicais superiores de rato. Objetivaram assim, obter uma ferramenta útil para estudar a biologia celular periférica glial. As células foram caracterizadas morfolologicamente e imunocitoquimicamente. Também foram investigadas a proliferação celular e mitose. Já MACIEL (2010) isolou, cultivou e caracterizou células tronco, com o objetivo de contribuir para a engenharia tecidual que por sua vez, tem papel fundamental na medicina regenerativa. MORIYAMA e colaboradores (1997) estabeleceram e caracterizaram a linhagem MGM-1 de GBM humano e propuseram que esta poderia ser útil para o estudo de mecanismos que regulam a motilidade e a invasão, uma vez que essa linhagem apresentava um fenótipo altamente móvel. OZDENER, SPIELMAN e RAWSON (2012) perceberam que não havia ainda um protocolo estabelecido para o estudo de células gustativas humanas. O estabelecimento de um protocolo e caracterização dessas células seria de grande importância para estudar as propriedades moleculares, regenerativa e funcional destas células. Nesse trabalho eles desenvolveram um método que aumentou o tempo de viabilidade (mais de 8 passagens) dessas células que não ultrapassava 3-5 dias. Por fim, NUKI e colaboradores (2004) estabeleceram e caracterizaram uma linhagem que pode ser usada em estudos de sinalização celular.

Para a caracterização de células em cultivo é necessária a observação de vários aspectos, como a descrição do histórico da célula, incluindo sua origem (órgão, tecido, idade, sexo e espécie do doador), e a metodologia utilizada para obtê-la, histórico de

passagens, meios de cultura usados e passagem em animais (ALVES e GUIMARÃES, 2010). Vários são os parâmetros que podem servir para caracterizar uma cultura primária. São eles: morfologia, cariótipo, expressão de proteínas, análise das fases do ciclo celular, DNA *fingerprinting* e tempo de duplicação celular. Nesse trabalho estudamos a expressão das proteínas que compõem os fenótipos mesenquimal, pró-neural e proliferativo como descrito em item anterior. Também a expressão de GFAP foi investigada. E por fim, caracterizamos a linhagem denominada ESP12 também quanto a um possível fenótipo de resistência e sua cinética de crescimento ou tempo de duplicação da população celular.

2.8.1 Importância da determinação da cinética de crescimento/tempo de duplicação da população celular (TDPC) – aplicações: estudos farmacológicos e toxicológicos, componente da caracterização de uma cultura celular

A capacidade proliferativa caracteriza uma cultura celular e é determinada através da curva de crescimento ou do tempo de duplicação da população celular (TDPC) (TAVARES e TAVARES, 2009). Essa curva reflete as fases de adaptação das células às condições ambientais, à disponibilidade de nutrientes e ao suporte de ancoragem, necessários para promover a produção de novas células. As células normais em cultura têm seu padrão de crescimento representado por essa curva sigmoide. As células tumorais, por sua vez, além do TDPC têm sua capacidade proliferativa mensurada por outras variáveis como análise de ciclo-celular (ALVES e GUIMARÃES, 2010) e fração das células tumorais que se encontram no grupo replicativo. A determinação do TDPC é considerada uma informação essencial, uma vez que numerosos tumores são caracterizados pela proliferação celular descontrolada.

A análise da cinética de crescimento celular é interessante para avaliar o efeito farmacológico e toxicológico *in vitro* de diversos agentes farmacológicos. ROBB e STUART (2011), por exemplo, utilizaram o TDPC como um parâmetro avaliar a inibição do crescimento e aumento da resistência ao estresse, *in vitro*, induzida por duas frações de resveratrol contra células de três linhagens: MRC5 fibroblastos de pulmão, C2C12 mioblastos de ratos e SHSY5Y neuroblastoma humano. Também utilizando o resveratrol, PELTS e colaboradores (2012) avaliaram os efeitos deste na autorrenovação e diferenciação de células tronco mesenquimais. O TDPC foi utilizado como parâmetro para análise desses efeitos. Ainda, FRÖHLICH e colaboradores (2012) avaliaram a citotoxicidade de partículas de carboxil polistireno em vinte linhagens celulares de diferentes espécies, padrões de

crescimento, tamanho celular, origem embriônica, TDPC e capacidade fagocítica. O TDPC permite a caracterização *in vitro* de fármacos utilizados na quimioterapia para inibir o crescimento e divisão celular (GU e col., 2012). Além disso, pode ser um parâmetro de resposta do metabolismo celular a diversos fármacos, visto que a maior parte dos testes devem ser realizados na fase log - período no qual a multiplicação celular é máxima e constante. Essa é a fase de maior viabilidade e atividade metabólica das células e, por isso, é o melhor período para estudo e experimentação.

Vários trabalhos utilizam o TDPC para caracterizar suas linhagens (STARR e col., 2005; UMEZU e col., 2007; IDE e col., 2009). A determinação do TDPC permite assim, a caracterização de certos parâmetros próprios de uma população sob determinadas condições de cultivo. O TDPC também pode ser considerado um parâmetro para avaliar se as características proliferativas da célula se mantêm ao longo das repicagens. Vale ressaltar que a biologia celular modifica-se em cada fase da curva, sendo importante o controle do estágio em que as células serão coletadas, quando será realizado o repique da cultura, quando novos nutrientes serão adicionados ou quando testes de toxicidade podem ser realizados (ALVES e GUIMARÃES, 2010). Por exemplo, testes de toxicidade devem ser realizados na fase log de crescimento, uma vez que essas células estão em franca atividade mitótica. Se fizermos testes de toxicidade na fase de declínio ou mesmo na fase lag não podemos discernir se o efeito tóxico foi devido à droga testada ou ao reduzido número de células. Outro exemplo, quanto mais curto o período de duplicação da célula, maior será a toxicidade e menor o valor da concentração inibitória para 50 % de células (IC_{50}). Por esta razão, o TDPC foi usado como critério de caracterização e para determinar os períodos de tratamento com as drogas nos nossos estudos.

2.9 BIOPROSPECÇÃO DE NOVOS AGENTES QUIMIOSENSIBILIZANTES

A bioprospecção pode ser definida como o método ou forma de localizar, avaliar e explorar sistemática e legalmente a diversidade de vida existente em determinado local, e tem como objetivo principal a busca de recursos genéticos e bioquímicos para fins comerciais (DOS SANTOS, 2013).

Dentre esses recursos para fins comerciais destacam-se os produtos naturais com atividade biológica ou farmacológica. Os produtos naturais são todos os compostos ou substâncias obtidos da natureza e estão frequentemente relacionados à química das plantas (fitoquímica). A atividade biológica ou farmacológica destes se deve, entre outros fatores, a

diversidade química apresentada. Existe um aumento no número de pesquisas que avaliam o potencial farmacológico de extratos ou substâncias obtidas a partir de plantas. É importante que esses trabalhos identifiquem substâncias capazes de aumentar a sensibilidade das células tumorais aos quimioterápicos e que estas não sejam substratos para as ATPases de efluxo. Em relação a isso, FERNANDES e colaboradores (2003) estudaram o efeito citotóxico de triterpenos extraídos da *Chrysobalanus icaco* em células leucêmicas K562. Essas substâncias inibiram o crescimento e foram citotóxicos para células dessa linhagem. Além disso, foram capazes de inibir também a proliferação de Lucena 1, uma linhagem celular com múltipla resistência a fármacos (FERNANDES e col., 2003). Recentemente, HAJJAJI e BOUGNOX (2013) revisaram o uso do ácido docosahexaenoico e eicosapentaenoico (derivados de algas e peixes) para sensibilizar seletivamente tecidos tumorais aos agentes antineoplásicos. Esses lipídios aumentaram a citotoxicidade de 15 agentes antineoplásicos sem afetar os tecidos normais. Já LEI e colaboradores (2013) estudaram os efeitos da glaucina, um alcaloide componente da *Corydalis yanhusuo*, como reversor da MDR mediada pela Pgp e MRP1 em células MCF-7/ADR, uma linhagem de câncer de mama resistente às múltiplas drogas. Dessa forma, a bioprospecção permite buscar além de agentes citotóxicos mais efetivos, investigar também novos quimioterápicos que não sejam substratos de transportadores MDR e/ou identificar de substâncias reversoras com baixa toxicidade (FERNANDES e col., 2004).

2.9.1 8-Metoxipsoraleno (8-MOP)

Dentro desse contexto, o Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular trabalha bioprospectando substâncias naturais com possível atividade antitumoral. Dentre essas, o 8-metoxipsoraleno (8-MOP) foi estudado por DE OLIVEIRA (2012) e mostrou atividade quimiossensibilizante e antitumoral, *in vitro*, em culturas da linhagem GL-15 de GBM. O 8-MOP ou metoxaleno ou amoidina ou xantotoxina é um composto de ocorrência natural, que pertence à família dos psoralenos ou furocumarinas, encontrado em várias espécies de plantas, incluindo *Psoralea corylifolia*. É uma substância fotoativa que forma adutos de DNA na presença de radiação ultravioleta A (CRUZ e col., 2012), sendo utilizado como tratamento padrão de pacientes com distúrbios dermatológicos como vitiligo e psoríase (SINGH e col., 2010). Os resultados prévios obtidos por DE OLIVEIRA (2012) revelaram uma possível atividade inibidora da glutathione-S-transferase (GST) π , pelo 8-MOP. Dessa

forma, a atividade quimiossensibilizante e antitumoral do 8-MOP também foi investigada, agora, em uma cultura primária de GBM.

3 JUSTIFICATIVA

Quando se pensa em câncer algumas situações são claras:

1. o câncer é uma doença que mata: embora os cânceres do SNC representem apenas 2% de todas as neoplasias malignas, estes últimos contribuem significativamente para a morbidade global (INCA, 2011). Portanto, há necessidade da redução da mortalidade através de efetividade no tratamento;
2. os custos relacionados ao tratamento são altos (TANGKA e col., 2013), e, portanto, há necessidade de redução destes (principalmente em países com poucos recursos destinados à saúde);
3. o envelhecimento é um importante fator de risco para o desenvolvimento do câncer (DE MAGALHÃES, 2013) e a população mundial de uma maneira geral está envelhecendo (PETSKO, 2008);
4. a exposição a poluentes, o estilo de vida e a industrialização são também fatores de risco para o desenvolvimento de câncer; as pessoas estão vivendo cada vez mais em um ambiente propício ao desenvolvimento da doença (KINSELLA e col., 2001), sugerindo que a incidência de câncer seja maior num futuro próximo.
5. há necessidade de minimizar ou reduzir o fenômeno da quimiorresistência: mais de 90% de todos os óbitos em cânceres estão relacionados à resistência às drogas antineoplásicas (DE MELO, 1991).

Diante desse cenário, esse trabalho propõe:

- a) um modelo *in vitro* para a subtipagem dos GBMs: essa subdivisão nortearia a terapêutica, uma vez que cada grupo possui características semelhantes, próprias e mais definidas.
- b) a caracterização de uma linhagem e o uso desta como um modelo *in vitro* para avaliar a quimiorresistência: isso permitiria selecionar droga (s) mais efetiva (s); direcionamento da terapêutica; redução de custos com tratamentos não eficazes; redução da exposição aos efeitos tóxicos de agentes antineoplásicos não eficazes com efeito impactante na qualidade de vida do paciente. Além disso, o estabelecimento de um teste *in vitro* usando culturas obtidas do paciente tornaria o tratamento individualizado e específico para o seu caso, aumentando a eficácia do tratamento e diminuindo a incidência de efeitos colaterais. Também, estabelecimento dessa metodologia pode ser utilizado para se triar novos agentes antitumorais ou agentes quimiossensibilizantes. Assim, o desenvolvimento e a consolidação de um modelo

in vitro permitirá a possibilidade de estudar alvos moleculares, mecanismos de toxicidade e outros aspectos importantes da terapia oncológica.

4 OBJETIVOS

4.1 GERAL

Caracterizar fenotipicamente casos de gliomas humanos e uma nova linhagem, ESP12, determinando *in vitro* a resistência às drogas clássicas utilizadas na quimioterapia de gliomas, em um modelo de cultura primária dessas células, obtidas a partir de um tumor humano.

4.2 ESPECÍFICOS

- a) Descrever aspectos clínicos de uma amostra de pacientes com astrocitomas;
- b) Subclassificar biópsias de glioma humano;
- c) Caracterizar morfológicamente células de glioma humano;
- d) Caracterizar de uma nova linhagem de células de glioma:
 - morfológicamente;
 - histoquimicamente, imunocitoquimicamente e por citometria de fluxo para subclassificação;
 - investigar possíveis mecanismos de resistência;
 - investigar o TDPC;
 - investigar a resistência dessas células aos quimioterápicos;
 - realização de ensaio de quimiossensibilidade com 8-MOP.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 REAGENTES

Na tabela 3 abaixo relacionamos os principais, reagentes, anticorpos, kits e seus respectivos fornecedores.

Tabela 3. Reagentes usados na pesquisa e seus respectivos fornecedores.

Reagentes	Fornecedor
colagenase Ia (EC 232-582-9), dimetil sulfóxido (DMSO), TMZ, brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT), dodecil sulfato de sódio (SDS), poli-D-lisina, Hoechst 33258, 8-MOP, L-glutamina e tripsina (EC 3.4.21.4)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.
meio de cultura DMEM-F12 e soro fetal bovino (SFB)	Cultilab, Campinas, Brazil
penicilina e estreptomicina	Gibco, Life Technologies, Paisley, Scotland, UK
anticorpos primários policlonais: (<i>anti-rabbit</i> -GFAP, sc:9065), (<i>anti-rabbit</i> -OLIG-2, sc:48817), (<i>anti-goat</i> -Gp-39, sc:30465), (<i>anti-rabbit</i> -PCNA, sc:7907)	Santa Cruz Biotechnology, CA, U.S.A.
anticorpo secundário conjugado a AlexaFluor 546 <i>goat anti-rabbit</i> IgG, human VEGF ELISA kit	Invitrogen, Oregon, U.S.A
anticorpo secundário conjugado a Dylight 549 <i>donkey anti-goat</i> IgG	Abcam, Cambridge, UK
LSAB+ SYSTEM-HRP Kit	DAKO, Glostrup, Denmark
fluoresceína-5-isotiocianato (FITC) <i>mouse anti-human</i> MRP1	Becton & Dickinson Company (BD) Pharmingen, La Jolla, CA, U.S.A.
Sulfato de vimblastina	Meizler UCB Biopharma S/A, São Paulo – Brasil
BCNU	Bristol-Myers Squibb
CD133/1 (AC133) - aloficocianina APC <i>human</i>	MACS Miltenyl Biotec, Auburn, CA, U.S.A.

5.2 AMOSTRAS DE TECIDO TUMORAL / PACIENTES

O estudo incluiu 9 pacientes. As nove amostras dos pacientes foram caracterizadas morfológicamente, subclassificadas histoquimicamente e usadas para estabelecer culturas primárias. Entre as nove linhagens, decidiu-se caracterizar e estudar a resistência *in vitro* naquela que apresentou maior capacidade proliferativa. Seis casos foram diagnosticados como GBM, um caso como oligodendroglioma grau III, um caso como astrocitoma fibrilar difuso com focos de anaplasia sugestivos de transformação maligna, e outro como astrocitoma anaplásico grau III. Seis casos foram diagnosticados pelo serviço de anatomopatologia do Hospital São Rafael, dois casos pela Clínica IMAGEPAT e um caso pelo Laboratório Silvano Studart. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi obtido de todos os pacientes antes do ato cirúrgico. O diagnóstico histopatológico e a graduação foram definidas usando critérios estabelecidos pela OMS. Cada amostra foi denominada de ESP seguida de um número correspondente a sua entrada no projeto. A amostra ESP12 foi a linhagem caracterizada. Para a caracterização, a amostra foi obtida de um doador do sexo masculino, com diagnóstico de GBM. As amostras representativas de tecido tumoral que foram utilizadas nesse estudo foram obtidas com a colaboração dos Serviços de Neurocirurgia dos Hospitais São Rafael, Santa Izabel e Geral Roberto Santos, imediatamente após a cirurgia. Este estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa da Universidade Federal da Bahia, alocado na Maternidade Climério de Oliveira (aprovação 123/08), do Hospital Santa Izabel Professor Dr. Celso Figueirôa (aprovação 17/09) e do Hospital São Rafael (aprovação 15/09). A submissão a três comitês de ética se deu por razões exigidas pelos próprios estabelecimentos. Cada instituição, mesmo seguindo as mesmas resoluções, prefere manter seu comitê de ética próprio a fim de agilizar as atividades de pesquisa e acadêmicas (caso o hospital desenvolva atividade de Hospital Escola). Esse projeto cumpriu ainda todas as determinações da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, Resolução CONEP 441 e Portaria 2201 do Ministério da Saúde.

5.3 SINTOMAS CLÍNICOS E CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS

Os sintomas clínicos foram avaliados na admissão de pacientes e no período pós-operatório. Os principais sintomas clínicos avaliados foram: cefaleia, convulsões, nível reduzido de consciência, perda de memória, distúrbios gastrointestinais e déficit motor. As características sociodemográficas foram obtidas através de relato próprio ou de familiar ou de revisão em prontuário.

5.4 CARACTERÍSTICAS DE IMAGEM DE ESP12 E ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS DE MALIGNIDADE

As características de neuroimagens têm sido frequentemente analisadas e correlacionadas com resultado cirúrgico e/ou sobrevida (PIERALLINI e col., 1998). Alguns achados presentes em tomografia computadorizada e RM, como localização, tamanho tumoral, edema, presença de necrose podem predizer a sobrevida dos pacientes. As características de RM observadas em ESP12 incluíram localização, envolvimento do lobo específico, edema, presença ou não de necrose e efeito de massa. Foram selecionadas imagens em duas dimensões (axial e coronal) e todas as imagens representaram achados pré-operatórios. As imagens de RM foram obtidas a partir de um escaner 1.5 T (GE- Medical Systems, U.S.A.) e fotografadas usando uma câmera digital SONY cybershotTM.

Os achados histopatológicos de malignidade de todos os casos foram pesquisados por microscopia óptica em cortes corados usando a técnica de hematoxilina e eosina (H&E). Os achados histopatológicos específicos de malignidade pesquisados foram: atipia nuclear, pleomorfismo celular, hiperplasia endotelial, presença de necrose, celularidade, presença de gemistócitos e existência de células gigantes. As amostras foram visualizadas em um microscópio Olympus Bx41 usando o programa ImageProPlus.

5.5 ANÁLISE DE SOBREVIDA

O tempo de sobrevida global foi contabilizado a partir da data da resecção cirúrgica até a data do óbito ou até a data do encerramento da coleta de dados, para os pacientes que chegaram vivos ao final desta. A análise da sobrevida foi calculada usando o método estatístico de Kaplan-Meier. Toda a análise foi feita utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism *software* (San Diego, U.S.A.).

5.6 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DAS LINHAGENS ESP - CULTURAS PRIMÁRIA DE GLIOMAS HUMANOS

As amostras de tecido tumoral foram obtidas como descrito detalhadamente por PÉDEBOSCQ e colaboradores (2007). Resumidamente, após a obtenção do material, em centro cirúrgico, os fragmentos foram lavados com solução salina balanceada de Hanks (SSBH). As áreas necróticas escuras e vasos foram removidos. Os fragmentos remanescentes foram finamente cortados, suspensos em SSBH e centrifugados, por duas vezes, a 1000g, por 5 minutos, descartando-se o sobrenadante. Após essa etapa adicionou-se colagenase (600 U/mL) (RUTKA e col., 1987; PÉDEBOSCQ e col., 2007; PAVON e col., 2012) ao sedimento, incubando-se a 37 °C, durante 10 minutos. A reação foi parada com a adição de meio de cultura suplementado com 10 % de SFB. Após nova centrifugação nas mesmas condições anteriormente descritas, descartou-se a camada avermelhada e o sedimento, agora contendo células gliais isoladas, foi ressuspenso em meio de cultura. As células foram dissociadas através do ato de pipetar de forma repetida. A suspensão celular foi, então, transferida para placas de Petri com 100 mm de diâmetro ou frascos apropriados de 25 cm² e as culturas foram mantidas a 37 °C em atmosfera com 5 % de CO₂. As células foram cultivadas até atingirem 80 % de confluência (2-3dias) em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) acrescido de nutriente Ham F-12 (meio DMEM-F12), suplementado com 10 % de SFB e 2 mM L-glutamina, penicilina 100 U.I./mL e estreptomicina 100 µg/mL. Nesse período, o meio de cultura foi trocado a cada 2 dias. Após atingirem a confluência, as células foram descoladas da placa através de uma solução de 0,05 % de tripsina/0,02 % de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), por 5 minutos a 37 °C. A digestão enzimática foi neutralizada adicionando-se igual volume de meio de cultura suplementado com 10 % de SFB. A partir daí, as células tiveram dois destinos: foram congeladas (usando meio de congelamento contendo 10 % de DMSO; v/v), em nitrogênio líquido, para estudos posteriores e formação do banco de células; ou, foram novamente colocadas em placas de Petri de 100 mm de diâmetro a fim de expansão da linhagem. A expansão permitiu o trabalho nas diversas técnicas e o aumento do número de tubos no estoque do banco de células. Além de formar um banco de cultura celular, as células também foram semeadas em placas de cultura de variados diâmetros e números de poços a fim de realizarmos as investigações por imunocitoquímica, citometria de fluxo, TDPC e os testes de resistência e de quimiossensibilidade com 8-MOP.

5.7 ANÁLISE MORFOLÓGICA

A morfologia das células das nove amostras foi observada através de microscopia de contraste de fase usando um microscópio invertido Eclipse TS100 (Nikon, Tokyo, Japan). As fotos foram realizadas usando-se uma câmera digital Sony *Cyber Shot* DSC-W180 (10.1) acoplada ao microscópio. O único processo usado para edição das imagens foi a transformação para cor preto/branco e ajuste de brilho e contraste. Uma régua micrométrica foi fotografada em mesmo aumento para confecção da barra de escala das fotomicrografias. Um recorte da régua foi adicionado às fotos usando-se o programa Photo Impression 4.0 (ArcSoft, Fremont, E. U. A.). Cada espaço na régua corresponde a 10 μm (Olympus, Tokyo, Japan).

5.8 IMUNOFENOTIPAGEM POR IMUNOHISTOQUÍMICA

Utilizamos a técnica de imunohistoquímica para subclassificar ou imunofenotipar as amostras dos nove pacientes. As amostras tumorais foram fixadas em paraformaldeído a 10 %. A imunohistoquímica foi realizada em seções 4 μm . A expressão de GFAP, OLIG-2 e PCNA foi detectada imunohistoquimicamente usando os kits Universal HRP Immunostaining *Kit* e LSAB+SYSTEM-HRP. Não foi possível avaliar a expressão de Gp-39 devido ao fato de não haver anticorpo primário disponível no mercado para essa técnica, naquela data. Resumidamente, as fatias tissulares foram desparafinizadas e reidratadas usando gradientes decrescentes de álcool. Após essa etapa, seguiu-se a recuperação de epítomos induzida pelo calor, em banho-Maria, em tampão citrato 0,1 mM (pH6). Em seguida, a atividade endógena da peroxidase foi bloqueada usando H_2O_2 a 3 %. Então, as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários nas seguintes diluições anti-GFAP (1:1000), anti-OLIG-2 (1:500) e anti-PCNA (1:500), em câmara úmida, *overnight*, a 4°C. Após esse período, as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário biotilado (LSAB+ SYSTEM-HRP Kit) em câmara úmida por 30 minutos em temperatura ambiente (TA) e com estreptavidina/peroxidase, também durante 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as seções foram submetidas à reação de cor com tetrahydroclorato de 3,3-diaminobenzidina a 0,02 % contendo H_2O_2 a 0,005 % em solução salina tamponada com fosfato (PBS) (pH 7,4). Como controle negativo foram usadas lâminas com a mesma

metodologia, porém sem a presença do anticorpo primário. A expressão da proteína foi determinada pela presença da marcação. As lâminas com marcação intensa para OLIG-2 foram classificadas como apresentando uma tendência ao fenótipo pró-neural e aquelas marcadas intensamente para PCNA como apresentando uma tendência ao fenótipo proliferativo. As células foram consideradas positivas para PCNA ou OLIG-2 quando o núcleo corava-se em marrom (Figuras 23 e 24). A marcação para GFAP denuncia a origem glial, além de proporcionar uma ideia de perda de diferenciação ou não. As células foram consideradas positivas para GFAP quando o citoplasma corava-se em marrom (Figura 22).

5.9 CARACTERIZAÇÃO DA LINHAGEM ESP12

Foi realizada a caracterização da linhagem ESP12 com objetivo de identificar a viabilidade desta para estudos em cancerologia experimental e testar um modelo *in vitro* para avaliação de quimiorresistência.

5.9.1 Imunofenotipagem por imunocitoquímica

A subclassificação histoquímica dessa nova linhagem foi realizada como descrito anteriormente. Para complementar a imunofenotipagem histoquímica, foi realizada a caracterização imunocitoquímica para as mesmas proteínas descritas anteriormente. Com intuito de comparar a expressão, a marcação também foi realizada em outras linhagens de GBM já estabelecidas (U87, U373, U251 e GL-15). As linhagens foram cultivadas sob as mesmas condições descritas para ESP12. As linhagens U87, U373, U251 foram gentilmente cedidas pela Dr^a. Raquel Maia do Centro de Pesquisas do Instituto Nacional do Câncer. A linhagem GL-15 de glioma humano foi caracterizada por BOCCHINI e colaboradores (2001). As etapas da marcação foram realizadas como descrito por ALEXANIAN e colaboradores (2008). Resumidamente, a marcação foi realizada diretamente em lamínulas, previamente tratadas com poli-D-lisina (5µg/mL), obtidas de placas de Petri com 35 mm de diâmetro após as células atingirem a confluência. As células foram lavadas duas vezes com PBS. Após a lavagem, as células foram fixadas por 3 minutos com metanol a 0 °C e lavadas duas vezes por 15 minutos com PBS. Em seguida, procedeu-se a permeabilização com 0,2 % Triton X, durante 3 minutos. Após outra etapa de lavagem, as lamínulas foram bloqueadas com soro a 10 %, da mesma espécie da qual o anticorpo secundário foi obtido, durante 20 minutos, a TA.

Após o bloqueio, seguiu-se a incubação com os anticorpos primários anti-PCNA e anti-Gp-39 (5 µg/mL), anti-OLIG-2 (1:500) e anti-GFAP (1:1000) (previamente diluídos em soro a 1,5 %), a 4°C, *overnight*. Em seguida, realizou-se outra lavagem, a fim de retirar o excesso destes, e adicionou-se o anticorpo secundário específico para a imunoglobulina empregada, AlexaFluor 546 *goat anti-rabbit* IgG (1:200, v/v) durante 90 minutos, ao abrigo da luz, em TA. O anticorpo secundário conjugado a Dylight 549 *donkey anti-goat* IgG (1:200, v/v) foi utilizado para determinação da expressão de Gp-39. Decorridos os 90 minutos, as células foram incubadas com Hoechst 33258 (5 µg/mL), durante 5 minutos, no escuro. Seguiu-se mais uma sequência de lavagens com objetivo agora de retirar o excesso do marcador de núcleo. Por fim, visualizaram-se as células imunorreativas através de análise em microscópio de fluorescência (Olympus BX 51-URA2, San Jose, U.S.A.) com o filtro adequado para o fluorocromo empregado. O controle negativo não foi marcado com o anticorpo primário. As fotografias foram feitas com um tempo de exposição de 350 ms para todas as fotos usando uma câmera Olympus BX-2 acoplada ao microscópio. As fotos foram editadas usando Adobe Photoshop CS3 Version 10.0.1. Uma régua micrométrica foi fotografada em mesmo aumento para confecção da barra de escala das fotomicrografias.

5.9.2 Imunofenotipagem por citometria de fluxo

Uma avaliação quantitativa das proteínas investigadas foi realizada através da imunofenotipagem utilizando a metodologia de citometria de fluxo. Resumidamente, as células foram descoladas com 2 % de EDTA em PBS. A concentração final de células no *pellet* foi 5×10^5 . Ao *pellet* foi adicionado 10 % solução de permeabilização BD e incubado por 30 minutos, em TA. Após esse período foi adicionado PBS 0,5 % Tween20 e centrifugou-se a 400g por 10 min. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se ao *pellet* PBS com 2 % de SFB. Incubou-se durante 15 minutos, em TA, e centrifugou-se novamente. Após essa etapa, adicionou-se ao *pellet* 5µL de anticorpo primário *rabbit policlonal* (anti-GFAP, anti-PCNA e anti-OLIG-2) para cada 5×10^6 células e incubou-se por 30 minutos, em TA. Para investigação de Gp-39 adicionou-se ao *pellet* 5µL de anticorpo primário *goat policlonal* anti-Gp-39 para cada 5×10^6 células e incubou-se por 30 minutos, em TA. O controle negativo foi constituído de células na ausência do anticorpo primário e de isotipo IgG. O controle positivo para a expressão de GFAP foi a linhagem de GBM humano U251, para OLIG-2 cérebro de rato e para PCNA a linhagem A549 de câncer de pulmão humano. Como controle positivo

para a expressão de Gp-39 foi utilizado cultura de hepatócitos de ratos. Adicionou-se novamente PBS 0,5 % Tween20 e procedeu-se a nova centrifugação. Após esse período, procedeu-se a marcação com anticorpo secundário policlonal conjugado AlexaFluor 546 (1:500 (GFAP/PCNA/OLIG-2)) e (1:100 Gp-39) incubando-se durante 30 minutos, no escuro, em TA. Após o término do período de incubação adicionou-se PBS 0,5 % Tween 20 e procedeu-se a última centrifugação. Suspendeu-se o *pellet* em PBS com 2 % de SFB. Por fim, a aquisição foi feita em citômetro de fluxo FACScalibur no canal FL2 (564-606 nm) (BD, San Jose, U.S.A.), utilizando o *software Cell Quest (Macintosh)*. Foram realizados 3 experimentos independentes para cada linhagem. Um total de 10.000 eventos (número de células) foi adquirido por tubo e a quantificação células positivas foi expressa em percentual do total de células contadas.

5.9.3 Imunomarcção para detecção de células CD133⁺

Com o objetivo de verificar a presença de uma subpopulação CSC foi realizada a investigação de células CD133⁺. Resumidamente, as células foram descoladas com 2 % de EDTA em PBS. A concentração final de células no *pellet* foi 5×10^5 . Para a imunomarcção de CD133⁺, o sedimento foi ressuspenso em uma solução tampão contendo 0,5 % de BSA e 2 mM de EDTA em PBS e incubou-se durante 30 minutos, em TA. Após esse período, centrifugou-se durante 10 minutos a 400g. Após essa etapa, adicionou-se ao *pellet* 5 μ L de anticorpo primário monoclonal conjugado a alofocianina para cada 5×10^5 células, deixando o controle negativo sem anticorpo e isotipo IgG. O controle positivo foi constituído de células mononucleares de sangue periférico. Incubou-se por 30 minutos, sob refrigeração. Após esse período, adicionou-se a mesma solução tampão e centrifugou-se novamente. Foram realizados 3 experimentos independentes para cada linhagem. Por fim, a aquisição foi realizada em citômetro de fluxo FACScalibur no filtro FL4 (BD, San Jose, U.S.A.), utilizando o *software Cell Quest (Macintosh)*. Um total de 10.000 eventos (número de células) foi adquirido por tubo e a quantificação células positivas foi expressa em percentual do total de células contadas.

5.9.4 Expressão de proteínas MDR - MRP1 e Pgp

A fim avaliar o perfil de resistência da linhagem ESP12 verificamos a positividade para as principais proteínas que compõem a classe de proteínas MDR, através de citometria de fluxo. As células ESP12 foram descoladas com 2 % de EDTA em PBS e centrifugadas por 5 minutos a 400g. Para a imunomarcação de MRP1, as células foram incubadas com 10 % solução de permeabilização BD por 30 minutos. Em seguida, as células foram lavadas com uma solução de PBS-0,5 % Tween20, centrifugando-as por 10 minutos a 400g. Para ambas as proteínas MDR, as células foram incubadas em PBS com 2 % de SFB durante 15 minutos, à TA. Após o bloqueio, as células foram centrifugadas nas mesmas condições e foram imunomarcadas com os anticorpos monoclonais *anti-human* MRP1 conjugado a FITC e *anti-human* Pgp conjugado a ficoeritrina (BD Pharmingen). Os controles negativos foram constituídos de células na ausência dos anticorpos primários e isotipo IgG. Após 30 minutos, em TA, as células foram lavadas em PBS com 0,5 % Tween 20 e PBS com 2 % de SFB, para MRP1 e Pgp, respectivamente. As células foram lavadas nas mesmas condições, ressuspensas em PBS com 2 % de SFB e adquiridas nos canais FL1 e FL2 através do citômetro FACScalibur (BD San Jose, U.S.A.), utilizando o *software* Cell Quest (Macintosh). As aquisições para a citometria de fluxo foram analisadas através do *software* Summit (Windows XP). Um total de 10.000 eventos (número de células) foi adquirido por tubo e a quantificação células positivas foi expressa em percentual do total de células contadas.

5.9.5 Expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)

A produção de VEGF foi medida no sobrenadante das culturas por ELISA, utilizando o Kit comercial Invitrogen seguindo as instruções do fabricante. A produção basal de VEGF, por células da linhagem ESP12, ESP13 e em linhagens já estabelecidas, foi avaliada após 72 horas de cultivo (nas condições descritas no item 5.6), em placas de Petri com 100 mm de diâmetro. Resumidamente, plaqueou-se o sobrenadante dessas culturas em placa de 96 poços tratada com anticorpo monoclonal detector. Após a adição de anticorpo conjugado a peroxidase, procedeu-se a adição de um substrato cromógeno. Em seguida, foi realizada a leitura da absorbância a 450 nm. As concentrações de VEGF foram determinadas através da interpolação de curvas padrões obtidas de concentrações de proteínas previamente conhecidas.

