

Isadora Moreira Costa do Nascimento Nogueira

Análise da Expressão Imuno-Histoquímica de COX-2 e P53 em Meningiomas e Astrocitomas

 **Atena**
Editora

Ano 2019

Isadora Moreira Costa do Nascimento Nogueira

Análise da Expressão Imuno-Histoquímica de COX-2 e P53 em Meningiomas e Astrocitomas

 **Atena**
Editora

Ano 2019

2019 by Atena Editora
Copyright © Atena Editora
Copyright do Texto © 2019 Os Autores
Copyright da Edição © 2019 Atena Editora
Editora Chefe: Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira
Diagramação: Karine de Lima
Edição de Arte: Lorena Prestes
Revisão: Os Autores



Todo o conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição Creative Commons. Atribuição 4.0 Internacional (CC BY 4.0).

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores. Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Conselho Editorial

Ciências Humanas e Sociais Aplicadas

Profª Drª Adriana Demite Stephani – Universidade Federal do Tocantins
Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas
Prof. Dr. Alexandre Jose Schumacher – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Antonio Gasparetto Júnior – Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Cristina Gaio – Universidade de Lisboa
Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira – Universidade Federal de Rondônia
Prof. Dr. Edvaldo Antunes de Faria – Universidade Estácio de Sá
Prof. Dr. Eloi Martins Senhora – Universidade Federal de Roraima
Prof. Dr. Fabiano Tadeu Grazioli – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionele delle Figlie de Maria Ausiliatrice
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense
Profª Drª Keyla Christina Almeida Portela – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso
Profª Drª Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Marcelo Pereira da Silva – Universidade Federal do Maranhão
Profª Drª Miranilde Oliveira Neves – Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará
Profª Drª Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Rita de Cássia da Silva Oliveira – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Sandra Regina Gardacho Pietrobom – Universidade Estadual do Centro-Oeste
Profª Drª Sheila Marta Carregosa Rocha – Universidade do Estado da Bahia
Prof. Dr. Rui Maia Diamantino – Universidade Salvador
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

Ciências Agrárias e Multidisciplinar

Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano
Prof. Dr. Antonio Pasqualetto – Pontifícia Universidade Católica de Goiás
Profª Drª Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná
Profª Drª Diocléa Almeida Seabra Silva – Universidade Federal Rural da Amazônia
Prof. Dr. Écio Souza Diniz – Universidade Federal de Viçosa
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Profª Drª Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Prof. Dr. Jorge González Aguilera – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Júlio César Ribeiro – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas

Ciências Biológicas e da Saúde

Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás
Prof. Dr. Edson da Silva – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
Profª Drª Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Profª Drª Magnólia de Araújo Campos – Universidade Federal de Campina Grande
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande

Ciências Exatas e da Terra e Engenharias

Prof. Dr. Adélio Alcino Sampaio Castro Machado – Universidade do Porto
Prof. Dr. Alexandre Leite dos Santos Silva – Universidade Federal do Piauí
Profª Drª Carmen Lúcia Voigt – Universidade Norte do Paraná
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará
Prof. Dr. Juliano Carlo Rufino de Freitas – Universidade Federal de Campina Grande
Profª Drª Neiva Maria de Almeida – Universidade Federal da Paraíba
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)	
N778a	<p>Nogueira, Isadora Moreira Costa do Nascimento. Análise da expressão imuno-histoquímica decox-2 e p53 em meningiomas e astrocitomas [recurso eletrônico] / Isadora Moreira Costa do Nascimento Nogueira. – Ponta Grossa, PR: Atena Editora, 2019.</p> <p>Formato: PDF Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader. Modo de acesso: World Wide Web. Inclui bibliografia ISBN 978-85-7247-806-9 DOI 10.22533/at.ed.069192211</p> <p>1. Meningioma – Diagnóstico. 2. Meningioma – Tratamento. I. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDD 616.99491</p>
Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422	

Atena Editora
Ponta Grossa – Paraná - Brasil
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br

“Se o que você está percorrendo é o caminho dos seus sonhos, comprometa-se com ele.”

(Paulo Coelho)

AGRADECIMENTOS

Instituição de Ensino e Pesquisa (IEP) da Santa Casa de Belo Horizonte (SCBH), por todo o conhecimento, e órgãos financiadores (CAPES e CNPQ).

Minha orientadora, Luciene, por me mostrar o tipo de profissional que eu quero ser, pelos ensinamentos, amizade e transformações, que proporcionaram em minha mente e coração muito além das teorias.

Minha co-orientadora, Renata, por contribuir no desenvolvimento deste trabalho. Aleida, por todo o apoio na análise estatística.

Dr Gervásio, por gentilmente ceder o seu banco de dados e amostras de astrocitomas e meningiomas, por contribuir significativamente, para a realização deste estudo.

Eliane, desde o primeiro dia, por todo o companheirismo e amizade durante todo este caminho.

Bárbara, por contribuir imensamente na realização deste trabalho, muito além da iniciação científica, e por esse re-encontro da faculdade.

Raíssa, por todo o apoio na organização e estruturação do trabalho.

Rejane, minha dupla do mestrado, pelos momentos de estudos e amizade.

Meu pai, Altair, mesmo que algumas lágrimas se vertam ante a falta do seu abraço, essas não serão suficientes para apagar a certeza de estarmos juntos, em dividir a emoção de viver esse momento, sinto-o presente comigo todos os dias.

Minha mãe, Elenice por todo o apoio e carinho, por ter iluminado os meus caminhos com afeto, para que eu prosseguisse sem medo e com esperança.

Meu irmão, Eduardo pelos momentos de alegria, música e descontração.

Meu amor, Wesley por encher os meus dias de amor, tornando a minha vida mais alegre e este caminho mais leve... Amo você!

E por fim, a Deus, tudo o que eu fizer no exercício da minha profissão, seja sempre em Seu nome.

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
INTRODUÇÃO	3
CAPÍTULO 2	6
REFERENCIAL TEÓRICO	
CAPÍTULO 3	22
OBJETIVOS	
CAPÍTULO 4	23
MATERIAIS E MÉTODOS	
CAPÍTULO 5	29
RESULTADOS	
CAPÍTULO 6	37
DISCUSSÃO	
CONCLUSÕES	43
REFERÊNCIAS	44
ANEXOS	49
SOBRE A AUTORA	58

Os meningiomas e astrocitomas são tumores originados em células meningoteliais e em astrócitos, respectivamente. A compreensão das alterações celulares e moleculares envolvidas na gênese destes tumores, proporcionam um suporte para a seleção dos marcadores biológicos, bem como a COX-2 e a p53, os quais podem ser avaliados por meio de imuno-histoquímica. Esta técnica consiste na detecção de antígenos específicos em células e tecidos, mediante o seu reconhecimento por anticorpos. Com o intuito de avaliar e comparar a expressão imuno-histoquímica de COX-2 e p53 em amostras de meningiomas e astrocitomas, e correlacionando-os com a idade e o sexo dos pacientes. A amostra foi composta por espécimes cirúrgicas provenientes do Serviço de Neurologia e Neurocirurgia da Santa Casa de Belo Horizonte, no período de 2009 a 2014, perfazendo um total de 213 casos, sendo 107 meningiomas e 106 astrocitomas. O material foi incluído em parafina e foram confeccionados os microarranjos de tecidos (TMA), os quais foram submetidos a reação imuno-histoquímica, pelo método de Polímero Indireto, empregando-se os anticorpos anti-COX-2 e anti-p53. A imunomarcação para COX-2 e p53 foi positiva e de intensidade forte na maioria dos tumores, independente do subtipo tumoral. A média de idade nos tumores analisados foi maior nos meningiomas em relação aos astrocitomas. No grupo dos astrocitomas, quando analisados separadamente, a média de idade foi maior nos glioblastomas. O sexo feminino foi o mais acometido por meningiomas, enquanto nos astrocitomas o sexo masculino foi o mais freqüente. Este último apresentou uma curva de sobrevida curta, dada a agressividade inata do tumor em questão.

PALAVRAS-CHAVE: COX-2. p53. imuno-histoquímica. meningiomas. astrocitomas.

Meningiomas and astrocytomas are tumors originating from meningotheial cells and astrocytes, respectively. The understanding of the cellular and molecular changes involved in the genesis of these tumors provides support for the selection of biological markers as well as COX-2 and p53, which can be evaluated by means of immunohistochemistry. Of specific antigens in cells and tissues, upon their recognition by antibodies. In order to evaluate and compare the immunohistochemical expression of COX-2 and p53 in samples of meningiomas and astrocytomas, and correlate them with the age and sex of the patients. The sample consisted of surgical specimens from the Department of Neurology and Neurosurgery of the Santa Casa of Belo Horizonte, from 2009 to 2014, making a total of 213 cases, 107 meningiomas and 106 astrocytomas. The material was included in paraffin and were (TMA), which were subjected to the immunohistochemical reaction using the Indirect Polymer method, using anti-COX-2 and anti-p53 antibodies. Immunoblotting for COX-2 and p53 was positive and of strong intensity in most tumors, regardless of the tumor subtype. The mean age of the analyzed tumors was higher in meningiomas than in astrocytomas. In the group of astrocytomas, when analyzed separately, the mean age was higher in glioblastomas. The female sex was the most affected by meningiomas, in which astrocytomas male was the most frequent. The latter presented a short survival curve, given the innate aggressiveness of the tumor in question

KEYWORDS: COX-2. p53. meningiomas. astrocytomas. immunohistochemistry

O câncer representa um conjunto de doenças, que têm em comum, o crescimento excessivo e desordenado de células, não coordenado com àquele dos tecidos normais, e que persiste mesmo após o término do estímulo inicial (INCA, 2016).

É incontestável o fato de que o câncer constitui problema de saúde pública e, por isso, o seu controle e prevenção devem ser priorizados, uma vez que, é responsável por importante causa de mortes em todo o mundo. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o impacto do câncer na população esperado para as próximas décadas corresponderá a mais de 20 milhões de casos novos, estimados até o ano de 2025 (OMS, 2016).

De acordo com os dados do INCA, a estimativa para o Brasil, no biênio 2016-2017, aponta a ocorrência de cerca de 600 mil novos casos de câncer. Destes, estima-se que, cerca de 10.270 casos sejam oriundos do sistema nervoso central (SNC), dos quais, separados por sexo, representarão 5.440 novos casos em homens e 4.830 novos casos em mulheres. Estes valores correspondem a risco estimado de 5,50 novos casos para cada 100 mil homens e 4,68 novos casos para cada 100 mil mulheres (INCA, 2016).

A incidência anual de tumores do SNC corresponde a 10-17 novos casos para cada 100.000 indivíduos, no âmbito de tumores intracranianos; e de 1-2 novos casos para cada 100.000 indivíduos, no âmbito de tumores intramedulares (CAMBRUZZI et al., 2010).

Tumores cerebrais representam neoplasias com crescimento anômalo, originadas de células do interior do crânio, o que leva à compressão e lesão de estruturas do cérebro. Esses tumores são classificados em duas categorias: tumor cerebral primário e tumor cerebral secundário ou metastático (CINTRA, NISHIDE, NUNES, 2008).

A classificação dos tumores cerebrais primários se dá por meio da identificação das células que lhes dão origem. Desta forma, dentre os tumores do SNC, aqueles originados nas células da glia, são denominados gliomas, sendo o grupo mais comum de tumores encefálicos. Dentre os subtipos de gliomas, aqueles originados nos astrócitos são denominados de astrocitomas, sendo: astrocitoma pilocítico, astrocitoma difuso, astrocitoma anaplásico e glioblastoma (GBM), em ordem crescente

de malignidade, respectivamente. E, aqueles originados em células meningoteliais oriundas das meninges, são denominados meningiomas; os quais representam de 15% a 25% dos casos de tumores oriundos do SNC (PASQUALE et al., 2011).

Os astrocitomas de baixo grau incluem o astrocitoma pilocítico (grau I) e o astrocitoma difuso (grau II). O astrocitoma pilocítico acomete preferencialmente, crianças e adultos jovens. Entretanto, o astrocitoma difuso, acomete predominantemente indivíduos do sexo masculino, preferencialmente entre a 3ª e a 4ª décadas de vida (LOUIS et al., 2007).

Já os astrocitomas de alto grau incluem o astrocitoma anaplásico (grau III) e o GBM (grau IV). O astrocitoma anaplásico acomete, em maior proporção, homens na 4ª década de vida (LOUIS et al., 2007).

O GBM é o tumor intracraniano primário mais comum, com frequência de aproximadamente 40% desses tumores. Acomete com frequência, discretamente maior, indivíduos do sexo masculino em relação ao sexo feminino, preferencialmente, entre a 4ª e 6ª décadas de vida, representando cerca de 50% a 60% de todos os gliomas (VAINBOIM et al., 2014).

O meningioma é o segundo tumor intracraniano primário mais comum na população adulta acometendo com maior frequência indivíduos do sexo feminino, na 5ª década de vida, o que perfaz de 13% a 27% dos tumores intracranianos primários. Entretanto, nas duas primeiras décadas de vida, representam de 1% a 5% dos tumores cerebrais primários (HANEL et al., 2001, CIMINO, 2015).

A compreensão das alterações celulares e moleculares, envolvidas na gênese de meningiomas e astrocitomas, proporciona uma base para a seleção de marcadores biológicos de interesse para estes tumores. Os marcadores biológicos são macromoléculas de caráter protéico que estão presentes em tecidos, no sangue e em outros líquidos biológicos. É considerado marcador biológico tumoral ideal àquele produzido por neoplasias de uma mesma linhagem e, mesmo na presença de pequenas quantidades de células, têm seus níveis mensuráveis (VALENTE, MASSABKI, 2011; CIMINO, 2015).

Dentre as técnicas de detecção de marcadores biológicos está a imunohistoquímica, que consiste na detecção de antígenos específicos em tecidos, por meio do seu reconhecimento por anticorpos. Técnica esta que promoveu revolução diagnóstica no processo de avaliação dos tumores. Desta forma, passou a ser incorporada à rotina laboratorial, sendo item relevante nos laudos anatomopatológicos. Dentre os potenciais marcadores biológicos para tal, estão a COX-2 e a p53 (MAHZOUNI, SARMADI, 2014).

A ciclooxigenase-2 (COX-2) é a isoforma 2 das enzimas ciclooxigenases (COX), a qual está associada a processos inflamatórios, proliferação e diferenciação celular e ainda, carcinogênese. É expressa em diversas alterações patológicas do SNC, de forma relativamente frequente, sendo associada ao comportamento maligno dos tumores (SHARMA et al., 2003; MAHZOUNI, SARMADI, 2014).