5.9.6 Padrão de crescimento - Tempo de duplicação da população celular (TDPC)

A fim de avaliar o caráter proliferativo das células, determinou-se o TDPC. Para isso, as células da linhagem ESP12 e das linhagens de GBM humano U373, U251, U87, GL-15 e de glioma de rato (C6) foram plaqueadas em placa de 96 poços e distribuídas com densidade de $1,6 \times 10^4$ células/poço. A atividade proliferativa foi determinada no tempo 0 (momento em que as células foram plaqueadas) e nos seguintes tempos 24, 48, 72 e 96 h, usando o ensaio com MTT (MOSMANN, 1983). A quantidade de MTT reduzido a formazan é proporcional ao número de células viáveis. Esse método baseia-se na redução do sal tetrazolato (de cor amarela) por desidrogenases presentes na mitocôndria, adquirindo uma coloração violácea que é avaliada por espectrofotometria. Resumidamente, após 24 h de incubação (nas mesmas condições descritas no item 5.6), retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 20 μ L de MTT (5 mg/mL) e 80 μ L de meio em cada poço. A placa foi mantida por mais 2 h (HANSEN, NIELSEN e BERG, 1989; SU, WANG e CHIU, 2010; SWARNKAR e col., 2012), em estufa, a 37 °C, em atmosfera com 5 % de CO₂. Após esse período de incubação, adicionou-se 100 μ L de tampão de lise a 10 % , em cada poço (TADA e col., 1986; HANSEN, NIELSEN e BERG, 1989). O tampão de lise era constituído de 20 % (p/v) de dodecilsulfato de sódio (SDS) dissolvido a 37 °C em uma solução de 50 % (v/v) de *N,N*-dimetil formamida e água de grau analítico, pH 4.7. Seguiu-se mais um período de incubação, agora de 12 h, a fim de ocorrer a solubilização dos cristais de formazan. A leitura da absorbância se deu espectrofotometricamente a 540 nm. O aumento na absorbância foi considerado como uma medida da proliferação celular. Todos os tempos foram realizados em triplicata. O TDPC foi calculado através do programa GraphPad Prism (San Diego, U.S.A.), usando a fórmula $Y = Y_0 \times 2^{Kx}$, onde Y_0 é o valor de Y (celularidade) quando X (tempo) é zero, K é uma constante de velocidade, expressa em recíproca das unidades de tempo do eixo x, então, se X é expresso em minutos, K é expresso em minutos inversos.

5.9.7 Avaliação da resistência aos quimioterápicos

O efeito citotóxico dos agentes quimioterápicos VIM, BCNU e TMZ foi testado também usando o ensaio colorimétrico com o MTT. As células de ESP12 foram distribuídas com densidade de $1,6 \times 10^4$ células/poço, em placas de 96 poços. Após 48 h de plaqueamento, as células foram tratadas durante 72 h com os quimioterápicos cujas

concentrações estão representadas na tabela 4. As concentrações foram determinadas a partir de outros trabalhos relacionados na literatura, e, sempre preservando a utilização de concentrações que fossem menores que a concentração plasmática. A absorbância foi mensurada espectrofotometricamente a 540 nm usando um leitor de placas (Thermo Plate TP-reader). A absorbância dos poços contendo as células não-tratadas (controle) foi considerada 100 % e a viabilidade celular das células tratadas (teste) foi expressa em relação ao percentual do controle. Por fim, a IC_{50} foi calculada.

Tabela 4. Faixa de concentrações dos quimioterápicos utilizados nos testes de citotoxicidade

<i>Quimioterápico</i>	<i>Concentrações (mM)</i>
TMZ	0,006 - 1
BCNU	0,00004 – 0,8
Vimblastina	0,00006 -1,1

5.10 BIOPROSPECÇÃO DO 8-MOP ENQUANTO AGENTE QUIMIOSENSIBILIZANTE

Inicialmente determinou-se a IC_{50} para esse agente. Posteriormente, utilizou-se doses mínimas citotóxicas deste associado à TMZ, com o intuito de avaliar uma possível atividade quimiossensibilizante. A detecção desse efeito potencializador citotóxico foi feita através do teste com MTT, descrito anteriormente.

Resumidamente, as células da linhagem ESP12 após atingirem a confluência foram tripsinizadas e plaqueadas em placas de 96 poços, com densidade de $1,6 \times 10^4 \text{ cm}^2$. Após 48 h, as células foram expostas a concentrações de 8-MOP que variaram de 5 – 400 μM , durante 72 h. As etapas seguintes são similares às descritas no item 5.9.6. A absorbância dos poços contendo as células não-tratadas (controle), o solvente do 8-MOP, foi considerada 100 % e a viabilidade celular das células tratadas (teste) foi expressa em relação ao percentual do controle. Por fim, a IC_{50} foi calculada.

Para a avaliação da quimiossensibilidade as células foram cultivadas nas mesmas condições descritas anteriormente e tratadas durante 72h, com as doses mínimas citotóxicas do 8-MOP, e concentrações crescentes de TMZ (100-1000 μM).

5.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A fim de obter a IC_{50} dos quimioterápicos testados, todos os dados gerados (absorbâncias) receberam tratamento estatístico adequado e foram expressos como média e erro médio padrão, ou mediana e percentil. A escolha da medida de tendência central e das medidas de dispersão foi feita de acordo com a distribuição dos dados em um histograma de frequência. A distribuição era considerada normal ou paramétrica se:

- passasse em qualquer dos testes de normalidade propostos pelo Programa GraphPad. Nessa situação o conjunto de dados foi representado pela média e por testes estatísticos paramétricos usados nas comparações entre grupos tratados e controles;

Caso a distribuição dos dados não passasse em nenhum dos testes de normalidade propostos pelo programa, a distribuição era considerada não-normal ou não-paramétrica. Nessa situação o conjunto de dados foi representado pela mediana e por testes estatísticos não-paramétricos usados nas comparações entre grupos tratados e controles;

A partir daí, regressões não lineares foram realizadas para o cálculo da IC_{50} , utilizando-se modelos de equação logarítmica propostos pela biblioteca do programa e só foram considerados para efeito de cálculos aquelas cujo coeficiente de regressão (r^2) foi superior a 0,9. Os valores de p adotados como estatisticamente significantes nas análises foram aqueles superiores a 0,05. A menor concentração estatisticamente diferente do controle foi considerada como concentração mínima citotóxica (CMC). Para determinação da CMC foi utilizado o teste ANOVA *one way* entre os grupos tratados e o controle.

O software *GraphPad Prism*, versão 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego California USA) foi utilizado para essas análises.

6 RESULTADOS

6.1 PACIENTES, CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E SOCIODEMOGRÁFICAS

Dentre os 9 casos avaliados, a idade média correspondeu a $52,6 \pm 14,1$ (Figura 5). Houve 5 casos (55,6 %) acometendo o sexo masculino e 4 casos acometendo o sexo feminino (44,4 %).

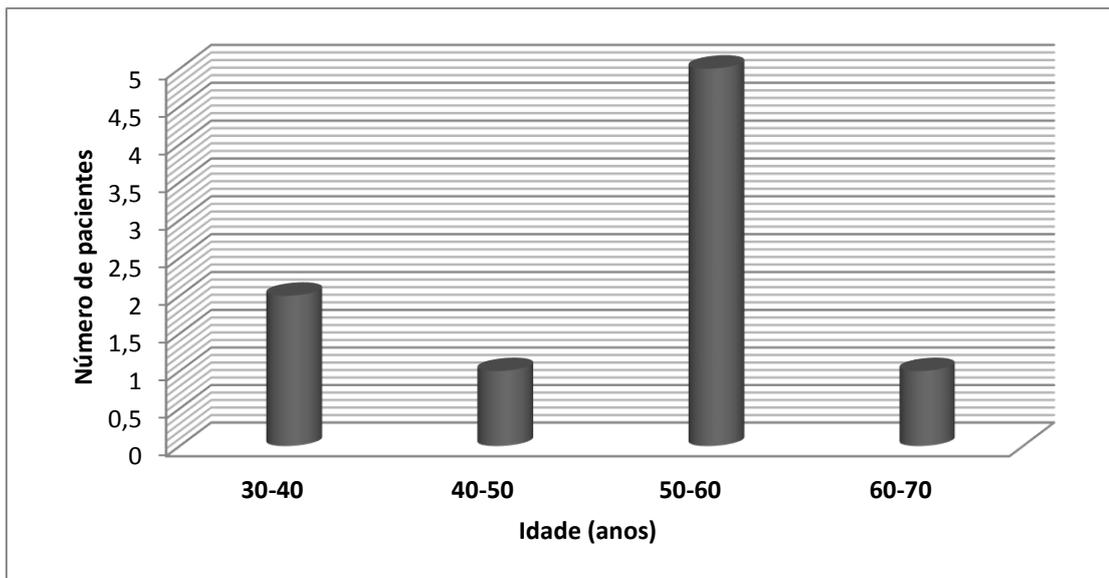


Figura 5. Incidência de glioma de alto grau em diversas faixas etárias.

Seis dos nove tumores foram considerados, do ponto de vista histológico, como tendo maior grau de agressividade. O estudo avaliou 9 casos de gliomas, sendo 66,7 % glioblastomas (6 casos), 11,1 % astrocitoma fibrilar difuso grau II (1 caso), 11,1 % astrocitoma anaplásico grau III (1 caso) e 11,1 % oligodendroglioma grau III (01 caso) (Figura 6). A maioria dos pacientes não havia completado o ensino fundamental e possuíam renda mensal de até 02 salários mínimos.

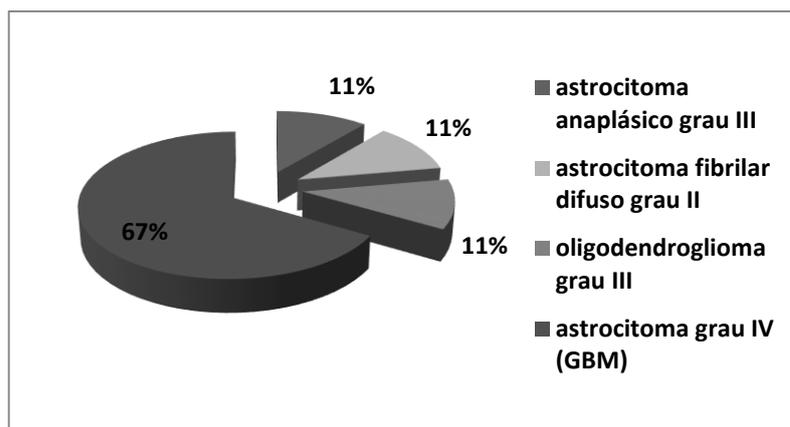


Figura 6. Casos de glioma, por diagnóstico anatomopatológico, em percentual.

Crises convulsivas e cefaleia foram as manifestações clínicas mais frequentes ocorrendo conjuntamente em seis pacientes (66,6 %). Os outros sintomas mais frequentes foram distúrbios do comportamento, diminuição da força muscular ou paresia, perda de memória, distúrbios gastrointestinais e rebaixamento do nível de consciência. 22,2 % dos pacientes eram provenientes de grandes metrópoles como Salvador e São Paulo, enquanto 77,7 % eram provenientes de pequenas cidades do interior do estado da Bahia. A tabela 5 resume os principais achados clínicos.

Tabela 5. Características clínicas dos pacientes envolvidos no estudo.

Parâmetros	Total
Número de pacientes	9
Idade < 50 anos	3
Idade > 50 anos	6
Sexo	
- homens	5
- mulheres	4
Localização / topografia tumoral	
- parietal	1
- parieto-occipital	1
- frontal	1
- fronto-temporal	1
- temporal	2
- temporo-parietal	2
- outros	1
Principais sintomas	
- cefaleia	6
- convulsão	6
- paresia / hemiplegia	3
- perda de memória	2
- rebaixamento do nível de consciência	4
- desordens gastrointestinais	2

Todos os 9 pacientes foram submetidos à ressecção cirúrgica, embora 2 deles de forma parcial. Nestes últimos casos, a ressecção total foi contraindicada devido à grande extensão do tumor e, devido ao envolvimento de regiões anatômicas importantes, tais como o tronco cerebral. Seis pacientes receberam tratamento adjuvante: 2 com radioterapia (RT) e 4 com radio e quimioterapia (QT). Três pacientes tiveram óbito durante o período pós-operatório, realizando apenas a ressecção cirúrgica (tabela 6).

Tabela 6. Informações dos doadores RE: ressecção cirúrgica, RT: radioterapia, QT: quimioterapia com BCNU, f: feminino, m: masculino.

Caso	Idade / sexo	Diagnóstico	Tratamento
ESP3	44/f	astrocitoma fibrilar difuso grau II com focos de anaplasia sugestivos de transformação para grau III	RE parcial +RT+QT
ESP4	51/f	Oligodendroglioma grau III	RE+RT+QT
ESP6	58/f	GBM primário	RE
ESP7	38/m	GBM primário	RE+RT
ESP9	71/f	GBM primário	RE
ESP10	57/m	GBM primário	RE
ESP11	67/m	GBM primário	RE + RT+QT
ESP12	58/m	GBM primário	RE+RT+QT
ESP13	26/m	astrocitoma grau III	RE parcial+RT

6.2 CARACTERÍSTICAS DE IMAGEM DE ESP12

Na figura 7 observa-se a imagem da lesão do caso que deu origem às células ESP12. A imagem em RM evidencia formação expansiva em lobo frontal alto esquerdo (figura 7A) caracterizada por uma área sólida com conteúdo necrótico (figura 7 B). Há também aspecto de extenso edema vasogênico ou lesão neoplásica infiltrativa envolvendo grande parte do lobo temporal esquerdo, com alargamento dos giros cerebrais envolvidos (figura 7 C). O caso não apresentou progressão da doença até o fechamento do estudo.

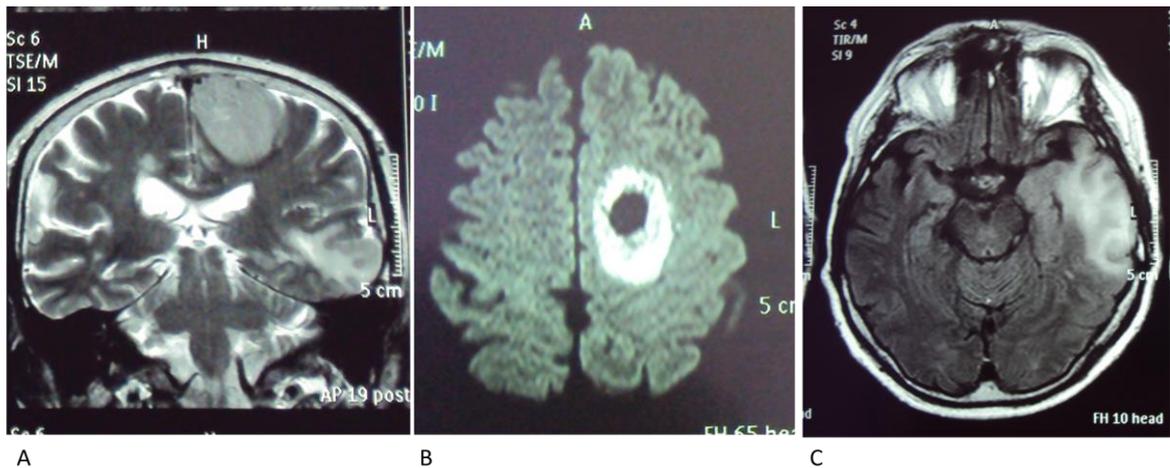


Figura 7. Características de imagem de ESP12, GBM (OMS). (A) imagem coronal evidenciando uma lesão que parece comprometer a substância branca do lobo frontal superior alto. Parece não haver contiguidade entre o edema vasogênico no lobo temporal e a lesão (B) Realce típico em anel periférico e irregular com áreas centrais que não realçam. (C) Edema vasogênico em lobo temporal à esquerda.

6.3 ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS DE MALIGNIDADE DOS CASOS ESTUDADOS

Cortes histológicos de 4 μ m e coloração com hematoxilina-eosina (H&E) de cada amostra de tumor são mostrados nas figuras 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14. Podemos observar diversos critérios de malignidade presentes ao estudo histológico nos casos estudados. A figura 8A e B representa um astrocitoma fibrilar difuso grau II. O que nos leva a considerar essa lâmina como “low grade” ou baixo grau é primeiro o número de células (há baixa celularidade), muito espaço entre as células, muita matriz e as células são relativamente parecidas umas com as outras (presença de poucas células anaplásicas), embora estejam presentes (8A, setas). Entretanto, a presença de focos sugestivos de malignização conduziu o diagnóstico para o grau III. Na figura 8B, embora a celularidade seja maior o padrão descrito anteriormente se repete.

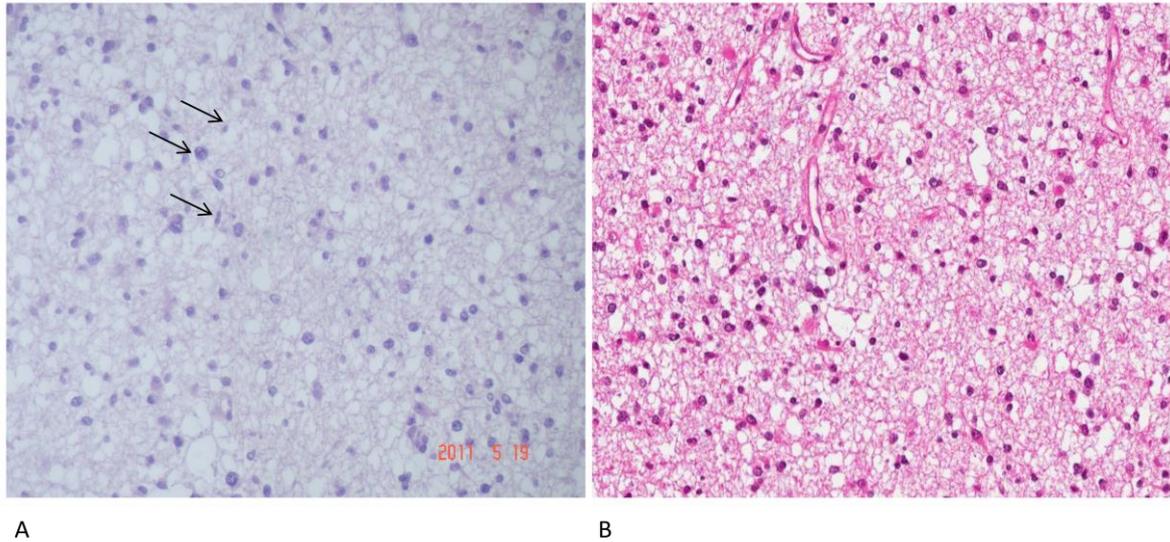


Figura 8. Características diagnósticas histopatológicas de ESP3. (A) presença de núcleos com tamanhos e formas atípicos (setas) (B) maior número de células e mantém-se atipia nuclear. H&E, 200x

A figura 9 faz parte de uma representatividade de um oligodendroglioma grau III. Nela observa-se a característica clássica de presença de muitas células pequenas, com núcleo redondo e homogêneo, e apresentando um halo claro perinuclear (setas), típicos oligodendrócitos. Notar a hipercelularidade evidente, sem atipias nucleares importantes, a relação núcleo citoplasma é mantida, mas existe a presença de componente vascular de angiogênese evidenciado pelo maior número de células endoteliais (9B). Esse componente vascular angiogênico é observado em maior aumento, na figura 13, onde é destacado um capilar com proliferação endotelial, em um GBM.

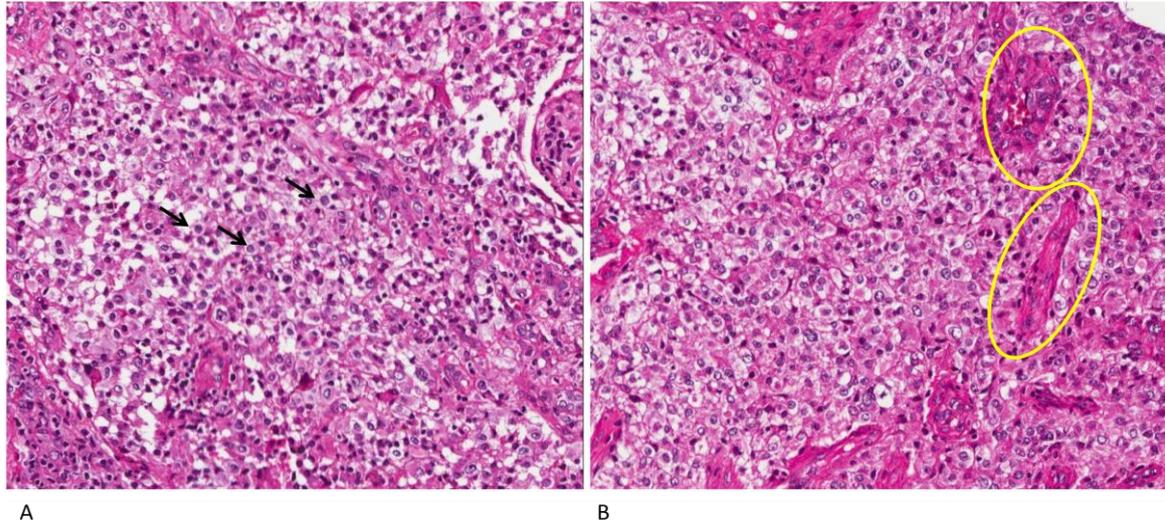


Figura 9. Características diagnósticas histopatológicas de ESP4. (A) presença de células oligodendrocitárias (setas) (que caracterizam a origem do tumor) e hipercelularidade. (B) presença de componente vascular de angiogênese evidenciado pelo maior número de células endoteliais (círculos). (H&E, 200×)

A presença de necrose em pseudopaliçada (figura 10) é um achado importante para o diagnóstico anatomopatológico de gliomas de alto grau. A necrose é causada pela proliferação endotelial dos vasos próximos, com obstrução da luz e isquemia. O termo “pseudopaliçada” refere-se à disposição mais concentrada e perpendicular dos núcleos neoplásicos em volta destas áreas de necrose. Tanto a proliferação vascular quanto a necrose são consideradas critérios na graduação da malignidade dos astrocitomas segundo a classificação da OMS.

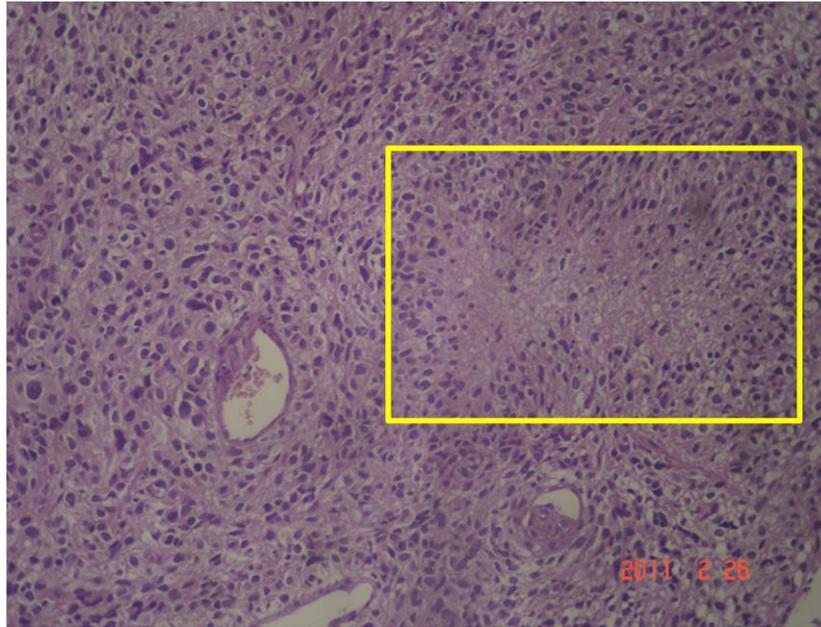


Figura 10. Características diagnósticas histopatológicas de ESP6. GBM (OMS). Notar hipercelularidade, hiperchromatismo e presença de área com necrose em pseudopaliçada (quadrado). H&E, 200x

A figura 11A e 11B representa dois casos de GBM (ESP7) e (ESP9) respectivamente. Tanto na figura 11A quanto na figura 11B observa-se grande número de células (hipercelularidade). Existem células com tamanho e formas diferentes, assim como núcleos também com tamanhos e formas diferentes (11A), além de multinucleação (11B, setas) foram observados.

A proliferação vascular é uma das principais características dos gliomas de alto grau (figura 12, 13). Ocorre hiperplasia das células vasculares, que se empilham umas sobre as outras formando pequenos novelos, conhecidos como pseudoglomerulos. A luz vascular é reduzida ou obliterada, causando áreas de necrose isquêmica, como descritas na figura 10.

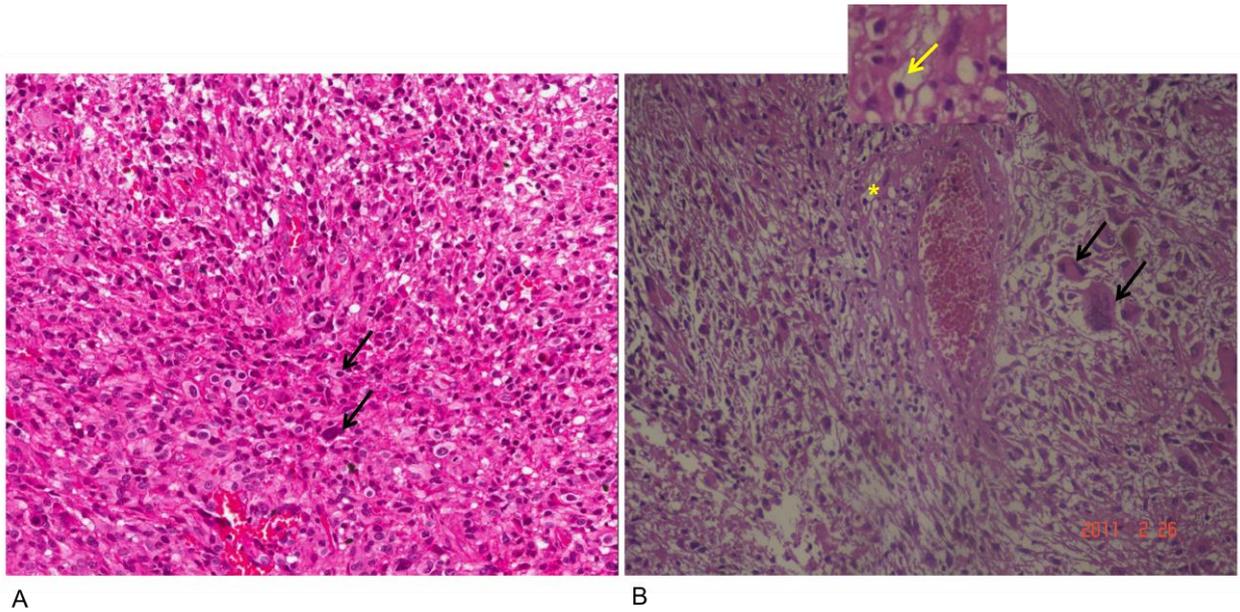


Figura 11. Características diagnósticas histopatológicas de ESP7 e ESP9. GBM (OMS). (A) ESP7. Notar hiper celularidade, atipia nuclear (setas) e parece haver dissociação de células (parte superior da microfotografia). (B) ESP9. O tumor é constituído por astrócitos atípicos, com núcleos hiper cromáticos, com grande pleomorfismo (variação de forma e tamanho), citoplasma róseo de limites imprecisos, com perda da relação núcleo-citoplasma (citoplasma escasso em relação ao tamanho do núcleo, asterisco e seta no destaque) e células gigantes multinucleadas (setas), revelando em seu conjunto um alto grau de anaplasia. H&E, 200×

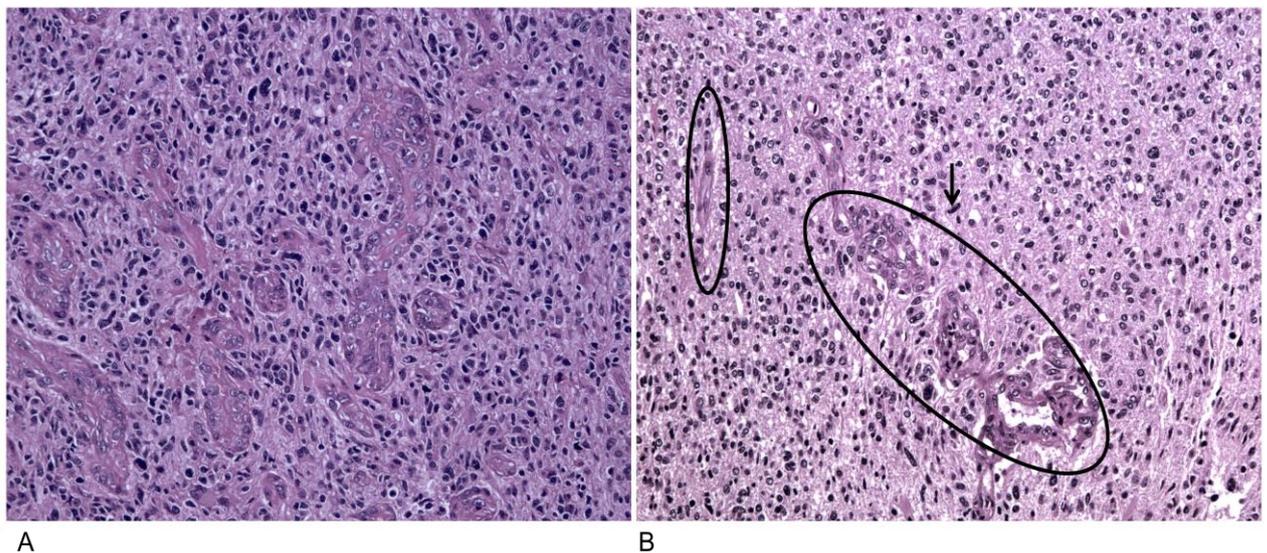


Figura 12. Características diagnósticas histopatológicas de ESP10 e ESP11. GBM (OMS). (A) ESP10. Observam-se vários pseudoglomerulos indicativos de processo angiogênico. (B) ESP11. Presença de mitoses atípicas (seta), angiogênese, comparar um capilar normal (círculo menor) com um capilar com proliferação endotelial formando várias luzes e tendendo a formar uma estrutura glomerulóide (círculo maior). H&E, 200×

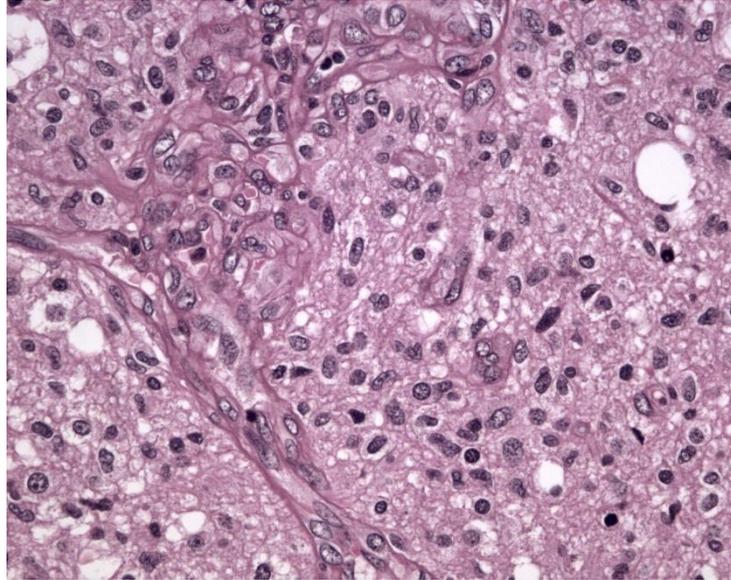


Figura 13. GBM (OMS). ESP11. Nesse aumento maior observa-se capilar com proliferação endotelial. H&E, 400×

Na figura 14 são apresentados um caso de GBM (ESP12) (figura 14A) e um caso de astrocitoma grau III (ESP13) (figura 14B).

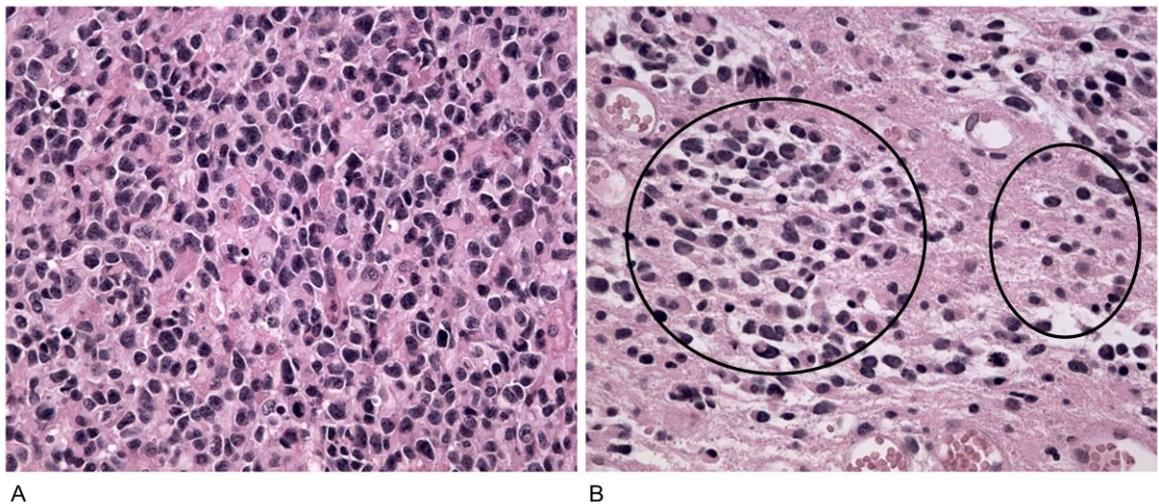


Figura 14. Gliomas de alto grau. (A) GBM (OMS). ESP12. Altamente anaplásico, com hiper celularidade, quase sem matriz. (B) Astrocitoma grau III (OMS). ESP13. Existe anaplasia, mas há espaço entre as células com focos de celularidade, sem vasos angiogênicos. Comparar a celularidade entre as regiões circulasdas. H&E, 400×

6.4 ANÁLISE DA SOBREVIDA

A mediana de sobrevida dos pacientes foi de 11,5 meses. No momento do encerramento da coleta de dados, 2 dos 9 pacientes estavam vivos, um deles com sobrevida de 7 meses e o outro com 3 meses. A maior sobrevida observada foi relacionada ao diagnóstico de astrocitoma fibrilar difuso, grau II, 24 meses. Embora, de graduação II o laudo anatomopatológico desse caso enfatizava a presença de focos de malignidade para grau III. Com um mês, a sobrevida para esse caso, por exemplo, era em torno de 66,7 %. Ao final de 22 meses a sobrevida caiu para 16,7 %. Em nenhum dos casos havia história prévia de glioma de baixo grau. A figura 15 representa esses achados.

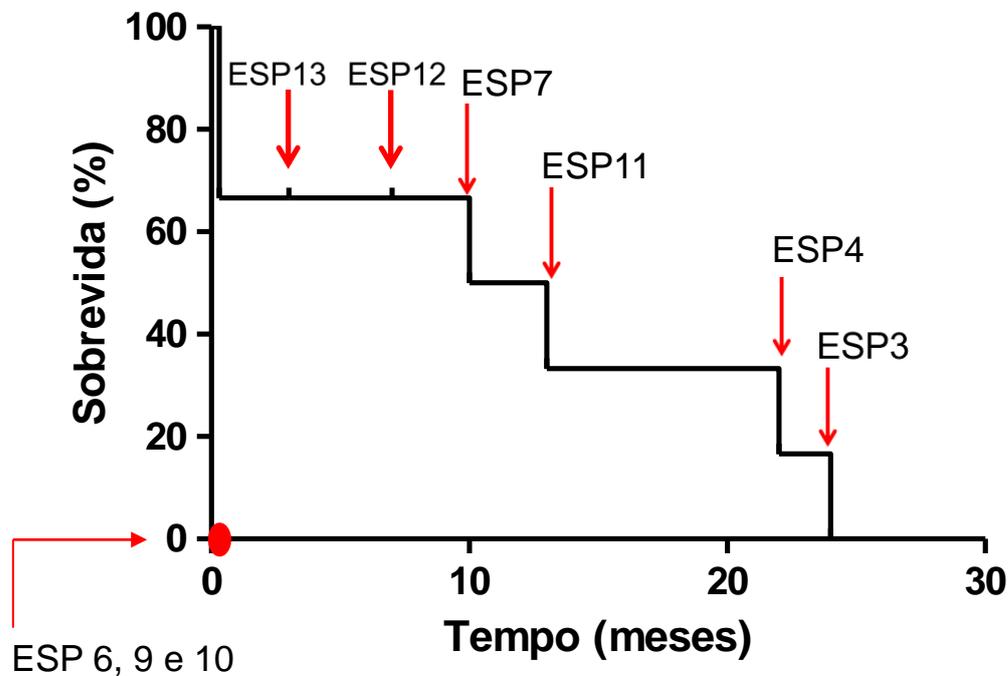


Figura 15. Curva de sobrevida dos pacientes. Probabilidade de sobrevida acumulada (em percentual) para gliomas de alto grau, nos casos estudados, no período entre 2009-2012 (método de Kaplan-Meier).

6.5 IMUNOFENOTIPAGEM POR IMUNOHISTOQUÍMICA

Os fenótipos pró-neural e proliferativo foram investigados através da expressão das proteínas OLIG-2 e PCNA respectivamente. Além, disso a expressão de GFAP foi avaliada. Todos os tumores estudados expressaram GFAP de maneira difusa (figura 16). Entretanto, ESP10 (figura 16F), ESP11 (figura 16G) e ESP12 (figura 16H) além de difusa revelaram uma positividade mais pronunciada.

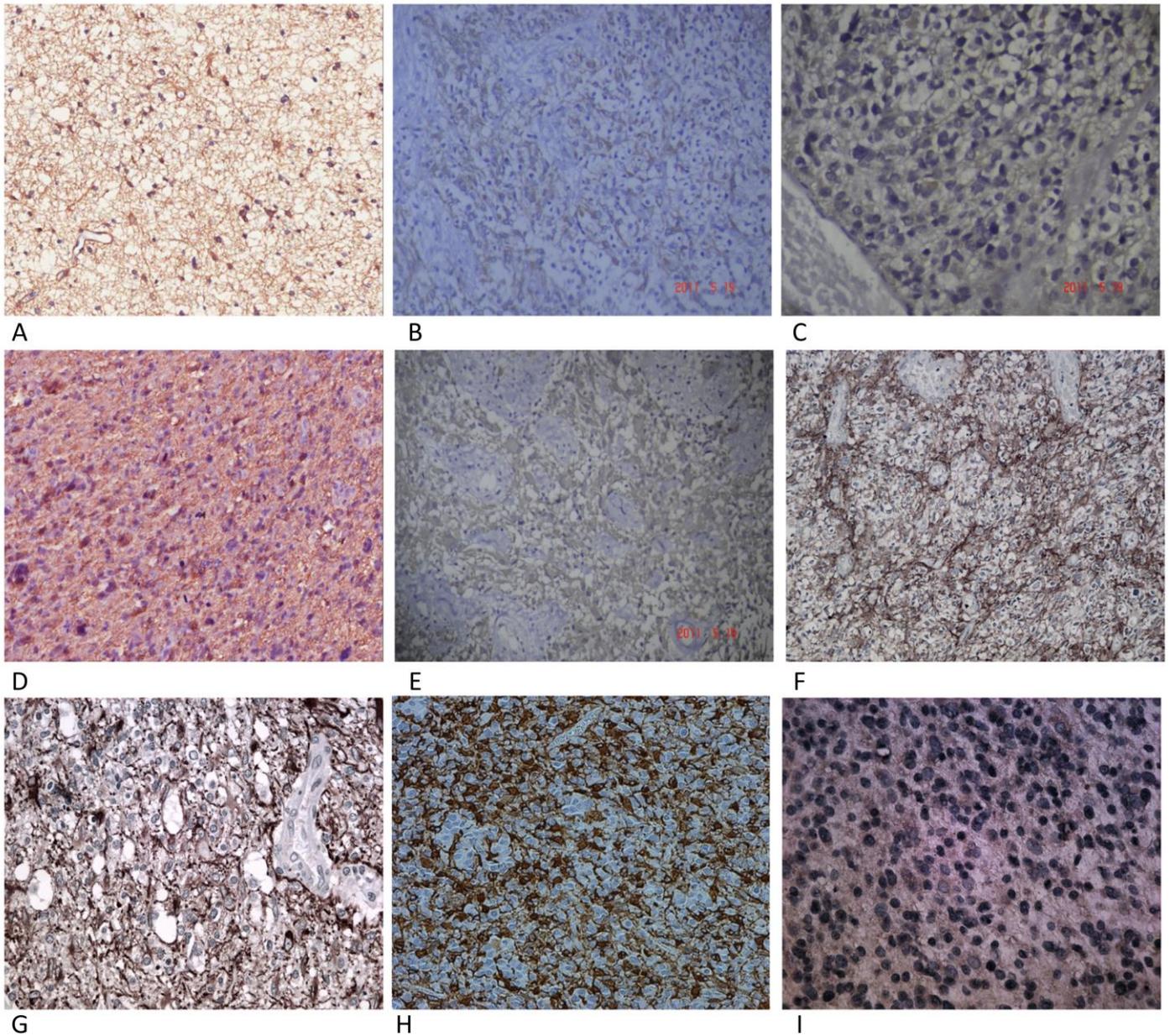


Figura 16. Expressão de GFAP em gliomas de alto grau. (A) ESP3 (B) ESP4 (C) ESP6 (D) ESP7 (E) ESP9 (F) ESP10 (G) ESP11 (H) ESP12 (I) ESP13. Aumento original: A, B, E e F 100×; D 200×; C, G, H e I 400×.

Todos os tumores também expressaram PCNA, sendo que ESP7 (figura 17D) e ESP12 (figura 17H) revelaram uma marcação mais expressiva.

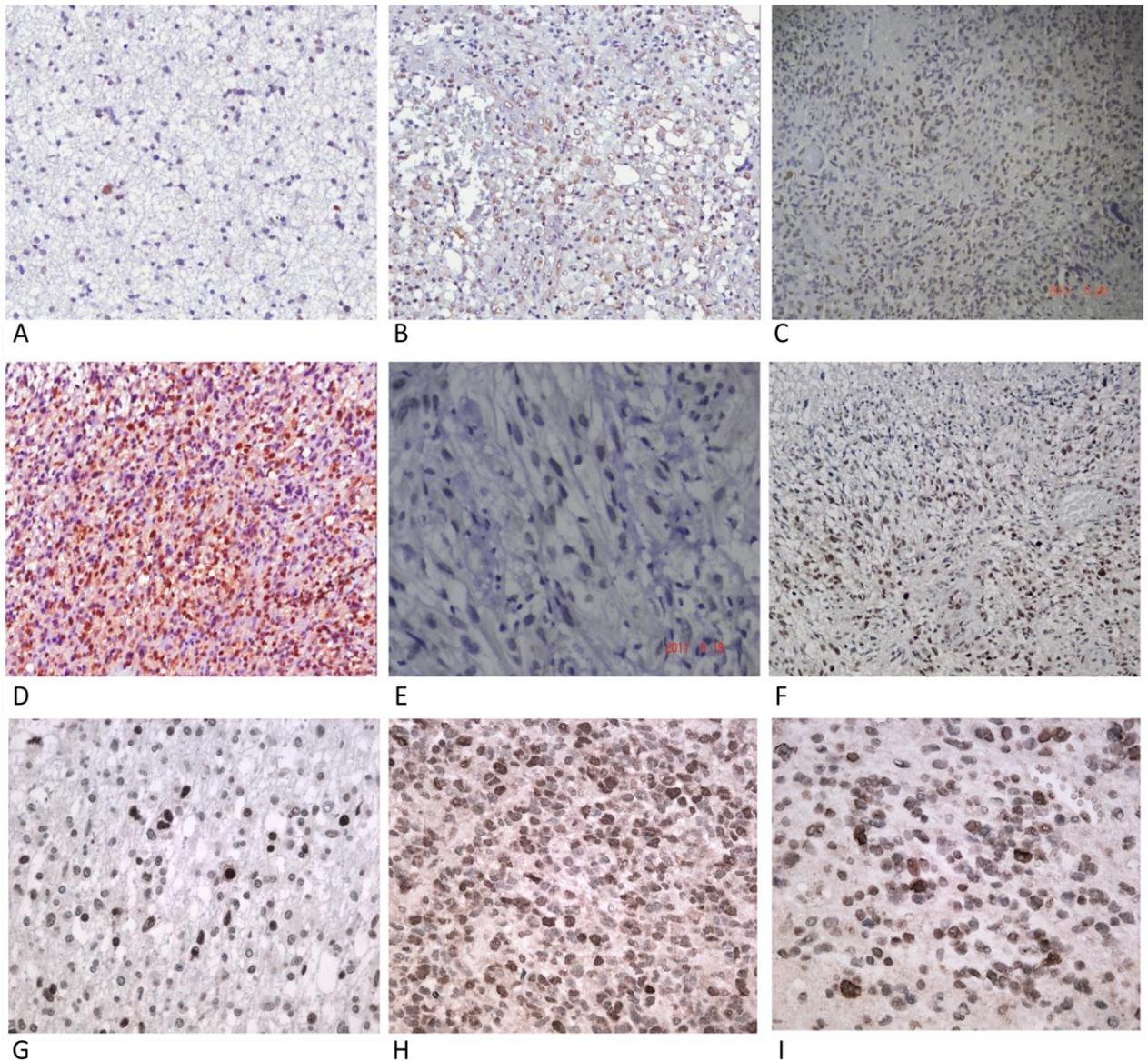


Figura 17. Expressão de PCNA em gliomas de alto grau. (A) ESP3 (B) ESP4 (C) ESP6 (D) ESP7 (E) ESP9 (F) ESP10 (G) ESP11 (H) ESP12 (I) ESP13. Aumento original: A, B, C, D e F 200×; E, G, H e I 400×.

A expressão de Olig-2 foi marcante em ESP12 (figura 18F) e ESP13 (figura 18G). Não houve marcação em dois casos (ESP3 e ESP9) (dados não mostrados).

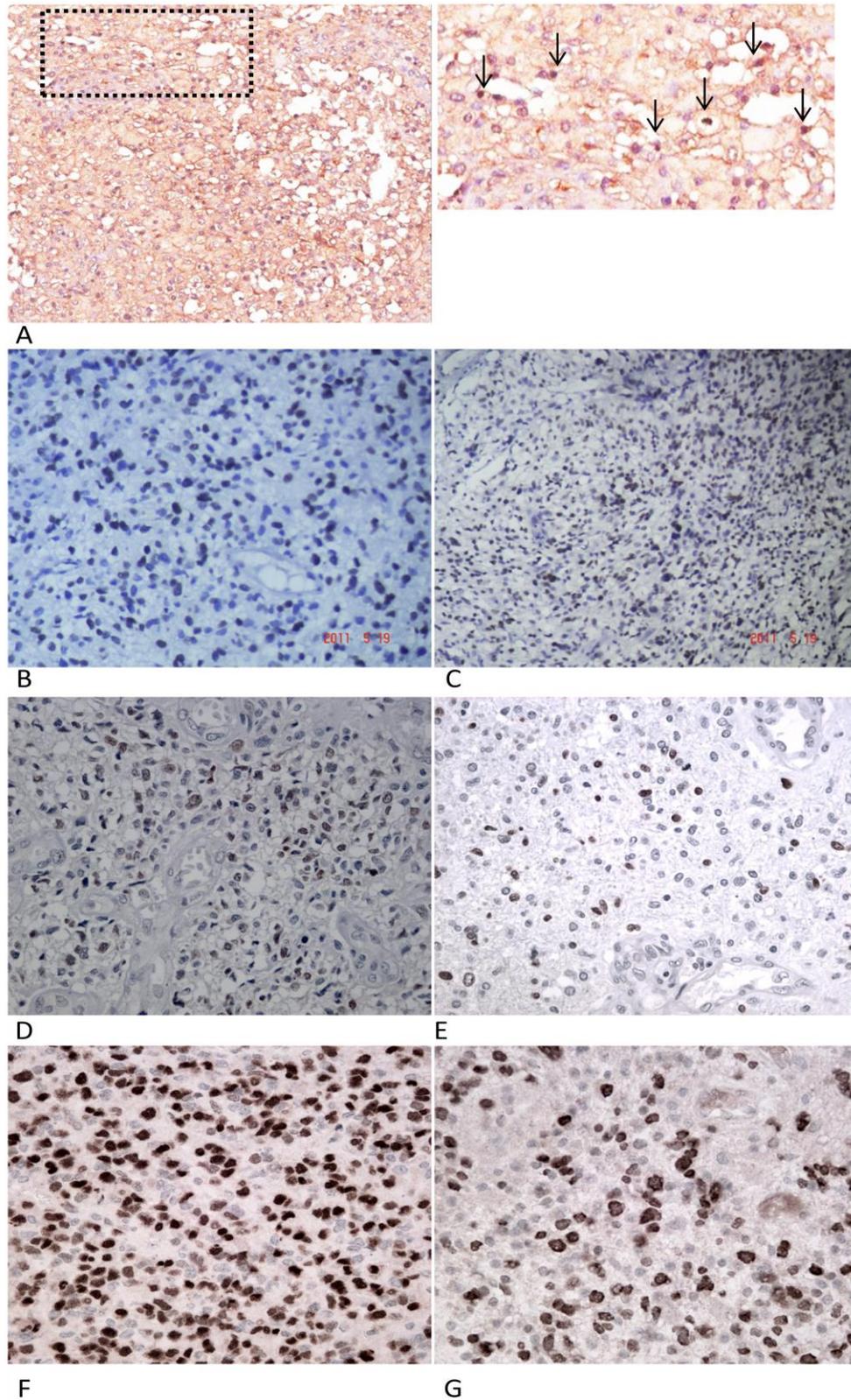


Figura 18. Expressão de OLIG-2 em gliomas de alto grau. (A) destaque da expressão de OLIG-2 em ESP4 (setas no destaque). (B) ESP6 (C) ESP7 (D) ESP10 (E) ESP11 (F) ESP12 (G) ESP13. Aumento original: A e C 100×; B, D, E, F e G 200×.

6.6 ANÁLISE MORFOLÓGICA DE CÉLULAS OBTIDAS DE CULTURA PRIMÁRIA DOS CASOS ESTUDADOS

As células aderiram à placa, tenderam a formar monocamadas mostrando capacidade de proliferação *in vitro*. Houve a formação de populações morfológicamente distintas, tais como células arredondadas, fusiformes e células com várias extensões citoplasmáticas longas (Figura 20). As figuras 19A, 19E e 19F revelam o intenso pleomorfismo dessas células. Tais tipos de células heterogêneas foram observadas nas primeiras passagens em cultura. Após repicagens subsequentes, contudo, tais tipos morfológicos já não mais predominavam e as células assumiam um fenótipo mais fusiforme. Independente da densidade celular, as células cresceram na placa sem inibição de crescimento por contato, até atingirem a confluência, quando então se destacavam da placa. As células foram cultivadas até no máximo 10 passagens.

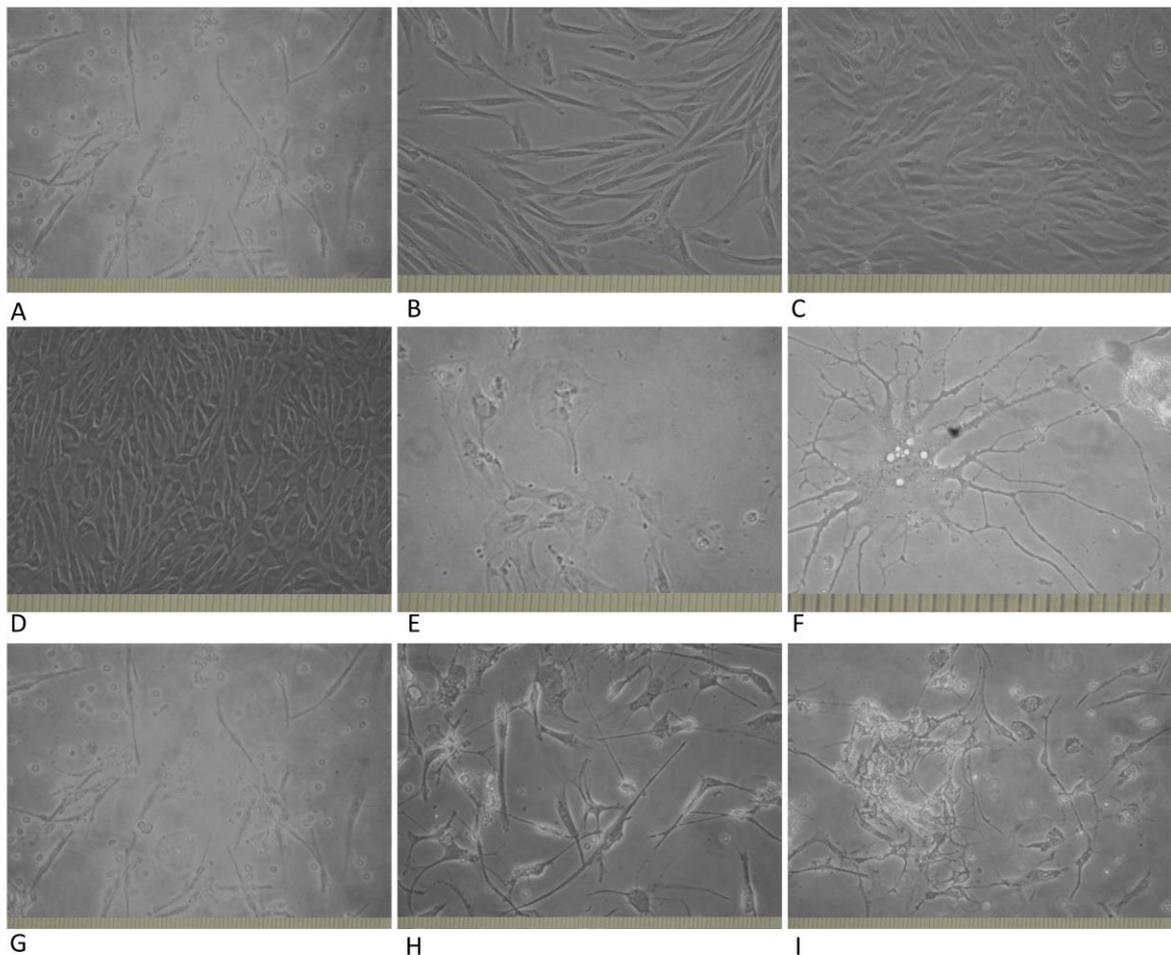


Figura 19. Morfologia de células de culturas primárias de gliomas isoladas de tumor. (A) ESP3 (B) ESP4 (C) ESP6 (D) ESP7 (E) ESP9 (F) ESP10 (G) ESP11 (H) ESP12 e (I) ESP13. Cada espaço na régua corresponde a 10 µm.

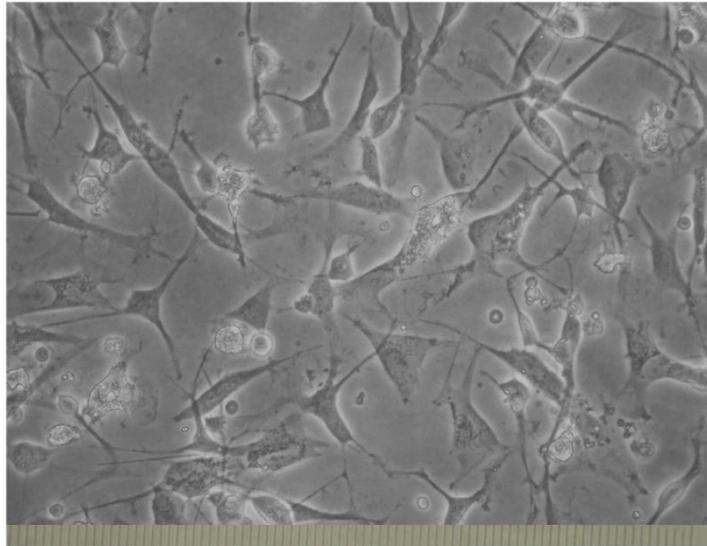


Figura 20. ESP12. Observar a variedade de tipos morfológicos. Cada espaço na régua corresponde a 10 μm .

6.7 CARACTERIZAÇÃO DA LINHAGEM ESP12

Devido ao caráter proliferativo evidenciado pela marcação para PCNA em imunohistoquímica, e, intenso pleomorfismo observado nas imagens em cultura, a linhagem ESP12 foi selecionada a fim de ser caracterizada. Essa caracterização incluiu além da subtipagem por imunocitoquímica e investigação de um fenótipo de resistência, avaliação da cinética de crescimento, verificação da produção do fator de crescimento endotelial vascular e a avaliação de sua viabilidade, *in vitro*, frente a quimioterápicos utilizados na prática clínica.

6.7.1 Fenotipagem por imunocitoquímica

Com o objetivo de subtipar 4 linhagens já estabelecidas de GBM e a primária ESP12 em um fenótipo proliferativo, mesenquimal ou pró-neural, foi realizada imunocitoquímica para detecção das proteínas PCNA, Gp-39 e OLIG-2 respectivamente. A expressão de GFAP também foi avaliada (figura 21). A análise imunocitoquímica da expressão de GFAP mostrou que essa proteína estava presente em praticamente todas as linhagens, embora muito fracamente na linhagem GL-15 (figura 21).

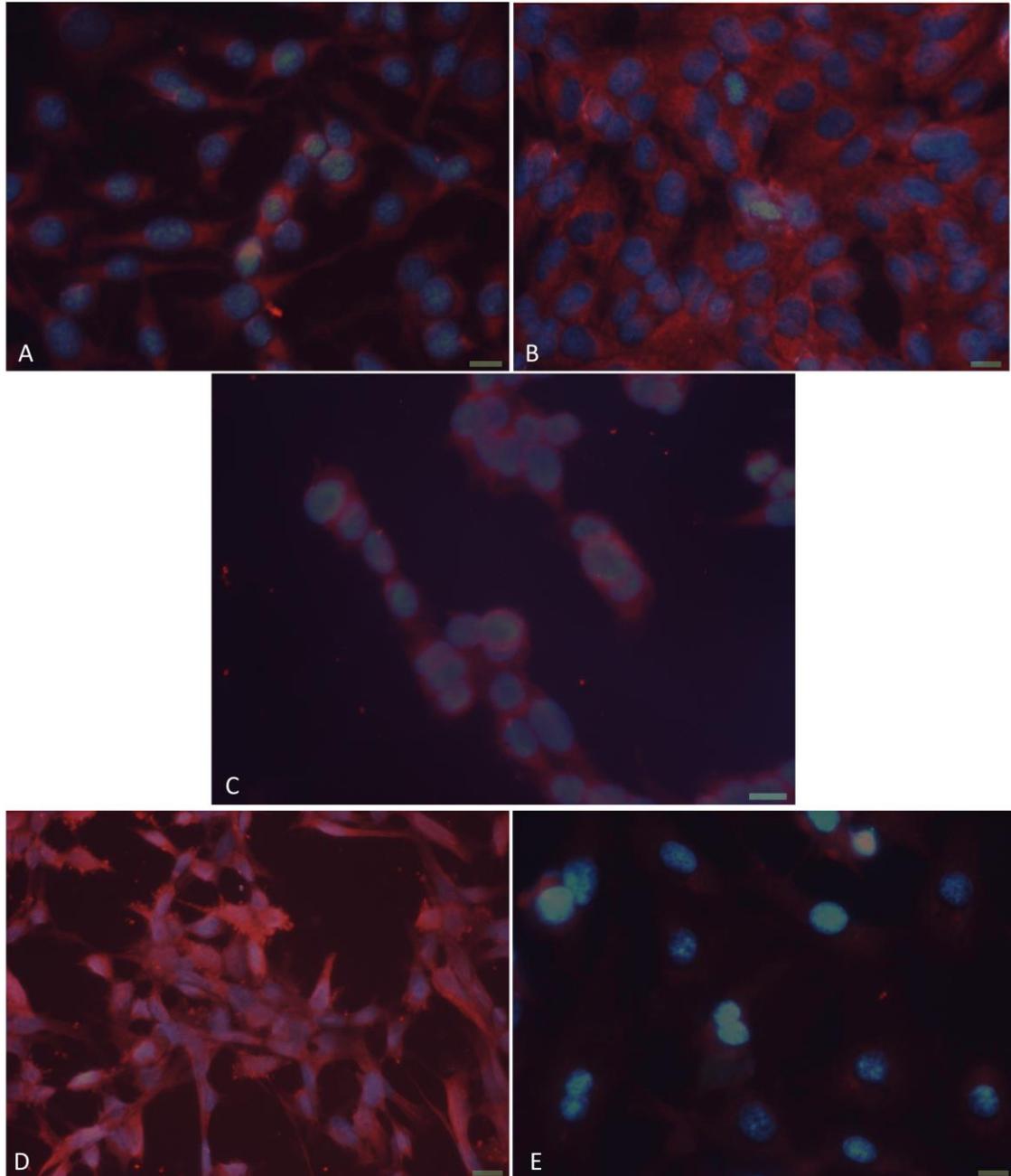


Figura 21. Expressão de GFAP em ESP12 e linhagens estabelecidas. Expressão de GFAP (em vermelho) e núcleos corados com *Hoescht* 33258. (A) U87, (B) U251, (C) células de cultivo primário de GBM (ESP12), (D) U373, (E) GL-15. A barra corresponde a 10 μ m.

A expressão de PCNA foi notória em U251 (figura 22B), ESP12 (figura 22C) e U373 (figura 22D), denotando um fenótipo proliferativo a essas células. Em todas as linhagens e em ESP12 a marcação se mostrou citoplasmática. A marcação foi menos intensa na linhagem U87 (figura 22A).

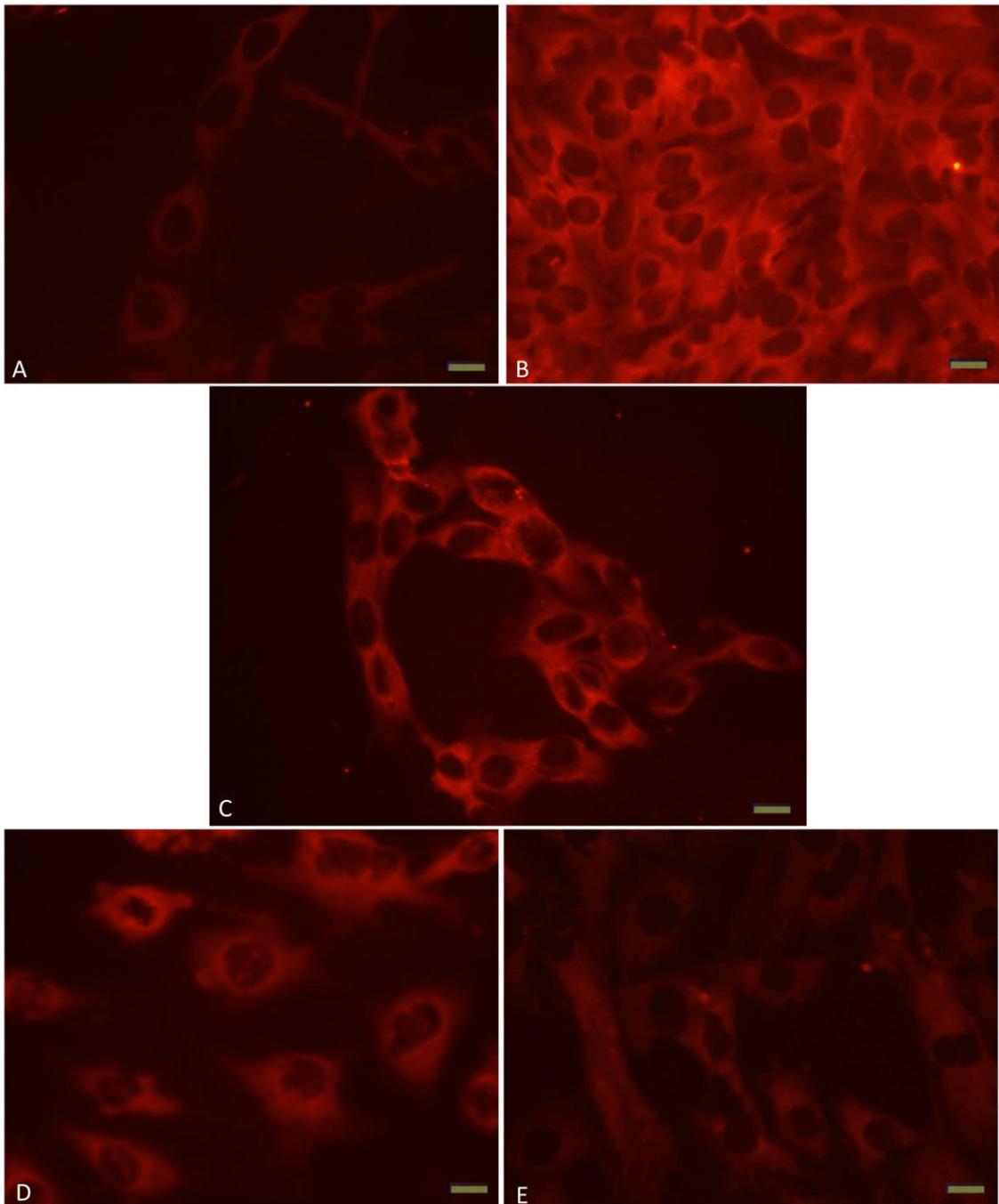


Figura 22. Caracterização imunocitoquímica para a proteína PCNA. A proteína PCNA encontra-se marcada em vermelho. (A) U87, (B) U251, (C) células de cultivo primário de GBM (ESP12), (D) U373, (E) GL-15. A barra corresponde a 10 μ m.

A expressão de Gp-39 foi observada em todas as linhagens e em ESP12 evidenciando também a presença de componente mesenquimal (figura 23).

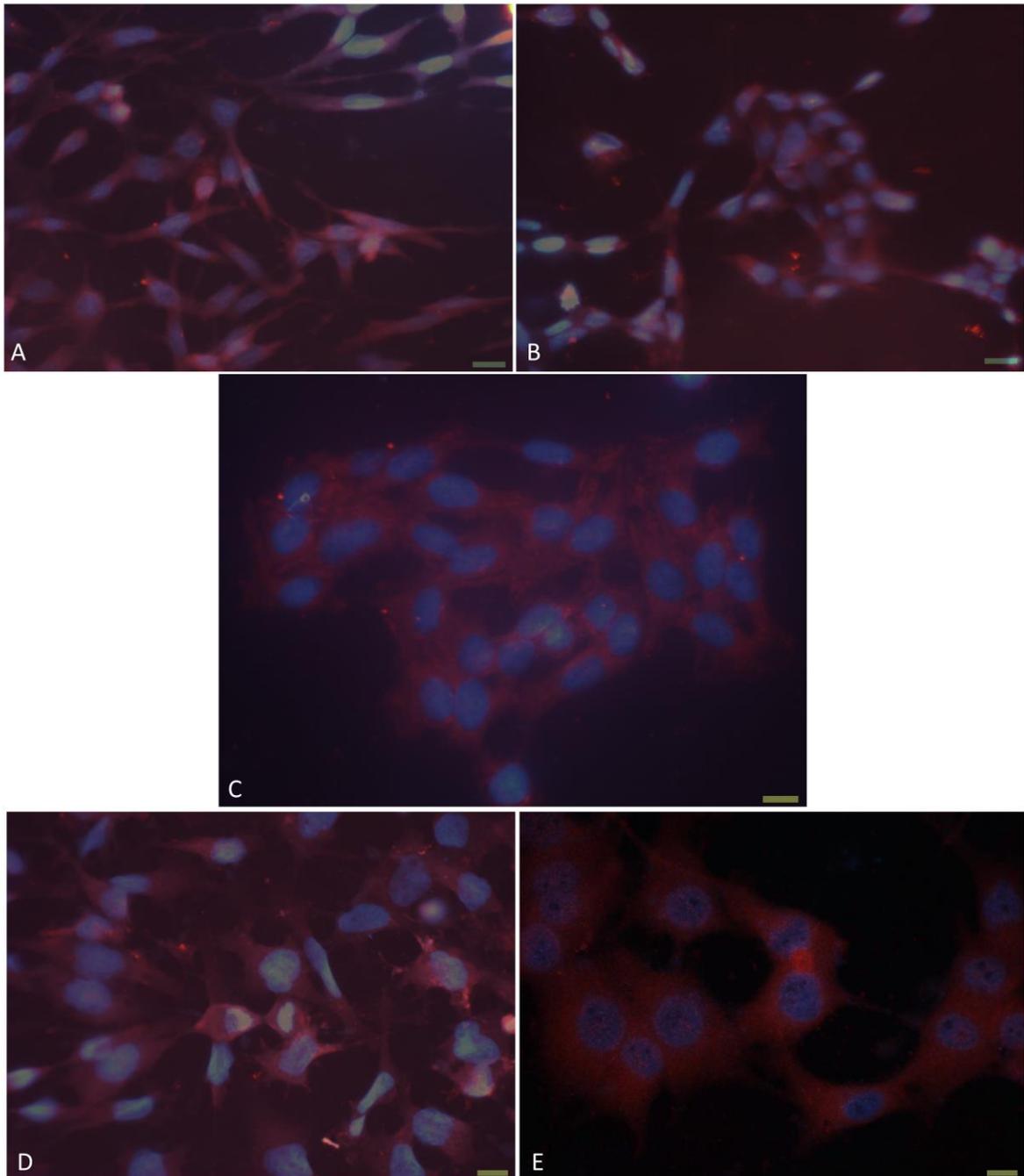


Figura 23. Caracterização imunocitoquímica para a proteína Gp-39. A proteína Gp-39 encontra-se marcada em vermelho. Os núcleos estão corados com *Hoescht* 33258. (A) U87, (B) U251, (C) células de cultivo primário de GBM (ESP12), (D) U373, (E) GL-15. A barra corresponde a 10 μ m.

OLIG-2 também foi detectada em todas as linhagens e em ESP12 evidenciando a presença de componente pró-neural (figura 24). O mesmo comportamento de expressão visto para a proteína PCNA foi observado para a marcação com OLIG-2. Ou seja, a expressão se mostrou citoplasmática embora se perceba marcação dessa proteína no núcleo (setas). A marcação foi menos intensa na linhagem GL-15 (figura 24E).