A p53, fosfoproteína nuclear, atua no controle do ciclo celular, sendo responsável pela regulação da transcrição do DNA, proliferação e apoptose celular. Mutações na proteína p53 resultam em incapacidade de atuação de sua atividade reguladora negativa sobre o ciclo celular (SIROMA, BARACAT, 2006).

Marcadores biológicos têm sido estudados com o intuito de identificar os fatores que podem prever a história natural dos tumores. Entretanto, observa-se carência em relação a publicações recentes relacionadas a marcadores direcionados para os meningiomas e astrocitomas, uma vez que, os achados histológicos são limitados em prever a evolução clínica e morfológica desses tumores (VALENTE, MASSABKI, 2011).

Por meio da imuno-histoquímica, é possível obter uma melhor compreensão a respeito do comportamento e características biológicas associadas aos meningiomas e astrocitomas. Assim, poderia auxiliar na compreensão dos mecanismos envolvidos na gênese desses tipos tumorais.

2.1 Sistema Nervoso

O sistema nervoso representa a maior diversidade celular dos sistemas orgânicos do corpo humano. O tecido nervoso é constituído, principalmente, por neurônios e células da glia, os quais desempenham importante papel no suporte e controle da atividade neural. O sistema nervoso, com base em critérios anatômicos e funcionais, é dividido em sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso periférico (SNP). O SNC é envolvido por três membranas conjuntivas, denominadas meninges: dura-máter, aracnóide e pia-máter, as quais são responsáveis, principalmente, pela proteção do SNC, identificadas na Figura 1 (MACHADO, HAERTEL, 2006).

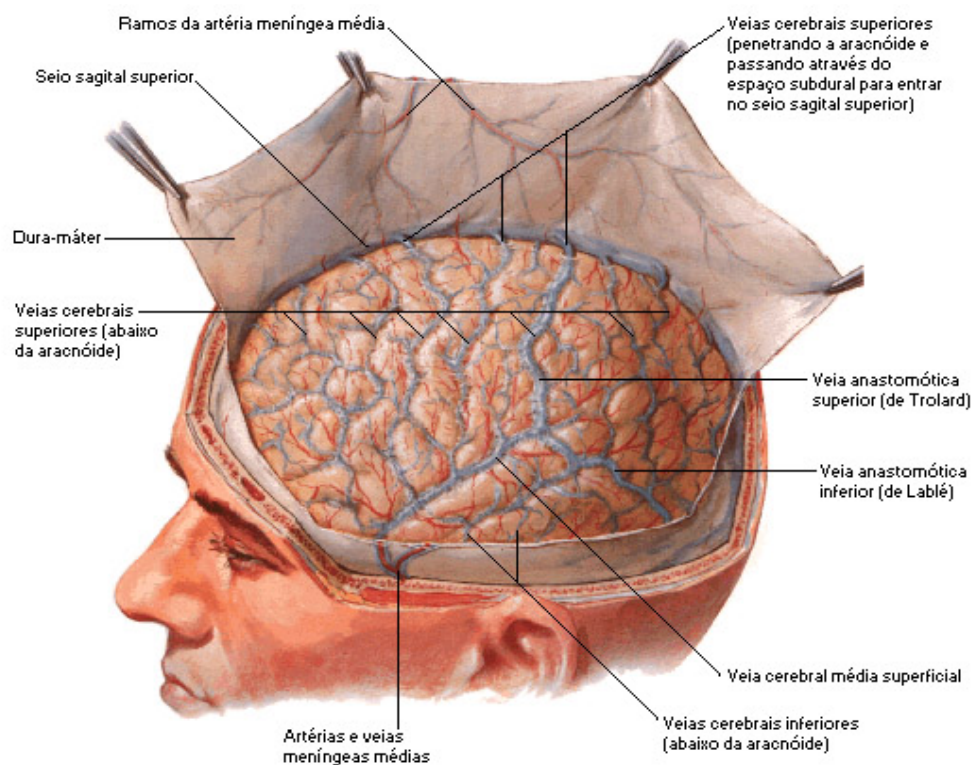


Figura 1: Meninges: Dura-máter, Aracnóide e Pia-máter

Fonte: Atlas Netter, 2000

A meninge mais externa e superficial é a dura-máter, constituída por inúmeras fibras colágenas, que a tornam mais espessa e assim, resistentes. Por esta razão, pode ser também denominada de paquimeninge. É uma membrana inervada e

vascularizada, constituída por tecido conjuntivo e pelas células meningoteliais, em sua superfície interna, apresenta dois folhetos, interno e externo. O espaço compreendido entre a dura-máter e a aracnóide é denominado espaço subdural, sendo este espaço virtual (MACHADO, HAERTEL, 2006).

A meninge mediana é a aracnoide, avascularizada, constituída por delgada membrana trabeculada, justaposta à superfície interna da dura-máter, a qual é separada pelo espaço subdural. Este espaço contém pequena quantidade de líquido, indispensável à superfície de contato com a dura-máter, evitando assim sua aderência (MACHADO, HAERTEL, 2006).

O espaço compreendido entre a aracnóide e a pia-máter é denominado espaço subaracnóideo, que contém o líquido cefalorraquidiano (LCR), sendo região de extensa ligação entre o espaço subaracnóideo do encéfalo e da medula. Filamentos transpõem-se o espaço subaracnóideo para se aderirem à pia-máter, denominados de trabéculas aracnóideas (MACHADO, HAERTEL, 2006).

Protrusões aracnóideas projetam-se para o interior dos seios venosos da dura-máter, sendo denominadas granulações aracnóideas, representadas na Figura 2. Atuam como válvula unidirecional, importante para a reabsorção do LCR, impedindo assim, a entrada de sangue no mesmo. Evolutivamente, as granulações aracnóideas, têm taxa de crescimento e desenvolvem-se de acordo com a faixa etária (MACHADO, HAERTEL, 2006).

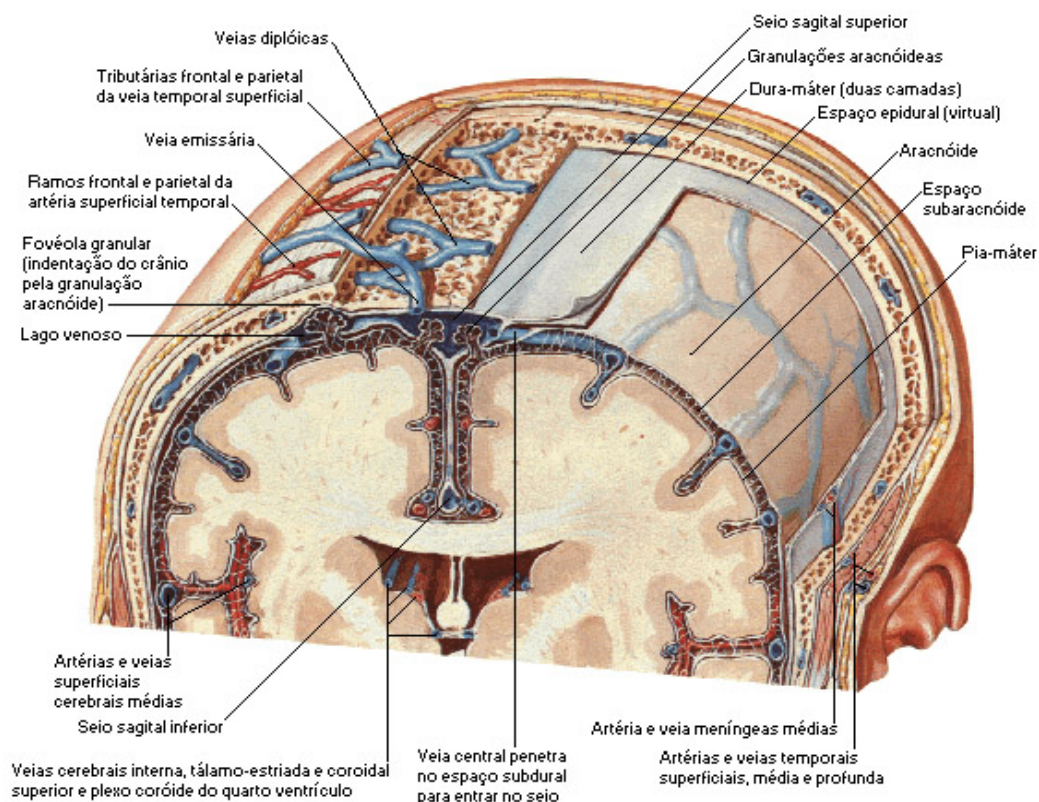


Figura 2: Granulações Aracnóideas

Fonte: Atlas Netter, 2000

A mais interna das meninges é a pia-máter, ricamente vascularizada, que adere-se estreitamente à superfície do encéfalo e da medula, embora não esteja em contato direto com estas estruturas. Constituída por camada de células meningoteliais e também por tecido conjuntivo. A aracnóide e a pia-máter, juntamente, são denominadas de leptomeninges (MACHADO, HAERTEL, 2006).

Em relação aos constituintes do sistema nervoso, os neurônios são células altamente excitáveis, responsáveis pela transmissão da informação, por meio da diferença de potencial elétrico em sua membrana, através das sinapses. Enquanto que, as células da glia são constituídas por astrócitos (50%), oligodendrócitos (40%), microglia (5%) e células ependimárias (5%), e têm como função proporcionar um suporte estrutural e funcional para os neurônios (GOMES, TORTELLI, DINIZ, 2012).

Os astrócitos são células de formato estrelado, que emitem prolongamentos ao longo do seu corpo celular, observado por imunofluorescência na Figura 3. Constituem as células gliais mais abundantes do SNC, sendo a principal fonte de moléculas de matriz extracelular para os neurônios, são responsáveis por desempenhar uma série de funções essenciais para o auxílio da homeostase do SNC (STIPURSKY et al., 2010).

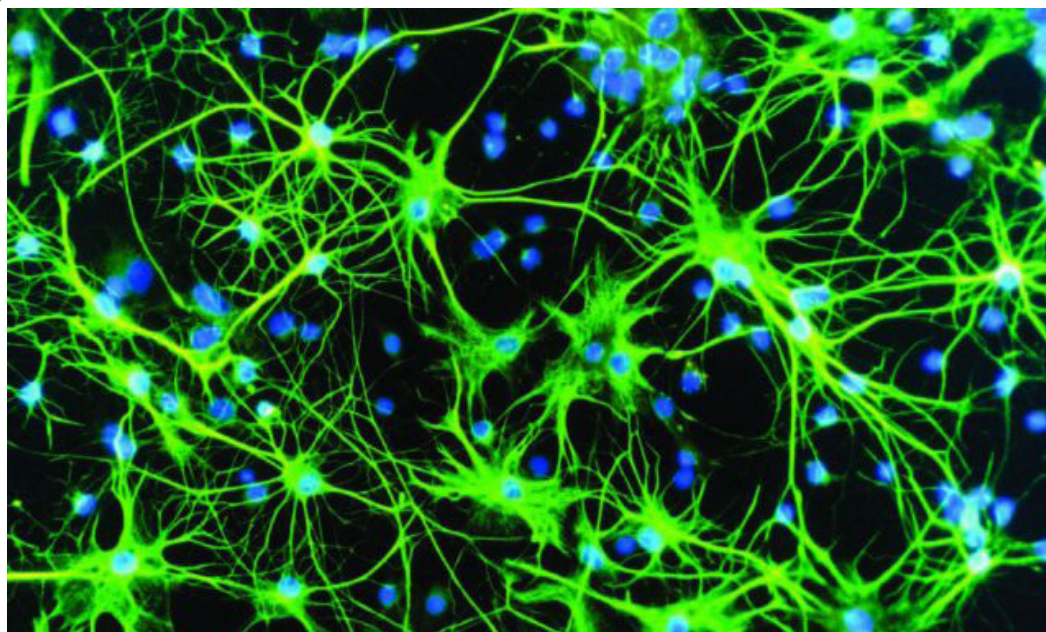


Figura 3: Astrócitos por Imunofluorescência

Fonte: <http://www.astropt.org>

Devido à complexidade morfológica e funcional inerentes ao SNC, o fundamento da estrutura e disposição das meninges e das células da glia é de extrema relevância, não somente para a compreensão de seu importante papel de proteção do SNC e sustentação neuronal, respectivamente (STIPURSKY, et al., 2010). Uma vez que, células gliais compreendem componentes celulares ativos no funcionamento fisiológico e patológico do SNC, inclusive associadas às meninges, podem ser frequentemente acometidas por processos patológicos, como: os

meningiomas e astrocitomas.

2.2 Meningiomas

Historicamente, em 1915, Harvey Cushing, médico e neurocirurgião norte-americano, discorreu que os tumores das meninges são oriundos de células da aracnóide. Posteriormente, em 1922, Cushing propôs o termo “meningioma” para então nomeá-los, termo este que alcançou aceitação global (BHAT et al., 2014).

O meningioma é um tumor originário de células meningoteliais, correspondentes a fibroblastos da aracnóide, comumente encontradas nas leptomeninges, aderidos à superfície interna da aracnóide. No entanto, qualquer região próxima às leptomeninges, é potencialmente sítio de origem para este tumor, sendo mais comum em locais onde se têm granulações aracnóides (BORIN, 2008).

A classificação de tumores cerebrais baseia-se na premissa de que cada tipo de tumor é o resultado do crescimento anômalo de um tipo celular em específico. Com o intuito de unificar a nomenclatura de tumores do SNC, a OMS classifica-os periodicamente. Sendo assim, a classificação da OMS (2007) para meningiomas é baseada nos aspectos morfológicos microscópicos associados ao prognóstico, o que equivale à classificação mais amplamente utilizada e difundida, categorizando os meningiomas em três graus distintos: I, II e III, com 15 subtipos histológicos (COMMINS, ATKINSON, BURNETT, 2007).

Oficialmente, a classificação da OMS (2016) de tumores do SNC representa atualização da 4ª edição de 2007. Em referência à classificação de meningiomas, esta se manteve de acordo com a classificação OMS (2007), sem grandes modificações (LOUIS et al., 2016).

Majoritariamente, os meningiomas são considerados benignos e assim, são categorizados como grau I, correspondendo a 9 subtipos histológicos, e representando melhor prognóstico. No entanto, alguns tipos histológicos são associados a clínica menos favorável, e são classificados como grau II e grau III, o que indica pior prognóstico e malignidade, respectivamente, contendo 3 subtipos histológicos cada um, representados na Tabela 1 (KUNIMATSU et al., 2016).