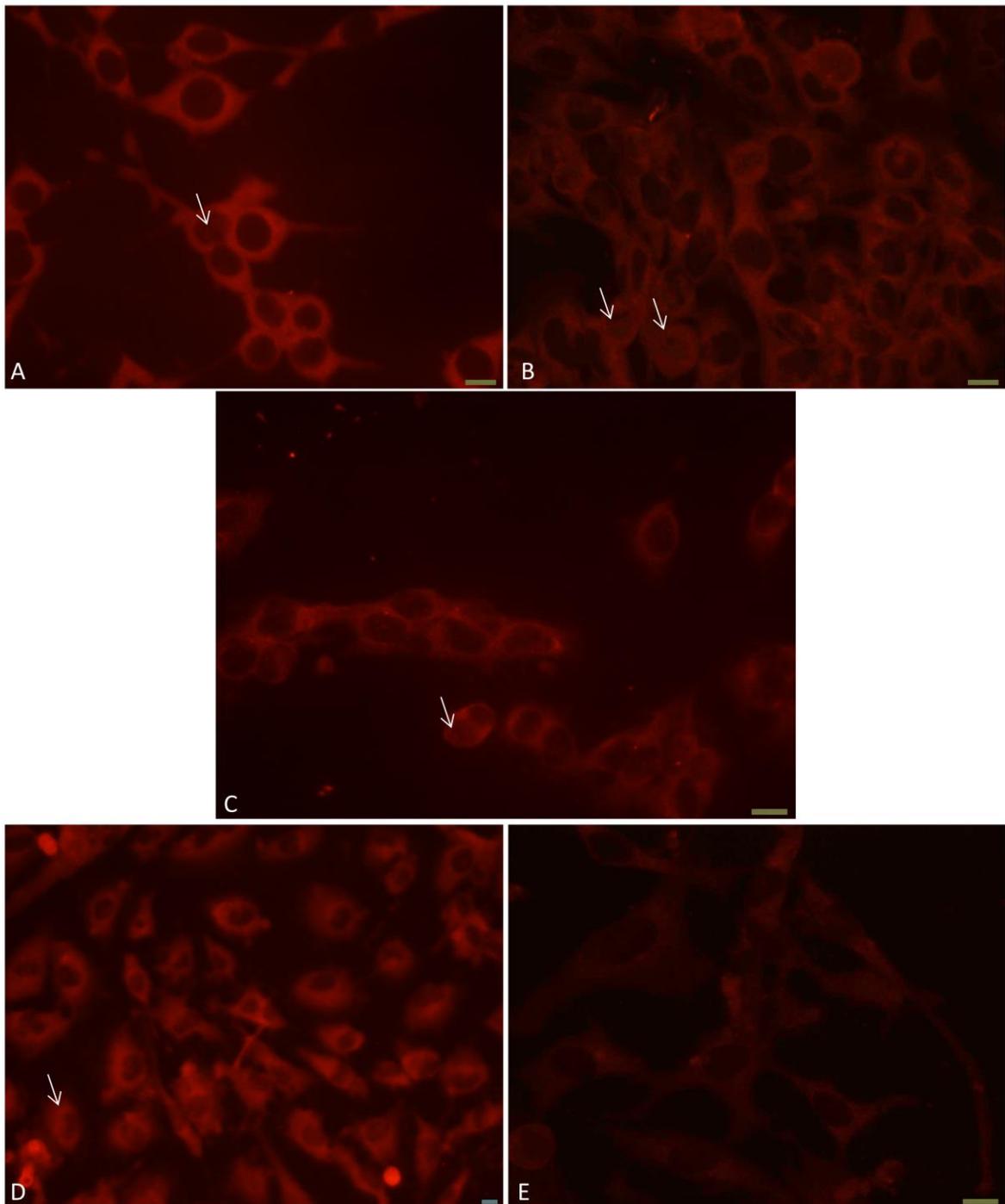


Figura 24. Caracterização imunocitoquímica para a proteína OLIG-2. A proteína OLIG-2 encontra-se marcada em vermelho. (A) U87, (B) U251, (C) células de cultivo primário de GBM (ESP12), (D) U373, (E) GL-15. Notar marcação da proteína no núcleo da célula (setas). A barra corresponde a 10 μ m.

6.7.2 Imunofenotipagem por citometria de fluxo

Com o objetivo de quantificar a expressão de GFAP, PCNA, Gp-39 e OLIG-2, que caracterizam os fenótipos descritos anteriormente, em ESP12, utilizamos a detecção dessas proteínas por citometria de fluxo. O resultado dessa imunofenotipagem é mostrado na tabela 7. O maior percentual de células positivas para PCNA caracteriza ESP12 como uma linhagem proliferativa.

Tabela 7. Percentual de células positivas para PCNA, OLIG-2 e Gp 39 em ESP12. Foram realizados três experimentos independentes com 10000 células cada.

% células positivas	ESP12	Desvio
PCNA	83,28	10,89
OLIG-2	63,5	4,94
Gp-39	34,1	1,97

6.7.3 Identificação de células CD133⁺

A fim de determinar a presença de uma subpopulação de CSC foi investigada a expressão de CD133 na linhagem ESP12. Além disso, células de outras linhagens de GBM (U87, U251, GL-15) foram marcadas para essa proteína. O resultado revela que a linhagem ESP12, assim como as outras linhagens de GBM, apresentaram menos de 1% de células positivas para CD133.

6.7.4 Expressão de proteínas MDR - MRP1 e Pgp

A presença de ATPases de efluxo caracteriza um fenótipo de resistência à múltiplas drogas. A MRP1 e a Pgp contribuem para a redução do quimioterápico intracelularmente. Com o intuito de avaliar o percentual de células positivas para MRP1 e Pgp, foi realizado a investigação da presença dessas proteínas em ESP12 e comparada com uma linhagem já estabelecida de GBM (U251). A detecção do percentual de positividade para essas proteínas foi feito através de citometria de fluxo e os resultados são mostrados na tabela 8. ESP12 apresentou uma maior positividade para Pgp quando comparada a U251. Em

relação à expressão de MRP1, ESP12 mostrou uma positividade menor para essa proteína quando comparada com a positividade em U251. Não é possível tecer nenhuma análise em termos de significância estatística entre as duas linhagens uma vez que seria necessário pelo menos mais um experimento para tal. Foram realizados dois experimentos independentes com 10000 células cada, sendo representado o percentual médio de positividade (Tabela 8).

Tabela 8. Percentual de células positivas para Pgp e MRP1, em células de GBM humano.

	Pgp (%)	Desvio padrão	MRP1 (%)	Desvio padrão
ESP12	38,59	15,71	15,64	0,47
U251	21,33	1,87	33,94	1,4

6.7.5 Expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)

A produção de VEGF foi medida no sobrenadante das culturas por ELISA, após 72h, e a análise estatística revelou que não há diferença entre a produção desse fator de crescimento entre ESP12, ESP13 e as outras linhagens (figura 25). Entretanto, quando comparamos as lâminas de ESP12 e ESP13, coradas por H&E, fica evidente que ESP12 possui mais achados de angiogênese que ESP13 (figura 26A). A produção de VEGF foi investigada em ESP13 no sentido de se comparar a produção de VEGF em ESP12, com outra linhagem obtida de uma graduação tumoral inferior.

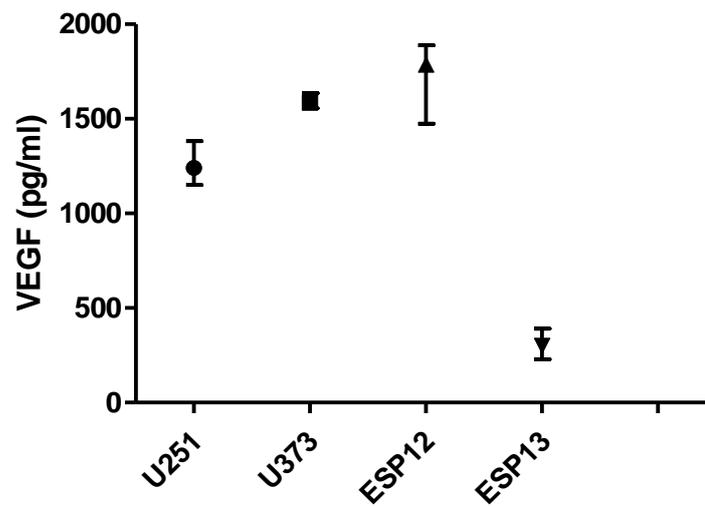


Figura 25. Expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em linhagens estabelecida de GBM, em ESP12 e ESP13. A produção de VEGF por ESP12 foi comparada com as outras linhagens através do teste não paramétrico Mann-Whitney. As dosagens foram realizadas em triplicata.

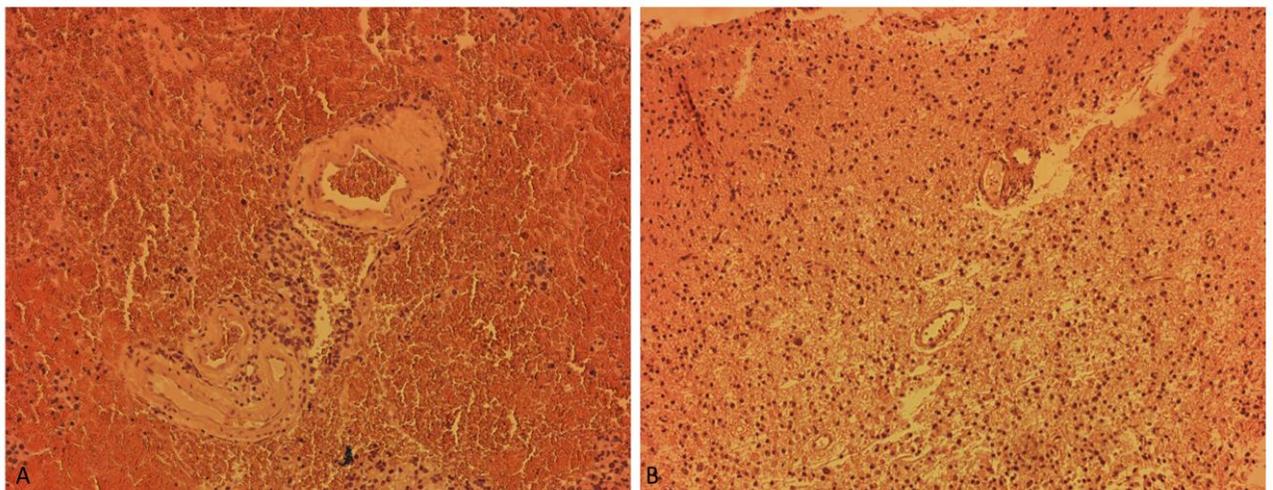


Figura 26. Coloração com H&E em gliomas de alto grau. (A) ESP12, notar vascularização mais evidente do tecido, tamanho e a forma tortuosa dos vasos (B) ESP13, menor número de vasos. Além disso, apresentam morfologia similar aos vasos normais. Aumento original: 200×

6.7.6 Tempo de duplicação da população celular (TDPC)

Uma vez que ESP12 tanto por imunohistoquímica quanto por imunocitoquímica revelou uma tendência ao fenótipo proliferativo, investigamos o tempo de duplicação da população celular (TDPC) para as células advindas dessa cultura primária. Os resultados da cinética de duplicação das linhagens U373, U251, U87, GL-15 e C6 e das

células obtidas de cultivo primário ESP12 e ESP13 são demonstrados na tabela 9. O TDPC foi obtido a partir da contagem das unidades relativas de absorvância de formazan total em função do tempo de incubação das células. Verificou-se que para as linhagens U251 e C6 e para ESP12 e ESP13, que de 0 a 48 horas de incubação as células apresentaram um crescimento exponencial, tendo, após este período, reduzido sua velocidade de crescimento com tendência, após 72 horas, a estabilização do crescimento. As linhagens U373 e GL-15 apresentaram crescimento exponencial dentro de 50 h de plaqueamento. A linhagem U87 foi a que apresentou maior tempo de crescimento exponencial.

Tabela 9. TDPC, em horas, de linhagens humanas e murina (C6) de gliomas de alto grau.

TDPC (h)						
ESP12	U251	ESP13	C6	U373	GL-15	U87
30,97	39,23	47,21	48,98	51,93	56,77	74,37

6.7.7 Testes de citotoxicidade – avaliação da quimiorresistência

As células de cultivo primário de GBM (ESP12), de linhagens humanas já estabelecidas (U87, U251, U373) e de glioma de rato (C6) foram cultivadas em placas de 96 poços e expostas a diferentes quimioterápicos a fim de se avaliar o efeito citotóxico destes. Inicialmente, todas as placas foram expostas a várias concentrações das drogas (n = 8 para cada concentração), durante 72 horas, com experimentos feitos em pelo menos triplicata, a fim de se determinar a IC₅₀ de cada uma delas, através do protocolo usando MTT. A faixa de concentração das drogas usadas está apresentada na tabela 4. O comportamento das células frente à exposição a TMZ é mostrado na tabela 10. ESP12 mostrou-se mais sensível que a linhagem C6 e U251, e mais resistente que a linhagem U87. Esta última foi a única para a qual se obteve uma IC₅₀, calculada através de regressão não-linear dos dados provenientes de experimentos com concentrações crescentes de TMZ, a partir da equação [1]. As equações forma obtidas do programa Graph Pad 5.0.

$$V = 36,03 + \frac{59,20}{1 + 10^{(\text{Log } C - 1,60)}} \quad (R^2 = 0.48) \quad [1]$$

onde V é a viabilidade e C corresponde à concentração expressa em μM .

Tabela 10. Efeito, após 72h de tratamento, com TMZ, em células de GBM humano e glioma de rato.

Linhagens	Concentração mínima citotóxica (CMC)		IC ₅₀ (μM)	
	Mediana (μM)	Varição (μM)	Mediana (μM)	Varição (μM)
ESP12	0,1	0,02 – 0,2	ND*	ND*
U251	>1	-	ND*	ND*
U87			0,129	0,099 – 0,575
C6	0,4	0,01 – 0,6	ND*	ND*

*ND – não determinado nas concentrações avaliadas.

A linhagem ESP12 foi a mais sensível em relação à exposição a BCNU enquanto que a linhagem C6 foi a mais resistente (tabela 11). A mediana da IC₅₀ para ESP12 foi calculada a partir das IC₅₀ obtidas nas equações [2] e [3]:

$$V = -3,84 + \frac{84,66}{1 + 10^{(-1,73+1,2\text{Log } C)}} \quad (R^2 = 0.90) \quad [2]$$

$$V = 3,01 + \frac{94,50}{1 + 10^{(-2,30+\text{Log } C)}} \quad (R^2 = 0.89) \quad [3]$$

onde V é a viabilidade e C corresponde à concentração expressa em μM.

Também foram obtidas as IC₅₀ para esse quimioterápico em outras linhagens, calculadas também através de regressão não-linear dos dados provenientes de experimentos com concentrações crescentes de BCNU, efetuados a partir das equações [4], [5] e [6] para U251, U373 e C6 respectivamente.

$$V = -8,89 + \frac{96,27}{1 + 10^{(\text{Log } C - 1,54)}} \quad (R^2 = 0.87) \quad [4]$$

$$V = -105,60 + \frac{198,63}{1 + 10^{(-1,43+0,59\text{Log } C)}} \quad (R^2 = 0.94) \quad [5]$$

$$V = 35,16 + \frac{56,31}{1 + 10^{(-3,38+2,35\text{Log } C)}} \quad (R^2 = 0.89) \quad [6]$$

onde V é a viabilidade e C corresponde à concentração expressa em μM.

Tabela 11. Efeito, após 72h de tratamento, com BCNU, em células de GBM humano e glioma de rato.

Linhagens	Concentração mínima citotóxica (CMC)		IC ₅₀ (μM)	
	Mediana (μM)	Varição (μM)	Mediana (μM)	Varição (μM)
ESP12	0,020	0,0004 – 0,077	0,092	0,056 – 0,106
U251	0,077	0,039 – 0,077	0,105	0,076 – 0,120
U373	0,039	0,008 – 0,389	0,139	0,039 – 0,69
C6	0,0077	0,0004 – 0,077	0,196	0,05 – 0,372

Em relação à exposição à VIM, mais uma vez ESP12 se mostrou mais sensível do que as linhagens já estabelecidas (tabela 12) e foi a única para a qual se obteve uma IC₅₀ desse quimioterápico. A mediana da IC₅₀ foi calculada a partir da equação [7]:

$$V = 21,44 + \frac{61,62}{1 + 10^{(-4,94 + 2,06 \text{Log } C)}} \quad (R^2 = 0,77) \quad [7]$$

onde V é a viabilidade e C corresponde à concentração expressa em μM.

Tabela 12. Efeito, após 72h de tratamento, com VIM, em células de GBM humano e glioma de rato.

Linhagens	Concentração mínima citotóxica (CMC)		IC ₅₀ (μM)	
	mediana (μM)	variação da mediana(μM)	mediana (μM)	variação (μM)
ESP12	0,330	0,011 – 0,55	0,260	0,200 – 0,480
U373	> 1,1	-	ND*	ND*
C6	0,550	0,110 – 0,550	ND*	ND*

* ND – não determinado nas concentrações avaliadas.

6.8 INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE QUIMIOSENSIBILIZANTE DO 8-MOP

O 8-MOP apresentou uma CMC mediana de 32 μM (5-320 μM), não sendo possível determinar a IC₅₀ nas concentrações testadas (5-400 μM). A partir daí, foram feitas duas associações do 8-MOP com a TMZ. Uma utilizando 8-MOP a 5 μM (figura 27A) e outra utilizando 8-MOP a 50 μM (figura 27B). A escolha dessas concentrações foi feita com o

intuito de aproveitar o efeito mínimo citotóxico das mesmas e observar o efeito quimiossensibilizante. As concentrações de TMZ variaram de 100-1000 μM em ambos os experimentos. O 8-MOP a 5 μM potencializou o efeito tóxico da TMZ somente a 600 μM . A viabilidade das células tratadas apenas com TMZ nessa concentração foi de 75,6 %. Quando associada ao 8-MOP a viabilidade das células tratadas caiu para 60,8 % (figura 27A).

Já quando associamos o 8-MOP a 50 μM a potencialização do efeito tóxico da TMZ se deu nas concentrações de 300 μM e de 600 μM . A viabilidade das células tratadas apenas com TMZ a 300 μM foi de 70,9 %. Quando associada ao 8-MOP a viabilidade das células tratadas caiu para 59,7 %. A viabilidade das células tratadas apenas com TMZ a 600 μM foi de 75,6 %. Quando associada ao 8-MOP a viabilidade das células tratadas caiu para 53,6 % (figura 27B).

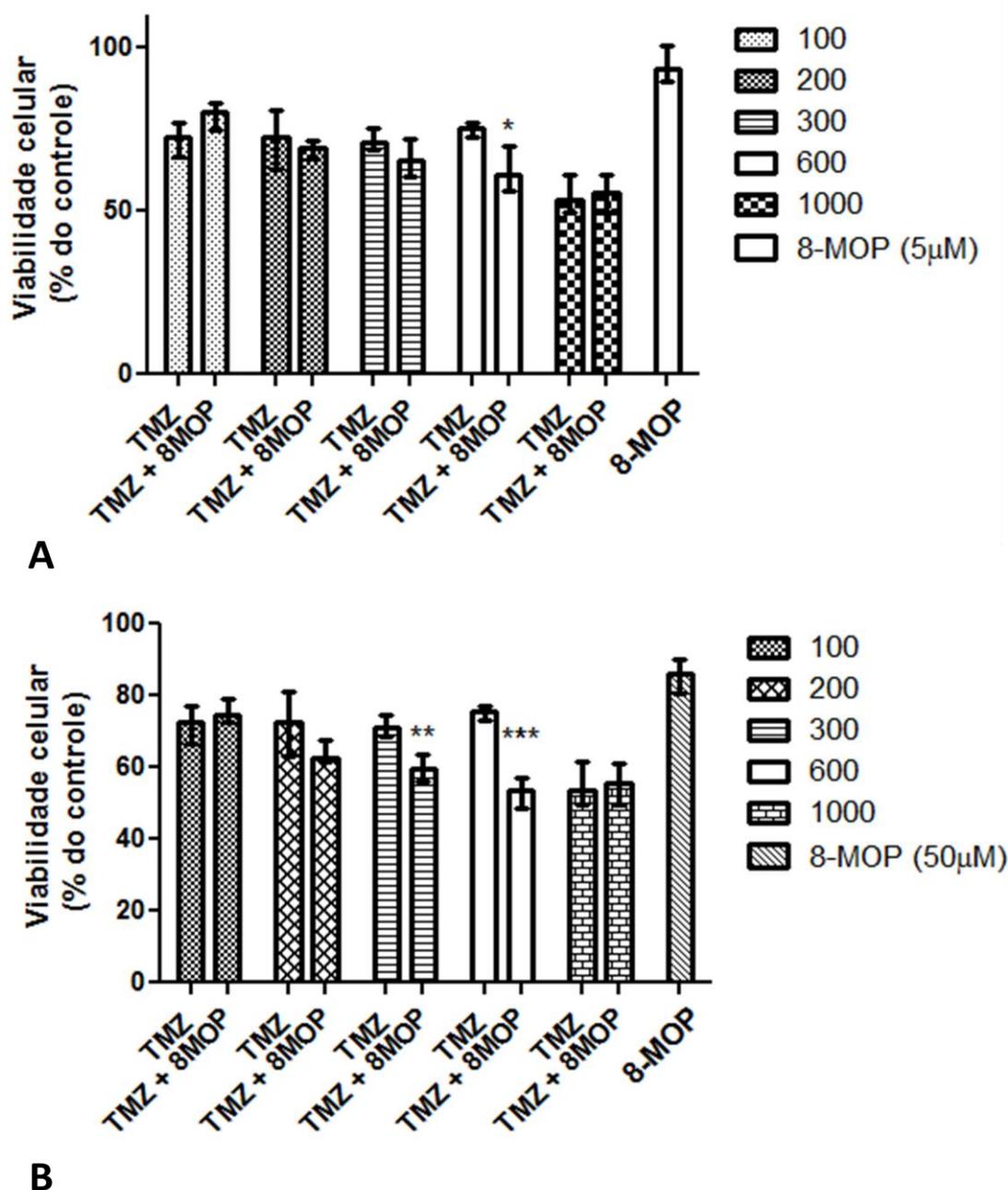


Figura 27. Toxicidade da TMZ, do 8-MOP e da associação TMZ e 8-MOP em células de cultivo primário (ESP12). (A) as células de ESP12 foram co-tratadas com TMZ (100-1000 µM) e 8-MOP (5 µM) durante 72 horas. (B) as células de ESP12 foram co-tratadas com TMZ (100-1000 µM) e 8-MOP (50 µM) durante 72 horas. Foram realizados 4 experimentos com $n=8$ para cada concentração. * $p = 0,0286$, ** $p = 0,0286$, *** $p = 0,0286$, teste Mann Whitney.

7 DISCUSSÃO

A distribuição por idade, por sexo e pela localização tumoral dos portadores de gliomas de alto grau nesse estudo reproduziu de um modo geral, as tendências mundiais. Sabe-se que a idade é um importante fator prognóstico associado à sobrevida dos pacientes com essa doença (USHIO e KOCHI, 1996; FOUTAINE e PAQUIS, 2010). Nesse trabalho, a maior parte dos casos concentrou-se na faixa etária entre 50-60 anos, corroborando com os dados obtidos por HUTTNER (2012). Dos cinco pacientes que se encontravam nessa faixa etária, dois foram a óbito durante o período pós-operatório. Os pacientes mais jovens ESP7 e ESP13, tiveram uma sobrevida de 10 meses e 3 meses (este último ainda estava vivo ao fechamento do estudo), respectivamente. A proporção de acometimento entre homens e mulheres nesse estudo também foi similar àquela descrita por HUTTNER (2012), mostrando maior incidência em homens em relação às mulheres numa proporção de 3:2. Já em relação aos sintomas clínicos, qualquer paciente que descreva mudança no padrão de cefaleia ou cefaleia crônica, persistente, em associação com náusea prolongada, vômitos, convulsões, sintomas neurológicos deve ser avaliado quanto à possibilidade de presença de tumor cerebral (CHANDANA e col., 2008). Os principais sintomas clínicos apresentados por nossos casos foram cefaleia e convulsão. Em relação a esse fato, dois grandes estudos com pacientes com gliomas de alto grau, conduzidos por FRANKEL e GERMAN (1958) e por ROTH e ELVIDGE (1960), mostraram que a cefaleia é o principal sintoma apresentado inicialmente. A cefaleia está frequentemente associada com outros sintomas como convulsões, distúrbios visuais, náusea e vômitos (FORSYTH e POSNER, 1993). As convulsões são mais comuns em pacientes com gliomas de baixo grau (CHANDANA e col., 2008), entretanto 18 % dos pacientes com GBM estudados por FRANKEL e GERMAN (1958) e por ROTH e ELVIDGE (1960) apresentaram inicialmente esse sintoma. Já PRAKASH e colaboradores (2012) afirmam que convulsões epiléticas são muito comuns entre pacientes com tumores da glia, atingindo cerca de 50 % em pacientes com GBM.

Os achados de imagem em ESP12 foram similares aos descritos na literatura (CBTRUS, 2004). Topograficamente, os GBMs predominam na região supratentorial, mais frequentemente nos lobos temporal (32 %), frontal (31 %), fronto-parietal (11 %), parietal (10 %), têmporo-parietal (7 %) e regiões occípito-parietais (5 %). O GBM é incomum na região do terceiro ventrículo e raramente ocorre na fossa posterior (RONDINELLI e MARTINEZ, 2002). Os aspectos mais frequentes nas imagens em RM de gliomas de alto grau são: presença

de lesões com contorno mal definido, edema vasogênico e necrose central. POPE e colaboradores (2005) também estudaram pacientes com gliomas de alto grau e encontraram lesões com características semelhantes em seus casos.

Os aspectos mais frequentes na histopatologia dos casos estudados foram os critérios que em conjunto conduziam a uma classificação de maior grau de malignidade. Ou seja, alta celularidade, atipia nuclear, pleomorfismo celular, proliferação vascular e necrose foram os principais achados que em associação determinaram o diagnóstico anatomopatológico. A OMS define tumores astrocitários difusamente infiltrativos como grau II, quando as lesões apresentam apenas atipia citológica e celularidade aumentada (LOUIS e col., 2007). No nosso estudo, tivemos um caso de astrocitoma difuso grau II, mas o estudo histológico encontrou algumas regiões que apresentavam focos de malignidade que conduziram o diagnóstico para a graduação III (muito provavelmente áreas de mitoses atípicas). As lesões que além de anaplasia apresentam atividade mitótica são classificadas como grau III (astrocitoma anaplásico). No nosso estudo, obtivemos um caso representativo dessa graduação. Aquelas lesões que, adicionalmente, mostram proliferação microvascular e/ou necrose são classificadas como grau IV. A maior parte dos nossos casos foram classificados dentro dessa graduação. Necrose em “pseudopaliçada” não necessariamente precisa estar presente (LOUIS e col., 2007), mas é um achado clássico para GBM, embora não seja exclusivo deste. Em um dos nossos casos foi evidenciado necrose nessa disposição. Embora não figurem entre os critérios de graduação tumoral da OMS, a presença de células gigantes multinucleadas entre os tipos celulares dos tumores astrocíticos são apontadas como indicadores de malignidade (FARIA, DO PATROCÍNIO e RABENHORST, 2006). Foram evidenciadas células gigantes em um dos GBMs investigados, associadas a elevada celularidade e expressivo pleomorfismo celular. Diversos autores consideram esses elementos celulares consequentes a alterações regressivas (indiferenciação) e sugerem sua correlação com pior prognóstico clínico (SCHMIDT e col., 2002). O padrão de angiogênese com formação de “complexos glomeruloides” foi observado no nosso estudo, e, essa parece ser uma característica única dos tumores cerebrais, assim como a heterogeneidade da distribuição do calibre microvascular (FOLKERTH, 2004). ESP4 não apresentou atipias importantes, manteve a relação núcleo-citoplasma, entretanto um componente de angiogênese foi evidenciado. BURGER e colaboradores (1987) defendem que a presença de componente angiogênico é um critério importante na definição do diagnóstico, prognóstico e sobrevida de pacientes com oligodendroglioma. Ainda, segundo esses autores, os oligodendrogliomas com

essa característica seriam classificados como anaplásicos ou tipo D, apresentariam um comportamento mais agressivo, sobrevida menor e incidência maior em pacientes mais velhos, acima dos 50 anos de idade. Os pacientes portadores de oligodendrogliomas grau III ou anaplásico apresentam sobrevida média de 5 anos (DE ANGELIS, 2009). Contudo, ESP4 apresentou uma sobrevida de 22 meses, muito menor do que a sobrevida média descrita por DE ANGELIS (2009) e tinha 51 anos ao diagnóstico.

A mediana de sobrevida dos pacientes nesse estudo foi de 11,5 meses corroborando a maior parte dos dados achados na literatura (KREX e col., 2007; SONODA e col., 2009; PICCOLO e FREY, 2013). CALOGLU e colaboradores (2009), entretanto, encontraram uma mediana de sobrevida menor em torno de 9,8 meses e há ainda aqueles que relatam menos de 6 meses (BARBUS e col., 2011). Já WELLER e colaboradores (2003) encontraram uma mediana de vida um pouco maior em torno de 17,3 meses. A despeito do prognóstico ruim relatado em praticamente todos os trabalhos, alguns autores ainda relatam um pequeno grupo de pacientes (algo em torno de 2 – 5 %) que sobrevivem acima de 3 anos (SENGER, CAIRNCROSS e FORSYTH, 2003; SONODA e col., 2009; BARBUS e col., 2011). Nove por cento dos 529 pacientes estudados por FIELD e colaboradores (2013) apresentaram uma sobrevida estendida (acima de 24 meses). Já PUZZILLI e colaboradores (1998) descreveram um caso de paciente com GBM que teve uma sobrevida de 11 anos após cirurgia, seguida de radio e quimioterapia. A maior sobrevida observada no presente estudo foi relacionada ao diagnóstico de astrocitoma fibrilar difuso, grau II, 24 meses. Essa sobrevida ainda assim é considerada muito inferior à mediana de sobrevida para pacientes com astrocitoma de graduação II que é de 5 a 8 anos (LIND-LANDSTRÖM e col., 2012). Esses tumores são de baixa celularidade, geralmente apresentam poucas atipias, e podem até confundir-se com áreas de gliose (MALHEIROS e col., 1998). Este caso, entretanto, apresentava focos de anaplasia sugestivos de malignidade para grau III, o que pode então explicar a sobrevida inferior à média.

Apesar da importância da classificação dos tumores cerebrais descritos por Percival Bailey (FERGUSON e LESNIAK, 2005) e do grande avanço na uniformização diagnóstica dos gliomas obtido a partir da publicação dos novos critérios da OMS em 1993, 2000 e mais recentemente em 2007, o diagnóstico anatomopatológico por si só, não consegue responder as diferenças na evolução de pacientes diagnosticados em um mesmo grupo. Ela fornece uma visão relativamente limitada das lesões moleculares subjacentes aos tumores. Na última década houve um progresso significativo na descoberta e aplicação clínica de

marcadores moleculares, que ajudam na avaliação e condução de pacientes com tumores cerebrais. Os trabalhos de MISCHEL, CLOUGHESY e NELSON (2004) e de PHILLIPS e colaboradores (2006) (e de sua posterior patente em 2007), mostram que é possível fazer uma classificação molecular e subtipar os tumores cerebrais. Essa classificação pode influir diretamente na terapia a ser adotada. PHILLIPS e colaboradores (2006) estudando o perfil gênico de uma amostra de 76 casos de astrocitoma grau IV observaram a expressão mais acentuada das proteínas PCNA, Gp-39 e OLIG-2, caracterizando os fenótipos proliferativo, mesenquimal e pró-neural respectivamente. MISCHEL, CLOUGHESY e NELSON (2004) fizeram uma vasta revisão sobre a possibilidade da utilização de microarranjo na subclassificação dos tumores cerebrais. A determinação de um perfil molecular, portanto, poderia desempenhar papéis no diagnóstico, no prognóstico e influenciar o processo de tomada de decisão clínica. A subtipagem poderia então responder a diferença de evolução clínica de pacientes diagnosticados em um mesmo grupo. Entretanto, os trabalhos mais recentes, assim como os citados anteriormente, utilizam metodologias sofisticadas como microarranjos e avaliação de alterações genéticas. Essas metodologias ainda não estão disponíveis na rotina histopatológica, que mantém o diagnóstico baseado na investigação de achados típicos à microscopia óptica e, em casos mais difíceis, recorre na maioria das vezes à imunohistoquímica. Nesse trabalho, os casos foram fenotipados para a expressão de duas dessas proteínas (OLIG-2 e PCNA) através da técnica de imunohistoquímica. Os fenótipos investigados, portanto, na imunohistoquímica foram o proliferativo e pró-neural. A presença da proteína GFAP também foi avaliada. Destes casos, escolhemos subtipar as células obtidas de um caso (ESP12) através de imunocitoquímica, como parte da caracterização da linhagem. A escolha desse caso se deu como veremos adiante devido ao seu caráter proliferativo acentuado e intenso pleomorfismo. Na imunocitoquímica, além dos fenótipos citados anteriormente, o mesenquimal também foi investigado.