Grau OMS (2007)	Subtipos histológicos de meningiomas
I	Meningioma Meningotelial
I	Meningioma Fibroso
I	Meningioma Transicional
I	Meningioma Psamomatoso
I	Meningioma Angiomatoso
I	Meningioma Microcístico
I	Meningioma Linfoplasmocítico
I	Meningioma Secretor
I	Meningioma Metaplásico
II	Meningioma Atípico

II	Meningioma de Células Claras
II	Meningioma Cordóide
III	Meningioma Anaplásico
III	Meningioma Rabdóide
III	Meningioma Papilífero

Tabela 1: Subtipos histológicos de meningiomas de acordo com a Classificação da OMS (2007)

Fonte: Perry, 2010.

Dentre os meningiomas grau I, os subtipos histológicos meningotelial, fibroso e transicional estão entre os mais frequentes (KUNIMATSU et al., 2016).

O meningioma meningotelial é caracterizado por apresentar lóbulos demarcados por fibras colágenas. Apresenta células uniformes, com núcleo oval, cromatina delgada, citoplasma amplo e róseo, com pseudoinclusões intranuclares. Também, pode ser denominado sincicial, apropriadamente designado, por possuir células em espiral, aglomeradas em grupos compactos. As membranas celulares não são bem visíveis e delimitadas, apresentando limites celulares imprecisos. É o subtipo histológico mais frequente em meningiomas (Figura 4) (PERRY, MAWRIN, 2010).

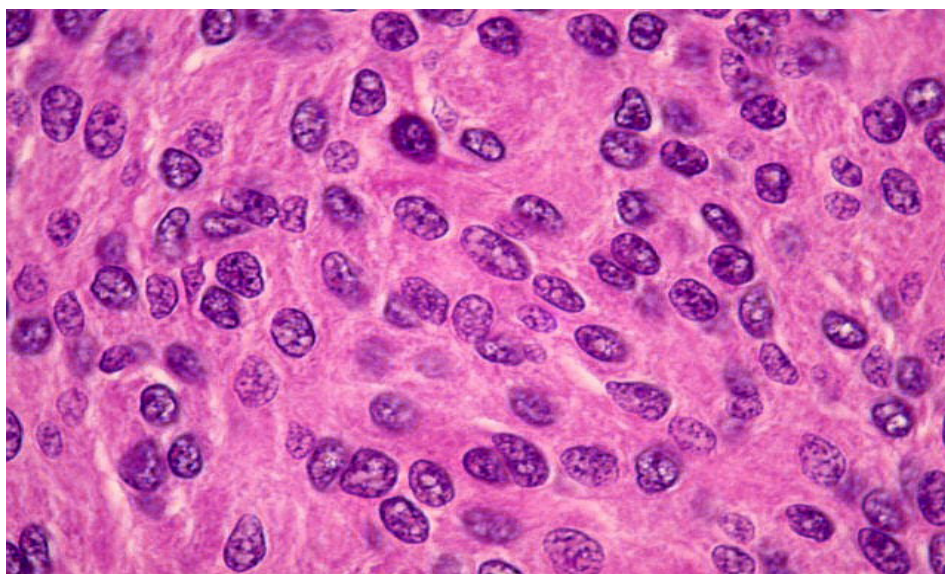


Figura 4: Meningioma Meningotelial

As células formam agrupamentos, arrajam-se paralelamente, em padrão que se assemelha um epitélio. Redemoinhos e corpos psamomatosos são excassos.

Fonte: Atlas Unicamp, 2010

O meningioma fibroso é caracterizado por apresentar células alongadas fusiformes, que dispõem-se em feixes direcionados de forma equidistante, em meio à uma matriz rica em fibras colágenas. Há uma menor celularidade com predominância de tecido conjuntivo, sendo o segundo subtipo histológico mais frequente em meningiomas (Figura 5) (PERRY, MAWRIN, 2010).

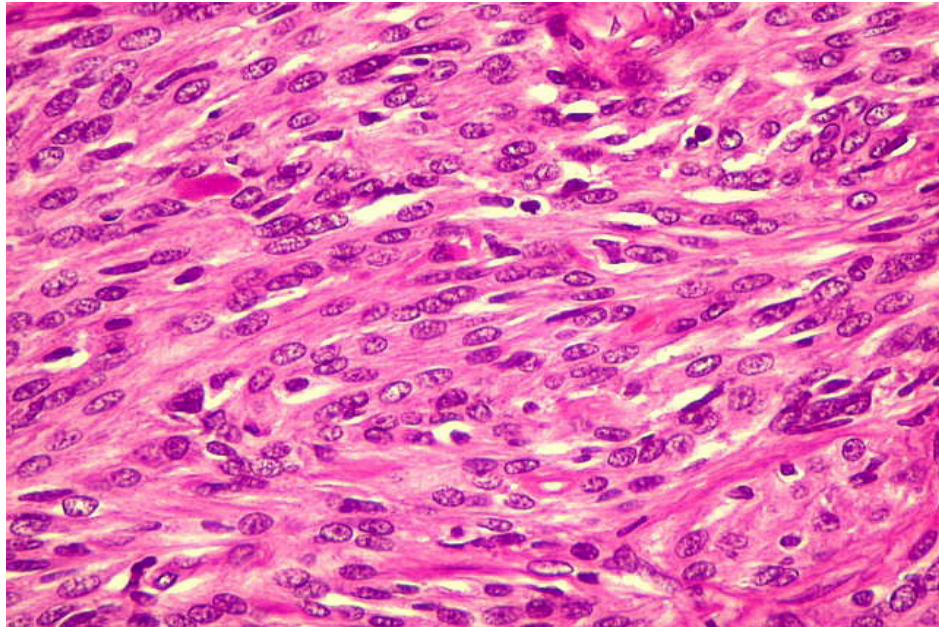


Figura 5: Meningioma Fibroso

As células dispõem-se em feixes, com núcleos em oval e presença de fibras colágenas.

Fonte: Atlas Unicamp, 2010.

O meningioma transicional é caracterizado por apresentar células alongadas que arranjam-se em feixes multidirecionados, com características comuns aos subtipos histológicos meningotelial e fibroso. Ainda, é comum a presença de redemoinhos e corpos psamomatosos, sendo o terceiro subtipo histológico mais frequente em meningiomas (Figura 6)(PERRY, MAWRIN, 2010).

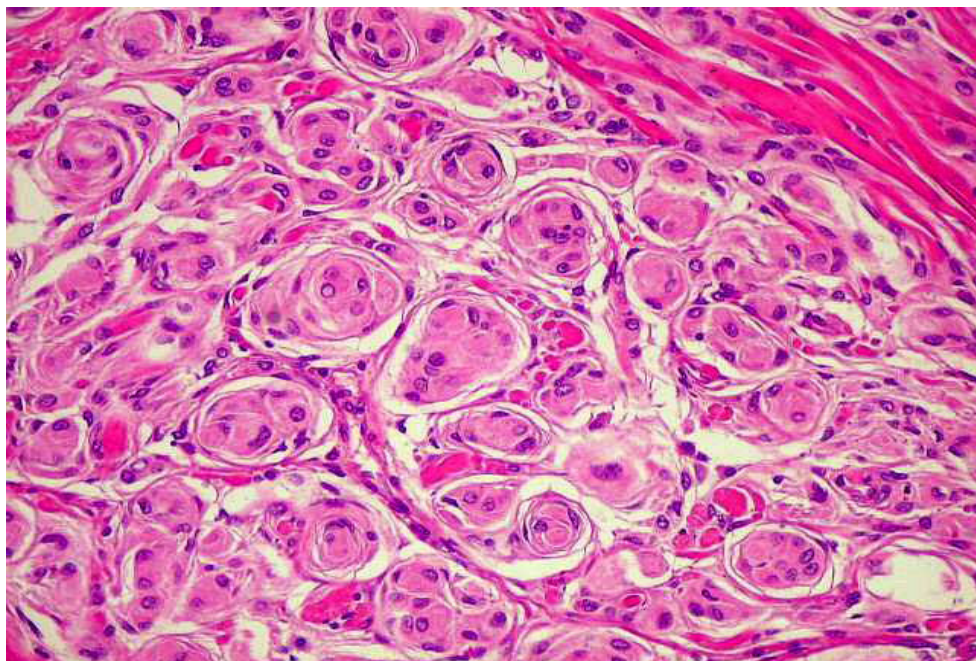


Figura 6: Meningioma Transicional

Contém os padrões histológicos Meningotelial e Fibroso, e a transição entre ambos. Redemoinhos e corpos psamomatosos são frequentes.

Fonte: Atlas Unicamp, 2010.

Os meningiomas apresentam incidência distinta em relação aos diferentes subtipos histológicos, quando avaliada a localização anatômica e a faixa etária comprometida. Para que se tenha estabelecimento seguro da incidência, enfatiza-se uma importante correlação dos dados histológicos com alguns achados clínicos, como: idade, gênero, localização anatômica e características dos tumores com o auxílio da imuno-histoquímica (PIMENTEL, et al., 2015).

Os meningiomas compreendem tumores intracranianos primários mais comuns do SNC, correspondendo à aproximadamente 30% de todos os casos do SNC. Sabe-se que, meningiomas grau I estão associados à forte predileção em indivíduos do sexo feminino. Diferentemente, os meningiomas grau II e III, subtipos histológicos associados às formas mais agressivas da doença, e que têm maior predileção por indivíduos do sexo masculino (ENDO et al., 2016).

A incidência dos subtipos histológicos em meningiomas é descrita na Tabela 2. A mensuração da prevalência em meningiomas torna-se difícil tarefa, pelo fato de, muitas vezes ter-se quadro assintomático e assim, o diagnóstico é feito incidentalmente (MESKAL et al., 2016).

Incidência (%)	Grau OMS (2007)	Subtipo histológico
57,8%	I	Meningioma Meningotelial
11,1%	I	Meningioma Fibroso
10,4%	I	Meningioma Transicional
3,8%	I	Meningioma Psamomatoso
1,6%	I	Meningioma Angiomatoso
1,6%	I	Meningioma Metaplásico
1,5%	I	Meningioma Secretório
1,1%	I	Meningioma Linfoplasmocítico
0,3%	I	Meningioma Microcístico
3,4%	II	Meningioma Atípico
1,4%	II	Meningioma Cordóide
1,1%	II	Meningioma de Células Claras
2,3%	III	Meningioma Rapdóide
1,4%	III	Meningioma Anaplásico
1,1%	III	Meningioma Papilífero

Tabela 2: Incidência dos subtipos histológicos de meningiomas

(Fonte: KUNIMATSU *et al.*, 2016)

As manifestações clínicas são dependentes da localização anatômica e da taxa de crescimento do tumor. Uma vez que, majoritariamente, os meningiomas crescem lentamente, o que favorece o aparecimento tardio dos sintomas. Desta forma, os pacientes são geralmente assintomáticos e a descoberta do tumor é um achado incidental. Qualquer sinal ou sintoma que se desenvolva geralmente é secundário à compressão de estruturas subjacentes (CASARES et al., 2011).

A alta complexidade dos tumores do SNC está relacionada à sua abordagem

e localização anatômica, uma vez que, são responsáveis por importante causa de morbidade e/ou mortalidade em indivíduos acometidos. Para uma importante conjectura prognóstica, a mesma pode ser obtida através de avaliação anatomopatológica, por meio de realização de biópsia do tumor. Desta forma, a escolha da terapia a ser instituída está relacionada ao comportamento tumoral, predizendo o prognóstico. A classificação da OMS (2007) é particularmente útil a este respeito (JOHANNESSE et al., 2004, CASARES et al., 2011).

O prognóstico para pacientes com meningiomas, sofreu uma mudança desde a década de 1960. Desta forma, é possível observar que nas últimas duas décadas, houve acréscimo no tempo de sobrevivência, concomitantemente com decréscimo na taxa de mortalidade pós-operatória. Neste sentido, os elementos prognósticos com maior relevância incluem: a localização do tumor, o grau histológico, marcadores biológicos tumorais e a extensão da ressecção cirúrgica. No entanto, o elemento prognóstico de maior relevância para meningiomas ainda constitui o fenótipo histológico (YANG et al., 2016; LINSLER et al., 2016).

2.3 Astrocitomas

Historicamente, em 1846, após análise em tecidos humanos *post mortem*, Virchow, foi o patologista responsável por descrever a neuroglia, evento este fundamental para o estabelecimento do conceito atual da classificação de tumores do SNC. Em 1893, Von Lenhossek, originalmente, introduziu o termo astrócito para designar àquelas células gliais com o formato em estrela. Posteriormente, em 1949, Kernohan elaborou o sistema para a classificação de gliomas de acordo com a graduação em ordem crescente de malignidade (KETTENMANN, RANSOM, 2005).

Glioma é o termo designado para tumores originários das células da glia, constituindo assim, o grupo mais comum de tumores encefálicos primários. Os gliomas são representados pelos astrocitomas, oligodendrogliomas, ependimomas e tumores da micróglia, sendo os astrocitomas os subtipos mais frequentes (ROBBINS, COTRAN, 2010).

Os astrocitomas são subdivididos em escala de quatro graus, sendo I, II, III e IV, correspondendo à astrocitoma pilocítico, astrocitoma difuso, astrocitoma anaplásico e GBM, respectivamente, sendo de ordem crescente de acordo com o grau de agressividade e malignidade. Esta subdivisão, está relacionada às características histomorfológicas, como: atipia nuclear, mitoses, proliferação endotelial e necrose (ROBBINS, COTRAN, 2010).

2.3.1 Astrocitoma Pilocítico

O astrocitoma pilocítico (grau I) representa, aproximadamente, 15% dos tumores do SNC. Majoritariamente, acomete crianças e adultos jovens de 0 a 20

anos, o qual ainda, pode ser associado a ocorrência de Neurofibromatose tipo 1 (NF1). Deste modo, raramente, desenvolvem-se em faixa etária acima da quinta década de vida (MATJA et al., 2016).

Quanto à sua localização, esta ocorre, predominantemente, no cerebelo, onde dois terços destes tumores estão localizados. No entanto, pode ser encontrado em outros locais do SNC, bem como, hemisférios cerebrais, tronco encefálico e medula, sendo capaz de provocar manifestações neurológicas variáveis (TUREL, KIEHL, GENTILI, 2016).

O astrocitoma pilocítico constituium tumor circunscrito, bem diferenciado, com baixa a moderada celularidade, sendo caracterizado por exibir padrão histológico bifásico, com peculiaridades que se assemelham tanto a padrões pilocíticos, quanto a protoplasmáticos. No que se refere ao primeiro, este é, constituído por astrócitos bipolares com extensos prolongamentos e inúmeras fibras de Rosenthal, estruturas hialinas alongadas, em meio a matriz fibrilar, com maior compactação. E ao que se refere ao último, este é constituído por astrócitos multipolares, entretanto, com curtos prolongamentos em meio a matriz com a presença de microcistos e corpúsculos granulares, com menor compactação (BURGER et al., 2000).

Trata-se de um tipo tumoral que contém lesões não infiltrativas, com baixo potencial proliferativo e ausência de atipias nucleares, mitoses, proliferação endotelial ou necrose. Em razão do crescimento tumoral lento, associado à lesão circunscrita, normalmente, tem-se bom prognóstico. Uma vez que, após ressecção cirúrgica, há baixo risco de recorrência, devido ao comportamento tumoral não infiltrativo (FIECHTER et al., 2016).

2.3.2 Astrocitoma Difuso

O astrocitoma difuso (grau II) representa de 10 a 15% dos tumores originários de astrócitos. Majoritariamente, acomete as faixas etárias compreendidas entre, a terceira e quarta décadas de vida, com maior predileção por indivíduos do sexo masculino. Apresenta, preferencialmente, localização supratentorial, nos lobos frontal e temporal (LOUIS et al., 2007).

Histologicamente, é constituído por elevado grau de diferenciação, com células que se assemelham a astrócitos normais ou patológicos. Entretanto, pode-se apresentar características fibrilares, protoplasmáticos ou gemistocísticos, sendo capazes de estarem associadas em uma mesma espécie, ou com predomínio de um destes (BURGER et al., 2000).

Usualmente, é constituído por lesões infiltrativas, com a presença de atipias nucleares, ausente ou baixo índice mitótico, e ausência de proliferação endotelial ou necrose. Apresenta má delimitação de suas extremidades, o que perfaz a ocorrência de potenciais recidivas e/ou possível progressão para níveis superiores de malignidade. Apesar de se ter, aparentemente, comportamento indolente, o

prognóstico é reservado e incerto, sendo influenciado à extensão do tecido residual e a essência infiltrativa(FIECHTER et al., 2016).

2.3.3 Astrocitoma Anaplásico

O astrocitoma anaplásico (grau III), representa 4% dos tumores do SNC, e perfaz 10% dentre os gliomas, acomete, preferencialmente, indivíduos do sexo masculino, na quarta década de vida (LOUIS et al., 2007).

É constituído por lesões histológicas infiltrativas, com alto índice mitótico e a presença de atipias nucleares, com maior celularidade. Desta forma, é conferido ao tumor, potencial maior de agressividade, e assim, portanto, malignidade (FIECHTER et al., 2016).

O estabelecimento do prognóstico pode ser instituído, através da análise da faixa etária comprometida, a extensão da ressecção cirúrgica e a manutenção da função neurológica. Uma vez que, o tratamento associado entre agentes quimioterápicos à radioterapia, após a ressecção cirúrgica, constitui de forma positiva, aumento asobrevida (YANG et al., 2017).

2.3.4 Glioblastoma Multiforme

O GBM constitui a variante mais comumente encontrada e letal de tumor encefálico, representa aproximadamente 40% das neoplasias primárias provenientes do SNC, e cerca de 50% dos subtipos de gliomas. De acordo com a OMS, é classificado na escala de astrocitomas como grau IV, sendo considerado tumor maligno. Localiza-se, preferencialmente, nos hemisférios cerebrais, sendo distribuídos pelos lobos cerebrais. Apresenta-se, com discreta predileção em indivíduos do sexo masculino, em termos de incidência, com uma proporção de 1,5:1, em relação ao sexo feminino (VAINBOIM et al., 2014).

Segundo dados do INCA, no biênio de 2016-2017, dos 10.270 novos casos de neoplasias oriundas do SNC, 2 a 4 mil casos correspondem ao GBM. Assim, apresenta-se como a neoplasia primária supratentorial mais frequente na população adulta, apresentando pico de incidência entre a quarta e a sexta década de vida. Entretanto, de forma infrequente, pode ocorrer na infância, na primeira década de vida (HERRERA et al., 2009).

A classificação de tumores do SNC, mais difundida e aceita, corresponde à 4ª edição da OMS (2007). No entanto, atualmente, de acordo com a mais recente classificação desse órgão (2016), os GBM estão listados no grupo de tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos, refletindo o seu comportamento altamente maligno. Desta forma, os GBM são subdivididos em glioblastoma IDH-selvagem e glioblastoma IDH-mutado. A IDH equivale à enzima isocitrato desidrogenase, e constitui importante grupo de proteínas, responsáveis por participarem do

metabolismo oxidativo do organismo (LOUIS et al., 2016).

Os subtipos IDH-1 e IDH-2, quando são acometidos por mutações, associam-se à estratificação e diferenciação dos subtipos de GBM, diferenciando-os em primário e secundário, segundo a OMS. O GBM primário e o secundário desenvolvem-se através de vias genéticas distintas, embora mantenham-se histomorfologicamente indistinguíveis ao estabelecimento do diagnóstico. Desta forma, a presença ou ausência da mutação envolvendo a enzima IDH em GBM auxilia na escolha terapêutica, apresentando um importante valor prognóstico. Uma vez que, a presença da mutação evidencia melhor prognóstico, com maior tempo de sobrevida (TRINDADE et al., 2012).

Morfologicamente, o GBM é extremamente variável, sendo um tumor altamente heterogêneo e angiogênico, o diagnóstico é estabelecido por meio de análise histológica. No entanto, devido à heterogeneidade tumoral, este é potencial fator que dificulta o diagnóstico em alguns casos. Apresenta-se com elevada taxa proliferativa e migratória, com ausência de apoptose, tornando-o um tumor altamente agressivo (MONTGOMERY et al., 2015).

O padrão histológico destes tumores caracteriza-se pelo pleomorfismo celular, presença de atipias nucleares, numerosas mitoses típicas e atípicas, proliferação vascular, áreas de necrose e alta celularidade. As células neoplásicas arranjam-se ao longo das superfícies necróticas, de forma irregular, dispostas em meio à matriz, o que resulta em padrão histológico comumente encontrado em GBM, denominado de pseudopaliçada (Figura 7). As células neoplásicas são, predominantemente, fusiformes e não se assemelham a astrócitos, o que o caracteriza como tumor pouco diferenciado, com elevado grau anaplásico (KLEIHUES E CAVENEE, 2000).

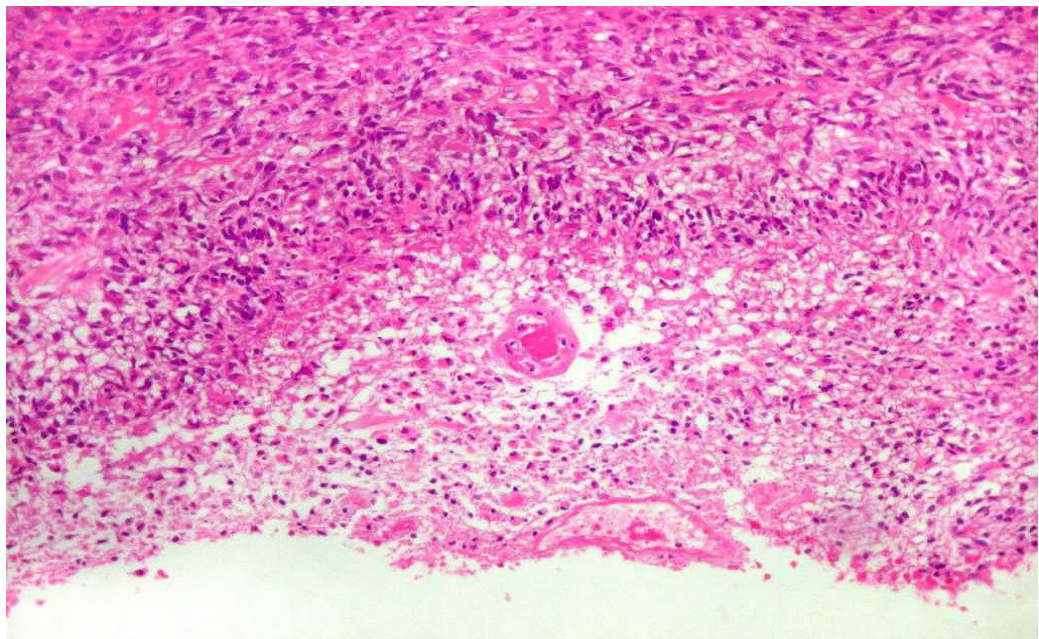


Figura 7: Glioblastoma Multiforme

Alto pleomorfismo celular, com hipercelularidade, sendo comum a ocorrência de pseudopaliçada.

Fonte: Atlas Unicamp, 2010.

Normalmente, o início das manifestações clínicas é abrupto, e está intimamente relacionado à localização e extensão tumoral, associados à taxa de crescimento do tumor. O quadro de déficit neurológico está relacionado à topográfica e extensão da lesão provocada pelo tumor, sendo comum a ocorrência de cefaleia, náusea, alterações no nível de consciência e crises convulsivas. A hipertensão crânica ocorre em decorrência do rápido crescimento tumoral, o que gera efeito compressivo no crânio (GRANT, 2004).

Recentemente, tem-se alcançado avanços em relação à terapêutica de GBM, através da instituição do tratamento concomitante de radioterapia e agentes quimioterápicos, aliados à ressecção cirúrgica. Ainda assim, a expectativa de vida permanece baixa em razão da natureza infiltrativa associada ao rápido crescimento tumoral, limitando assim a eficácia terapêutica. Com sobrevida média de apenas 15 meses após o diagnóstico estabelecido, e com expectativa média de vida de aproximadamente 2 anos. O tratamento concomitante é responsável por reduzir o volume tumoral, entretanto, não é capaz de modificar o comportamento natural agressivo da doença (BENNETT et al., 2016).

Porquanto, os mecanismos de resistência terapêutica associados à agressividade tumoral inata oriundo do GBM apresentam-se como o pior prognóstico entre todos os gliomas. Menos de 5% dos pacientes permanecem vivos, resultando em incapacidade progressiva e óbito (MESKAL et al., 2016).

Uma das principais vantagens do TMA é que possibilita a análise simultânea de grande número de espécimes, de maneira eficaz, permitindo o bom desempenho de ensaios, dentre eles, a imuno-histoquímica. Desta forma, através do TMA, centenas de fragmentos representativos de tecidos e/ou tumores são incluídos em apenas uma única lâmina para o ensaio, e análise, (JAWHAR, 2009; DAKO, 2013).

2.4 Microarranjos de tecidos - TMA

Historicamente, em 1986, *Battifora* propôs novo método de arranjo de amostras teciduais e/ou tumorais em matriz, denominado *Multi tumor tissue block* (MTTB). Responsável por retirar fragmentos teciduais e/ou tumorais incluídos em blocos de parafina que são cortados na forma de cilindros, e reincluídos em novo bloco de parafina, sendo dispostos paralelamente. No entanto, não se tinha a identificação dessas amostras teciduais e/ou tumorais, sendo a técnica realizada em sequência aleatória (ALMEIDA et al., 2008).

Posteriormente, em 1998, Kononen e colaboradores, foram responsáveis por aprimorarem este método, denominado de *tissue micro array* (TMA), ou seja, microarranjos de tecido. Utilizaram-se de dispositivo cilíndrico mecânico, com mecanismo em que se retirava os cilindros e, posteriormente montava-se novo bloco já pré-moldado e vazado. Desta forma, tem-se a confecção de novo bloco de parafina receptor, contendo fragmentos cilíndricos de inúmeras amostras teciduais e/ou

tumorais, obtidas a partir de centenas de blocos de parafina doadores. Os cilindros tumorais são dispostos neste novo bloco receptor, o qual segue-se ordenação já predeterminada para tal (ANDRADE et al., 2007).

Para a confecção do TMA segue-se várias etapas. Inicialmente, tem-se a seleção de amostras representativas teciduais e/ou tumorais de interesse, provenientes do bloco de parafina doador. Previamente, é feita a escolha de uma matriz adequada para a realização do processo. Posteriormente, a construção de novo bloco de parafina receptor. Por fim, tem-se a montagem do novo bloco com os fragmentos das amostras teciduais e/ou tumorais de interesse selecionadas e com isso, é realizada a análise do mesmo, segundo a Figura 8 (ANDRADE et al., 2007).

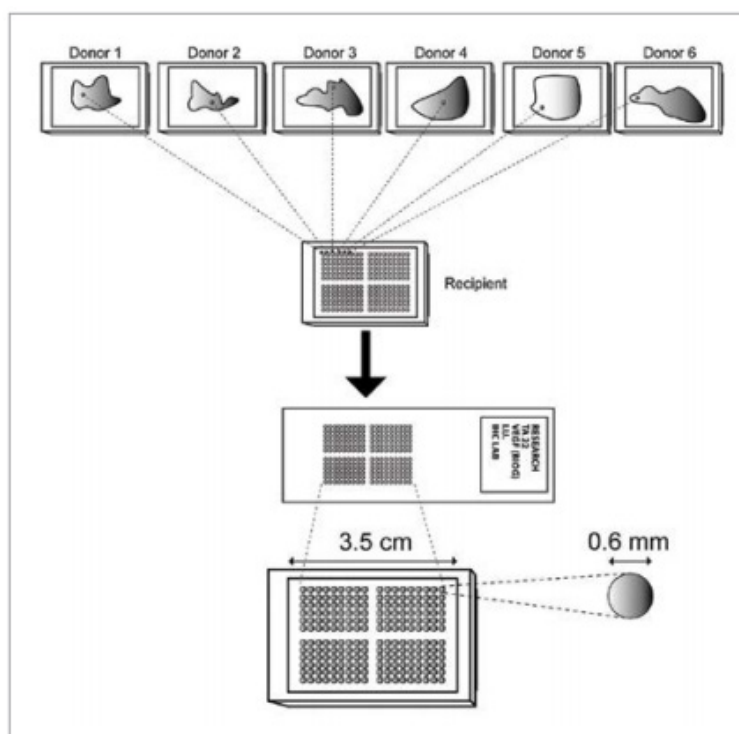


Figura 8: Princípio da análise do Microarranjos de tecidos (TMA)

Fonte: Dako, 2013

Através da análise simultânea dos espécimes, obtêm-se enorme economia de tempo de técnica, de reagentes e de análise. E ainda, permite a uniformização das reações, o que facilita a interpretação dos resultados obtidos. Uma vez que, os fragmentos teciduais e/ou tumorais são submetidos ao mesmo tratamento, de maneira homogênea, garantindo uniformidade experimental. Desta forma, variáveis que poderiam ocorrer em etapas importantes da imuno-histoquímica como recuperação antigênica, tempo de incubação de anticorpos, temperaturas e outros são padronizadas uniformemente diminuindo os vieses, devido à disposição do TMA (JUNIOR et al., 2010, DAKO, 2013).