Os dados da imunohistoquímica revelaram que todos os tumores expressaram GFAP, confirmando a origem glial destes, embora de forma heterogênea, com ESP10, ESP11 e ESP12 expressando de maneira mais intensa a proteína. SARKAR, JAIN e SURI (2009) já relatam que a imunorreatividade para GFAP em GBMs é heterogênea. Ainda, essa superexpressão em ESP10, ESP11 e ESP12 pode estar relacionada à resposta morfológica astrogliar à injúria (gliose reativa). Oligodendrócitos normais não expressam GFAP, mas oligodendrogliomas típicos e formas mistas, constituídas de uma mistura de astrócitos e oligodendrócitos, podem expressá-lo (HILBIG e col., 2006). Do ponto de vista

histológico, o oligodendroglioma pode apresentar células típicas de oligodendrócitos, porém quase sempre possui componente astrocítico variável, de 0 a 49 %, sendo considerado puro quando esse componente é menor que 25 % (SIMÃO e col., 2001). Embora HOLLAND (2001) afirme que não há expressão da GFAP em oligodendrogliomas, observamos a marcação para essa proteína em ESP4, um oligodendroglioma. HILBIG e colaboradores (2006) também encontraram expressão dessa proteína estudando 42 pacientes com oligodendroglioma, com idade entre 4 e 60 anos. Trinta e três casos (78,57 %) mostraram positividade para GFAP. Seis casos expressaram intensamente essa proteína e a expressão muitas vezes foi focal. Em 11 casos houve expressão apenas em poucas células. Esses autores concluíram que áreas focais de diferenciação neuronal e/ou glial podem estar presentes em oligodendrogliomas típicos. Ainda, segundo estes, o estudo imunohistoquímico com marcadores glial e neuronal tem sido utilizado e pode auxiliar no diagnóstico diferencial em oligodendrogliomas e diferentes tipos de tumores podem mostrar áreas oligodendrogliais. TENA-SUCK e colaboradores (2008) também avaliaram a expressão de GFAP em 28 casos de oligodendrogliomas. Essa proteína estava presente tanto em tumores de graduação II quanto de graduação III. Os autores sugerem uma correlação entre a expressão da GFAP e proteína de choque térmico como um mecanismo de defesa próprio do tumor. Por fim, a expressão da GFAP em oligodendrogliomas pode ser explicada pela presença de alguns astrócitos maduros reativos dentro do tumor ou de formas transicionais entre astrócitos e oligodendrócitos, denominados microgemistocistos. Oligodendrócitos gliofibrilares e microgemistocistos são frequentes em oligodendrogliomas anaplásicos, mas parece não haver significado prognóstico para a presença destes (SARKAR, JAIN e SURI, 2009). É possível também que as células tumorais positivas representem oligodendrócitos imaturos, que podem expressar transitoriamente GFAP (HILBIG e col., 2006). SMITH e colaboradores (1983) observaram em 40 % dos casos de oligodendrogliomas estudados alterações celulares sugerindo componente astrocítico. Os autores, porém, não encontraram relação entre a presença desse componente e alteração da sobrevida, embora a presença de necrose e proliferação vascular seja mais frequente nesses casos. TICE e colaboradores (1993), entretanto, avaliando apenas oligodendrogliomas puros, em crianças e adolescentes, encontraram taxa de crescimento tumoral bastante lenta e excelente sobrevida após ressecção parcial ou total dos tumores. Já SKALLI e colaboradores (2013) examinaram uma população de 47 pacientes com GBM submetidos à cirurgia. Eles fizeram uma avaliação imunohistoquímica semi-quantitativa da presença das proteínas que constituem filamentos

intermediários (GFAP, vimentina, nestina e sinemina) nas células tumorais. Segundo esses autores, o sistema de filamentos intermediários ajuda células e tecidos a lidar contra vários tipos de estresses, e assim poderia afetar o potencial de malignidade do GBM. Esses autores propuseram, então, uma subclassificação dos astrocitomas grau IV de acordo com a expressão das proteínas relacionadas aos filamentos intermediários. Os resultados obtidos por estes revelaram que a expressão dessas proteínas está relacionada com a malignidade do GBM. Os padrões de expressão dessas proteínas de filamentos intermediários poderiam ter significado biológico e clínico. De toda maneira, fica evidente que esses achados necessitam ainda de melhor avaliação estatística para definir seu significado prognóstico da presença ou não de um componente astrocítico em oligodendrogliomas.

Todos os casos também expressaram imunohistoquimicamente PCNA, sendo que ESP7 e ESP12 foram mais evidentes. Esse foi um dos parâmetros que nos levaram a escolher as células de ESP12 para caracterização da linhagem. MAITI e colaboradores (2008) também encontraram marcação para PCNA nos GBMs e astrocitomas anaplásicos estudados por eles. Esses autores concluíram que a marcação para essa proteína aumentava de acordo com o aumento da graduação tumoral. Dessa forma, o aumento da expressão de PCNA parece estar associado com o aumento no grau de malignidade. Isso possivelmente está relacionado com as funções próprias dessa proteína necessária para a atividade da DNA-polimerase delta e como recrutadora de mecanismos de reparo (o PCNA, por exemplo, é substrato da via RAD6 responsável por reparos ao DNA) (MAITI e col., 2008). ALKIZA e colaboradores (2000) também concordam que os gliomas mais malignos são caracterizados pela alta expressão de PCNA e que esta proteína pode ser utilizada como um marcador prognóstico complementar a outros critérios. Outros autores como ALLEGRANZA e colaboradores (1991) enfatizam que GBMs, por vezes, mostram um certo grau de heterogeneidade intratumoral, de distribuição das células imunocoradas e por isso a importância de uma amostragem representativa para estudos cinéticos.

O fenótipo pró-neural foi investigado através da expressão da proteína OLIG-2. Embora a positividade para esta proteína tenha sido vista em todos os casos, a expressão foi marcante em ESP12 e ESP13, GBM e astrocitoma grau III respectivamente. A expressão em ESP4, um oligodendroglioma, foi observada, mas não tão intensa como de se esperar. Não houve marcação em dois casos (ESP3 e ESP9) (dados não mostrados). MOKHTARI e colaboradores (2005) investigaram a expressão de OLIG-2, também por imunohistoquímica. Os resultados obtidos por esses autores revelaram que a expressão de

OLIG-2 foi restrita aos tumores gliais e oligodendrócitos não-tumorais. Além disso, a expressão dessa proteína foi alta em oligodendrogliomas quando comparada com astrocitomas e oligoastrocitomas, e maior nos tumores de maior graduação do que naqueles de grau II. OLIG-2 foi ausente ou fracamente expressa nos GBMs diferentemente dos nossos resultados onde encontramos forte marcação dessa proteína em GBM. É importante ressaltar que a expressão de OLIG-2 em astrocitomas e GBMs é menos proeminente (PREUSSER e col., 2007; TABU e col., 2007). Já LIGON e colaboradores (2004) atribuem heterogeneidade à expressão de OLIG-2 em GBMs, heterogeneidade esta vista no trabalho de AGUIRRE-CRUZ e colaboradores (2004), usando hibridação *in situ*. Assim como em nosso trabalho, esses autores também observaram expressão de OLIG-2 em astrocitoma fibrilar difuso e astrocitoma anaplásico. Entretanto, apenas 1 GBM expressou OLIG-2, diferentemente dos nossos achados onde praticamente todos os GBMs expressaram essa proteína. O consenso é que expressar essa proteína tem um valor prognóstico positivo em GBMs. É o que DONEV e colaboradores (2010) observaram. O trabalho deles descreveu a expressão de antígenos neuronais (DLL-3, BCAN, beta-tubulina classe III) em astrocitomas de alto grau, particularmente GBMs. A expressão desses antígenos expressos em estágios precoces da diferenciação neuronal, entre eles OLIG-2 parece estar associada a um melhor prognóstico. A presença de um componente oligodendroglial em tumores de maior malignidade parece ser um fator que está relacionado a maior sobrevida do paciente (HILBIG e col., 2006; LU e col., 2001; PINTO e CHIMELLI, 2004), inclusive sendo um indicador de sobrevida tanto pela classificação da OMS quanto pela classificação de Saint- Anne (DAUMAS-DUPORT e col., 2000). Pesquisadores do Instituto Saint- Anne fazem críticas à classificação proposta pela OMS, pois essa não leva em conta critérios clínicos, de imagem e alterações moleculares em comuns presentes em alguns grupos de tumores (FIGARELLA-BRANGER e BOUVIER, 2005). Dessa forma, a subclassificação GBM com componente oligodendroglial (GBMo) distingue esses tumores dos GBMs clássicos identificando um subgrupo de pacientes que responde melhor à quimioterapia e/ou tem um prognóstico melhor (KLEIHUES e col., 2002). GBMo contém alterações genéticas associadas com o aumento na quimiosensibilidade observada em oligodendrogliomas como a perda da heterozigosidade nos braços cromossômicos 1p e 19q (VORDERMARK e col., 2006). TABU e colaboradores (2007) também observaram que a expressão de OLIG-2 suprimiu o fenótipo motor em células de GBM da linhagem U12-1 através da ativação de RhoA. A família de GTPases Rho regula a migração de vários tipos celulares incluindo células de glioma através da reorganização do

citoesqueleto de actina durante a migração celular, indução da formação de fibras de estresse e adesão focal que confere contratilidade ao corpo celular, lamelipodia e filopodia. Assim, parece que a expressão de OLIG-2 contribui para a redução da migração e invasividade celular.

As linhagens apresentaram diferentes morfologias *in vitro*, mas ao longo das repicagens a morfologia fusiforme predominou. Essa morfologia fusiforme também foi observada por NUKI e colaboradores (2004) em uma linhagem de GBM estabelecida por estes. Já as linhagens estabelecidas por PERZELOVÁ e colaboradores (1998) apresentaram uma morfologia poligonal achatada. MORIYAMA e colaboradores (1997) encontraram tanto aspecto fusiforme quanto poligonal na linhagem MGM-1 de GBM estabelecida por eles. ISHIWATA e colaboradores (2005), por sua vez, observaram células de astrocitoma apresentando processos citoplasmáticos que se conectavam uns aos outros. Em alguns de nossos casos, ESP3, ESP12 e ESP13 essa característica também foi notada. As células de oligodendroglioma estudadas por ISHIWATA e colaboradores (2005) eram pequenas e fusiformes. As células obtidas de ESP4, um oligodendroglioma, também apresentaram essa morfologia. As células de GBM de ESP12 apresentavam pleomorfismo intenso e possuíam extensos processos citoplasmáticos.

Partimos então para a caracterização de ESP12. Como citado anteriormente, ESP12 foi escolhida por apresentar um fenótipo proliferativo muito pronunciado na imunohistoquímica e pleomorfismo acentuado ao estudo em microscopia de contraste de fase. A subtipagem nos fenótipos pró-neural, proliferativo e mesenquimal, agora por imunocitoquímica, foi realizada em ESP12 e em células de linhagens de GBM já estabelecidas (U251, U373, U87 e GL-15). A expressão de GFAP também foi avaliada. Todas as linhagens estabelecidas e as células de ESP12 expressaram GFAP confirmando a origem glial do tumor. BREHAR e colaboradores (2009) também encontraram expressão de GFAP na linhagem T11 de GBM humano, assim como STUDER e colaboradores (1985) em quatro linhagens de GBM. A linhagem GL-15 foi a que apresentou uma marcação menos intensa para GFAP. Em relação a esse dado, somente 30 % da população de células de GL-15 estudadas por BOCCHINI e colaboradores (1993) expressavam GFAP. BALIK e colaboradores (2009) não observaram expressão de GFAP, através de citometria de fluxo, em 11 GBMs. RUTKA e colaboradores (1987) observaram que culturas primárias cultivadas sob condições de cultivo padrão dão origem a células sem nenhuma característica glial, com ausência de expressão de GFAP. A expressão de GFAP, portanto, é muitas vezes

completamente perdida em gliomas malignos. A ausência de expressão de marcadores astrocitários maduros provavelmente se dá devido à natureza indiferenciada do tumor (BALIK e col., 2009). Além disso, muitas células acabam por não evidenciar a expressão de GFAP à medida que são feitas as repicagens (LOJA e col., 2009; PÉDEBOSCQ e col., 2007; GOMÈS e col., 1997). Esse fenômeno já é bem descrito em cultura primária de GBM (BAKIR e col., 1998; RUTKA e col., 1987) ou linhagens desdiferenciadas (ZHOU e SKALLI, 2000). Também tem sido observada uma estreita relação entre a diminuição ou mesmo ausência de expressão dessa proteína com o aumento da malignidade da célula tumoral (GODBOUT e col., 1998), embora WILHELMSSON e colaboradores (2003) discordem. Por fim, a diminuição da expressão de GFAP pode estar regulada pelo fator de crescimento transformante (TGF) e sua variante TGF- α (PÉDEBOSCQ e col., 2007; ZHOU e SKALLI, 2000).

O fenótipo proliferativo, caracterizado pela expressão de PCNA, foi evidenciado nas linhagens U251, U373, GL-15 e em ESP12. A marcação foi menos intensa na linhagem U87. Até o presente momento nenhum estudo havia mostrado a expressão dessa proteína nas linhagens estudadas e em células de cultura primária de GBM, por imunocitoquímica.

Curiosamente, em todas as linhagens e em ESP12 o padrão de marcação se mostrou citoplasmático embora se perceba marcação dessa proteína no núcleo. Classicamente, o PCNA está envolvido em uma gama de funções nucleares (fator crucial para a síntese de DNA e de reparação deste) (MOLDOVAN; PFANDER e JENTSCH, 2007). Entretanto, uma quantidade substancial de PCNA é encontrada no citoplasma embora ainda com função desconhecida. NARYZHNY e LEE (2003) encontraram, usando fracionamento subcelular, uma quantidade de PCNA citoplasmática relativamente constante ao longo do ciclo celular. Esses mesmos autores, em 2010, mostraram através de *Far-Western Blotting* e por espectrometria de massa que o PCNA se associa a várias oncoproteínas citoplasmáticas, incluindo o fator 1 de alongação de peptídeos, a malato desidrogenase e a peptidil-prolil isomerase. Ainda segundo esses autores, o PCNA estaria envolvido na integridade do citoesqueleto e outras vias de sinalização celular através da ligação de proteínas citoplasmáticas e de membrana incluindo anexina A2, sarcolectina, peptidilprolil cis-trans isomerase ou proteínas ribossomais 40S. O PCNA também se associa com seis enzimas glicolíticas que estão envolvidas na regulação das etapas 4–9 da via glicolítica. Estimula por exemplo, a atividade da aldolase e da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. Isso é importante

porque células tumorais funcionam sob o efeito Warburg, ou seja, vivem basicamente sob vias glicolíticas acopladas a fermentação láctica, com pouca dependência dos processos aeróbicos mitocondriais e por isso são mais resistentes à hipóxia. Assim, apesar de todas as funções descritas para o PCNA até o momento refletirem exclusivamente uma localização nuclear, parece existir uma interação dessa proteína com enzimas e proteínas reguladoras tais como cinases dependentes de ciclina (CDKs) (KOUNDRIOUKOFF e col., 2000) e as anteriormente citadas. Em consequência, ao PCNA têm sido atribuídos outros papéis que não apenas aqueles relacionados à replicação, por exemplo, atuando como um comunicador celular em importantes processos celulares. Em neutrófilos, por exemplo, o PCNA é curiosamente expresso e localizado exclusivamente no citosol. Ele está associado com pró-caspases para impedir a sua ativação e, portanto, tem um papel antiapoptótico. Na busca por adicionais proteínas reguladoras do ciclo celular em neutrófilos, WITKO-SARSAT e colaboradores (2010) identificaram esse papel inesperado antiapoptótico para o PCNA. Os neutrófilos são células não-proliferativas e parecem ser o modelo ideal, até o momento, para decifrar os mecanismos moleculares subjacentes a sua atividade antiapoptótica, independentemente do ciclo celular. Por fim, DE MOURA e colaboradores (2006) afirmam que o padrão de positividade para PCNA é nuclear, podendo ocorrer diferenças na intensidade de marcação em decorrência das fases do ciclo celular, portanto, maior positividade nuclear para as células que encontram na fase S do ciclo celular.

A expressão de Gp-39 foi observada em todas as linhagens caracterizando a presença de um componente mesenquimal nestas. KU e colaboradores (2011) também demonstraram a expressão de Gp-39 em células de glioma U87 e U373 usando imunocitoquímica. Esses autores concluíram que Gp-39 regula a invasão de células de gliomas através da modulação da adesão, de rearranjos no citoesqueleto e expressão de metaloproteinase-2. Além disso, a expressão de Gp-39 estava relacionada ao aumento no crescimento independente de ancoragem e conferia resistência à cisplatina, ao ETO e à doxorubicina. Células da linhagem U87 têm um perfil de expressão gênica mesenquimal similar aos glioblastomas primários (TSO e col., 2006) e expressam altos níveis do marcador de subtipo mesenquimal Gp-39 quando comparado com células da linhagem U373 (KU e col., 2011). FRANCESCONE e colaboradores (2011) também avaliaram a expressão de Gp-39 em U87, entretanto usando imunohistoquímica e *western-blot*. Esses autores estudaram a participação de Gp-39 na angiogênese e na resistência à radiação. Eles concluíram que GBMs que expressam Gp-39 possuem uma “marca” ou “sinal” para a invasividade tumoral. Isso

porque Gp-39 induz angiogênese estimulando a expressão de VEGF. GE e colaboradores (2012) observaram através de citometria de fluxo e imunocitoquímica, que células de U251 quando expostas a condições hipóxicas aumentam a expressão de proteínas precursoras de antígenos tumorais associados à glioma, dentre estas Gp-39. ZHANG e colaboradores (2010) demonstraram que o resveratrol reprime a expressão de Gp-39 através da diminuição da atividade de seu promotor, diminuição da transcrição de seu RNAm e diminuição na expressão da proteína em células U87. Trabalhos que evidenciassem a expressão de Gp-39 em cultura primária de GBM ou GL-15 não foram encontrados na literatura.

OLIG-2 também foi detectada em todas as linhagens e em ESP12 evidenciando a presença de componente pró-neural. A marcação foi menos intensa na linhagem GL-15. Estudos investigando a expressão de OLIG-2 em cultura primária de GBM ou nas linhagens estudadas, por imunocitoquímica, não foram encontrados na literatura. Um fato interessante é que o mesmo comportamento de padrão de expressão citoplasmática visto para a proteína PCNA foi observado para a marcação com OLIG-2. Em relação a esse achado, duas hipóteses explicam essa marcação não usual. A primeira é que células progenitoras imaturas são capazes de se diferenciar tanto em células gliais quanto em células neuronais e podem ser identificadas pela expressão de OLIG-2 (CASSIANI-INGONI e col., 2006). OLIG-2 é um fator de transcrição que atua como um repressor da expressão gênica neuronal e astrocitária, dessa forma mantendo as células em um estado indiferenciado ou conduzindo-as ao desenvolvimento de oligodendrócitos mielinizantes (ZHOU e ANDERSON, 2002). Durante o desenvolvimento cerebral, progenitores gliais superam essa repressão a fim de ativar a expressão de GFAP e gerar astrócitos o que acontece através da exportação de OLIG-2 do núcleo para o citoplasma (CASSIANI-INGONI e col., 2006). Em oposição, a diferenciação em oligodendrócitos requer a aquisição de outros fatores de transcrição como, Nkx2.2 e a manutenção de OLIG-2 no núcleo (CASSIANI-INGONI e col., 2006). Assim, OLIG-2 mediará a diferenciação astrocítica durante o desenvolvimento do cérebro. Este fator de transcrição é usado como um marcador para progenitores, uma vez que nem astrócitos maduros, nem oligodendrócitos normais no SNC expressam OLIG-2 (MAGNUS e col., 2007). Uma vez que astrócitos maduros não expressam OLIG-2, a observação dessa proteína no citoplasma destas células é indicativa de uma transição de um progenitor glial para um fenótipo astrocítico, com consequente expressão de GFAP (MAGNUS e col., 2007). A outra hipótese para a translocação de OLIG-2 do núcleo para o citoplasma está relacionada à lesão cerebral. MAGNUS e colaboradores (2007) estudaram um dos vários mecanismos

moleculares que regulam a diferenciação de células precursoras após a lesão cerebral aguda. Esses pesquisadores encontraram evidências da translocação do fator de transcrição OLIG-2 para o citoplasma na primeira semana após a lesão e essa translocação se mantinha por meses. A translocação núcleo-citoplasma e subsequente diferenciação astrocítica contribui para a resposta astrogliol. Esse fenômeno é observado especificamente nas áreas próximas à lesão ou *in vitro* após exposição ao soro. Esses estímulos conduzem a regulação para baixo de marcadores de células progenitoras, como a translocação de OLIG-2 e a aquisição de imunorreatividade para GFAP. Assim, parece que a translocação núcleo-citoplasma de OLIG-2 medeia a diferenciação, induzida pela lesão aguda no cérebro, de precursores gliais a astrócitos. Confirmando essa hipótese, ZHAO e colaboradores (2009) encontraram que a translocação de OLIG-2 está confinada a regiões cerebrais envolvidas ou afetadas por processos patológicos, ou seja, que a translocação citoplasmática de OLIG-2 está associada com a injúria e ocorre em astrócitos em proliferação. Células Olig-2⁺ reagem a uma grande variedade de condições patológicas, como acidente vascular cerebral, lesão por objeto perfuro-cortante ou desmielinização induzida quimicamente, aumentando em número, migração, e possivelmente se diferenciando em um fenótipo mais maduro (CASSIANI-INGONI e col., 2006). Após a injúria, a conversão de células progenitoras OLIG-2⁺ a astrócitos reativos envolveria a translocação de OLIG-2 do núcleo para o citoplasma. A diferenciação astrocitária durante a resposta à injúria se constitui em um mecanismo protetor, uma vez que astrócitos quando comparados a oligodendrócitos têm um potencial neuroprotetor maior. No cérebro intacto ou não lesionado a expressão de OLIG-2 estaria confinada no núcleo.

ESP12 evidenciou a presença de marcadores para fenótipo mesenquimal, pró-neural e proliferativo através de imunocitoquímica. No intuito de quantificar a positividade desses marcadores e estabelecer um fenótipo mais definido para essa linhagem foi realizada a investigação dessas proteínas por citometria de fluxo. Os resultados mostraram ESP12 como uma linhagem com características de fenótipo proliferativo. O padrão de alterações genéticas que distingue esse subtipo é caracterizado por ampliações ou mutações frequentes no gene do receptor do fator de crescimento epidérmico, por expressar genes de células tronco hematopoiéticas, entre outras alterações genéticas (HUSE e HOLLAND, 2010; HUSE, HOLLAND e DE ANGELIS, 2013). Além disso, o PCNA, assim como a topoisomerase II- α , ambos marcadores de proliferação, são superexpressos nesse fenótipo quando comparados com os fenótipos mesenquimal e pró-neural (PHILLIPS e col., 2006).

Embora pacientes com esse fenótipo se beneficiem particularmente de tratamento quimioterápico combinado a radioterapia, o prognóstico ainda é pior. Questiona-se, então, se culturas primárias e linhagens estabelecidas são representativas do tumor *in situ*, principalmente em relação à “assinatura” molecular. Isso porque quando células tumorais são cultivadas, alterações são inevitavelmente induzidas devido às condições artificiais de crescimento. Assim, a heterogeneidade dos tumores e as incertezas que rodeiam culturas primárias de células e linhagens estabelecidas desafiam a extrapolação *in vitro* para comparações *in vivo*. Sob esse aspecto, POTTER e colaboradores (2009) afirmam que culturas primárias derivadas de astrocitoma retém a “assinatura” molecular do tumor *in situ*.

Prosseguimos a caracterização de ESP12 avaliando um dos aspectos relacionados à quimiorresistência – a presença de células CD133⁺. No nosso estudo, menos de 1 % da população de células foram CD133⁺. BALIK e colaboradores (2009) analisaram a presença de células CD133⁺ em 11 amostras de cultura primária de GBM. O percentual de positividade variou entre 0,6 – 2,6 %. GARCIA e colaboradores (2010) encontraram uma variação maior de positividade (0,1 - 3,2 %), porém analisando o tecido fresco e não cultura primária de GBM. WANG e colaboradores (2008), por sua vez, analisando o fenótipo CD133⁺, também em cultura primária de GBM, encontraram 1,3 % das células marcadas. Esses valores estão de acordo com o observado na literatura, onde se sabe que apenas um pequeno percentual de células da massa tumoral é capaz de proliferar e formar novos tumores quando enxertado em animais imunodeficientes (DE SOUZA, 2006; PÉREZ CASTILLO e col., 2009).

Dando continuidade à caracterização de ESP12, investigamos a positividade para proteínas MRP1 e Pgp, que constituem, entre outras, o fenótipo MDR. Ambas as proteínas foram detectadas em ESP12, sendo que a Pgp apresentou maior positividade do que a MRP1. Resultado oposto foi obtido por GARRIDO e colaboradores (2011), utilizando cultura primária de GBM e avaliando a expressão dessas proteínas, por *western-blotting*. Já PEIGÑAN e colaboradores (2011) encontraram a presença de Pgp e MRP1 em cultura primária de GBM, usando *western-blotting*. PEREGO e colaboradores (1994) também encontraram positividade para Pgp em células de GBM obtidas de cultura primária. Já DECLÉVES e colaboradores (2002), agora utilizando linhagens (GL-15 e U87) não encontraram expressão de Pgp, através da investigação por *western-blotting*. A ausência ou fraca expressão dessa proteína nos estudos parece estar relacionada às técnicas empregadas para detecção (o que não foi o nosso caso) ou ainda a superexpressão de outras proteínas da

família ABC, como as MRPs. A superexpressão de MRP1 está associada com a quimiorresistência intrínseca em células de GBM (GARRIDO e col., 2011). Em relação à proteína MRP1, ESP12 mostrou uma menor positividade quando comparada à linhagem U251. YOUNG-HWA e colaboradores (2005), por sua vez, utilizando RT-PCR, não encontraram expressão de MRP1 em células da linhagem U251. Embora a presença do fenótipo MDR seja considerada um fator prognóstico negativo (PEIGÑAN e col., 2011), esses achados levantam a questão de quais os substratos para essas proteínas e de quais estratégias poderiam ser adotadas para tornar a quimioterapia mais efetiva.

Um dos fatores que tornam o GBM extremamente agressivo é a capacidade que esse tumor tem de formar novos vasos. Esse aspecto foi investigado na cultura de células de ESP12 e comparado com outras linhagens de GBM. A produção de VEGF foi o aspecto investigado correlacionado com a angiogênese. Embora não tenha havido diferença estatística entre a produção de VEGF entre ESP12 e as outras linhagens, devido ao teste ser realizado com *n* de três experimentos, quando dividimos, por exemplo, a mediana da produção de VEGF por ESP12 (1788 pg/ml) pela mediana de produção de VEGF por ESP13 (300 pg/ml) encontramos um aumento na produção de VEGF em ESP12 em torno de 596 % ou seja, quase 6 vezes maior. Assim, parece que o grau de malignidade também está relacionado com a produção de VEGF, uma vez que ESP12 é um GBM e ESP13, um astrocitoma anaplásico. Em relação a isso, LAMSZUS e colaboradores (2003) correlacionaram os níveis do receptor 1 do VEGF em tumores astrocíticos com o grau de malignidade. O nível do receptor 1 do VEGF foi 12 vezes maior nos GBMs do que nos astrocitomas difusos e astrocitomas anaplásicos. MADERNA e colaboradores (2007), por sua vez, encontraram 61 % de expressão de VEGF em GBMs, enquanto que esse percentual caiu para 12 % nos astrocitomas anaplásicos. Recentemente, MAIURI e colaboradores (2010) avaliaram a correlação entre a expressão de vários fatores de crescimento, incluindo VEGF, com a graduação tumoral. A expressão de todos os fatores de crescimento, exceto TGF β 1, TGF β R1 e tenascina, correlacionou-se com a graduação em todos os tumores, tanto os de origem astrogliar quanto os oligodendrogliais.

Outros trabalhos disponíveis na literatura verificam a modulação da expressão de VEGF com possíveis drogas que podem vir a serem usadas em terapia antiangiogênica. BLÁZQUEZ e colaboradores (2004) observaram que a exposição a um canabinoide sintético atenuou a produção de VEGF por células U373 e em células de cultura primária de GBM. A exposição de células GL-15 ao flavonoide rutina reduziu a produção de VEGF (FREITAS e col., 2011). GOLDMAN e colaboradores (1993), por sua vez,

observaram um aumento na produção de VEGF por células U251 cultivadas com diferentes concentrações de soro fetal bovino. Outros estudos relacionam a expressão de marcadores de angiogênese, como VEGF, com o subtipo tumoral. Por exemplo, PHILLIPS e colaboradores (2006) mostraram que tumores mesenquimais superexpressam esses marcadores de angiogênese.

Prosseguimos a caracterização de ESP12 com a avaliação do TDPC por entender que a cinética de crescimento é um importante dado que revela a agressividade do tumor. Além disso, a avaliação do TDPC permite determinar um esquema de repicagens da cultura e determinar o tempo de exposição às drogas teste. Nesse trabalho, verificou-se um crescimento exponencial entre 0 e 48 horas de incubação na maior parte das linhagens (ESP12, U251, ESP13 e C6), tendo o TDPC sido determinado nesse período. Isso revela um TDPC relativamente curto, podendo indicar uma adaptação perfeita das células às condições de cultura.

Em linhagens estabelecidas por outros pesquisadores, a G5A foi a que apresentou menor TDPC e a WJ1 o maior TDPC (Tabela 13). ESP12 com um TDPC de 30,9 h esteve próximo à média (37,03 h) dos TDPC avaliados por esses pesquisadores (Tabela 13). Ainda, ESP12 apresentou um TDPC menor que ESP13, o que sugere que à medida que se aumenta a graduação tumoral o TDPC diminui, ou ainda, que o TDPC pode estar relacionado com a graduação tumoral e a sobrevida (FURNEAUX e col., 2008). U87 foi a linhagem que apresentou maior TDPC (74,37 h) próximo ao TDPC encontrado para a linhagem LN-18 (72 h) estabelecida por DISERENS e colaboradores (1981).

Tabela 13. Tempo de duplicação celular (TDPC), em horas (h), de diferentes linhagens estabelecidas a partir de GBM.

Linhagem	TDPC (h)	Referência
G5A	22,9	NAKAMURA e col., 1984
GBM8401/TSGH	38	LEE e col., 1988
DBTRG-05MG	34-41	KRUSE e col., 1992
MGM-1	42,9	MORIYAMA e col., 1997
GATAGM-96	38-42	BAKIR e col., 1998
8-MG-BA	20-24	PERZELOVÁ e col., 1998
42-MG-BA	48-54	PERZELOVÁ e col., 1998
NYGM	24	NUKI e col., 2004
HUBT-n	32	ISHIWATA e col., 2005
WJ1	60	WANG e col., 2007

A caracterização de ESP12 prosseguiu com a investigação de um teste *in vitro* para avaliar a quimiorresistência. GIL-SALÚ e colaboradores (2008) avaliaram a quimiorresistência, também usando MTT, em 7 amostras de GBM, tratadas com cinco diferentes quimioterápicos. Esses autores, assim como SARGENT (2003) concluem que o ensaio com MTT é um método válido para mensurar a quimiorresistência *in vitro*. ESP12 mostrou-se mais sensível que a linhagem C6 e U251, e mais resistente que a linhagem U87, quando exposta à TMZ. De toda maneira, ESP12, C6 e U251 se mostraram resistentes ao tratamento com TMZ, nas concentrações avaliadas. A MGMT é uma enzima chave para determinar a sensibilidade à TMZ (NISHIKAWA, 2010). Talvez ESP12 mantenha conservada a ação dessa enzima (dados não investigados). Em relação a isso, FRUEHAUF e colaboradores (2006) afirmam que a resistência a agentes como a TMZ pode não estar associada com a graduação tumoral ou terapias prévias, sugerindo que mecanismos de resistência intrínsecos expressos ao tempo do diagnóstico (como a ação da MGMT) podem ser os maiores contribuintes para a falência no tratamento. TASPINAR e colaboradores (2013), entretanto, não encontraram essa resistência em cultura de células primárias de GBM tratadas com TMZ nas mesmas concentrações usadas em nosso trabalho. Já a quimiorresistência apresentada pela linhagem U251 à TMZ parece envolver, entre outros aspectos, esse aumento na atividade da MGMT (PAN e col., 2012). A linhagem U87 foi a única em que se obteve uma IC_{50} quando exposta à TMZ. A maior sensibilidade da U87 à TMZ parece também estar associada aos baixos níveis de MGMT (KANZAWA e col., 2003). Nesse mesmo estudo conduzido por KANZAWA e colaboradores (2003) em tratamento com TMZ por 48 h a IC_{50} obtida foi de 100 μ M, enquanto em nosso estudo essa linhagem tratada durante 72 h com TMZ apresentou uma IC_{50} mediana de 129 μ M. TASPINAR e colaboradores (2013), por sua vez, encontraram uma IC_{50} de 100 μ M nas células U87 tratadas com TMZ, durante 72 h.

Embora tenha sido resistente a ação da TMZ, ESP12 mostrou-se mais sensível em relação à exposição a BCNU, enquanto que a linhagem C6 foi a mais resistente. SHAPIRO e colaboradores (1993) através de análise citogenética de 16 GBMs observaram que a BCNU é mais eficaz em células hiperdiploides (que têm grandes alterações de ploidia e rearranjo cromossômico), enquanto que a resistência a essa droga é característica de populações quase diploides (com algumas mudanças de ploidia e cromossomos reorganizados). Talvez ESP12 traga essa característica de hiperdiploidia. Já a resistência das

células C6 a BCNU pode ser devida a maior expressão de genes relacionados a MDR1 e MGMT por essas células (ZHENG e col., 2009). Outra hipótese proposta por YANG, YIN e YANG (2007) é que a superexpressão da óxido nítrico sintase induzível, com resultante formação de *S*-nitrosoglutation, assim como a indução do fator induzido pela hipóxia em células C6 de glioma de rato poderiam aumentar a resistência dessas células ao tratamento com BCNU.

Em relação à exposição à VIM, ESP12 se mostrou mais sensível do que as linhagens já estabelecidas. Em relação à resistência em linhagens estabelecidas, BARTH e colaboradores (2010) estudaram o papel da glicosilceramida-sintase na quimiorresistência em uma linhagem estabelecida, U87. Para esses autores, muitos agentes quimioterápicos, incluindo alcaloides da vinca, estimulam a acumulação de ceramida. O acúmulo de ceramida induz estresse oxidativo através de indução de disfunção mitocondrial e estimulação da atividade de NADPH oxidase. Ambos os mecanismos estão implicados na morte celular. A glicosilceramida sintase inibe a atividade da NADPH oxidase e com isso reduz ou inibe o estresse oxidativo contribuindo para a quimiorresistência. Dessa forma, o aumento na atividade da glicosilceramida sintase e o produto de sua atividade – a glicosilceramida – representam um importante mecanismo de quimiorresistência em GBM. Segundo esses autores, algumas linhagens que são resistentes a VIM acumulam glicosilceramida, sugerindo que a atividade da glicosilceramida-sintase esteja alta nessas células. Além disso, os alcaloides da vinca têm baixa penetração através da barreira hematoencefálica, entre outros fatores, por serem substratos para ATPases de efluxo como a Pgp (TSUJI, 1998).

Vários estudos mostram haver heterogeneidade de resposta à exposição às drogas, entre diferentes linhagens *in vitro* (YUNG, SHAPIRO e SHAPIRO, 1982; KIMMEL, SHAPIRO e SHAPIRO, 1987; ZUPI e col., 1988). Por fim, ficou evidente o estabelecimento de um modelo *in vitro* para avaliar a quimiorresistência em células de GBM, assim como já desenvolvido em outros tipos celulares (BRIGULOVÁ e col., 2010).

Após o estabelecimento de um modelo *in vitro* para avaliar a quimiorresistência e caracterização parcial de uma linhagem obtida de cultura primária, decidimos então usar o modelo estabelecido para investigar a atividade quimiossensibilizante do 8-MOP. Isso porque estudos prévios em nossa equipe mostraram atividade antitumoral dessa substância em células GL-15 de GBM. Perguntamos se essa atividade poderia ser reproduzida usando agora células obtidas de cultura primária. Além disso, essa investigação contribuiria para o uso dessa metodologia para a prospecção de outros agentes

quimiossensibilizantes. O 8-MOP (5 μM e 50 μM) sensibilizou as células tratadas com TMZ a 300 μM e a 300 μM e 600 μM respectivamente. Parece que ao tratarmos as células com 8-MOP a 50 μM há um efeito mais abrangente no aumento da quimiossensibilidade à TMZ, de forma significativa. Em relação a isso, algumas furanocumarinas são capazes de inibir competitivamente a ligação e o efluxo de drogas pela Pgp (BARTHOMEUF e col., 2005) e inibir GST e suas isoformas (DE OLIVEIRA, 2012).