As identidades das amostras de tecidos e/ou tumores são registradas e mapeadas, para cada cilindro no bloco de parafina receptor, ou seja, o TMA. Assim, um mapa detalhado é fornecido, para serem apoiadas à informação clínica e

doenças correspondentes de cada amostra utilizada. Para otimização da técnica, insere-se mais de um fragmento representativo da mesma amostra tecidual e/ou tumoral, caso haja o descolamento de alguma amostra, durante a realização da imuno-histoquímica, representado na Figura 9 (DAKO, 2013).

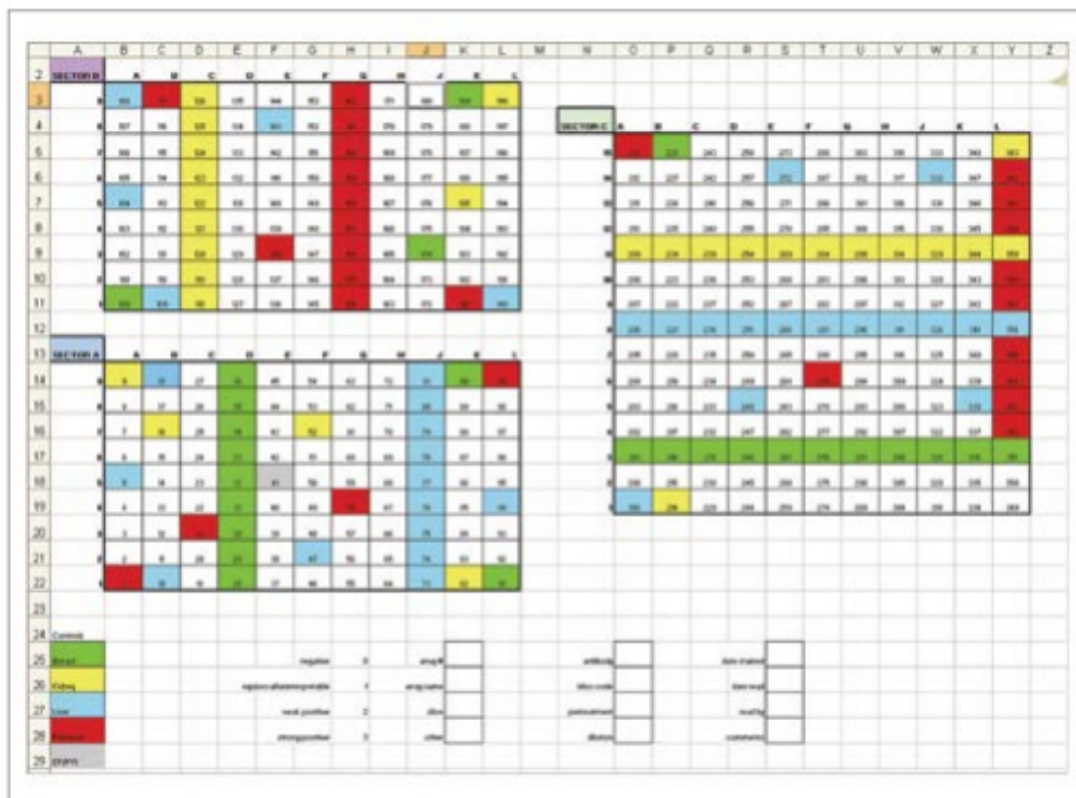


Figura 9: Mapa representativo do Microarranjos de tecidos (TMA)

Fonte: Dako, 2013.

O TMA desponta como uma importante técnica no âmbito de pesquisas científicas, na transição dos resultados da pesquisa básica para a aplicação clínica, com forte impacto positivo. Com o uso da imuno-histoquímica, em única lâmina, proveniente do TMA, é possível identificar a expressão de determinados marcadores biológicos em inúmeras amostras de tecido e/ou tumores, ao custo de apenas uma única reação. Desta forma, tem-se o potencial de acelerar significativamente as reações, sendo ferramenta prática e eficaz. A análise de grande número de amostras de tecidos e/ou tumores através de técnicas convencionais são lentas e dispendiosas (ANDRADE et al., 2007).

2.5 COX-2

As ciclooxigenases (COX) são as primeiras enzimas oxidases envolvidas no processo de síntese fisiológica de prostaglandinas (PGs), o que ocorre a partir do ácido araquidônico. Contém 3 isoformas (COX-1, COX-2 e COX-3), sendo ambas derivadas de genes distintos, mas que, em suas estruturas apresentam 60% de

homologia (MATSUYAMA, YOSHIMURA, 2009).

A COX-2 é codificada pelo gene PTGS2 localizado no cromossomo 1q (locus q25.2-q25.3), com 70 kDa. Fisiologicamente, está ausente ou expressa em mínimas quantidades nos tecidos normais. Constitui enzima inflamatória, sendo induzida a partir de estímulos pró-inflamatórios, que modulam estados inflamatórios agudos e/ou crônicos, e mitogênicos (BUCCOLIERO, et al., 2007).

Em processos pré-malignos e malignos, a COX-2 tem a sua super expressão reportada, sendo responsável por estimular a angiogênese e a inibição da apoptose, propiciando assim, o crescimento tumoral. Desta forma, é capaz estimular a carcinogênese, por catalisar a síntese de mutágenos associada ao decréscimo do índice apoptótico, corroborando assim, para o aumento do potencial de invasão e metástases em tecidos adjacentes (BUCCOLIERO, et al., 2007).

A superexpressão das isoformas COX-1 e COX-2, recentemente, foram reportadas, em amostras tumorais de gliomas e meningiomas. Majoritariamente, localiza-se em células tumorais e em macrófagos, o qual é associada ao grau patológico tumoral (NATHOO, BARNETT, GOLUBIC, 2004).

2.6 p53

A p53 é uma fosfoproteína nuclear, essencial para a manutenção da integridade e estabilidade do material genético, uma vez que, atua no controle do ciclo celular, essencial para a viabilidade das células. p53 é codificada pelo gene TP53, importante supressor tumoral, localizada no cromossomo 17 (locus 17p13.1), constituída por 375 aminoácidos, com 53 kDa em sua estrutura (BORRESEN-DALE, 2003).

Fisiologicamente, a proteína p53 selvagem está presente no núcleo em células normais, e tem-se meia vida reduzida, a qual se mantém expressa por apenas 20 minutos, em razão de ser rapidamente degradada pela ação de proteínas nos proteossomos. No entanto, a p53 mutada tem a sua conformação estrutural alterada, evitando o processo de degradação por proteínas, o que resulta no acúmulo de sua concentração nas células, sendo passível de detecção por técnicas imunohistoquímicas (PASQUALE et al., 2011).

A persistência de p53 mutada pode refletir um possível evento carcinogênico, em resposta ao dano persistente ao DNA, associado à sua super expressão. A mutação protéica pode ser sugestiva de possível mutação gênica, embora que, para a confirmação é necessário realizar o sequenciamento (GARAY et al., 2003).

A p53 é ativada como resposta a sinais de dano celular, sendo responsável por promover a parada do ciclo celular na fase G1, até que se complete o reparo ao DNA. Isto ocorre, através da ativação do sistema de reparo, no intuito de impedir que aquele dano celular seja perpetuado nas células filhas. No entanto, se este reparo ao DNA não for finalizado de forma eficiente, a p53 induz a apoptose celular, e ainda, promove *check point* na fase S para G2. (NARLA, et al., 2014).

Há cerca de poucas décadas, a p53 tornou-se importante ferramenta no âmbito das pesquisas, devido à sua relevância para o câncer. Uma vez que, tem proporcionado melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na carcinogênese em diferentes neoplasias (FETT-CONTE, SALLES, 2002).

O gene TP53, quando mutado, associa-se à formação e ao desenvolvimento tumoral, uma vez que, o déficit funcional da p53 é determinante na progressão tumoral em neoplasias do SNC, como em meningiomas e astrocitomas (ZHAO et al., 2015).

Os achados histopatológicos em meningiomas e astrocitomas são limitados em prever a evolução clínica e morfológica desses tumores. Recentemente, discorre de um grande interesse na identificação de potenciais marcadores biológicos. Desta forma, o estudo dos marcadores biológicos COX-2 e p53 através da imuno-histoquímica poderia auxiliar na compreensão dos mecanismos envolvidos na gênese desses tipos tumorais, e ainda na possível identificação de potenciais alvos moleculares para otimização da terapêutica a ser instituída.

3.1 Objetivo Geral

Avaliar e comparar a expressão de COX-2 e p53 por imuno-histoquímica, em amostras de meningiomas e astrocitomas

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a idade e sexo dos pacientes com meningiomas e astrocitomas
- Correlacionar a expressão imuno-histoquímica de COX-2 e p53 com a idade e sexo dos pacientes
- Avaliar a sobrevida em pacientes com glioblastomas

4.1 Seleção de casos

Trata-se de um estudo retrospectivo transversal. Os casos foram selecionados a partir de espécimes cirúrgicas incluídas em parafina, contendo amostras de tumores cerebrais, obtidos a partir de ressecção cirúrgica, realizadas no Serviço de Neurologia e Neurocirurgia do Hospital Santa Casa de Belo Horizonte, Minas Gerais, no período entre 2009 à 2014, sob a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da SCBH (CEP/SCBH) n 019/2010. O Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi obtido dos pacientes e/ou responsáveis.

As amostras tumorais, colhidas durante ressecção cirúrgica, foram acondicionadas em formalina à 10% e enviadas ao Departamento de Patologia da Santa Casa de Belo Horizonte, sendo alocadas em blocos incluídos em parafina, após fixação no formol, para estudo histopatológico. Todas as amostras foram diagnosticadas por um anatomopatologista, utilizando critérios recomendados pela OMS (2007). Apenas os casos anteriormente classificados como meningiomas e astrocitomas foram incluídos na pesquisa, a partir dessa seleção inicial, foi obtido um total de 213 casos, sendo 107 meningiomas e 106 astrocitomas.

As lâminas dos casos selecionados, coradas por HE (Hematoxilina e Eosina), foram revisadas e a área que melhor representasse o tumor foi selecionada por um patologista, de forma independente, sem a identificação dos casos.

Como critério de inclusão, foram considerados, a presença de áreas de tumor, a conservação adequada dos blocos de parafina, amostra satisfatória para a referida análise com boa fixação e processamento.

Como critério de exclusão, foram considerados, a ausência de áreas do tumor, a conservação inadequada dos blocos de parafina, amostras insuficientes para a referida análise, com artefatos de fixação e processamento.

4.2 Confecção dos Microarranjos de tecidos (TMAs)

A confecção dos microarranjos de tecidos (TMAs) foi realizada no Hospital A.C. Camargo, localizado em São Paulo, por um técnico especializado do referido hospital, no mês de junho em 2016.

Para a confecção dos blocos de TMA, utilizou-se o equipamento manual, em dispositivo de base fixa, o MTA-I (Figura 10), proveniente da *Beecher Instruments*. Inseriu-se, 213 cilindros de 1,0 mm de diâmetro cada em duplicata, cada cilindro contendo uma amostra representativa do tumor, e com um espaçamento de 1,2 mm entre os centros dos cilindros, em três blocos distintos identificados como 1, 2 e 3.

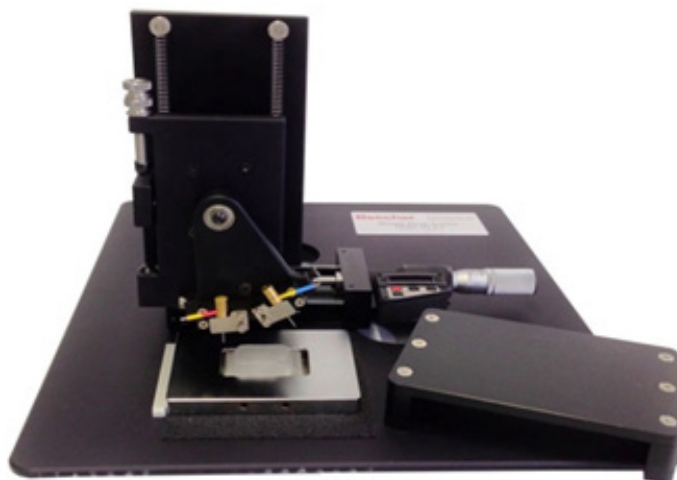


Figura 10: Equipamento manual para confecção de Microarranjos de tecidos - MTA-I

Fonte: Hospital A.C. Camargo, 2016

Desta forma, retirou-se parte de um tecido tumoral, que foi preparado em blocos de parafina convencionais, denominado de bloco doador, e assim colocou-se em um novo bloco, denominado de bloco receptor. O bloco receptor foi preparado anteriormente, confeccionado com os espaços já demarcados, que receberam os novos cilindros.

A posição dos casos foi identificada em um mapa com referências de colunas e linhas, responsável por orientar a localização espacial de cada um dos casos. Além disso, o mapa é fundamental, para o auxílio da análise e distinção, em relação aos diferentes subtipos histopatológicos de meningiomas, e astrocitomas que estão em cores distintas dos controles (Figura 11).

mm	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
0	Fígado	112	88/156	88/178	79/1	30/178	30/178	30/178	2	100/111	136/111	116				
1.2	260/12	252/1	87C	16	46	280/10	420/15	365/10	321/10	422/15	427/15	79				
2.4	44	240	4/17/14	320/10	424/15	171	190/2	221	99	360/10	379/10	392/10				
3.6	300/10	400/15	428/15	322/10	172/1	144/1	182/1	157/1	177	190/2	207/2	0				
4.8	222/2	142/1	442/15-1	1/0	80	324/10	320/10	287/10	437/2	331/10	128	388/10				
6.0	209/10	244	100/1	219/1	200/0	202/1	187	209/12	394/10	107	129	78/2				
7.2	86/178					Mama	Mama	Mama		Mama	Mama	Mama				
8.4																
9.6	Fígado	112	88/156	88/178	79/1	30/178	30/178	30/178	2	100/111	136/111	116				
10.8	260/12	252/1	87C	16	46	280/10	420/15	365/10	321/10	422/15	427/15	79				
12.0	44	240	4/17/14	320/10	424/15	171	190/2	221	99	360/10	379/10	392/10				
13.2	300/10	400/15	428/15	322/10	172/1	144/1	182/1	157/1	177	190/2	207/2	0				
14.4	222/2	142/1	442/15-1	1/0	80	324/10	320/10	287/10	437/2	331/10	128	388/10				
15.6	209/10	244	100/1	219/1	200/0	202/1	187	209/12	394/10	107	129	78/2				
16.8	86/178					Mama	Mama	Mama		Mama	Mama	Mama				
18.0																
19.2																
20.4																
21.6																
22.8																

Título: Cerebro-1
 Autor: Dra. Luciene Tafuri

Meningioma Meningeotubal
 Controle Placenta
 Controle Mama

TMA 1.0mm Junho 2016

mm	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
0	Fígado	220	147	208	10	213	176/1	16	1	10	77	110	121			
1.2	71	90/1	62	62	64	14	73/A	95/2	35	43	85	80	58/C			
2.4	302	226	286/12	192/2	280/12-1	240/12-2	282	190/2	186/1	296	194/2	87	306/12			
3.6	400/10	357/10	326/10	250/12	209	385/10	255/12-1	119	344/10	340/10	111	311/12	391/10			
4.8	347/10	305/12	184/1	319/10	16	283/12-2	238	190/2	281/2	163/1	128/2	270/12	194			
6.0	257/12	187/1	209	88	91	159/1	96	204	337/10	382	384	240	116			
7.2	Placenta	Placenta	Placenta		Mama	Mama	Mama									
8.4																
9.6	Fígado	220	147	208	10	213	176/1	16	1	10	77	110	121			
10.8	71	90/1	62	62	64	14	73/A	95/2	35	43	85	80	58/C			
12.0	302	226	286/12	192/2	280/12-1	240/12-2	282	190/2	186/1	296	194/2	87	306/12			
13.2	400/10	357/10	326/10	250/12	209	385/10	255/12-1	119	344/10	340/10	111	311/12	391/10			
14.4	347/10	305/12	184/1	319/10	16	283/12-2	238	190/2	281/2	163/1	128/2	270/12	194			
15.6	257/12	187/1	209	88	91	159/1	96	204	337/10	382	384	240	116			
16.8	Placenta	Placenta	Placenta		Mama	Mama	Mama									
18.0																
19.2																
20.4																
21.6																
22.8																

Título: Cerebro-2
 Autor: Dra. Luciene Tafuri

Glioblastoma
 Controle Placenta
 Controle Mama

TMA 1.0mm Junho 2016



Figura 11: Mapas representativos 1, 2 e 3 do TMA

Fonte: Hospital A.C. Camargo, 2016

Cada bloco de TMA foi submetido à microtomia, com uma espessura de 4 μm , obtendo-se, cortes histológicos sequenciais, os quais foram incluídos em lâminas com carga elétrica, para a realização da imuno-histoquímica.

4.3 Imuno-histoquímica

Através da técnica de imuno-histoquímica foram pesquisados, em todos os 107 casos de meningiomas e 106 casos de astrocitomas, as proteínas p53 e COX-2. Foram utilizadas amostras de carcinoma de mama como controle positivo para p53, e placenta para COX-2. Como controles negativos, foram utilizados os mesmos casos com a supressão do anticorpo primário.

As lâminas contendo amostras tumorais de meningiomas e astrocitomas foram incubadas em estufa à 50°C *overnight*, e posteriormente imersas em xilol para desparafinização, e rehidratadas em banhos sequenciais de álcool etílico absoluto e água destilada.

Para a recuperação antigênica, as lâminas foram imersas em soluções previamente aquecida de tampão EDTA (pH 9), para COX-2, e de citrato de sódio (pH 6), para p53, e submetidas à temperatura de 95°C em panela à vapor por 30 minutos.

Posteriormente, após o resfriamento das lâminas, estas foram tratadas com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) à 3%, para o bloqueio da enzima peroxidase endógena.

E assim, incubadas com os anticorpos primários anti-p53 e anti-COX-2 em câmara úmida, por 1 hora, em temperatura ambiente. O método imuno-histoquímico empregado foi o de Polímero Indireto. Esta metodologia foi padronizada no Laboratório de Imuno-histoquímica do Instituto de Ensino e Pesquisa (IEP) da Santa Casa de Belo Horizonte, MG. As especificações técnicas dos anticorpos estão descritas na Tabela 3.

Anticorpo	COX-2	P53
Origem	Cayman Chemical	Dako®
Animal	Camundongo	Camundongo
Clonalidade	Monoclonal	Monoclonal
Clone	CX229	DO-7
Controle	Placenta	Mama
Diluição utilizada	1:100	1:100
pH	pH 9	pH 6

Tabela 3: Descrição dos anticorpos anti-COX2 e anti p53

Fonte: Bula dos kits dos anticorpos COX-2 (Cayman Chemical) e p53 (Dako®)

Após incubação com os anticorpos primários, as lâminas foram tratadas com solução diluída de tampão (TBS).

A seguir, utilizou-se o HiDef™ HRP (CELL MARQUE), sistema de detecção de polímero, sendo um sistema livre de biotina. Assim, elimina-se a possível coloração não específica em decorrência da presença de biotina endógena. O HiDef™ HRP, consiste em dois reagentes já prontos para o uso, o detector e o amplificador. Inicialmente, utilizou-se o amplificador, e posteriormente o detector, ambos em câmara úmida à temperatura ambiente. A fim de se obter amplificação do sinal, proporcionando uma melhora exponencial na ligação e visualização dos anticorpos.

A revelação da reação IHQ foi realizada com o cromógeno DAB ((3-3)-tetrahydrocloro de diaminabenzidina, na diluição de 1:20, sendo este responsável pela emissão de uma coloração marrom. A contra-coloração foi realizada por um banho rápido em hematoxilina e com sua posterior diferenciação em água corrente. Posteriormente, procedeu-se à desidratação em álcool etílico absoluto, seguido de xilol.

Por fim, foi realizada a montagem das lâminas, sendo recobertas com lamínula de tamanho apropriado para o TMA, empregando-se o meio de montagem denominado de Entellan®, para posterior análise em microscópio óptico.

4.4 Interpretação da reação imuno-histoquímica

A análise imuno-histoquímica foi realizada em microscópio óptico (MOTIC BA310), nas objetivas de 4X, 10X e 40X, por dois patologistas, de forma independente. A expressão de p53 é identificada por exibir padrão de imunomarcção nuclear,

enquanto que, a COX-2 é identificada por exibir padrão de imunomarcção citoplasmática.

A imunomarcção de p53 e COX-2 foi considerada positiva ou negativa, de acordo com a quantidade e a intensidade de coloração de células imunomarcadas. A intensidade de coloração da imunomarcção das células de p53 foi categorizada em duas graduações distintas: fraca e forte, sendo a intensidade moderada avaliada juntamente à forte, baseado no estudo de Montgomery et al., (2015).

A expressão de p53 foi considerada positiva quando foi observada a marcação nuclear em quantidade igual ou superior a 10% de células tumorais avaliadas. De outro modo, foram considerados negativos os casos sem marcação nuclear ou em quantidade inferior a 10% de células imunomarcadas. Os casos p53 positivos foram categorizados, de acordo com a intensidade de coloração, em fraca ou forte. Ressalta-se que, foram desconsideradas as reações inespecíficas de padrão de membrana e citoplasmática, embora p53 possa apresentar, esporadicamente, imunomarcção citoplasmática em alguns casos.

A expressão de COX-2 foi considerada positiva quando a marcação citoplasmática ocorreu em quantidade igual ou superior a 10% de células tumorais. De outro modo, foram considerados negativos, os casos sem marcação citoplasmática ou em quantidade inferior a 10% de células imunomarcadas. Os casos COX-2 positivos foram categorizados, de acordo com a intensidade de coloração, em fraca ou forte. Ressalta-se que, foram avaliados apenas os casos em que foi exibido um padrão de imunomarcção citoplasmática, desconsiderando-se as reações inespecíficas de padrão de membrana celular e nuclear.

4.5 Análise Estatística

Para a caracterização da amostra total, foram usadas tabelas de frequência para as variáveis categóricas, e as medidas descritivas (média, mediana, mínimo, máximo e desvio-padrão) para as variáveis contínuas.

Os dados foram analisados quanto a sua distribuição pelo teste de Kolmogorov-Smirnov que demonstrou dados com distribuição Normal, portanto a classe dos testes paramétricos foi utilizada para comparação de dados contínuos.

O teste ANOVA avaliou a idade de acordo com a intensidade da coloração e o teste T de Student para a expressão dos marcadores.

As comparações múltiplas foram feitas pelo Teste de Tukey. Foi utilizado o Teste Qui-quadrado para avaliar a associação da expressão dos marcadores e sexo, tipo tumoral e intensidade da coloração.

A curva de sobrevivência foi estimada pelo método de Kaplan-Meier. O nível de significância adotado para todos os testes estatísticos foi de 5%, e o software utilizado para análise é o SPSS versão 20.0.

5.1 Caracterização da amostra

Foram analisadas 213 amostras de tumores, sendo 107 meningiomas e 106 astrocitomas, obtidas em ressecções cirúrgicas, realizadas no período entre 2009 a 2014. Dentre os meningiomas, a maior parte dos casos foi do subtipo meningotelial (72/33,8%), enquanto que, para os astrocitomas, o maior número de casos foi o subtipo GBM (76/35,7%) (TAB 4).

Dentre os subtipos de meningiomas, todos são pertencentes ao grau I, entretanto, em astrocitomas, tem-se o estadiamento, em graus I, II, III e V, sendo, astrocitoma pilocítico, difuso, anaplásico e GBM, respectivamente (TAB 4).

Frequência dos subtipos tumorais	n (%)	Grau tumoral
Meningioma Meningotelial	72 (33,8)	Grau I
Meningioma Transicional	17 (8,0)	Grau I
Meningioma Fibroso	7 (3,3)	Grau I
Meningioma Psamomatoso	4 (1,9)	Grau I
Meningioma Microcístico	3 (1,4)	Grau I
Meningioma Angiomatoso	2 (0,9)	Grau I
Meningioma Secretório	2 (0,9)	Grau I
Subtotal	107 (50,23)	
Astrocitoma Pilocítico	10 (4,7)	Grau I
Astrocitoma Difuso	15 (7,0)	Grau II
Astrocitoma Anaplásico	5 (2,3)	Grau III
Glioblastoma Multiforme	76 (35,7)	Grau IV
Subtotal	106 (49,77)	
Total	213 (100)	

Tabela 4: Caracterização da amostra de acordo com o subtipo e grau tumoral

Fonte: Dados da pesquisa

Dentre os 107 casos de meningiomas, observou-se maior frequência em indivíduos do sexo feminino, quando comparados aos indivíduos do sexo masculino, sendo, 79 casos (73,83%) em mulheres, enquanto que, 28 casos (26,17%) em homens (TAB 5).

Dentre os 106 casos de astrocitomas, observou-se frequência discretamente maior em indivíduos do sexo masculino, quando comparados aos indivíduos do sexo

feminino, sendo, 59 casos (55,66%) em homens, e 47 casos (44,34%) em mulheres (TAB 5).

Tipo Tumoral	Sexo n,(%)	
	Feminino	Masculino
Meningiomas	79 (73,83)	28 (26,17)
Astrocitomas	47 (44,34)	59 (55,66)
Subtotal	126 (59,15)	87 (40,85)
Total	213 (100)	

Tabela 5: Caracterização da amostra de acordo o tipo tumoral e sexo

Fonte: Dados da pesquisa

As idades, nos tumores analisados (astrocitomas e meningiomas), variaram entre 1 a 81 anos, com média das idades de 51,07 anos (TAB 6).

Nos meningiomas, a idade variou, entre os de 19 a 80 anos, com a média das idades de 53,67 anos, com desvio padrão de 15,34. Entre os astrocitomas, independente do subtipo, a faixa etária variou entre 1 a 81 anos, com a média das idades de 48,57 anos e desvio padrão de 19,43. A diferença média de idade entre os dois tipos tumorais (astrocitomas e meningiomas) foi de 5,14. (TAB 6).

Tipo tumoral	N	Média de idade (+/- DP)	Diferença média	IC 95%
Meningiomas	105	53,57 (+/- 15,34)	5,14	0,40; 9,90
Astrocitomas	106	48,57 (+/- 19,43)		
Total	213	51,07		

Tabela 6: Caracterização da amostra de acordo com o tipo tumoral e faixa etária

Fonte: Dados da pesquisa

Valor p: 0,034

Entretanto, ao se analisar a média de idade dos GBMs separadamente dos outros subtipos de astrocitomas, observou-se diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$), com média de idade maior nos GBMs (55,86 anos) em relação ao astrocitomas de menor grau (30,77 anos). O intervalo de confiança à 95%, apresentou limite inferior de 50,71 e o limite superior de 56,64 (TAB 7).

Tipo tumoral	n	Média de idade (+/- DP)	IC 95%	
			Limite inferior	Limite superior
Meningiomas	105	53,57(15,34)	50,71	56,64
Astrocitomas	30	30,77 (18,34)		
Glioblastomas	76	55,86 (14,87)		
Total	211	50,61 (18,25)		

Tabela 7: Média de idade de acordo com os tipos tumorais

Fonte: Dados da pesquisa

Valor p: < 0,001

Não houve diferença na média de idade entre os meningiomas e GBMs ($p=0,701$). Por outro lado, entre meningiomas/astrocitomas e astrocitomas/GBMs, essa diferença foi observada de modo significativo ($p < 0,001$) (TAB 8).

Tipo tumoral		Diferença média	Valorp	IC 95%	
				Limite inferior	Limite superior
Meningiomas	Astrocitomas	22,90	< 0,001	13,97	31,87
	Glioblastomas	-2,19	0,701	-7,62	3,24
Astrocitomas	Glioblastomas	-25,09	< 0,001	-34,2445	-15,9404

Tabela 8: Diferença média de idade entre os tipos tumorais

Fonte: Dados da pesquisa

Ao estratificar a idade em 3 grupos: < 18 anos (infanto-juvenis), 19-40 anos (adultos jovens) e > 40 anos (adultos) foi observado que tanto os meningiomas (87/81,3%), quanto os astrocitomas (63/59,4%) foram mais frequentes em indivíduos acima dos 40 anos (TAB 9).

Entretanto, em relação aos meningiomas (0/0,0%), o grupo dos astrocitomas (11/10,4%) tem uma porcentagem de tumores com idade inferior a 18 anos (TAB 9).

Tipo tumoral	Faixa etária (anos) n,%			Total
	< 18	19-40	>40	
Meningiomas	0 (0,0)	20 (18,7)	87 (81,3)	107 (100)
Astrocitomas	11 (10,4)	25 (23,6)	63 (59,4)	106 (100)
Total	11 (5,2)	45 (21,1)	150 (70,4)	213 (100)

Tabela 9: Caracterização da amostra de acordo com estratificação da faixa etária e tipo tumoral

Fonte: Dados da pesquisa

Diferentemente dos meningiomas, dentre os subtipos de astrocitomas, estes têm uma maior número de tumores em indivíduos com idade inferior a 40 anos, sendo os astrocitomas pilocítico e difuso, com o maior número de representantes desta faixa etária (GRA 1).