Embora não possamos afirmar qual o mecanismo dessa quimiossensibilidade nesse estudo, fica clara a importância desse modelo para a bioprospecção de novos agentes antitumorais. Nesse sentido, vários estudos têm sido realizados em diversos tipos celulares, com o objetivo de estabelecer culturas primárias *in vitro*, triar novos agentes terapêuticos e avaliar a quimiossensibilidade (KRATZKE e KRAMER, 1996; NEWTON, 2000; BAGRIACIK e col., 2012; MAZUR e col., 2012). Fica evidente também a necessidade de comparação com outras técnicas ou protocolos e estudos de acompanhamento *in vivo* a fim de comprovar e/ou validar a eficácia desse modelo em reproduzir achados *in vitro* para a realidade *in vivo*. Isso significa que o valor preditivo de resposta desses testes necessita ser melhor elucidado.

8 CONCLUSÕES

O presente trabalho verificou que:

1. A idade média dos pacientes foi 52,6, sendo a incidência de casos de GBM maior no sexo masculino. Os sintomas clínicos mais preponderantes foram cefaleia e convulsões. As características clínicas dos casos corresponderam aos achados na literatura.
2. A lesão em ESP12 apresentou em RM os aspectos característicos descritos na literatura: oval, infiltrante, com contornos mal definidos, podendo haver edema vasogênico e necrose.
3. Os achados histopatológicos dos casos corresponderam aos graus de malignidade.
4. A análise da sobrevida revelou que a mediana de sobrevida obtida está de acordo com a maior parte dos trabalhos científicos, ou seja, próximo aos 12 meses, para pacientes com astrocitoma grau IV.
5. A imunofenotipagem por imunohistoquímica mostrou que as proteínas investigadas estão presentes confirmando a origem glial dos tumores, revelando o caráter proliferativo de alguns casos e confirmando a presença de componente oligodendroglial em outros.
6. A análise morfológica das células obtidas da cultura primárias de cada caso revelou heterogeneidade morfológica nas primeiras passagens com posterior assunção de morfologia fusiforme.
7. Caracterização de ESP12
 - 7.1 A marcação do PCNA e de OLIG-2 foi observada por imunohistoquímica em ESP 12.
 - 7.2 A marcação do PCNA, OLIG-2 e Gp-39 também foi observada por imunocitoquímica.
 - 7.3 As células obtidas de ESP12 apresentaram um fenótipo eminentemente proliferativo determinado quantitativamente por citometria de fluxo.
 - 7.4 A subpopulação de CSC nessa linhagem representa menos de 1 %.
 - 7.5 A Pgp está presente nessa linhagem em torno de 22,8-54,3 %, contribuindo para o fenótipo MDR.
 - 7.6 ESP12 produz VEGF assim como as outras linhagens já estabelecidas.
 - 7.7 Comparada com linhagens estabelecidas, ESP12 foi a que apresentou o menor TDPC, duplicando sua população celular em 30,97 horas.
 - 7.8 ESP12 se mostrou mais sensível aos agentes antitumorais estudados quando comparada às outras linhagens estabelecidas. Isoladamente se mostrou resistente apenas à TMZ;
 - 7.9 Usamos ESP12 como um modelo para avaliar a atividade quimiossensibilizante do 8-MOP. Este último mostrou atividade quimiossensibilizante significativa.

O conjunto desses resultados permitiu o desenvolvimento de um teste *in vitro* para avaliar a quimiorresistência em células de GBM, o desenvolvimento de um modelo *in vitro* para subtipar células de GBM e caracterizou uma nova linhagem ESP12 que pode ser usada em estudos para bioprospecção de novos agentes antitumorais e em cancerologia experimental.

9 REFERÊNCIAS

ABE, T.; MORI, T.; WAKABAYASHI, Y.; NAKAGAWA, M.; COLE, S.P.; KOIKE, K.; KUWANO, M.; HORI, S. Expression of multidrug resistance protein gene in patients with glioma after chemotherapy. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 40, p. 11-18, 1998.

AGARWALA, S.S. e KIRKWOOD, J.M. Temozolomide, a novel alkylating agent with activity in the central nervous system, may improve the treatment of advanced metastatic melanoma. **The Oncologist**, v. 5, p. 144-151, 2000.

AGUIRRE-CRUZ, L.; MOKHTARI, K.; HOANG-XUAN, K.; MARIE, Y.; CRINIÈRE, E.; TAILLIBERT, S.; LOPES, M.; DELATTRE, J-Y.; SANSON, M. Analysis of the bHLH transcription factors Olig1 and Olig2 in brain tumors. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 67, p. 265–271, 2004.

ALELÚ-PAZ, R.; ASHOUR, N.; GONZÁLEZ-CORPAS, A.; ROPERO, S. DNA methylation, histone modifications, and signal transduction pathways: a close relationship in malignant gliomas pathophysiology. **Journal of Signal Transduction**, doi: 10.1155/2012/956958, 2012.

ALEXANIAN, A.R.; MAIMAN, D.J.; KURPAD, S.N.; GENNARELLI, T.A. *In vitro* and *in vivo* characterization of neurally modified mesenchymal stem cells induced by epigenetic modifiers and neural stem cell environment. **Stem cells and Development**, v. 17, p. 1123-1130, 2008.

ALKIZA, K.; ADÁN, B.; GARIBI, J.M.; LAFUENTE, J.V. The evaluation of cell proliferation in gliomas. **Revista de Neurologia**, v. 30, p. 141-146, 2000.

ALLEGGRANZA, A.; GIRLANDO, S.; ARRIGONI, G.L.; VERONESE, S.; MAURI, F.A.; GAMBACORTA, M.; POLLO, B.; DALLA PALMA, P.; BARBARESCHI, M. Proliferating cell nuclear antigen expression in central nervous system neoplasms. **Virchows Archive A: Pathological Anatomy and Histology**, v. 419, p. 417-423, 1991.

ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A.; REINA L.C.B.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo celular não-específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, p. 118-129, 2005.

ALVES, E.A.; GUIMARÃES, A.C.R.; **Cultivo celular**. In: MOLINARO, E.M.; CAPUTO, L.F.G.; AMENDOEIRA, M.R.R.(Org). Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde, Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, v. 2, cap. 5, p.216-253, 2010.

APPIN, C.L.; GAO, J.; CHISOLM, C.; TORIAN, M.; ALEXIS, D.; VINCENTELLI, C.; SCHNIEDERJAN, M.J.; HADJIPANAYIS, C.; OLSON, J.J.; HUNTER, S.; HAO, C.; BRAT, D.J. Glioblastoma with oligodendroglioma component (GBM-O): molecular genetic and clinical characteristics. **Brain Pathology**, doi: 10.1111/bpa.12018, 2013.

BAGRIACIK, E.U.; BAYKANER, M.K.; YAMAN, M.; SIVRIKAYA, G.; DURDAĞ, E.; EMMEZ, H.; FINCAN, G.Ö.; BÖRCEK, A.Ö.; SEÇEN, A.E.; ERCAN, S. Establishment of a primary pleomorphic xanthoastrocytoma cell line: *in vitro* responsiveness to some chemotherapeutics. **Neurosurgery**, v. 70, p. 188-197, 2012.

BAKIR, A.; GEZEN, F.; YILDIZ, O.; AYHAN, A.; KAHRAMAN, S.; KRUSE, C.A.; VARELLA-GARCIA, M.; YILDIZ, F.; KUBAR, A. Establishment and characterization of a human glioblastoma multiforme cell line. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 103, p. 46-51, 1998.

BALIK, V.; MIROSSAY, P.; PETER, B.; SULLA, I.; MIROSSAY, L.; SARISSKY, M. Flow cytometry analysis of neural differentiation markers expression in human glioblastomas may predict their response to chemotherapy. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 29, p. 845-858, 2009.

BAO, S.; WU, Q.; MCLENDON, R.E.; HAO, Y.; SHI, Q.; HJELMELAND, A.B.; DEWHIRST, M.W.; BIGNER, D.D.; RICH, J.N. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. **Nature**, v. 444, p. 756-760, 2006a.

BAO, S.; WU, Q.; SATHORNSUMETEE, S.; HAO, Y.; LI, Z.; HJELMELAND, A.B.; SHI, Q.; MCLENDON, R.E.; BIGNER, D.D.; RICH, J.N. Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor. **Cancer Research**, v. 66, p. 7843-7848, 2006b.

BAO, B.; ALI, S.; AHMAD, A.; AZMI, A.S.; LI, Y.; BANERJEE, S.; KONG, D.; SETHI, S.; ABOUKAMEEL, A.; PADHYE, S.B.; SARKAR, F.H. Hypoxia-induced aggressiveness of pancreatic cancer cells is due to increased expression of VEGF, IL-6 and miR-21, which can be attenuated by CDF treatment. **Public Library of Science One**, v. 7, e50165. doi: 10.1371/journal.pone.0050165, 2012.

BARBUS, S.; TEWS, B.; KARRA, D.; HAHN, M.; RADLWIMMER, B.; DELHOMME, N.; HARTMANN, C.; FELSBERG, J.; KREX, D.; SCHACKERT, G.; MARTINEZ, R.; REIFENBERGER, G.; LICHTER, P. Differential retinoic acid signaling in tumors of long- and short-term glioblastoma survivors. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 103, p. 598-606, 2011.

BARTH, B.M.; GUSTAFSON, S.J.; YOUNG, M.M.; FOX, T.E.; SHANMUGAVELANDY, S.S.; KAISER, J.M.; CABOT, M.C.; KESTER, M.; KUHN, T.B. Inhibition of NADPH oxidase by glucosylceramide confers chemoresistance. **Cancer Biology & Therapy**, v. 10, p. 1126-1136, 2010.

BARTHOMEUF, C.; GRASSI, J.; DEMEULE, M.; FOURNIER, C.; BOIVIN, D.; BÉLIVEAU, R. Inhibition of P-glycoprotein transport function and reversion of MDR1 multidrug resistance by cnidiadin. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 56, p. 173-181, 2005.

BEIER, D.; SCHULZ, J.B.; BEIER, C.P. Chemoresistance of glioblastoma cancer stem cells - much more complex than expected. **Molecular Cancer**, v. 10, p. 128-139, 2011.

BINDA, E.; VISIOLI, A.; REYNOLDS, B.; VESCOVI, A.L. Heterogeneity of cancer-initiating cells within glioblastoma. **Frontiers in Bioscience**, v. 4, p. 1235-1248, 2012.

BLÁZQUEZ, C.; GONZÁLEZ-FERIA, L.; ÁLVAREZ, L.; HARO, A.; CASANOVA, M.L.; GUZMÁN, M. Cannabinoids inhibit the vascular endothelial growth factor pathway in gliomas. **Cancer Research**, v. 64, p. 5617-5623, 2004.

BOCCHINI, V.; CASALONE, R.; COLLINI, P.; REBEL, G.; LO CURTO, F. Changes in glial fibrillary acidic protein and karyotype during culturing of two cell lines established from human glioblastoma multiforme. **Cell and Tissue Research**, v. 265, p. 73-81, 1991.

BOCCHINI, V.; BECCARI, T.; ARCURI, C.; BRUYERE, L.; FAGES, C.; TARDY, M. Glial fibrillary acidic protein and its encoding mRNA exhibit mosaic expression in a glioblastoma multiform cell line of clonal origin. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 11, p. 485-492, 1993.

BOCK, T.; MOEST, H.; OMASITS, U.; DOLSKI, S.; LUNDBERG, E.; FREI, A.; HOFMANN, A.; BAUSCH-FLUCK, D.; JACOBS, A.; KRAYENBUEHL, N.; UHLEN, M.; AEBERSOLD, R.; FREI, K.; WOLLSCHIED, B. Proteomic analysis reveals drug accessible cell surface N-glycoproteins of primary and established glioblastoma cell lines. **Journal of Proteome Research**, v. 11, p. 4885-4893, 2012.

BOHNEN, N.I. e KURLAND, L.T. Brain tumor and exposure to pesticides in humans: a review of the epidemiologic data. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 132, p. 110-121, 1995.

BONGCAM-RUDLOFF, E.; NISTÉR, M.; BETSHOLTZ, C.; WANG, J.L.; STENMAN, G.; HUEBNER, K.; CROCE, C.M.; WESTERMARK, B. Human glial fibrillary acidic protein: complementary DNA cloning, chromosome localization, and messenger RNA expression in human glioma cell lines of various phenotypes. **Cancer Research**, v. 51, p. 1553-1560, 1991.

BOOKBINDER, M. e MCHUGH, M.E. Symptom management in palliative care and end of life care. **Nursing Clinics of North America**, v. 45, p. 271-327, 2010.

BRAGA, J.L. Astrocitoma anaplásico. **Revista Científica do Hospital Central do Exército**, ANO III, nº2, p. 82-90, 2008.

BRANDES, A.A.; FRANCESCHI, E.; TOSONI, A.; BLATT, V.; PESSION, A.; TALLINI, G.; BERTORELLE, R.; BARTOLINI, S.; CALBUCCI, F.; ANDREOLI, A.; FREZZA, G.; LEONARDI, M.; SPAGNOLLI, F.; ERMANI, M. MGMT promoter methylation status can predict the incidence and outcome of pseudoprogression after concomitant radiochemotherapy in newly diagnosed glioblastoma patients. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, p. 2192 – 2197, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **A situação do câncer no Brasil/Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Instituto Nacional de Câncer, Coordenação de Prevenção e Vigilância**. Rio de Janeiro: INCA, 2006.

BRAT, D.J.; SHEHATA, B.M.; CASTELLANO-SANCHEZ, A.A.; HAWKINS, C.; YOST, R.B.; GRECO, C.; MAZEWSKI, C.; JANSS, A.; OHGAKI H & PERRY A. Congenital glioblastoma: a clinicopathologic and genetic analysis. **Brain Pathology**, v. 17, p. 276-281, 2007.

BREDEL, M. e ZENTNER, J. Brain-tumour drug resistance: the bare essentials. **The Lancet Oncology**, v. 3, p. 397–406, 2002.

BREHAR, F.M.; BLEOTU, C.; STEFAN, L.M.; BUZGARIU, W.; CHIVU, M.; UTOIU, E.; MATEI, L.; CIUREA, A.V.; TASCU, A. Isolation and partial characterization of a new human glioblastoma cell line. **Chirurgia**, v. 104, p. 453-461, 2009.

BREM, S.; ROZENTAL, J.M.; MOSKAL, J.R. What is the etiology of human brain tumors? A report on the first Lebow conference. **Cancer**, v. 76, p. 709-713, 1995.

BRENNAN, C.; MOMOTA, H.; HAMBARDZUMYAN, D.; OZAWA, T.; TANDON, A.; PEDRAZA, A.; HOLLAND, E. Glioblastoma subclasses can be defined by activity among

signal transduction pathways and associated genomic alterations. **Public Library of Science**, v. 4, e.7752, 2009.

BRIGULOVÁ, K.; CERVINKA, M.; TOŠNER, J.; SEDLÁKOVÁ, I. Chemoresistance testing of human ovarian cancer cells and its *in vitro* model. **Toxicology in Vitro**, v. 24, p. 2108-2115, 2010.

BRONGER, H.; KONIG, J.; KOPFLOW, K.; STEINER, H.H.; AHMADI, R.; HEROLD-MENDE, C.; KEPPLER, D.; NIES, A.T. ABCC drug efflux pumps and organic anion uptake transporters in human gliomas and the blood-tumor barrier. **Cancer Research**, v. 65, p. 11419-11428, 2005.

BROWN, E. e MARKMAN, M. Tumor chemosensitivity and chemoresistance assays. **Cancer**, v. 77, p. 1020–1025, 1996.

BURGER, P.C.; RAWLINGS, C.E.; COX, E.B.; MCLENDON, R.E.; SCHOLD, S.C. JR.; BULLARD, D.E. Clinicopathologic correlations in the oligodendroglioma. **Cancer**, v. 59, p. 1345-1352, 1987.

CALATOZZOLO, C.; GELATI, M.; CIUSANI, E.; SCIACCA, F.L.; POLLO, B.; CAJOLA, L.; MARRAS, C.; SILVANI, A.; VITELLARO-ZUCCARELLO, L.; CROCI, D.; BOIARDI, A.; SALMAGGI, A. Expression of drug resistance proteins Pgp, MRP1, MRP3, MRP5 and GST-pi in human glioma. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 74, p. 113-121, 2005.

CALOGLU, M.; YURUT-CALOGLU, V.; KARAGOL, H.; BAYIR-ANGIN, G.; TURAN, F.N.; UZAL, C. Prognostic factors other than the performance status and age for glioblastoma multiforme: a single-institution experience. **Journal of Balkan Union of Oncology**, v. 14, p. 211-218, 2009.

CAMPBELL, S.L.; BUCKINGHAM, S.C. e SONTHEIMER, H. Human glioma cells induce hyperexcitability in cortical networks. **Epilepsia**, v. 53, p. 1360–1370, 2012.

CARRO, M.S.; LIM, W.K.; ALVAREZ, M.J.; BOLLO, R.J.; ZHAO, X.; SNYDER, E.Y.; SULMAN, E.P.; ANNE, S.L.; DOETSCH, F.; COLMAN, H.; LASORELLA, A.; ALDAPE,

K.; CALIFANO, A.; IAVARONE, A. The transcriptional network for mesenchymal transformation of brain tumours. **Nature**, v. 463, p. 318–325, 2010.

CASSIANI-INGONI, R.; COKSAYGAN, T.; XUE, H.; REICHERT-SCRIVNER, S.A.; WIENDL, H.; RAO, M.S.; MAGNUS, T. Cytoplasmic translocation of Olig2 in adult glial progenitors marks the generation of reactive astrocytes following autoimmune inflammation. **Experimental Neurology**, v. 201, p. 349-358, 2006.

CBTRUS. Central Brain Tumor Registry of the United States. **Statistical report: primary brain tumours in the United States (1997-2001)**. Chicago: Central Brain Tumor Registry of the United States, p. 15-18, 2004

CHANDANA, S.R.; MOVVA, S.; ARORA, M.; SINGH, T. Primary brain tumors in adults. **American Family Physician**, v. 77, p. 1423-1430, 2008.

CHEN, L.; BURGER, R.A.; ZAUNBRECHER, G.M.; CHENG, H.; LINCOLN, A.J.; MALLARINO, M.C.; MONK, B.J.; KHAN, S.A. Protein kinase C isoform expression and activity alter paclitaxel resistance *in vitro*. **Gynecologic Oncology**, v. 72, p. 171–179, 1999.

CHEN, W. e SILVERMAN, D.H. Advances in evaluation of primary brain tumors. **Seminars in Nuclear Medicine**, v. 38, p. 240-250, 2008.

CHEN, R.; NISHIMURA, M.C.; BUMBACA, S.M.; KHARBANDA, S.; FORREST, W.F.; KASMAN, I.M.; GREVE, J.M.; SORIANO, R.H.; GILMOUR, L.L.; RIVERS, C.S.; MODRUSAN, Z.; NACU, S.; GUERRERO, S.; EDGAR, K.A.; WALLIN, J.J.; LAMSZUS, K.; WESTPHAL, M.; HEIM, S.; JAMES, C.D.; VANDENBERG, S.R.; COSTELLO, J.F.; MOOREFIELD, S.; COWDREY, C.J.; PRADOS, M.; PHILLIPS, H.S. A hierarchy of self-renewing tumor-initiating cell types in glioblastoma. **Cancer Cell**, v. 17, p. 362-375, 2010.

CHIARUGI, A. A snapshot of chemoresistance to PARP inhibitors. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 33, p. 42-48, 2012.

CHOE, G.; HORVATH, S.; CLOUGHESY, T.F.; CROSBY, K.; SELIGSON, D.; PALOTIE, A.; INGE, L.; SMITH, B.L.; SAWYERS, C.L.; MISCHER, P.S. Analysis of the phosphatidylinositol 3'-kinase signaling pathway in glioblastoma patients *in vivo*. **Cancer Research**, v. 63, p. 2742–2746, 2003.

CHOU, C.-W.; WANG, C.-C.; WU, C.-P.; LIN, Y.-J.; LEE, Y.-C.; CHENG, Y.-W.; HSIEH, C.-H. Tumor cycling hypoxia induces chemoresistance in glioblastoma multiforme by upregulating the expression and function of ABCB1. **Neuro-Oncology**, v. 14, p. 1227-1238, 2012.

CHOWDHARY, S. e CHAMBERLAIN, M.C. Oligodendroglial tumors. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 4, p. 519-532, 2006.

CLARKE, J.; BUTOWSKI, N.; CHANG, S. Recent advances in therapy for glioblastoma. **Archives of Neurology**, v. 67, p. 279-283, 2010.

CLAVREUL, A.; ETCHEVERRY, A.; CHASSEVENT, A.; QUILLIEN, V.; AVRIL, T.; JOURDAN, M.-L.; MICHALAK, S.; FRANÇOIS, P.; CARRE, J.-C.; MOSSER, J.; THE GRAND OUEST GLIOMA PROJECT NETWORK, MENEI, P. Isolation of a new cell population in the glioblastoma microenvironment. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 106, p. 493–504, 2012.

COBBS, C.S. Evolving evidence implicates cytomegalovirus as a promoter of malignant glioma pathogenesis. **Herpesviridae**, p. 2-7, 2011.

COLLINS, V. P. Brain tumours: classification and genes. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 75, p. 2-11, 2004.

CRUZ, L.A.; GUECHEVA, T.N.; BONATO, D.; HENRIQUES, J.A.P. Relationships between chromatin remodeling and DNA damage repair induced by 8-methoxypsoralen and UVA in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, p. 1052-1059, 2012.

CURTA, J.C. **Efeito do óxido nítrico nos mecanismos envolvidos na resistência a daunorrubicina em células de linhagem de leucemia mielóide aguda humana.** Florianópolis: UFSC, 2010. 122 p. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

DA SILVA, L.L.; DONNICI, C.L.; LOPES, J.C.D.; GOULART, M.O.F.; DE ABREU, F.C.; DE PAULA, F.S.; BRAVO, C.E.S.; SANTORO, M.M.; DENADAI, A.M.L.; SANTOS, A. M.C.; MONTANARI, C.A. Investigação eletroquímica e calorimétrica da interação de novos agentes antitumorais biscatiônicos com DNA. **Química Nova**, v. 35, p. 1318-1324, 2012.

DAUMAS-DUPORT, C.; BEUVON, F.; VARLET, P.; FALLET-BIANCO, C. Gliomes: classifications de l'OMS et de l'Hôpital Sainte Anne. **Annales de Pathologie**, v. 20, p. 413-428, 2000.

DE ANGELIS, L.M. Anaplastic glioma: how to prognosticate outcome and choose a treatment strategy. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, p. 5861-5862, 2009.

DE ALMEIDA-LEITE, C.M. e ARANTES, R.M. Primary culture of glial cells from mouse sympathetic cervical ganglion: a valuable tool for studying glial cell biology. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 194, p. 81-86, 2010.

DE BARROS, Joana Maria **Astrocitomas difusos de baixo grau.** Porto: Universidade do Porto. 2011. 90p. Dissertação (Mestrado) – Mestrado Integrado em Medicina.

DE MAGALHÃES, J.P. How ageing processes influence cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, p. 357-365, 2013.

DE MELO, M.V. Reações de detoxicação no desenvolvimento de resistência a quimioterápicos antineoplásicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Cancerologia**, v. 14, p. 32, 1991.

DE MOURA, S.A.B.; CATÃO, M.H.; GERBI, M.; BELTRÃO, R.V.; de SALES, M.A.O.; DA COSTA, L.J. Marcadores biológicos no câncer de boca. **International Journal of Dentistry**, v. 1, p. 58-62, 2006.

DE OLIVEIRA, D.M. **Atividade quimiossensibilizante e antitumoral in vitro do 8-metoxipsoraleno, um novo inibidor da glutathione S-transferase- π** . Salvador: UFBA, 2012. 164p. Tese (Doutorado em Patologia Experimental) – Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.

DE SOUZA, T.L. A persistência dos cânceres e as células-tronco tumorais. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 52, p. 379-379, 2006.

DECLÉVES, X.; FAJAC, A.; LEHMANN-CHE, J.; TARDY, M.; MERCIER, C.; HURBAIN, I.; LAPLANCHE, J.-L.; BERNAUDIN, J.-F.; SCHERRMANN, J.-M. Molecular and functional mdr1-pgp and MRPs expression in human glioblastoma multiforme cell lines. **International Journal of Cancer**, v. 98, p. 173–180, 2002.

DEL GIGLIO, A.; O'BRIEN, S.; FORD, R.J.; MANNING, J.; SAYA, H.; KEATING, M.; JOHNSTON, D.; CHAMONE, D.F.; DEISSEROTH, A.B. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in chronic lymphocytic leukemia (CLL). **Leukemia and Lymphoma**, v. 10, p. 265-271, 1993.

DEL GIGLIO, A.; DRACH, J.; KORNBLAU, S.M.; PATEL, S.; NOVAES, M.; KHETAN, R.; SAWAYA, N.; DORLHIAC-LLCER, P.; CHAMONE, D.F.; ANDREEFF, M.; HESTER, J.; DEISSEROTH, A.B. Quantitative expression of proliferating cell nuclear antigen by western blot (PCNAWB) in peripheral blasts correlates with remission induction in patients with acute myelogenous leukemia. **Leukemia and Lymphoma**, v. 19, p. 235-241, 1995.

DI LLIO, C.; SACCHETTA, P.; DEL BOCCIO, G.D.; LA ROVERE, G.; FEDERICI, G. Glutathione peroxidase, glutathione S-transferase and glutathione reductase activity in normal and neoplastic human breast tissue. **Cancer Letters**, v. 29, p. 37-42, 1985.

DISERENS, A.C.; DE TRIBOLET, N.; MARTIN-ACHARD, A.; GAIDE, A.C.; SCHNEGG, J.F.; CARREL, S. Characterization of an established human malignant glioma cell line: LN-18. **Acta Neuropathologica**, v. 53, p. 21-8, 1981.

DONEV, K.; SCHEITHAUER, B.W.; RODRIGUEZ, F.J.; JENKINS, S. Expression of diagnostic neuronal markers and outcome in glioblastoma. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 36, p. 411–421, 2010.

DOS SANTOS, A.S.R. **Biodiversidade, bioprospecção, conhecimento tradicional e futuro da vida**. Em: < <http://www.ccuec.unicamp.br/revista/infotec/artigos/silveira.html>> Acesso em: 26 de abril de 2013.

DUARTE, M.B. e REGO, M.A.V. Comorbidade entre depressão e doenças clínicas em um ambulatório de geriatria. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, p. 691-700, 2007.

DZIURZYNSKI, K.; CHANG, S.M.; HEIMBERGER, A.B.; KALEJTA, R.F.; DALLAS, S. R.M.; SMIT, M.; SOROCEANU, L.; COBBS, C.S. Consensus on the role of human cytomegalovirus in glioblastoma. **Neuro-Oncology**, v. 14, p. 246–255, 2012.

EBERLIN, L.S.; NORTON, I.; DILL, A.L.; GOLBY, A.J.; LIGON, K.L.; SANTAGATA, S.; COOKS, R.G.; AGAR, N.Y. Classifying human brain tumors by lipid imaging with mass spectrometry. **Cancer Research**, v. 72, p. 645-654, 2012.

ERMOIAN, R.P.; FURNISS, C.S.; LAMBORN, K.R.; BASILA, D.; BERGER, M.S.; GOTTSCHALK, A.R.; NICHOLAS, M.K.; STOKOE, D.; HAAS-KOGAN, D.A. Dysregulation of PTEN and protein kinase B is associated with glioma histology and patient survival. **Clinical Cancer Research**, v. 8, p. 1100–1106, 2002.

EYÜPOGLU, I.Y.; BUCHFELDER, M. e SAVASKAN, N.E. Surgical resection of malignant gliomas - role in optimizing patient outcome. **Nature Reviews Neurology**, v. 9, p. 141-151, 2013.

FARIA, M.H.G.; DO PATROCÍNIO, R.M.S.V. e RABENHORST, S.H.B. Estratégias auxiliares para graduação dos tumores astrocíticos segundo os critérios histopatológicos estabelecidos pela OMS. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, p. 401-410, 2006.

FERGUSON, S. e LESNIAK, M.S. Percival Bailey and the classification of brain tumors. **Neurosurgical Focus**, v. 18, p. e7, 2005.

FERNANDES, J.; CASTILHO, R.O.; DA COSTA, M.R.; WAGNER-SOUZA, K.; KAPLAN, M.A.C.; GATTASS, C.R. Pentacyclic triterpenes from Chrysobalanaceae species: cytotoxicity on multidrug resistant and sensitive leukemia cell lines. **Cancer Letters**, v. 190, p. 165–169, 2003.

FERNANDES, J.; RUMJANEK, V.M.; CASTILHO, R.O.; KAPLAN, M.A.; GATASS, C.R. Alternativas contra o câncer. **Scientific American Brasil**, Edição 22, p. 12-13, 2004.

FERREIRA, C.G.; TOLIS, C.; GIACCONE, G. p53 and chemosensitivity. **Annals of Oncology**, v. 10, p. 1011-1021, 1999.

FIELD, K.M.; ROSENTHAL, M.A.; YILMAZ, M.; TACEY, M.; DRUMMOND, K. Comparison between poor and long-term survivors with glioblastoma: review of an Australian dataset. **Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology**, doi:10.1111/ajco.12076, 2013.

FIGARELLA-BRANGER, D. e BOUVIER, C. Classification anatomopathologique des gliomes: faits et controversies. **Bull Cancer**, v. 92, p. 301-309, 2005.

FILHO, G.B; PEREIRA, F.E.L.; GUIMARÃES, R.C.; **Distúrbios do crescimento e da diferenciação**. In:_____Bogliolo Patologia Geral - 3ª ed., Rio de Janeiro, cap.8, p. 173-235, 2004.

FISHER, J.L.; SCHWARTZBAUM, J.A.; WRENSCH, M.; WIEMELS, J.L. Epidemiology of brain tumors. **Neurologic Clinics**, v. 25, p. 867-890, 2007.

FLETCHER, J.I.; HABER, M.; HENDERSON, M.J.; NORRIS, M.D. ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, p. 147-156, 2010.

FOLKERTH, R.D. Histologic measures of angiogenesis in human primary brain tumors. **Cancer Treatment and Research**, v. 117, p. 79-95, 2004.

FORSYTH, P.A. e POSNER, J.B. Headaches in patients with brain tumors: a study of 111 patients. **Neurology**, v. 43, p. 1678–1683, 1993.

FOUTAINE, D. e PAQUIS, P. Glioblastoma: clinical, radiological and biological prognostic factors. **Neurochirurgie**. v. 56, p. 467-476, 2010.

FRANCESCONI, R.A.; SCULLY, S.; FAIBISH, M.; TAYLOR, S.L.; OH, D.; MORAL, L.; YAN, W.; BENTLEY, B.; SHAO, R. Role of YKL-40 in the angiogenesis, radioresistance and progression of glioblastoma. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, p. 15332–15343, 2011.

FRANKEL, S.A. e GERMAN, W.J. Glioblastoma multiforme; review of 219 cases with regard to natural history, pathology, diagnostic methods, and treatment. **Journal of Neurosurgery**, v. 15, p. 489–503, 1958.

FREIJE, W.A.; CASTRO-VARGAS, F.E.; FANG, Z.; HORVATH, S.; CLOUGHESY, T.; LIAU, L.M.; MISCHEL, P.S.; NELSON, S.F. Gene expression profiling of gliomas strongly predicts survival. **Cancer Research**, v. 64, p. 6503–6510, 2004.

FRENAY, M.; LEBRUN, C.; LONJON, M.; BONDIAU, P.Y.; CHATEL, M. Up-front chemotherapy with fotemustine (F) / cisplatin (CDDP) / etoposide (VP16) regimen in the treatment of 33 non-removable glioblastomas. **European Journal of Cancer**, v. 36, p. 1026-1031, 2000.

FREITAS, S.; COSTA, S.; AZEVEDO, C.; CARVALHO, G.; FREIRE, S.; BARBOSA, P.; VELOZO, E.; SCHAER, R.; TARDY, M.; MEYER, R.; NASCIMENTO, I. Flavonoids

inhibit angiogenic cytokine production by human glioma cells. **Phytotherapy Research**, v. 25, p. 916-921, 2011.

FRUEHAUF, J.P.; BREM, H.; BREM, S.; SLOAN, A.; BARGER, G.; HUANG, W.; PARKER, R. **In vitro drug response and molecular markers associated with drug resistance in malignant gliomas**. *Clinical Cancer Research*, v. 12, p. 4523-4532, 2006.

FU, J.; LIU, Z-G.; LIU, X-M.; CHEN, F-R.; SHI, H-L.; PANG, J. C-S.; NG H-K.; CHEN, Z-P. Glioblastoma stem cells resistant to temozolomide-induced autophagy. **Chinese Medical Journal**, v. 122, p. 1255-1259, 2009.

FURNEAUX, C. E.; MARSHALL, E. S.; YEOH, K.; MONTEITH, S. J.; MEWS, P. J.; SANSUR, C. A.; BAGULEY, B. C. Cell cycle times of short-term cultures of brain cancers as predictors of survival. **British Journal of Cancer**, v. 99, p. 1678–1683, 2008.

GALANIS, E. e BUCKNER, J. Chemotherapy for high-grade gliomas. **British Journal of Cancer**, v. 82, p. 1371–1380, 2000.

GALIATSATOS, P.; FOULKES, W.D. Familial adenomatous polyposis. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 101, p. 385-398, 2006.

GARCEZ, R.C. **Adesão, proliferação e migração de células de astrocitoma humano u-87 em fibronectina, laminina e colágeno IV e a expressão e organização de vimentina e GFAP**. Santa Catarina: UFSC, 2004. 87p. Dissertação (Mestrado em Neurociências) - Programa de Pós-Graduação em Neurociências. Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de Ciências Biológicas, 2004.

GARCIA, J.L.; PEREZ-CARO, M.; GOMEZ-MORETA, J.A.; GONZALEZ, F.; ORTIZ, J.; BLANCO, O.; SANCHO, M.; HERNANDEZ-RIVAS, J.M.; GONZALEZ-SARMIENTO, R.; SANCHEZ-MARTIN, M. Molecular analysis of ex-vivo CD133⁺ GBM cells revealed a common invasive and angiogenic profile but different proliferative signatures among high grade gliomas. **BiomedCentral (BMC) Cancer**, v. 10, p. 454, 2010.

GARRIDO, W.; MUÑOZ, M.; SAN MARTÍN, R.; QUEZADA, C. FK506 confers chemosensitivity to anticancer drugs in glioblastoma multiforme cells by decreasing the expression of the multiple resistance-associated protein-1. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 411, p. 62–68, 2011.