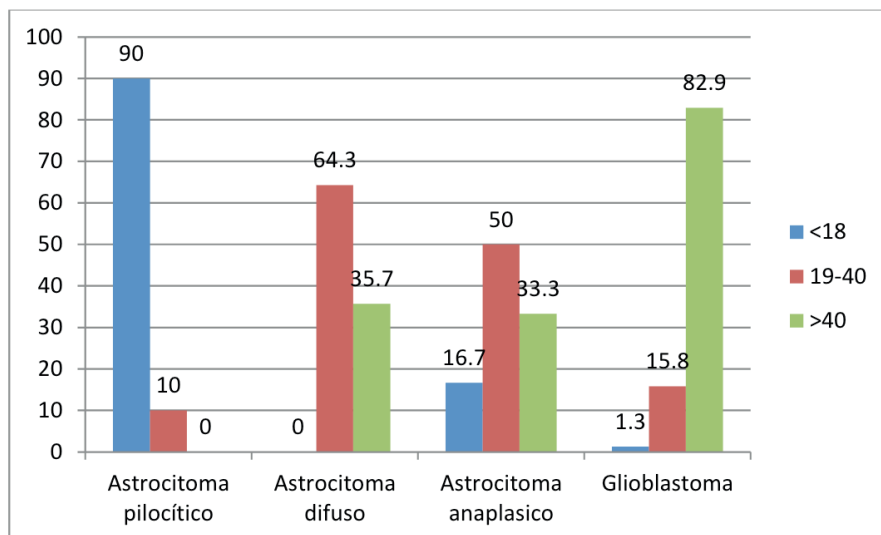


Gráfico1: Distribuição dos subtipos de Astrocitomas de acordo com a faixa etária (%)

Fonte: Dados da pesquisa

A curva de sobrevida dos indivíduos acometidos pelo subtipo de astrocitoma, denominado de glioblastoma, demonstrou uma sobrevida mediana de 12 meses (IC95%: 10,5 A 13,5 meses). Foi observado que em 10 meses, a sobrevida foi de 63,3%, decaindo para 30,9% no tempo em 15 meses (GRA 2).

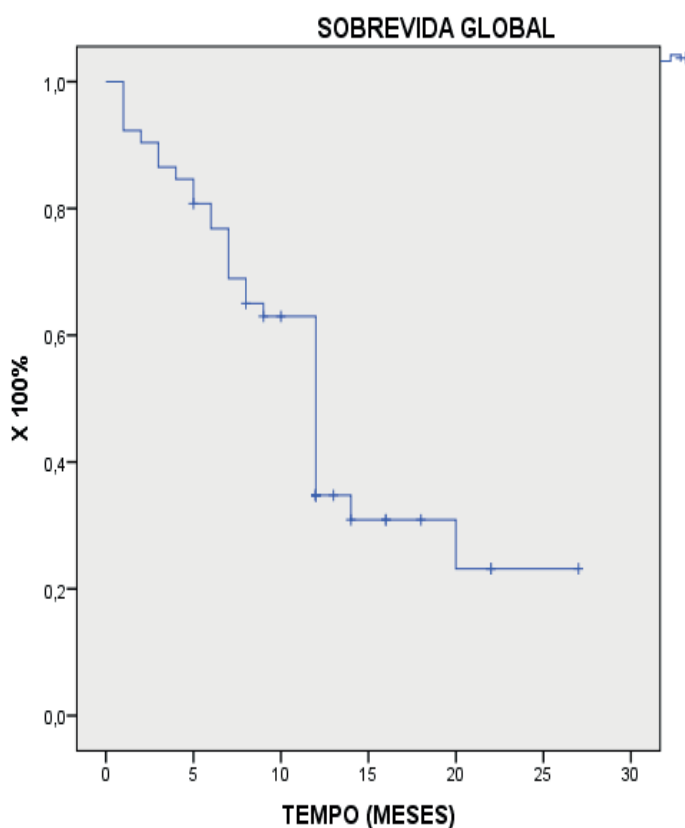


GRÁFICO 2: Análise da sobrevida em pacientes com Glioblastomas

Fonte: Dados da pesquisa

4.2 Análise imuno-histoquímica

A análise imuno-histoquímica foi realizada nos 213 casos (meningiomas e astrocitomas), onde foram utilizados os anticorpos anti-p53 e anti-COX-2.

A expressão imuno-histoquímica dos marcadores está demonstrada na figura 12.

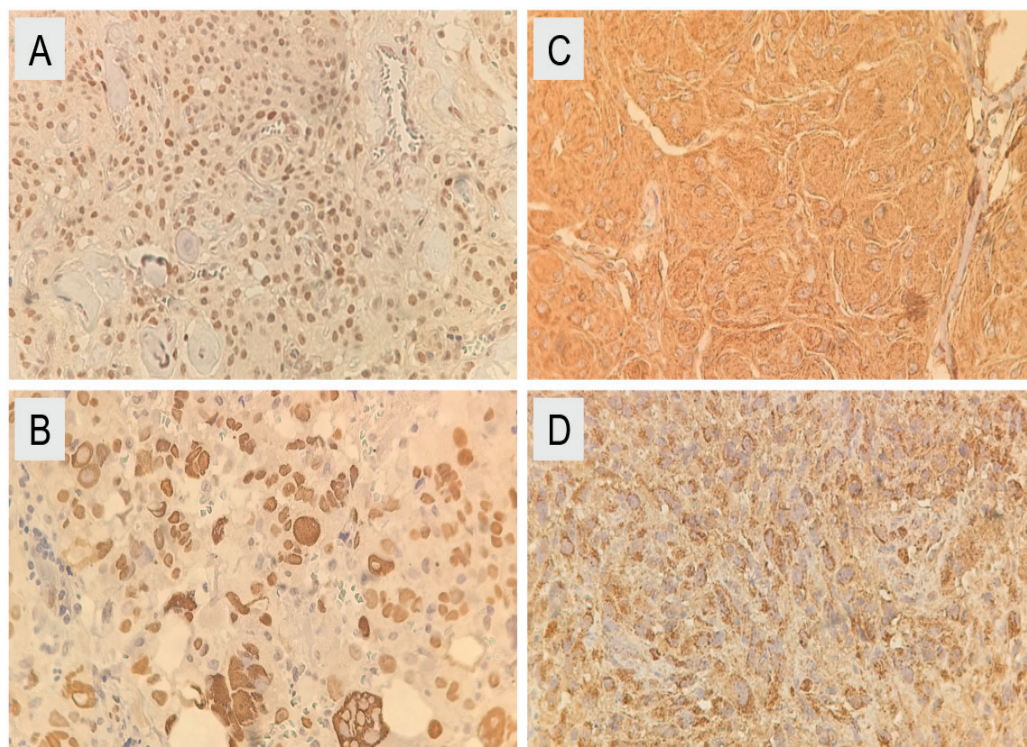


Figura 12: Fotomicrografias de cortes histológicos de meningiomas e glioblastomas corados pela técnica de IHQ por polímero.

Fonte: Dados da pesquisa

Expressão nuclear positiva para p53 em meningioma 400X (A) e em glioblastoma 400X (B). Expressão citoplasmática positiva para COX-2 em meningioma 400X (C) e glioblastoma 400X (D).

A frequência dos marcadores analisados está demonstrada na Tabela 10.

Após a realização da técnica IHQ houve soltura de alguns casos, diminuindo a amostra final em alguns tumores

Desse modo, em meningiomas, foi possível a análise em 104 amostras, para COX-2, sendo 103 (99,0%) casos positivos e apenas 1 caso (1,0%), negativo. Para p53, foram analisados 106 pacientes, com positividade em 96 casos (90,6%) e 10 (9,4%), apresentaram-se negativos (TAB 10).

Dos 30 astrocitomas analisados, todos foram positivos para COX-2 (100%), e 28 (93,3%) apresentaram imunomarcagem positiva para p53 apenas e apenas 2 (6,7%) foram negativos para este marcador (TAB 10).

Os GBMs foram analisados separadamente, pois são considerados, dentre os astrocitomas, os de mais alto grau e, portanto, malignos.

Estes tumores, mostraram-se positivos, para COX-2, em 68 casos, e com 3 casos negativos. Imunomarcaçã para p53 apresentou positividade em 63 casos (88,7%) e 8 (11,3%) foram negativos, para o total de 76 casos (100%) (TAB 10).

		Positivo n,%	Negativo n,%	Total	Soltou	Total (100%)
COX-2	Meningiomas	103 (99,0)	1 (1,0)	104	3	107
	Astrocitomas	30 (100)	0	30	0	30
	Glioblastomas	68 (95,8)	3 (4,2)	71	5	76
P53	Meningiomas	96 (90,6)	10 (9,4)	106	1	107
	Astrocitomas	28 (93,3)	2 (6,7)	30	0	30
	Glioblastomas	63 (88,7)	8 (11,3)	71	5	76

Tabela 10: Imunomarcaçã para COX-2 e p53 em Meningiomas e Astrocitomas

Fonte: Dados da pesquisa

Os casos positivos foram avaliados quanto à intensidade de imunomarcaçã (TAB 11).

A intensidade de imunomarcaçã foi avaliada para ambas as proteíνας, nos meningiomas e astrocitomas. Foi verificado que, a maioria dos tumores independente do subtipo ou proteína, apresentou imunomarcaçã forte, o qual foi agrupado as intensidades moderada e forte em apenas um único grupo (TAB 11).

Foi detectada imunomarcaçã para COX-2, com intensidade forte, nos GBMs (62/91,2%), em detrimento dos outros astrocitomas de menor grau (29/96,7%). Do mesmo modo, nos meningiomas a intensidade forte (89/86,4%) também foi predominante. (TAB 11).

A imunomarcaçã para p53, com intensidade forte, foi detectada nos meningiomas (81/84,4%), em detrimento dos GBMs (39/61,9%) e dos astrocitomas (17/60,7%) (TAB 11).

		Fraco n,%	Forte n,%	Total (100%)
COX-2	Meningiomas	14 (13,6)	89 (86,4)	107
	Astrocitomas	1 (3,3)	29 (96,7)	30
	Glioblastomas	6 (8,8)	62 (91,2)	76
P53	Meningiomas	15 (15,6)	81 (84,4)	107
	Astrocitomas	11 (39,3)	17 (60,7)	30
	Glioblastomas	24 (38,1)	39 (61,9)	76

Tabela 11: Intensidade de imunomarcaçã para COX-2 e p53 em Meningiomas e Astrocitomas

Fonte: Dados da pesquisa

O cruzamento entre a imunomarcaçã para COX-2 em meningiomas, de acordo com o sexo, revelou positividade em membrana celular em 103 casos e negatividade em somente 1 caso, dos 107 casos (TAB 12).

Optou-se somente pela descriçã sem testes de significãncia estatística devido

a frequência muito baixa de casos negativos para as imunomarcações. Quando as categorias apresentam frequências muito baixas, as comparações possuem poder muito baixo de análise.

Destes a positividade para COX-2 no sexo feminino estava presente em 76 casos (73,8%), e no masculino, em 27 casos (26,2%) (TAB 12).

		Imuno marcação COX-2 n,(%)		Total
		+	-	
Sexo	Feminino	76 (73,8)	1 (100)	77 (74,0)
	Masculino	27 (26,2)	0 (0)	27 (26,0)
Total		103 (100)	1 (100)	104 (100)

Tabela 12: Cruzamento entre marcação IHQ para COX-2 e sexo em Meningiomas

Fonte: Dados da pesquisa

A análise da marcação para p53, em meningiomas, revelou positividade nuclear em 96 casos e negatividade em 10 casos. O cruzamento entre a expressão de p53 e sexo, mostrou que, no sexo feminino, a positividade estava presente em 72 casos (75,0%), e no masculino, em 24 casos (25,0%) (TAB 13).

		Imunomarcaçãop53 n,(%)		Total
		+	-	
Sexo	Feminino	72 (75,0)	6 (60,0)	78 (73,6)
	Masculino	24 (25,0)	4 (40,0)	28 (26,4)
Total		96 (100)	10 (100)	106 (100)

Tabela 13: Cruzamento entre marcação IHQ para p53 e sexo em Meningiomas

Fonte: Dados da pesquisa

Dos 71 casos de GBMs analisados para a expressão de COX-2, e seu cruzamento com o sexo, 68 casos foram positivos e 3 foram negativos. Destes, houve positividade em 31 indivíduos (45,6%) do sexo feminino, e em 37 indivíduos (54,4%) do sexo masculino (TAB 14).

		Imuno marcaçãoCOX-2 n,(%)		Total
		+	-	
Sexo	Feminino	31 (45,6)	2 (66,7)	33 (46,5)
	Masculino	37 (54,4)	1 (33,3)	38 (53,5)
Total		68 (100)	3 (100)	71 (100)

Tabela 14: Cruzamento entre marcação IHQ para COX-2 e sexo em Glioblastomas

Fonte: Dados da pesquisa

Para a expressão de p53, em GBMs, 63(%) casos foram positivos e 8 (%) foram negativos. Quando foi realizado o cruzamento entre a expressão de p53 e o sexo para estes casos, demonstrou-se positividade em 29 (46%) indivíduos do sexo

feminino, e 34 (54%) de indivíduos do sexo masculino (TAB 15).

		Imunomarcção p53 n,(%)		Total
		+	-	
Sexo	Feminino	29 (46,0)	4 (50,0)	33 (46,5)
	Masculino	34 (54,0)	4 (33,3)	38 (53,5)
		63 (100)	8 (100)	71 (100)

Tabela 15: Cruzamento entre marcação IHQ para p53 e sexo em Glioblastomas

Fonte: Dados da pesquisa

A média de idade nos meningiomas, positivos para COX-2 (101), foi de 53,22 anos, com desvio padrão de 15,21, e naqueles negativos (1) foi de 75 anos. Nos casos positivos para p53 (95), a média de idade foi de 54,54, com desvio padrão de 14,70, enquanto que, nos casos negativos (9) foi de 43,88 anos, com desvio padrão de 19,76 (TAB 16).

Em GBMs, o cruzamento entre a idade e a imunomarcção revelou que nos casos positivos (68) para COX-2, a média de idade foi de 55,98 anos, com desvio padrão de 13,98, e naqueles negativos (3), a média de idade foi de 32,66 com desvio padrão de 34,64. Para p53, os casos positivos (63), foi de 54,66 anos a média de idade, com desvio padrão de 16,17, nos casos negativos (8) foi de 53,75 anos e desvio padrão de 15,75 (TAB 16).