GARSIDE, R.; PITT, M.; ANDERSON, R.; ROGERS, G.; DYER, M.; MEALING, S.; SOMERVILLE, M.; PRICE, A.; STEIN, K. The effectiveness and cost-effectiveness of carmustine implants and temozolomide for the treatment of newly diagnosed high-grade glioma: a systematic review and economic evaluation. **Health Technology Assessment**, v. 11, p. iii-221, 2007.

GE, L.; CORNFORTH, A.N.; HOA, N.T.; DELGADO, C.; CHIOU, S.K.; ZHOU, Y.H.; JADUS, M.R. Differential glioma-associated tumor antigen expression profiles of human glioma cells grown in hypoxia. **Public Library of Science**, v. 7, p. e42661, 2012.

GEHLEN, G. **Efeito dos hormônios gonadais sobre os filamentos intermediários de astrócitos hipocâmpais, durante o desenvolvimento e o ciclo estral: uma abordagem imunoistoquímica**. Porto Alegre: UFRGS, 2009. 142p. Tese (Doutorado em Neurociências) – Programa de Pós-Graduação em Neurociências. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

GIL-SALÚ, J.L.; BOSCO-LÓPEZ, J.; DOMINGUEZ-VILLAR, M.; DOMÍNGUEZ-PASCUAL, I.; PÉREZ-REQUENA, J.; PALOMO, M.J.; LÓPEZ-ESCOBAR, M. Chemosensitivity test on brain tumors. **Neurocirurgia (Astur)**, v. 19, p. 5-11, 2008.

GLOBOCAN 2008 (International Agency for Research on Cancer - IARC) Section of Cancer Information < acesso em: 31/7/2012 >
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>

GODBOUT, R.; BISGROVE, D.A.; SHKOLNY, D.; DAY, R.S. 3rd. Correlation of B-FABP and GFAP expression in malignant glioma. **Oncogene**, v. 16, p. 1955-1962, 1998.

GOLD, E.B.; DIENER, M.D.; SZKLO, M. Parental occupations and cancer in children--a case-control study and review of the methodologic issues. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**, v. 24, p. 578-584, 1982.

GOLDMAN, C.K.; KIM, J.; WONG, W.L.; KING, V.; BROCK, T.; GILLESPIE, G.Y. Epidermal growth factor stimulates vascular endothelial growth factor production by human malignant glioma cells: a model of glioblastoma multiforme pathophysiology. **Molecular Biology of the Cell**, v. 4, p. 121-133, 1993.

GOMÈS, D.; DE NÉCHAUD, B.; MAUNOURY, R.; MOURA NETO, V.; BRIGAUDEAU, C.; LABROUSSE, F.; DUPOUEY, P. Glial fibrillary acidic protein expression in a new human glioma cell line in culture before and after xenogenic transplantation into nude mice. **Acta Neuropathologica**, v. 94, p. 376-384, 1997.

GOMES, J.; AL ZAYADI, A.; GUZMAN, A. Occupational and environmental risk factors of adult primary brain cancers: a systematic review. **International Journal of Occupational Medicine & Environmental**, v. 2, p. 82-111, 2011.

GRAÇA, J.; PALMA, T.; PEREIRA, P.; MEDINA, P.; RIBEIRO, C.; EVANGELISTA, P. Avaliação dos gliomas cerebrais por técnicas avançadas de ressonância magnética. **Acta Médica Portuguesa**, v. 16, p. 117-123, 2003.

GUILLEM, J.G.; SMITH, A.J.; CALLE, J.P.-L. RUO, L. Gastrointestinal polyposis syndromes. **Current Problems in Surgery**, v. 36, p. 100-106, 1999.

GUO, J.; NIU, R.; HUANG, W.; ZHOU, M.; SHI, J.; ZHANG, L.; LIAO, H. Growth factors from tumor microenvironment possibly promote the proliferation of glioblastoma-derived stem-like cells *in vitro*. **Pathology & Oncology Research**, v. 18, p. 1047-1057, 2012.

HAJJAJI, N. e BOUGNOUX, P. Selective sensitization of tumors to chemotherapy by marine-derived lipids: a review. **Cancer Treatment Review**, v. 39, p. 473-488, 2013.

HANSEN, M.B.; NIELSEN, S.E. e BERG, K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. **Journal of Immunological Methods**, v. 119, p. 203-210, 1989.

HEGI, M.E.; LIU, L.; HERMAN, J.G.; STUPP, R.; WICK, W.; WELLER, M.; MEHTA, M.P.; GILBERT, M.R. Correlation of O⁶-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, p. 4189-4199, 2008.

HILBIG, A.; BARBOSA-COUTINHO, L.M.; NETTO, G.C.; BLEIL, C.B.; TOSCANI, N.V. Imunoistoquímica em oligodendrogliomas. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 64, p. 67-71, 2006.

HOLLAND, E.C. Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models. **Nature Reviews**, v. 2, p. 120-129, 2001.

HUANG, P.H.; MUKASA, A.; BONAVIA, R.; FLYNN, R.A.; BREWER, Z.E.; CAVENEE, W.K.; FURNARI, F.B.; WHITE, F.M. Quantitative analysis of EGFRvIII cellular signaling networks reveals a combinatorial therapeutic strategy for glioblastoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, p. 12867-12872, 2007.

HUANG, Q.; ZHANG, Q.-B.; DONG, J.; WU, Y.-Y.; SHEN, Y.T.; ZHAO, Y.-D.; ZHU, Y.-D.; DIAO, Y.; WANG, A.-D.; LAN, Q. Glioma stem cells are more aggressive in recurrent tumors with malignant progression than in the primary tumor, and both can be maintained long-term *in vitro*. **Biomedcentral (BMC) Cancer**, v. 8, p. 304-315, 2008.

HUET, S.; MARIE, J-P.; GUALDE, N.; ROBERT, J.; Reference Method for Detection of Pgp Mediated Multidrug Resistance in Human Hematological Malignancies: A Method Validated by the Laboratories of the French Drug Resistance Network. **Cytometry (Communications in Clinical Cytometry)**, v. 34, p. 248–256, 1998.

HUSE, J.T. e HOLLAND, E.C. Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, p. 319-331, 2010.

HUSE, J.T.; HOLLAND, E. e DE ANGELIS, L.M. Glioblastoma: molecular analysis and clinical implications. **Annual Review of Medicine**, v. 64, p. 59-70, 2013.

HUTTNER, A. Overview of Primary Brain Tumors Pathologic Classification, Epidemiology, Molecular Biology, and Prognostic Markers. **Hematology/ Oncology Clinics of North America**, v. 26, p. 715–732, 2012.

Instituto Nacional de Câncer (INCA). José Alencar Gomes da Silva. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil** / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: INCA, 2011. 118 p.

ISHIWATA, I.; ISHIWATA, C.; IGUCHI, M.; SATO, Y.; SONOBE, M.; KIGUCHI, K.; TACHIBANA, T.; ISHIKAWA, H. Establishment and characterization of human glioblastoma cell line (HUBT-n). **Human Cell**, v. 18, p. 59-65, 2005.

ISOLAN, G.R.; FILHO, J.M.R.; ISOLAN, P.M.B.S.; GIOVANINI, A.; MALAFAIAS, O.; DINI, L.I.; KUMMER JR., A.; NEGRÃO, A.W. Neoplasias astrocitárias e correlação com as proteínas p53 mutada e Ki-67. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 63, p. 997-1004, 2005.

JAKACKI, R.I.; BOUFFET, E.; ADAMSON, P.C.; POLLACK, I.F.; INGLE, A.M.; VOSS, S.D.; BLANEY, S.M. A phase 1 study of vinblastine in combination with carboplatin for children with low-grade gliomas: a Children's Oncology Group phase1 consortium study. **Neuro-Oncology**, v. 13, p. 910–915, 2011.

JANUCHOWSKI, R.; WOJTOWICZ, K.; SUJKA-KORDOWSKA, P.; ANDRZEJEWSKA, M.; ZABEL, M. MDR gene expression analysis of six drug-resistant ovarian cancer cell lines. **Biomed Research International**, doi:10.1155/2013/241763, 2013.

JIANG, J.T.; ZHANG, L.F.; ZHOU, B.; ZHANG, S.Q.; LI, S.M.; ZHANG, W.; ZHANG, J.; QIAO, Z.; KONG, R.R.; MA, Y.F.; CHEN, S. Relationships of uPA and VEGF expression in

esophageal cancer and microvascular density with tumorous invasion and metastasis. **Asian Pacific Organization for Cancer Prevention**, v. 13, p. 3379-3383, 2012.

JOHANNESSEN, T.-C.A.; BJERKVIG, R.; TYSN, B.B. DNA repair and cancer stem-like cells – Potential partners in glioma drug resistance? **Cancer Treatment Reviews**, v. 34, p. 558-567, 2008.

JONES, D.T.W.; GRONYCH, J.; LICHTER, P.; WITT, O.; PFISTER, S.M. MAPK pathway activation in pilocytic astrocitoma. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 69, p. 1799–1811, 2012.

JUNG, S.; PAEK, Y.-W.; MOON, K.-S.; WEE, S.-C.; RYU, H.-H.; JEONG, Y.-I.; SUN, H.-S.; JIN, Y.-H.; KIM, K.-K.; AHN, K.-Y. Expression of Nm23 in gliomas and its effect on migration and invasion *in vitro*. **Anticancer Research**, v. 26, p. 249-258, 2006.

JUNIOR, H.F.; GAMARRA, L.F. Isolation, cultivation and characterization of CD133⁺ stem cells from human glioblastoma. **Einstein**, v. 10, p. 197-202, 2012.

KAHLERT, U.D.; NIKKHAH, G. e MACIACZYK, J. Epithelial-to-mesenchymal (-like) transition as a relevant molecular event in malignant gliomas. **Cancer Letters**, v. 331, p. 131-138, 2013.

KANG, M.K.; KANG, S.K. Pharmacologic blockade of chloride channel synergistically enhances apoptosis of chemotherapeutic drug-resistant cancer stem cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 373, p. 539–544, 2008.

KANG, F.-W.; GAO, Y.; QUE, L.; SUN, J.; WANG, Z.-L. Hypoxia-inducible factor-1 α overexpression indicates poor clinical outcomes in tongue squamous cell carcinoma. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 5, p. 112-118, 2013.

KANZAWA, T.; GERMANO, I.M.; KONDO, Y.; ITO, H.; KYO, S.; KONDO, S. Inhibition of telomerase activity in malignant glioma cells correlates with their sensitivity to temozolomide. **British Journal of Cancer**, v. 89, p. 922-929, 2003.

KAYASELCUK, F.; ZORLUDEMIR, S.; GUMURDULU, D.; ZEREN, H.; ERMAN, T. PCNA and Ki-67 in central nervous system tumors: correlation with the histological type and grade. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 57, p. 115–121, 2002.

KIM, J-H.; KIM, Y.B.; HAN, J.H.; CHO, K-G.; KIM, W.S-H.; SHEEN, S.S.; LEE, H.W.; JEONG, S-Y.; KIM, B.Y.; LEE, K.B. Pathologic diagnosis of recurrent glioblastoma: morphologic, immunohistochemical, and molecular analysis of 20 paired cases. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 36, p. 620–628, 2012.

KIMMEL, D.W.; SHAPIRO, J.R.; SHAPIRO, W.R. *In vitro* drug sensitivity testing in human gliomas. **Journal of Neurosurgery**, v. 66, p. 161-171, 1987.

KINSELLA, K. Urban and rural dimensions of global population aging: an overview. **The Journal of Rural Health**, v. 17, p. 314-322, 2001.

KITCHENS, C.A.; MCDONALD, P.R.; SHUN, T.Y.; POLLACK, I.F.; LAZO, J.S. Identification of chemosensitivity nodes for vinblastine through small interfering RNA high-throughput screens. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 339, p. 851-858, 2011.

KLEIHUES, P.; LOUIS, D.N.; SCHEITHAUER, B.W.; RORKE, L.B.; REIFENBERGER, G.; BURGER, P.C.; CAVENEE, W.K. The WHO classification of tumors of the nervous system. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 61, p. 215-225, 2002.

KOGA, K.; TODAKA, T.; MORIOKA, M.; HAMADA, J.-I.; KAI, Y.; YANO, S.; OKAMURA, A.; TAKAKURA, N.; SUDA, T.; USHIO, Y. Expression of angiopoietin-2 in human glioma cells and its role for angiogenesis. **Cancer Research**, v. 61, p. 6248-6254, 2001.

KORNBLITH, P.L. e SZYPKO, P.E.
Variations in response of human brain tumors to BCNU in vitro. **Journal of Neurosurgery**, v.48, p. 580-586, 1978.

KOUNDRIOUKOFF, S.; JÓNSSON, Z.O.; HASAN, S.; DE JONG, R.N.; VAN DER VLIET, P.C.; HOTTIGER, M.O.; HÜBSCHER, U. A direct interaction between proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Cdk2 targets PCNA-interacting proteins for phosphorylation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 22882-22887, 2000.

KOUKOURAKIS, G.V.; KOULOULIAS, V.; ZACHARIAS, G.; PAPADIMITRIOU, C.; PANTELAKOS, P.; MARAVELIS, G.; FOTINEAS, A.; BELI, I.; CHALDEOPOULOS, D.; KOUVARIS, J. Temozolomide with radiation therapy in high grade brain gliomas: Pharmaceuticals considerations and efficacy. **Molecules**, v. 14, p. 1561-1577, 2009.

KRASNAPOLSKI, M.A.; TODARO, L.B.; DE KIER, J.E.B. Is the epithelial-to-mesenchymal transition clinically relevant for the cancer patient? **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 12, p. 1891-1899, 2011.

KRATZKE, R.A. e KRAMER, B.S. Evaluation of *in vitro* chemosensitivity using human lung cancer cell lines. **Journal of Cell Biochemistry**, v. 24, p. 160-164, 1996.

KREX, D.; KLINK, B.; HARTMANN, C.; VON DEIMLING, A.; PIETSCH, T.; SIMON, M.; SABEL, M.; STEINBACH, J.P.; HEESE, O.; REIFENBERGER, G.; WELLER, M.; SCHACKERT, G.; GERMAN GLIOMA NETWORK. Long-term survival with glioblastoma multiforme. **Brain**, v. 130, p. 2596-2606, 2007.

KRUSE, C.A.; MITCHELL, D.H.; KLEINSCHMIDT-DEMASTERS, B.K.; FRANKLIN, W.A.; MORSE, H.G.; SPECTOR, E.B.; LILLEHEI, K.O. Characterization of a continuous human glioma cell line DBTRG-05MG: growth kinetics, karyotype, receptor expression, and tumor suppressor gene analyses. **In Vitro Cell Development Biology**, v. 28A, p. 609-614, 1992.

KU, B.M.; LEE, Y.K.; RYU, J.; JEONG, J.Y.; CHOI, J.; EUN, K.M.; SHIN, H.Y.; KIM, D. G.; HWANG, E.M.; YOO, J.C.; PARK, J-Y.; ROH, G.S.; KIM, H.J.; CHO, G.J.; CHOI, W. S.; PAEK, S.H.; KANG, S.S. CHI3L1 (YKL-40) is expressed in human gliomas and regulates

the invasion, growth and survival of glioma cells. **International Journal of Cancer**, v. 128, p. 1316–1326, 2011.

KUO, M.T. Redox regulation of multidrug resistance in cancer chemotherapy: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 11, p. 99-134, 2009.

LAFAY-COUSIN, L.; HOLM, S.; QADDOUMI, I.; NICOLIN, G.; BARTELS, U.; TABORI, U.; HUANG, A.; BOUFFET, E. Weekly vinblastine in pediatric low-grade glioma patients with carboplatin allergic reaction. **Cancer**, v. 103, p. 2636-2642, 2005.

LAMSZUS, K.; ULBRICHT, U.; MATSCHKE, J.; BROCKMANN, M.A.; FILLBRANDT, R.; WESTPHAL, M. Levels of soluble vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor 1 in astrocytic tumors and its relation to malignancy, vascularity, and VEGF-A. **The Clinical Cancer Research**, v. 9, p. 1399-1405, 2003.

LE MERCIER, M.; LEFRANC, F.; MIJATOVIC, T.; DEBEIR, O.; HAIBE-KAINS, B.; BONTEMPI, G.; DECAESTECKER, C.; KISS, R.; MATHIEU, V. Evidence of galectin-1 involvement in glioma chemoresistance. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 229, p. 172-183, 2008.

LE MERCIER, M.; FORTIN, S.; MATHIEU, V.; KISS, R.; LEFRANC, F. Galectins and gliomas. **Brain Pathology**, v. 20, p. 17-27, 2009.

LEE, W.H.; YEH, M.Y.; TU, Y.C.; HAN, S.H.; WANG, Y.C. Establishment and characterization of a malignant glioma cell line, GBM8401/TSGH, NDMC. **Journal of Surgical Oncology**, v. 38, p. 173-181, 1988.

LEFRANC, F.; KISS, R. The sodium pump alpha1 subunit as a potential target to combat apoptosis-resistant glioblastomas. **Neoplasia**, v. 10, p. 198-206, 2008.

LEHNUS, K.S.; DONOVAN, L.K.; HUANG, X.; ZHAO, N.; WARR, T.J.; PILKINGTON, G.J.; AN, Q. CD133 glycosylation is enhanced by hypoxia in cultured glioma stem cells. **International Journal of Oncology**, v. 42, p. 1011-1017, 2013.

LEI, Y.; TAN, J.; WINK, M.; MA, Y.; LI, N.; SU, G. An isoquinoline alkaloid from the Chinese herbal plant *Corydalis yanhusuo* W.T. Wang inhibits P-glycoprotein and multidrug resistance-associate protein 1. **Food Chemistry**, v. 136, p. 1117-1121, 2013.

LESLIE, E.M.; DEELEY, R.G. e COLE, S.P. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 204, p. 216-237, 2005.

LIGON, K.L.; ALBERTA, J.A.; KHO, A.T.; WEISS, J.; KWAAN, M.R.; NUTT, C.L.; LOUIS, D.N.; STILES, C.D.; ROWITCH, D.H. The oligodendroglial lineage marker OLIG2 is universally expressed in diffuse gliomas. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 63, p. 499-509, 2004.

LIMA, R.M.F. **Estudo sobre a citotoxicidade do catecol, um metabólito do benzeno, na linhagem n2a de neuroblastoma murino**. Salvador: UFBA, 2008. 97p. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2008.

LIND-LANDSTRÖM, T.; HABBERSTAD, A.H.; SUNDSTRØM, S.; TORP, S.H. Prognostic value of histological features in diffuse astrocytomas WHO grade II. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 5, p. 152-158, 2012.

LIU, G.; YUAN, X.; ZENG, Z.; TUNICI, P.; NG, H.; ABDULKADIR, I.R.; LU, L.; IRVIN, D.; BLACK, K.L., YU, J.S. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133⁺ cancer stem cells in glioblastoma. **Molecular Cancer**, v. 5, p. 67–71, 2006.

LOJA, T.; CHLAPEK, P.; KUGLIK, P.; PESAKOVA, M.; OLTOVA, A.; CEJPEK, P.; VESELSKA, R. Characterization of a GM7 glioblastoma cell line showing CD133 positivity

and both cytoplasmic and nuclear localization of nestin. **Oncology Reports**, v. 21, p. 119-127, 2009.

LOUIS, D.N.; HOLLAND, E.C.; CAIRNCROSS, J.G. Glioma classification: a molecular reappraisal. **American Journal of Pathology**, v. 159, p. 779-786, 2001.

LOUIS, D.N.; OHGAKI, H.; WIESTLER, O.D.; CAVENEE, W.K.; BURGER, P.C.; JOUVET, A.; SCHEITHAUER, B.W.; KLEIHUES, P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta Neuropathologica**, v. 114, p. 97–109, 2007.

LU, Q.R.; PARK, J.K.; NOLL, E.; CHAN, J.A.; ALBERTA, J.; YUK, D.; ALZAMORA, M.G.; LOUIS, D.N.; STILES, C.D.; ROWITCH, D.H.; BLACK, P.M. Oligodendrocyte lineage genes (OLIG) as molecular markers for human glial brain tumors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 19, p. 10851–10856, 2001.

LU, C. e SHERVINGTON, A. Chemoresistance in gliomas. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 312, p. 71–80, 2008.

LUCAS, M.R. Psychosocial implications for the patient with a high-grade glioma. **Journal of Neuroscience Nursing**, v. 42, p. 104-108, 2010.

LUCENA, R.C.G.; DE MELLO, R.J.V.; LESSA JR., J.R.; CAVALCANTE, G.M.; RIBEIRO, M. Correlação clínico-topográfica em glioblastomas multiformes nas síndromes motoras. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 64, p. 441-445, 2006.

MA, J.; MURPHY, M.; O'DWYER, P.J.; BERMAN, E.; REED, K.; GALLO, J.M. Biochemical changes associated with a multidrug-resistant phenotype of a human glioma cell line with temozolomide-acquired resistance. **Biochemical Pharmacology**, v. 63, p. 1219-1228, 2002.

MACIEL, B.B. **Isolamento, cultivo e caracterização de células tronco mesenquimais da medula óssea e do tecido adiposo de gato**. Curitiba: UFPR, 2010. 107p. Dissertação (mestrado em Ciências Veterinárias, Área de Concentração Patologia Animal), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

MACHADO, C.M.L. **Análise morfológica, citogenética e imunofenotípica de uma linhagem de glioblastoma humano: NG97.** São Paulo: UNICAMP, 2004. 72p., Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, São Paulo, 2004.

MADERNA, E.; SALMAGGI, A.; CALATOZZOLO, C.; LIMIDO, L.; POLLO, B. Nestin, PDGFRbeta, CXCL12 and VEGF in glioma patients: different profiles of (pro-angiogenic) molecule expression are related with tumor grade and may provide prognostic information. **Cancer Biology & Therapy**, v. 6, p. 1018-1024, 2007.

MALHEIROS, S.M.F.; STÁVALE, J.N.; FRANCO, C.M.R.; BRAGA, F.M.; GABBAI, A.A. Astrocitomas difusos de baixo grau de malignidade. **Revista de Neurociências**, v. 6, p. 75-80, 1998.

MAGNUS, T.; COKSAYGAN, T.; KORN, T.; XUE, H.; ARUMUGAM, T.V.; MUGHAL, M.R.; ECKLEY, D.M.; TANG, S.C.; DETOLLA, L.; RAO, M.S.; CASSIANI-INGONI, R.; MATTSON, M.P. Evidence that nucleocytoplasmic Olig2 translocation mediates brain-injury-induced differentiation of glial precursors to astrocytes. **Journal Neuroscience Research**, v. 85, p. 2126-2137, 2007.

MAITI, A.K.; GHOSH, K.; CHATTERJEE, U.; CHAKROBARTI, S.; CHATTERJEE, S.; BASU, S. Epidermal growth factor receptor and proliferating cell nuclear antigen in astrocitomas. **Neurology India**, v. 56, p. 456-462, 2008.

MAIURI, F.; DEL BASSO DE CARO, M.; SICILIANO, A.; PECA, C.; VERGARA, P.; MARINIELLO, G.; PETTINATO, G. Expression of growth factors in brain tumors: correlation with tumor grade, recurrence and survival. **Clinical Neuropathology**, v. 29, p. 109-114, 2010.

MATSUMOTO, Y.; TAMIYA, T. e NAGAO, S. Resistance to topoisomerase II inhibitors in human glioma cell lines overexpressing multidrug resistant associated protein (MRP) 2. **Journal of Investigative Medicine**, v. 52, p. 41-48, 2005.

MAUGERI-SACCÀ, M.; DI MARTINO, S.; DE MARIA, R. Biological and clinical implications of cancer stem cells in primary brain tumors. **Frontiers in Oncology**, v. 3, doi:10.3389/fonc.2013.00006, 2013.

MAZUR, L.; OPYDO-CHANEK, M.; WOJCIESZEK, K.; STOJAK, M.; NIEMEYER, U. Comparative effects of new generation oxazaphosphorines on the size and viability of human acute myeloblastic leukemia cells. **Folia Biologica (Krakow)**, v. 60, p. 35-40, 2012.

MCGILL, G.; FISCHER, D.E. p53 and cancer therapy: a double-edged sword. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 104, p. 223-225, 1999.

MCMORMICK, D. e HALL, P.A. The complexities of proliferating cell nuclear antigen. **Histopathology**, v. 21, p. 591-594, 1992.

MCNAMARA, S. Treatment of primary brain tumors in adults. **Nursing Standard**, v. 27, p. 42-47, 2012.

MENG, X.; ZHONG, J.; LIU, S.; MURRAY, M.; GONZALEZ-ANGULO, A.M. A new hypothesis for the cancer mechanism. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 31, p. 247-268, 2012.

MERRY, S.; KAYE, S.B. e FRESHNEY, R.I. Cross-resistance to cytotoxic drugs in human glioma cell lines in culture. **British Journal of Cancer**, v. 50, p. 831-835, 1984.

MIN, B.S.; KIM, N.K.; JEONG, H.C.; CHUNG, H.C. High levels of serum VEGF and TIMP-1 are correlated with colon cancer liver metastasis and intrahepatic recurrence after liver resection. **Oncology Letters**, v. 4, p. 123-130, 2012.

MISCHEL, P.S.; CLOUGHESY, T.F. e NELSON, S.F. DNA-microarray analysis of brain cancer: molecular classification for therapy. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 5, p. 782-792, 2004.

MOKHTARI, K.; PARIS, S.; AGUIRRE-CRUZ, L.; PRIVAT, N.; CRINIÈRE, E.; MARIE, Y.; HAUW, J.J.; KUJAS, M.; ROWITCH, D.; HOANG-XUAN, K.; DELATTRE, J.Y.;

SANSON, M. Olig2 expression, GFAP, p53 and 1p loss analysis contribute to glioma subclassification. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 31, p. 62-69, 2005.

MOLASSIOTIS, A.; WILSON, B.; BRUNTON, L.; CHAUDHARY, H.; GATTAMANENI, R.; MCBAIN, C. Symptom experience in patients with primary brain tumours: a longitudinal exploratory study. **European Journal of Oncology Nursing**, v. 14, p. 410-416, 2010.

MOLDOVAN, G.L.; PFANDER, B.; JENTSCH, S. PCNA, the maestro of the replication fork. **Cell**, v. 129, p. 665-679, 2007.

MONTALDI, A.P. e SAKAMOTO-HOJO, E.T. Methoxyamine sensitizes the resistant glioblastoma T98G cell line to the alkylating agent temozolomide. **Clinical and Experimental Medicine**, DOI 10.1007/s10238-012-0201-x, 2012.

MONTEIRO, G.T.R. e KOIFMAN, S. Mortalidade por tumores de cérebro no Brasil, 1980-1998. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, p. 1139-1151, 2003.

MORENO-GARCIA, V.; BASU, B.; MOLIFE, L.R.; KAYE, S.B. Combining antiangiogenics to overcome resistance: rationale and clinical experience. **Clinical Cancer Research**, v. 18, p. 3750-3761, 2012.

MORISAK, Y.; SHIMA, S.; YOSHIZUMI, Y.; SUGIURA, Y.; TANAKA, S.; TAMAI, S. PCNA immunostaining combined with AgNOR staining in esophageal squamous cell carcinoma to identify patients with a poor prognosis. **The Japanese Journal of Surgery**, v. 25, p.389-395, 1995.

MORIYAMA, T.; KATAOKA, H.; SEGUCHI, K.; NABESHIMA, K.; KAWANO, H.; GOYA, T.; WAKISAKA, S.; OHGAMI, A.; SUZUMIYA, J.; KIKUCHI, M.; KOONO, M. Establishment and characterization of a new human glioblastoma cell line (MGM-1) with highly motile phenotype. **Human Cell**, v. 10, p. 105-110, 1997.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MUNOZ, M.; HENDERSON, M.; HABER, M.; NORRIS, M. Role of the MRP1/ABCC1 multidrug transporter protein in cancer. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life**, v. 59, p. 752–757, 2007.

MRUGALA, M.M.; CHAMBERLAIN, M.C. Mechanisms of disease: temozolomide and glioblastoma—look to the future. **Nature Clinical Practice Oncology**, v. 5, p. 1-11, 2008.

MUSELLA FOUNDATION **Brain tumor guide for the newly diagnosed**. Versão 3. Disponível em: <http://www.virtualtrials.com/faq/Patient_Guide%203.0.pdf> Acesso em: 20 nov. 2012.

NAGASAKA, T.; GUNJI, M.; HAYASHI, N.H.K.; IKEDA, H.; INAO, M.I.S. FISH 1p/19q deletion/imbalance for molecular subclassification of glioblastoma. **Brain Tumor Pathology**, v. 24, p. 1–5, 2007.

NAJMAN, H. e GADELHA, M.I.P. Temozolomida. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, p. 439-445, 2002.

NAKADAA, M.; NAKADAA, S.; DEMUTHA, T.; TRANA, N.L.; HOELZINGERA, D.B.; BERENSA, M.E. Molecular targets of glioma invasion. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, p. 458–478, 2007.

NAKAMURA, T.; SEKI, S.; MATSUBARA, O.; KASUGA, T. Establishment of human glioblastoma multiforme cell line, G5A. **The Bulletin of Tokyo Medical and Dental University**, v. 31, p. 187-194, 1984.

NATIONAL CANCER INSTITUTE **FDA Approval for Temozolomide**. Em: <<http://www.cancer.gov/cancertopics/druginfo/fda-temozolomide>> Acesso em: 29 de maio de 2013.

NARYZHNY, S.N. e LEE, H. Observation of multiple isoforms and specific proteolysis patterns of proliferating cell nuclear antigen in the context of cell cycle compartments and sample preparations. **Proteomics**, v. 3, p. 930–936, 2003.

NARYZHNY, S.N. e LEE, H. Proliferating cell nuclear antigen in the cytoplasm interacts with components of glycolysis and cancer. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 584, p. 4292-4298, 2010.

NAVAS-ACIÉN, A.; POLLAN, M.; GUSTAVSSON, P.; PLATO, N. Occupation, exposure to chemicals and risk of gliomas and meningiomas in sweden. **American Journal of Industrial Medicine**, v. 42, p. 214–227, 2002a.

NAVAS-ACIÉN, A.; POLLAN, M.; GUSTAVSSON, P.; PLATO, N.; FLODERUS, B.; DOSEMECI, M. Interactive effect of chemical substances and occupational electromagnetic field exposure on the risk of gliomas and meningiomas in Swedish men. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 11, p. 1678-1683, 2002b.

NELSON, J.S.; BURCHFIEL, C.M.; FEKEDULEGN, D.; ANDREW, M.E. Potential risk factors for incident glioblastoma multiforme: the Honolulu Heart Program and Honolulu-Asia Aging Study. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 109, p. 315-321, 2012.

NEWTON, H.B. Novel chemotherapeutic agents for the treatment of brain cancer. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 9, p. 2815-2829, 2000.

NIGRO, J.M.; MISRA, A.; ZHANG, L.; SMIRNOV, I.; COLMAN, H.; GRIFFIN, C.; OZBURN, N.; CHEN, M.; PAN, E.; KOUL, D.; YUNG, W.K.; FEUERSTEIN, B.G.; ALDAPE, K.D. Integrated array-comparative genomic hybridization and expression array profiles identify clinically relevant molecular subtypes of glioblastoma. **Cancer Research**, v. 65, p. 1678-1686, 2005.

NISHIKAWA, R. Standart therapy for glioblastoma – a review where we are. **Neurologia medico-chirurgica**, v. 50, p. 713–719, 2010.

NIKKHAH, G.; TONN, J.C.; HOFFMANN, O.; KRAEMER, H.P.; DARLING, J.L.; SCHACHENMAYR, W.; SCHÖNMAYR, R. The MTT assay for chemosensitivity testing of human tumors of the central nervous system. Part II: Evaluation of patient- and drug-specific variables. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 13, p. 13-24, 1992.

NIKIFOROVA, M.N. e HAMILTON, R.L. Molecular diagnostics of gliomas. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 135, p. 558–568, 2011.

NOUSHMEHR, H.; WEISENBERGER, D.J.; DIEFES, K.; PHILLIPS, H.S.; PUJARA, K.; BERMAN, B.P.; PAN, F.; PELLOSKI, C.E.; SULMAN, E.P.; BHAT, K.P.; VERHAAK, R.G.; HOADLEY, K.A.; HAYES, D.N.; PEROU, C.M.; SCHMIDT, H.K.; DING, L.; WILSON, R.K.; VAN DEN BERG, D.; SHEN, H.; BENGTSSON, H.; NEUVIAL, P.; COPE, L.M.; BUCKLEY, J.; HERMAN, J.G.; BAYLIN, S.B.; LAIRD, P.W.; ALDAPE, K.; CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK. Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. **Cancer Cell**, v.17, p. 510-522, 2010.

NUKI, Y.; UCHINOKURA, S.; MIYATA, S.; FUKUSHIMA, T.; HAMASUNA, R.; NAKANO, S.; WAKISAKA, S.; AKIYAMA, Y.; ITOH, H.; KATAOKA, H. Establishment and characterization of a new human glioblastoma cell line, NYGM. **Human cell**, v. 17, p. 145-50, 2004.

OH, M.C.; KIM, J.M.; SAFAEE, M.; KAUR, G.; SUN, M.Z.; KAUR, R.; CELLI, A.; MAURO, T.M.; PARSA, A.T. Overexpression of calcium-permeable glutamate receptors in glioblastoma derived brain tumor initiating cells. **Public Library of Science**, v. 7, e47846, 2012.

OHGAKI, H. e KLEIHUES, P. Primary and secondary glioblastomas: From concept to clinical diagnosis1. **Neuro-oncology**, v. 1, p. 44–51, 1999.

OHGAKI, H. e KLEIHUES, P. Epidemiology and etiology of gliomas. **Acta Neuropathologica**, v. 109, p. 93–108, 2005a.

OHGAKI H. e KLEIHUES P. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. **Journal of Neuropathology Experimental Neurology**, v. 64, p.479-489, 2005b.

OLIVA, C.R.; MOELLERING, D.R.; GILLESPIE, G.Y.; GRIGUER, C.E. Acquisition of chemoresistance in gliomas is associated with increased mitochondrial coupling and decreased ROS production. **Public Library of Science**, v. 6, p. 1-10, 2011.

OLIVEIRA, R.B. e ALVES, R.J. Agentes antineoplásicos bio redutíveis: uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. **Química Nova**, v. 25, p. 976-984, 2002.

OLIVEIRA, D.V.; MACEDO, M.D.; BRANDÃO, L.M.D.; NAJM, D.G.; RODELLA, P.; MIZIARA, R.C. Glioblastoma: base conceitual e perspectivas futuras de tratamento. **Revista Uniara**, v. 12, p. 227-242, 2009.

O'TOOLE, S.A.; SHEPPARD, B.L.; MCGUINNESS, E.P.J.; GLEESON, N.C.; YONEDA, M.; BONNAR, J. The MTS assay as an indicator of chemosensitivity/resistance in malignant gynaecological tumours. **Cancer Detection and Prevention**, v. 27, p. 47-54, 2003.

OZDENER, H.; SPIELMAN, A.I.; RAWSON, N.E. Isolation and culture of human fungiform taste papillae cells. **Journal of Visualized Experiments**, v. 63, doi: 10.3791/3730, 2012.

PAETAU, A.; VIRTANEN I KURKI. P.; LINDER, E.; VAHERI, A.; WESTERMARK, B.; DAHL, D.; HALTIA, M. Glial fibrillary acidic protein and intermediate filaments in human glioma cells. **Acta Neuropathologica**, v. 47, p. 71-74, 1979.

PAN, Q.; YANG, X.J.; WANG, H.M.; DONG, X.T.; WANG, W.; LI, Y.; LI, J.M. Chemoresistance to temozolomide in human glioma cell line U251 is associated with increased activity of O6-methylguanine-DNA methyltransferase and can be overcome by metronomic temozolomide regimen. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 62, p. 185-191, 2012.

PARNEY, I.F.; WALDRON, J.S.; PARSA, A.T. Flow cytometry and in vitro analysis of human glioma-associated macrophages. **Journal of Neurosurgery**, v. 110, p. 572–582, 2009.

PAVON, L.F.; MARTI, L.C.; SIBOV, T.T.; MIYAKI, L.A.M.; MALHEIROS, S.M.F.; MAMANI, J.B.; BRANDT, R.A.; RIBAS, G.C.; PAGURA, J.R.; JOAQUIM, M.A.S.; JUNIOR, H.F.; GAMARRA, L.F. Isolation, cultivation and characterization of CD133+ stem cells from human glioblastoma. **Einstein**, v. 10, p. 197-202, 2012.

PÉDEBOSCQ, S.; L'AZOUA, B.; LIGUOROC, D.; POMETANB, J.-P.; CAMBARA, J. Interindividual differences in anticancer drug cytotoxicity in primary human glioblastoma cells. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 58, p. 247–253, 2007.

PEIGÑAN, L.; GARRIDO, W.; SEGURA, R.; MELO, R.; ROJAS, D.; CÁRCAMO, J.G.; SAN MARTÍN, R.; QUEZADA, C. Combined use of anticancer drugs and an inhibitor of multiple drug resistance-associated protein-1 increases sensitivity and decreases survival of glioblastoma multiforme cells *in vitro*. **Neurochemical Research**, v. 36, p. 1397-1406, 2011.

PEREGO, P.; BOIARDI, A.; CARENINI, N.; DE CESARE, M.; DOLFINI, E.; ROBERTO-GIARDINI, M.I.; MARTIGNONE, S.; SILVANI, A.; SORANZO, C.; ET AL. Characterization of an established human, malignant, glioblastoma cell line (GBM) and its response to conventional drugs. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 120, p. 585-592, 1994.

PERES, C.M. e CURI, R. **Como cultivar células**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 283 p.

PÉREZ-CASTILLO, A.; AGUILAR-MORANTE, D.; MORALES-GARCÍA, J.A.; DORADO, J. Cancer stem cells and brain tumors. **Clinical and Translational Oncology**, v. 10, p. 262-267, 2008.

PERZELOVÁ, A.; MÁCIKOVÁ, I.; MRÁZ, P.; BÍZIK, I.; STENO, J. Characterization of two new permanent glioma cell lines 8-MG-BA and 42-MG-BA. **Neoplasma**, v. 45, p. 25-29, 1998.

PETSKO, G.A. A seat at the table. **Genome Biology**, doi:10.1186/gb-2008-9-12-113, 2008.

PHILLIPS, H.S.; KHARBANDA, S.; CHEN, R.; FORREST, W.F.; SORIANO, R.H.; WU, T.D.; MISRA, A.; NIGRO, J.M.; COLMAN, H.; SOROCEANU, L.; WILLIAMS, P.M.; MODRUSAN, Z.; FEUERSTEIN, B.G.; ALDAPE, K. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. **Cancer Cell**, v. 9, p. 157–173, 2006.

PHILLIPS, H.S.; FORREST III, W.F.; KHARBANDA, S.; WU, T.D. Method for diagnosing, prognosing and treating glioma. **Genentech, Inc. (E. U. A.) U. S. Pat. Appl.** 20070141066, 2007.

PICCOLO, S.R. e FREY, L.J. Clinical and molecular models of glioblastoma multiforme survival. **International Journal of Data Mining and Bioinformatics**, v. 7, p. 245-265, 2013.

PIERALLINI, A.; BONAMINI, M.; PANTANO, P.; PALMEGGIANI, F.; RAGUSO, M.; OSTI, M.F.; ANAVERI, G.; BOZZAO, L. Radiological assessment of necrosis in glioblastoma: variability and prognostic value. **Neuroradiology**, v. 40, p. 150-153, 1998.

PINTO, L.W. e CHIMELLI, L. Componente oligodendroglial e neuronal em glioblastomas possível relação com o prognóstico. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 62, p. 1074-1078, 2004.

POPE, W.B.; SAYRE, J.; PERLINA, A.; VILLABLANCA, J.P.; MISCHEL, P.S.; CLOUGHESY, T.F. MR imaging correlates of survival in patients with high-grade gliomas. **American Journal of Neuroradiology**, v. 26, p. 2466–2474, 2005.

POTTER, N.E.; PHIPPS, K.; HARKNESS, W.; HAYWARD, R.; THOMPSON, D.; JACQUES, T.S.; HARDING, B.; THOMAS, D.G.; REES, J.; DARLING, J.L.; WARR, T.J. Astrocytoma derived short-term cell cultures retain molecular signatures characteristic of the tumour *in situ*. **Experimental Cell Research**, v. 315, p. 2835-2846, 2009.

PRAKASH, O.; LUKIW, W.J.; PERUZZI, F.; REISS, K.; MUSTO, A.E. Gliomas and seizures. **Medical Hypotheses**, v. 79, p. 622-626, 2012.

PRESTON-MARTIN, S. Epidemiology of primary CNS neoplasms. **Neurologic Clinics**, v. 14, p. 273-290, 1996.

PREUSSER, M.; BUDKA, H.; ROSSLER, K.; HAINFELLNER, J.A. OLIG2 is a useful immunohistochemical marker in differential diagnosis of clear cell primary CNS neoplasms. **Histopathology**, v. 50, p. 365–370, 2007.

PREUSSER, M.; RIBAUPIERRE, S.; WOHRER, A.; ERRIDGE, S.C.; HEGI, M.; WELLER, M.; STUPP, R. Current concepts and management of glioblastoma. **Annals of Neurology**, v. 70, p. 9–21, 2011.

PROSPERI, E. Multiple roles of the proliferating cell nuclear antigen: DNA replication, repair and cell cycle control. **The Progress in Cell Cycle Research**, v. 3, p. 193-210, 1997.

PUROW, B. e SCHIFF, D. Advances in the genetics of glioblastoma: are we reaching critical mass? **Nature Reviews Neurology**, v. 5, p. 419–426, 2009.

PUZZILLI, F.; RUGGERI, A.; MASTRONARDI, L.; DI STEFANO, D.; LUNARDI, P. **Long-term survival in cerebral glioblastoma. Case report and critical review of the literature.** *Tumori - A Journal of Experimental and Clinical Oncology*, v. 84, p. 69-74, 1998.

PYRKO, P.; SCHÖNTHAL, A.H.; HOFMAN, F.M.; CHEN, T.C.; LEE, A.S. The unfolded protein response regulator GRP78/BiP as a novel target for increasing chemosensitivity in malignant gliomas. **Cancer Research**, v. 67, p. 9809-9816, 2007.

REILLY, K.M.; LOISEL, D.A.; BRONSON, R.T.; MCLAUGHLIN, M.E.; JACKS, T. *Nf1;Trp53* mutant mice develop glioblastoma with evidence of strain-specific effects. **Nature Genetics**, v. 26, p. 109-113, 2000.

ROBB, E.L. e STUART, J.A. Resveratrol interacts with estrogen receptor- β to inhibit cell replicative growth and enhance stress resistance by upregulating mitochondrial superoxide dismutase. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 50, p. 821-831, 2011.

ROBERTSON, T.; KOSZYCA, B. E GONZALES, M. Overview and recent advances in neuropathology. Part 1: Central nervous system tumours. **Pathology**, v. 43, p. 88-92, 2011.

ROMÃO, L.F. **Interação neurônio-glia: efeito de fator de crescimento transformante- β 1 e fator de crescimento de tecido conjuntivo na biologia da glia normal e tumoral**. Rio de Janeiro: UFRJ, 2007. 300p. Tese (Doutorado em Ciências Morfológicas) - Programa de Pós-graduação em Ciências Morfológicas. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Ciências Biomédicas, 2007.

RONDINELLI, P.I.P. e MARTINEZ, C.A.O. Metástases intrarraquidianas de glioblastoma multiforme supratentorial da infância. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 60, p. 643-646, 2002.

RONG, Y.; DURDEN, D.L.; VAN MEIR, E.G.; BRAT, D.J. “Pseudopalisading” necrosis in glioblastoma: a familiar morphologic feature that links vascular pathology, hypoxia, and angiogenesis. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 65, p. 529-539, 2006.

ROTARESCU, V. e CIUREA, V.A. Psychic stress in cranial-cerebral tumors. **Journal of Medicine and Life**, v. 4, p. 378-385, 2009.

ROTH, J.G. e ELVIDGE, A.R. Glioblastoma multiforme: a clinical survey. **Journal of Neurosurgery**, v. 17, p. 736-750, 1960.

RUTKA, J.T.; GIBLIN, J.R.; DOUGHERTY, D.Y.; LIU, H.C.; MCCULLOCH, J.R.; BELL, C.W.; STERN, R.S.; WILSON, C.B.; ROSENBLUM, M.L. Establishment and characterization of five cell lines derived from human malignant gliomas. **Acta Neuropathologica**, v. 75, p. 92-103, 1987.

RUTKA, J.T.; ACKERLEY, C.; HUBBARD, S.; TILUP, A.; DIRKIS, P.B.; JUNG, S.; IVACHUK, S.; KURIMOTO, M.; TSUGU, A.; BECKER, L.E. Characterization of glial filament-cytoskeletal interactions in human astrocytomas: a immuno-ultrastructural analysis. **European Journal of Cell Biology**, v. 76, p. 279-287, 1998.

SAFDAR, S.; PAYNE, C.A.; TU, N.H.; TAITE, L.J. Targeted nitric oxide delivery preferentially induces glioma cell chemosensitivity via altered p53 and O(6)-Methylguanine-DNA Methyltransferase activity. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 110, p. 1211-1220, 2013.

SALCIDO, C.D.; LAROCHELLE, A.; TAYLOR, B.J.; DUNBAR, C. E.; VARTICOVSKI, L. Molecular characterisation of side population cells with cancer stem cell-like characteristics in small-cell lung cancer. **British Journal of Cancer**, v. 102, p. 1636–1644, 2010.

SALMAGGI, A.; BOIARDI, A.; GELATI, M.; RUSSO, A.; CALATOZZOLO, C.; CIUSANI, E.; SCIACCA, F.L.; OTTOLINA, A.; PARATI, E.A.; LA PORTA, C.; ALESSANDRI, G.; MARRAS, C.; CROCI, D.; DE ROSSI, M. Glioblastoma-derived tumorspheres identify a population of tumor stem-like cells with angiogenic potential and enhanced multidrug resistance phenotype. **Glia**, v. 54, p. 850-860, 2006.

SANAI, N. e BERGER, M.S. Intraoperative stimulation techniques for functional pathway preservation and glioma resection. **Neurosurgical Focus**, v. 28, p. 1-9, 2010.

SARGENT, J.M. The use of the MTT assay to study drug resistance in fresh tumour samples. **Recent Results in Cancer Research**, v. 161, p. 13-25, 2003.

SARKAR, C.; JAIN, A. e SURI, V. Current concepts in the pathology and genetics of gliomas. **Indian Journal of Cancer**, v. 46, p. 108-119, 2009.

SCHMIDT, M.C.; ANTWEILER, S.; URBAN, N.; MUELLER, W.; KUKLIK, A.; MEYER-PUTTLITZ, B.; WIESTLER, O.D.; LOUIS, D.N.; FIMMERS, R.; VON DEIMLING, A. Impact of genotype and morphology on the prognosis of glioblastoma. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 61, p. 321-328, 2002.

SCHMITT, C.A.; FRIDMAN, J.S.; YANG, M.; LEE, S.; BARANOV, E.; HOFFMAN, R.M.; LOWE, S.W. A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy. **Cell**, v. 109, p. 335-346, 2002.

SCHULER, P.J.; TRELLAKIS, S.; GREVE, J.; BAS, M.; BERGMANN, C.; BÖLKE, E.; LEHNERDT, G.; MATTHEIS, S.; ALBERS, A.E.; BRANDAU, S.; LANG, S.; WHITESIDE, T.L.; BIER, H.; HOFFMANN, T.K. *In vitro* chemosensitivity of head and neck cancer cell lines. **European Journal of Medical Research**, v. 15, p. 337-344, 2010.

SENGER D., CAIRNCROSS J.G., FORSYTH P.A. Long-term survivors of glioblastoma: statistical aberration or important unrecognized molecular subtype? **The Cancer Journal**, v. 9, p. 214-221, 2003.

SEOL, H.J.; CHANG, J.H.; YAMAMOTO, J.; ROMAGNUOLO, R.; SUH, Y.; WEEKS, A.; AGNIHOTRI, S.; SMITH, C.A.; RUTKA, J.T. Overexpression of CD99 increases the migration and invasiveness of human malignant glioma cells. **Genes Cancer**, v. 3, p. 535–549, 2012.

SENFT, C.; FRANZ, K.; BLASEL, S.; OSZVALD, A.; RATHERT, J.; SEIFERT, V.; GASSER, T. Influence of iMRI-guidance on the extent of resection and survival of patients with glioblastoma multiforme. **Technology in Cancer Research and Treatment**, v. 9, p. 339-346, 2010.

SHAO, R.; HAMEL, K.; PETERSEN, L.; CAO, J.Q.; ARENAS, R.B.; BIGELOW, C.; BENTLEY, B.; YAN, W. YKL-40, a secreted glycoprotein, promotes tumor angiogenesis. **Oncogene**, v. 28, p. 4456–4468, 2009.

SHAPIRO, J.R.; PU, P.Y.; MOHAMED, A.N.; GALICICH, J.H.; EBRAHIM, S.A.; SHAPIRO, W.R. Chromosome number and carmustine sensitivity in human gliomas. **Cancer**, v. 71, p. 4007-4021, 1993.

SHIRAHATA, M.; OBA, S.; IWAO-KOIZUMI, K.; SAITO, S.; UENO, N.; ODA, M.; HASHIMOTO, N.; ISHII, S.; TAKAHASHI, J.A.; KATO, K. Using gene expression profiling to identify a prognostic molecular spectrum in gliomas. **Cancer Science**, v. 100, p. 165–172, 2009.

SILVA, K.L.; VASCONCELOS, F.C.; MARQUES-SANTOS, L.F.; KWEE, J.K.; MAIA, R.C. CPT-11-induced cell death in leukemic cells is not affected by the MDR phenotype. **Leukemia Research**, v. 27, p. 243-251, 2003.

SIMÃO, M.N.; SIMÃO, G.N.; DOS SANTOS, A.C.; TRAD, C.S. Tomografia computadorizada e ressonância magnética nos oligodendrogliomas: correlação clínica e patológica. **Radiologia Brasileira**, v. 34, p. 145-149, 2001.

SINGH, T.P.; SCHÖN, M.P.; WALLBRECHT, K.; MICHAELIS, K.; RINNER, B.; MAYER, G.; SCHMIDBAUER, U.; STROHMAIER, H.; WANG, X.J.; WOLF, P. 8-methoxypsoralen plus ultraviolet A therapy acts via inhibition of the IL-23/Th17 axis and induction of Foxp3+ regulatory T cells involving CTLA4 signaling in a psoriasis-like skin disorder. **The Journal of Immunology**, v. 184, p. 7257-7267, 2010.

SKALLI, O.; WILHELMSSON, U.; ORNDAHL, C.; FEKETE, B.; MALMGREN, K.; RYDENHAG, B.; PEKNY, M. Astrocytoma grade IV (glioblastoma multiforme) displays 3 subtypes with unique expression profiles of intermediate filament proteins. **Human Pathology**, doi:10.1016/j.humpath.2013.03.013, 2013.

SMITH, M.T.; LUDWIG, C.L.; GODFREY, A.D.; ARMBRUSTMACHER, V.W. Grading of oligodendrogliomas. **Cancer**, v. 52, p. 2107-2114, 1983.

SONODA, Y.; KUMABE, T.; WATANABE, M.; NAKAZATO, Y.; INOUE, T.; KANAMORI, M.; TOMINAGA, T. Long-term survivors of glioblastoma: clinical features and molecular analysis. **Acta Neurochirurgica (Wien)**, v. 151, p. 1349-1358, 2009.

SOTTORIVA, A.; SPITERI, I.; PICCIRILLO, S.G.; TOULOUMIS, A.; COLLINS, V.P.; MARIONI, J.C.; CURTIS, C.; WATTS, C.; TAVARÉ, S. Intratumor heterogeneity in human

glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, v. 110, p. 4009-4014, 2013.

SPIEGL-KREINECKER, S.; BUCHROITHNER, J.; ELBLING, L.; STEINER, E.; WURM, G.; BODENTEICH, A.; FISCHER, J.; MICKSCHE, M.; BERGER, W. Expression and functional activity of the ABC-transporter proteins P-glycoprotein and multidrug-resistance protein 1 in human brain tumor cells and astrocytes. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 57, p. 27-36, 2002.

STICOZZI, C.; BELMONTE, G.; MEINI, A.; CARBOTTI, P.; GRASSO, G.; PALMI, M. IL-1 β induces GFAP expression in vitro and in vivo and protects neurons from traumatic injury-associated apoptosis in rat brain striatum via NF κ B/Ca²⁺- Calmodulin/ERK mitogen activated protein kinase signalling pathway. **Neuroscience**, doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.07.061, 2013.

STUDER, A.; DE TRIBOLET, N.; DISERENS, A.C.; GAIDE, A.C.; MATTHIEU, J.M.; CARREL, S.; STAVROU, D. Characterization of four human malignant glioma cell lines. **Acta Neuropathologica**, v. 66, p. 208-217, 1985.

STUMMER, W. e KAMP, M.A. The importance of surgical resection in malignant glioma. **Current Opinion in Neurology**, v. 22, p. 645-649, 2009.

STUPP, R.; MASON, W.P.; VAN DEN BENT, M.J.; WELLER, M.; FISHER, B.; TAPHOORN, M.J.B.; BELANGER, K.; BRANDES, A.A.; MAROSI, C.; BOGDAHN, U.; CURSCHMANN, J.; JANZER, R.C.; LUDWIN, S.; GORLIA, T.; ALLGEIER, A.; LACOMBE, D.; CAIRNCROSS, G.; EISENHAUER, E.; MIRIMANOFF, R.O. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. **The New England Journal of Medicine**, v. 352, p. 987-996, 2005.

SU, C-C.; WANG, M-J. e CHIU, T-L. The anti-cancer efficacy of curcumin scrutinized through core signaling pathways in glioblastoma. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 26, p. 217-224, 2010.

SUMANTRAN, V.N. Cellular chemosensitivity assays: an overview. **Methods in Molecular Biology**, v. 731, p. 219-236, 2011.

SUN, S.; LEE, D.; LEE, N.P.; PU, J.K.S.; WONG, S.T.S.; LUI, W.M.; FUNG, C.F.; LEUNG, G.K.K. Hyperoxia resensitizes chemoresistant human glioblastoma cells to temozolomide. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 109, p. 467-475, 2012a.

SUN, S.; WONG, T.S.; ZHANG, X.Q.; PU, J.K.S.; LEE, N.P.; DAY, P.J.R.; NG, G.K.B.; LUI, V.M.; LEUNG, G.K.K. Protein alterations associated with temozolomide resistance in subclones of human glioblastoma cell lines. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 107, p. 89–100, 2012b.

SWARNKAR, S.; SINGH, S.; GOSWAMI, P.; MATHUR, R.; PATRO, I.K.; NATH, C. Astrocyte activation: a key step in rotenone induced cytotoxicity and DNA damage. **Neurochemical Research**, v. 37, p. 2178-2189, 2012.

SYKES, A.M.; HUTTNER, W.B. Prominin-1 (CD133) and the cell biology of neural progenitors and their progeny. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 777, p. 89-98, 2013.

TABU, K.; OHBA, Y.; SUZUKI, T.; MAKINO, Y.; KIMURA, T.; OHNISHI, A.; SAKAI, M.; WATANABE, T.; TANAKA, S.; SAWA, H. Oligodendrocyte lineage transcription factor 2 inhibits the motility of a human glial tumor cell line by activating RhoA. **Molecular Cancer Research**, v. 5, p. 1099-1109, 2007.

TADA, H.; SHIHO, O.; KUROSHIMA, K.; KOYAMA, M.; TSUKAMATO, K. An improved colorimetric assay for interleukin 2. **Journal of Immunological Methods**, v. 93, p. 157-165, 1986.

TALLEN, U.G.; TRUSS, M.; KUNITZ, F.; WELLMANN, S.; UNRYN, B.; SINN, B.; LASS, U.; KRABBE, S.; HOLTKAMP, N.; HAGEMEIERS, C.; WURM, R.; HENZE, G.; RIABOWOL, K.T.; VON DEIMLING, A. Down-regulation of the inhibitor of growth 1 (ING1)

tumor suppressor sensitizes p53-deficient glioblastoma cells to cisplatin-induced cell death. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 86, p. 23–30, 2008.

TANAKA, S.; LOUIS, D.N.; CURRY, W.T.; BATCHELOR, T.T.; DIETRICH, J. Diagnostic and therapeutic avenues for glioblastoma: no longer a dead end? **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 10, p. 14–26, 2013.

TANGKA, F.K.; TROGDON, J.G.; EKWUEME, D.U.; GUY, G.P. JR.; NWAISE, I.; ORENSTEIN, D. State-level cancer treatment costs: how much and who pays? **Cancer**, v. 119, p. 2309-16, 2013.

TASPINAR, M.; ILGAZ, S.; OZDEMIR, M.; OZKAN, T.; OZTUNA, D.; CANPINAR, H.; REY, J.A.; SUNGUROĞLU, A.; CASTRESANA, J.S.; UGUR, H.C. Effect of lomeguatrib-temozolomide combination on MGMT promoter methylation and expression in primary glioblastoma tumor cells. **Tumour Biology**, v. 34, p. 1935-1947, 2013.

TAVARES, A.A.S. e TAVARES, J.R.M.S. Princípios Gerais de Culturas de Células e Citometria de Fluxo para Avaliação dos Efeitos da Radiação Ionizante. **Relatório Interno**. Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, p. 10-11, 2009.

TENA-SUCK, M.L.; MORENO-JIMÉNEZ, S.; ALONSO, M.; AGUIRRE-CRUX, L.; SÁNCHEZ, A. Oligodendrogliomas in relation to astrocytes differentiation. Clinicopathologic and immunohistochemical study. **Annals of Diagnostic Pathology**, v. 12, p. 313-321, 2008.

THIAGO, L. S. A persistência dos cânceres e as células-tronco tumorais. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 52, p.375-388, 2006.

THOMAS, T.L. e WAXWEILER, R.J. Brain tumors and occupational risk factors. **Scandinavian Journal of Working Environmental Health**, v. 12, p. 1-15, 1986.

THOMAS, A.A.; ERNSTOFF, M.S. e FADUL, C.E. Immunotherapy for the treatment of glioblastoma. **The Cancer Journal**, v. 18, p. 59-68, 2012.

TICE, H.; BARNES, P.D.; GOUMNEROVA, L.; SCOTT, R.M.; TARBELL, N.J. Pediatric and adolescent oligodendrogliomas. **American Journal of Neuroradiology**, v. 14, p. 1293-1300, 1993.

TSO, C.L.; SHINTAKU, P.; CHEN, J.; LIU, Q.; LIU, J.; CHEN, Z.; YOSHIMOTO, K.; MISCHEL, P.S.; CLOUGHESY, T.F.; LIAU, L.M.; NELSON, S.F. Primary glioblastomas express mesenchymal stem-like properties. **Molecular Cancer Research**, v. 4, p. 607–619, 2006.

TSUJI, A. P-glycoprotein-mediated efflux transport of anticancer drugs at the blood-brain barrier. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 20, p. 588-590, 1998.

TSURUO, T.; NAITO, M.; TOMIDA, A.; FUJITA, N.; MASHIMA, T.; SAKAMOTO, H.; HAGA, N. Molecular targeting therapy of cancer: drug resistance, apoptosis and survival signal. **Cancer Science**, v. 94, p. 15–21, 2003.

USHIO, Y. e KOCHI, M. Prognostic factors in malignant gliomas. **Gan To Kagaku Ryoh**, v. 23, p. 643-648, 1996.

VAN DER HEIJDEN, R.; JACOBS, D.I.; SNOEIJER, W.; HALLARD, D.; VERPOORTE, R. The Catharanthus Alkaloids: Pharmacognosy and Biotechnology. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, 607-628, 2004.

VAN MEIR, E.G.; HADJIPANAYIS, C.G.; NORDEN, A.D.; SHU, H.-K.; WEN, P.Y.; OLSON, J.J. Exciting new advances in Neuro-Oncology: The avenue to a cure for malignant glioma. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 60, p. 166–193, 2010.

VERHAAK, R.G.W.; HOADLEY, K.A.; PURDOM, E.; WANG, V.; QI, Y.; WILKERSON, M.D.; MILLER, R.; DING, L.I.; GOLUB, T.; MESIROV, J.P.; ALEXE, G.; LAWRENCE, M.; O'KELLY, M.; TAMAYO, P.; WEIR, B.A.; GABRIEL, S.; WINCKLER, W.; GUPTA, S.; JAKKULA, L.; FEILER, H.S.; HODGSON, J.G.; JAMES, C.D.; SARKARIA, J.N.; BRENNAN, C.; KAHN, A.; SPELLMAN, P.T.; WILSON, R.K.; SPEED, T.P.; GRAY, J.

W.; MEYERSON, M.; GETZ, G.; PEROU, C.M.; HAYES, D.N.; Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. **Cancer Cell**, v. 17, p. 98–110, 2010.

VIVANCO, I. e SAWYERS, C. L. The phosphatidylinositol 3-kinase AKT pathway in human cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, p. 489–501, 2002.

VORDERMARK, D.; RUPRECHT, K.; RIECKMANN, P.; ROGGENDORF, W.; VINCE, G.H.; WARMUTH-METZ, M.; KÖLBL, O.; FLENTJE, M. Glioblastoma multiforme with oligodendroglial component (GBMO): favorable outcome after post-operative radiotherapy and chemotherapy with nimustine (ACNU) and teniposide (VM26). **Biomedcentral (BMC) Cancer**, v. 6, p. 1-7, 2006.

WANG, J.; WANG, X.; JIANG, S.; LIN, P.; ZHANG, J.; WU, Y.; XIONG, Z.; REN, J.J.; YANG, H. Partial Biological Characterization of Cancer Stem-like Cell Line (WJ2) of Human Glioblastoma Multiforme. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 28, p. 991–1003, 2008.

WANG, X.; CHEN, J.X.; LIU, Y.H.; YOU, C.; MAO, Q. Mutant TP53 enhances the resistance of glioblastoma cells to temozolomide by up-regulating O(6)-methylguanine DNA-methyltransferase. **Neurological Sciences**, DOI 10.1007/s10072-012-1257-9, 2012.

WANG, Y. e JIANG, T. Understanding high grade glioma: molecular mechanism, therapy and comprehensive management. **Cancer Letters**, v. 331, p. 139-146, 2013.

WEISENTHAL, L.M. e LIPPMAN, M.E. Clonogenic and nonclonogenic *in vitro* chemosensitivity assays. **Cancer Treatment Reports**, v. 69, p. 615–632, 1985.

WEISWALD, L.B.; RICHON, S.; MASSONNET, G.; GUINEBRETIERE, J.M.; VACHER, S.; LAURENDEAU, I.; COTTU, P.; MARANGONI, E.; NEMATI, F.; VALIDIRE, P.; BELLET, D.; BIÈCHE, I.; DANGLES-MARIE, V. A short-term colorectal cancer sphere

culture as a relevant tool for human cancer biology investigation. **British Journal of Cancer**, v. 108, p. 1720-1731, 2013.

WELLER, M.; MULLER, B.; KOCH, R.; BAMBERG, M.; KRAUSENECK, P.; NEURO-ONCOLOGY WORKING GROUP OF THE GERMAN CANCER SOCIETY. Neuro-Oncology working group 01 trial of nimustine plus teniposide versus nimustine plus cytarabine chemotherapy in addition to involved-field radiotherapy in the first-line treatment of malignant glioma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 21, p. 3276-3284, 2003.

WELLER, M. Novel diagnostic and therapeutic approaches to malignant gliomas. **Swiss Medical Weekly**, v. 141, p.1-7, 2011.

WELLING, L.; LYNCH, J.C.; PEREIRA, C.; ANDRADE, R.; HIDALGO, F. P.; PEREIRA, A.G.L.; ESCOTEGUY, C. Fatores prognósticos no glioblastoma multiforme. **Arquivos Brasileiros de Neurocirurgia**, v.29, p.121-125, 2010.

WEN, P.Y. e KESARI, S. Malignant gliomas in adults. **The New England Journal of Medicine**, v. 359, p. 492-507, 2008.

WESTHOFF, M.A.; ZHOU, S.; BACHEM, M.G.; DEBATIN, K.M.; FULDA, S. Identification of a novel switch in the dominant forms of cell adhesion-mediated drug resistance in glioblastoma cells. **Oncogene**, v. 27, p. 5169–5181, 2008.

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**, v. 22, p. 3407–3411, 2003.

WILSON, T.R.; LONGLEY, D.B. e JOHNSTON, P.G. Chemoresistance in solid tumours. **Annals of Oncology**, v. 17, p. 315–324, 2006.

WITKO-SARSAT, V.; MOCEK, J.; BOUAYAD, D.; TAMASSIA, N.; RIBEIL, J.A.; CANDALH, C.; DAVEZAC, N.; REUTER, N.; MOUTHON, L.; HERMINE, O.; PEDERZOLI-RIBEIL, M.; CASSATELLA, M.A. Proliferating cell nuclear antigen acts as a

cytoplasmic platform controlling human neutrophil survival. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 207, p. 2631-2645, 2010.

WU, W.T.; LIN, Y.J.; LIOU, S.H.; YANG, C.Y.; CHENG, K.F.; TSAI, P.J.; WU, T.N. Brain cancer associated with environmental lead exposure: evidence from implementation of a National Petrol-Lead Phase-Out Program (PLPOP) in Taiwan between 1979 and 2007. **Environment International**, v. 40, p. 97-101, 2012.

YAMANAKA, R. e SAYA, H. Molecularly targeted therapies for glioma. **Annals of Neurology**, v. 66, p. 717–729, 2009.

YANG, J.J.; YIN, J.H. e YANG, D.I. Nitric oxide donors attenuate clongenic potential in rat C6 glioma cells treated with alkylating chemotherapeutic agents. **Neuroscience Letters**, v. 418, p. 106-110, 2007.

YIN, L-T.; FU, Y-J.; XU, Q-L.; YANG, J.; LIU, Z-L.; LIANG, A-H.; FAN, X-J.; XU, C-G. Potential biochemical therapy of glioma cancer. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 362, p. 225–229, 2007.

YOON, J.-H.; AHN, S.-G.; LEE, B.-H.; JUNG, S.-H.; OH, S.-H. Role of autophagy in chemoresistance: regulation of the ATM-mediated DNA-damage signaling pathway through activation of DNA-PKcs and PARP-1. **Biochemical Pharmacology**, v. 83, p. 747-757, 2012.

YOU, G.; SHA, Z.-Y.; YAN, W.; ZHANG, W.; WANG, Y.-Z.; LI, S.-W.; SANG, L.; WANG, Z.; LI, G.-L.; LI, S.-W.; SONG, Y.-J.; KANG, C.-S.; JIANG, T. Seizure characteristics and outcomes in 508 Chinese adult patients undergoing primary resection of low-grade gliomas: a clinicopathological study. **Neuro-Oncology**, v. 14, p. 230–241, 2012.

YOUNG-HWA, K.; EUNMYONG, L.; HEE-JEONG, Y.; SO, H. K.; HYUN, J.L.; YONG-GEUN, P.; SOO-JEONG, L. Potentiation by alpha-tocopheryl succinate of the etoposide response in multidrug resistance protein 1-expressing glioblastoma cells. **Cancer Letters**, v. 217, p. 181–190, 2005.

YUNG, W.K.; SHAPIRO, J.R. e SHAPIRO, W.R. Heterogeneous chemosensitivities of subpopulations of human glioma cells in culture. **Cancer Research**, v. 42, p. 992-998, 1982.

ZABOIKIN, M.; SRINIVASAKUMAR, N. e SCHUENING, F. Gene therapy with drug resistance genes. **Cancer Gene Therapy**, v. 13, p. 335–345, 2006.

ZHANG, W.; MURAO, K.; ZHANG, X.; MATSUMOTO, K.; DIAH, S.; OKADA, M.; MIYAKE, K.; KAWAI, N.; FEI, Z.; TAMIYA, T. Resveratrol represses YKL-40 expression in human glioma U87 cells. **Biomedcentral (BMC) Cancer**, v. 10, p. 593-602, 2010.

ZHAO, J.W.; RAHA-CHOWDHURY, R.; FAWCETT, J.W.; WATTS, C. Astrocytes and oligodendrocytes can be generated from NG2+ progenitors after acute brain injury: intracellular localization of oligodendrocyte transcription factor 2 is associated with their fate choice. **European Journal of Neuroscience**, v. 29, p. 1853-1869, 2009.

ZHENG, L.T.; LEE, S.; YIN, G.N.; MORI, K.; SUK, K. Down-regulation of lipocalin 2 contributes to chemoresistance in glioblastoma cells. **Journal of Neurochemistry**, v. 111, p. 1238-1251, 2009.

ZHOU, Q. e ANDERSON, D.J. The bHLH transcription factors OLIG2 and OLIG1 couple neuronal and glial subtype specification. **Cell**, v. 109, p. 61–73, 2002.

ZHOU, R. e SKALLI, O. TGF- α differentially regulates GFAP, vimentin, and nestin gene expression in U-373 MG glioblastoma cells: correlation with cell shape and motility. **Experimental Cell Research**, v. 254, p. 269-278, 2000.

ZUPI, G.; CANDILORO, A.; LAUDONIO, N.; CARAPPELLA, C.; BENASSI, M.; RICCIO, A.; BELLOCCI, M.; GRECO, C. Establishment, characterization and chemosensitivity of two human glioma derived cell lines. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 6, p. 169-177, 1988.