Para os astrocitomas de graus I, II e III, não foi possível realizar os cruzamentos de positivamente ou não dos marcadores, uma vez que, a frequência de negativos foi muito baixa.

		Meningiomas	N	Glioblastomas	n
COX-2	+	53,22 (15,21)	101	55,98 (13,99)	68
	-	75,0	1	32,66 (34,64)	3
P53	+	54,54 (14,70)	95	54,66 (16,17)	63
	-	43,88 (19,76)	9	53,75 (15,75)	8

Tabela 16: Cruzamento entre a média de idade e a expressão de marcadores COX-2 e p53

Fonte: Dados da pesquisa

Os tumores do encéfalo não são comuns, entretanto, possuem alta letalidade (LONN et al., 2004, VAINBOIM et al., 2014). De acordo com a Sociedade Americana do Câncer, mais de 13.000 pessoas morrem em decorrência desses tumores, a cada ano, nos Estados Unidos (CBTRUS, 2000). A etiologia dessas neoplasias é diversificada, e estudos descritivos caracterizam a incidência, mortalidade e sobrevida dos tumores encefálicos em associação com os subtipos histológicos, idade, sexo, entre outros fatores (WRENSCH et al., 2002).

Desse modo, este estudo teve como objetivo investigar, pelo método imunohistoquímico, a expressão de marcadores moleculares em diferentes tipos de tumores do sistema nervoso, os meningiomas e os astrocitomas em associação com a idade e sexo dos pacientes.

Dentre os meningiomas, a maioria dos tumores analisados foi o do subtipo meningotelial (grau I), o que era esperado, uma vez que, se trata da variante histológica mais frequente entre esses tumores, dado este em concordância com a literatura (ENDO et al., 2016, MONTGOMERY et al., 2015, LOUIS et al., 2016).

Homens e mulheres apresentam diferenças significativas para o risco de desenvolvimento de doenças e os seus respectivos prognósticos. O câncer não é exceção, e podem ser observadas, diferenças não só na prevalência, mas também na mortalidade e progressão dessa doença, quando se considera o sexo. Nos tumores cerebrais, com poucas exceções, as diferenças entre os sexos são evidentes no que diz respeito à mortalidade e incidência (SUN et al., 2015, VAINBOIM et al., 2014).

Os indivíduos do sexo feminino foram os mais acometidos por esses tumores, dado este, também esperado. Há mais de duas décadas, a dependência hormonal em meningiomas tem sido investigada, e parece haver aumento na razão do crescimento tumoral no período reprodutivo da mulher (gravidez e fase luteal do ciclo menstrual) (KORHONEN et al., 2010). Esse dado é reforçado pelo fato de que meningiomas raramente se desenvolvem em crianças pré-púberes, em que os hormônios sexuais circulantes estão baixos (CEA-SORIANO, WALLANDER, GARCIA, 2012).

Em adição, é sabido que meningiomas expressam receptores de estrógeno e progesterona, determinando que os respectivos hormônios sejam capazes de influenciar no desenvolvimento tumoral (BERGOGLIO et al., 2013).

Ademais, a terapia de reposição hormonal em mulheres parece aumentar o

risco de meningiomas, determinando uma frequência 2 vezes maior dessa neoplasia neste sexo (KORHONEN et al., 2010, GUEVARA et al., 2010). Por outro lado, o uso de contraceptivos hormonais parece não estar associado com a gênese desse tumor pois a oscilação hormonal não é significativa (KORHONEN et al., 2010).

Mulheres com histórico prévio de câncer de mama parecem ter risco elevado para o desenvolvimento de meningiomas, reforçando assim, o caráter hormônio-dependente deste tumor. No entanto, essa hipótese ainda necessita de investigação mais apurada para a determinação dos mecanismos envolvidos na gênese tumoral e sua relação com os hormônios citados (WIGERTZ et al., 2008).

A baixa frequência de meningiomas no sexo masculino pode estar relacionada com o efeito protetor da testosterona. Homens com câncer de próstata, tratados com bloqueadores androgênicos, apresentam risco aumentado para desenvolvimento de meningiomas. Reforçando esse achado, relatos de casos de pacientes transexuais (homem para mulher) empregando terapia com hormônios femininos descrevem o desenvolvimento de meningiomas nestes indivíduos (BERGOGLIO et al., 2013, CEBULA et al., 2010).

Diferente dos meningiomas, o presente trabalho revelou que os astrocitomas são mais frequentes em homens. A literatura é escassa em associar os diferentes subtipos de astrocitomas com o sexo, dando ênfase maior aos GBMs. Wrensch et al. (2002) inferiram que há maior incidência de GBMs em indivíduos do sexo masculino, provavelmente em decorrência do efeito protetor dos hormônios femininos para os astrocitomas.

A maior frequência de determinados subtipos histológicos de GBMs no sexo masculino também pode estar correlacionada à heterogeneidade molecular. Mutações em genes como TP53, PTEN e IDH estão associados a frequência duas vezes maior em homens que mulheres (SUN et al., 2015).

A distribuição da idade pode diferir, levando-se em conta vários fatores etiológicos, localização do tumor, bem como os tipos histológicos. Algumas dessas variações podem ser influenciadas pelas limitações em métodos diagnósticos e pelo tempo de exposição aos fatores de risco. São citados, também, a resposta imune e o número e tipo de alterações genéticas de cada tumor (WRENSCH et al., 2002, PARK et al., 2014, SEER, 2013).

A maioria dos tumores cerebrais acomete indivíduos em torno dos 55 anos, semelhante à média de idade dos pacientes analisados no presente trabalho (PARK et al., 2014).

Ao estratificar os subtipos tumorais, a média de idade entre os astrocitomas foi menor do que a média de idade encontrada nos meningiomas. Dado esse em concordância com a literatura, uma vez que, há tendência de aumento na incidência de meningiomas com o aumento na idade, exceto, por ligeiro declínio após os 85 anos, onde a mortalidade é maior por outras doenças (SUN et al., 2015).

No presente trabalho, esse achado, foi comprovado ao se verificar que a

incidência de meningiomas é progressiva ao se analisar a idade estratificada por faixas etárias. Os tumores cerebrais na fase pré púbere, em meninos e meninas, parecem estar associados a alterações moleculares específicas em combinação com os subtipos tumorais (CBTRUS, 2000, SEER, 2013, OBER, LOISEL, GILAD, 2008).

No grupo dos astrocitomas, incluindo os GBMs, o pico de incidência está entre os 65 e 74 anos, dado esse diferente do resultado encontrado nessa dissertação, onde a média de idade para esses tumores foi menor (MATJA et al., 2016).

Esse achado pode ser explicado devido a presença de subtipos de astrocitomas, como o pilocítico e o difuso, sabidamente mais frequentes em adultos jovens, tumores estes, presentes nessa dissertação, em maior proporção, na faixa etária abaixo dos 40 anos (CBTRUS, 2000).

Por outro lado, a análise isolada do GBM revelou média de idade maior do que os astrocitomas em geral, o que aproxima o resultado aos encontrados na literatura corrente (WRENSCH et al., 2002).

Os GBMs são os gliomas mais agressivos da linhagem astrocítica e correspondem ao grau IV da OMS. São também os tumores cerebrais mais frequentemente diagnosticados, representando quase 50% dos tumores cerebrais primários malignos, com o prognóstico sombrio. Possuem expressão aberrante de diferentes genes e proteínas controladoras da diferenciação e crescimento celular. As combinações de mutações nesses genes podem justificar agressividade tumoral (CHAURASIA et al., 2016, ZHAO et al., 2017).

A sobrevida mediana dos pacientes acometidos por GBM é de cerca de 10 a 17 meses, como relatada em trabalhos recentes (HARRIS et al., 2017, HUANG et al., 2017). A análise da curva de sobrevida dessa dissertação revelou resultados próximos ao citado por estes autores.

Entre os fatores prognósticos, são citados os histopatológicos, como a infiltração a tecidos nervosos adjacentes, a presença de necrose e a angiogênese. E entre os clínicos, o avançar da idade e a escala de Karnovsky, parecem contribuir para esse pior prognóstico (JHA et al., 2011, ZHAO et al., 2017).

Os resultados de sobrevida encontrados demonstram número decrescente com o aumento da idade. Assim, pode-se inferir que, o paciente em faixas etárias acima dos 40 anos dispõe de pior prognóstico, devido à agressividade inata do tumor em questão, bem como, a resistência a agentes quimioterápicos, em razão ao bloqueio inerente à barreira hematoencefálica (HARRIS et al., 2017).

Estudos recentes envolvendo a patogênese molecular desses tumores têm mostrado que apesar dos GBMs apresentarem aspectos histológicos semelhantes, há grande heterogeneidade molecular nesses tumores (CHAURASIA et al., 2016, JHA et al., 2017).

Nesse contexto, são diversas as referências em que são citados a análise da expressão de marcadores moleculares para melhor compreensão do comportamento biológico desses tumores (CHAURASIA et al., 2016, MONTGOMERY et al., 2015,

PIMENTEL et al., 2015).

A IHQ é um dos métodos utilizados para o estudo dessas moléculas e há uma gama de marcadores relacionados aos tumores cerebrais em estudo, dentre eles, COX-2 e o p53 (PIMENTEL et al., 2015).

A proteína p53 é supressora tumoral e atua como protetora do DNA, induzindo o reparo e a apoptose em células com mutações. Assim a forma selvagem dessa proteína tem efeito inibitório na proliferação e transformação celular. (TELUGO et al., 2016).

Nos meningiomas desse estudo, a proteína p53 apresentou expressão positiva e forte na maioria dos casos, fato esse também citado na literatura (TROTT, et al., 2015, TELUGU, et al., 2016,).

Muitos autores estratificam a análise para p53, em meningiomas, para os graus I, II e III, e descrevem aumento na imunopositividade da proteína de acordo com o grau. Nesses relatos, aumento na intensidade e número de células imunomarcadas está associado com pior prognóstico da doença (TELUGU et al., 2016, ZHAO et al., 2017, TROTT et al., 2015).

A realização dessa correlação não foi possível nessa dissertação, devido limitação na amostra analisada, que contém apenas tumores grau I. Entretanto, ao se analisar a intensidade de imunomarcção com a média de idade, o padrão forte foi predominante nos indivíduos mais velhos. Esse dado pode sugerir que o envelhecimento biológico induz a maior expressão da proteína mutada (TROTT et al., 2015, TELUGU et al., 2016).

TROTT et al., (2015) citam que casos imunomarcados para p53 nos tumores grau I podem estar associados com o aumento da idade dos pacientes analisados, pois é sabido que o efeito protetor de p53 declina com a idade. Além disso, o clone utilizado na reação IHQ, pode, mesmo em menor quantidade, imunomarc a proteína selvagem. Portanto, a relação entre a super expressão proteica e a mutação no gene pode não ser exata (CHAURASIA et al., 2016).

A imunomarcção para p53 foi discretamente maior em indivíduos do sexo feminino. Fato esse ocorrido provavelmente em decorrência das influências hormonais, como já citados previamente (KORHONEN et al., 2010, BERGOGLIO et al., 2013, CEBULA et al., 2010).

A inativação de p53 exerce influencia fundamental na biologia dos cânceres humanos, sendo indispensável na manutenção do número de células normais e na preservação da função e estabilidade genômica. Alterações em p53 podem ter diferentes consequências em machos e fêmeas em múltiplas espécies, causando impacto na transformação celular, especialmente em células nervosas (HANAHAN, WEINBERG, 2011).

Nos astrocitomas, a imunomarcção positiva para p53 é relativamente maior nos GBMs, corroborando com a literatura. As mutações em TP53 são encontradas em mais de 50% dos astrocitomas difusos, anaplásicos e GBMs (APPIN, BRAT, 2014).

A imunoreatividade para p53 é utilizada muitas vezes como marcador para a diferenciação astrocítica. Assim, marcação com intensidade forte para p53 na categoria de gliomas infiltrativos, favorecem o diagnóstico para os GBMs, que são os de mais alto grau (SUN et al., 2015).

Outro marcador associado à compreensão dos aspectos moleculares dos meningiomas e astrocitomas é a COX-2. Essa enzima está envolvida na síntese de prostaglandinas e é induzida em resposta à mitógenos e citocinas inflamatórias (KATO et al., 2014).

Os resultados encontrados revelaram expressão positiva na quase totalidade dos tumores analisados. Evento esse de acordo com a maioria dos autores consultados, que descrevem que independente do grau tumoral, a super expressão de COX-2 é um evento frequente (MATSUO et al., 2001, MAHZOUNI, SARMADI, 2014).

Por outro lado, os resultados obtidos por LIN e colaboradores (2003) foram contraditórios, não indicando expressão de COX-2 nos meningiomas de baixo grau. Entretanto, este mesmo autor descreve, posteriormente, super expressão nos meningiomas de alto grau, sendo esse achado interpretado como indicador de isquemia em torno das áreas de necrose. Esse evento não pode ser avaliado nos casos analisados, pois foram selecionados para o estudo em TMA áreas sem necrose.

A super expressão deste marcador é importante evento no desenvolvimento de cânceres como, por exemplo, o colo retal, mama e renal. Apesar da expressão de COX-2 também ter sido associada com tumores cerebrais, incluindo meningiomas e gliomas, o número de estudos é limitado e seu valor clínico patológico permanece controverso, especialmente em meningiomas (KATO et al., 2014, NATHOO et al., 2003).

Em relação a intensidade de marcação, está descrito que a imunomarcação para COX-2 mais forte pode estar correlacionada com recidiva e invasividade, especialmente, nos tumores graus II e III (NATHOO et al., 2003).

O mecanismo molecular associado ao fenótipo maligno dos GBM, bem como a sua progressão não está claro. Acredita-se que, COX-2 esteja envolvida na regulação da progressão tumoral, invasividade e angiogênese em diversas neoplasias (EL-SAYED, M TAHA, 2010).

Os resultados analisados neste trabalho evidenciaram uma marcação para COX-2 na maioria dos astrocitomas, incluindo GBMs. É descrito que a expressão dessa enzima está correlacionada com o grau histológico, bem como a razão de proliferação nesses tumores (NATHOO et al., 2003).

A intensidade mais forte de imunomarcação para COX-2 nos GBMs em relação aos astrocitomas de menor grau pode indicar alterações moleculares progressivas. Acredita-se que, muitos GBMs desenvolvem-se a partir da progressão de astrocitomas de baixo grau e anaplásicos (BHAT et al., 2014).

Associado a este fato, SHONO e colaboradores (2001) descreveram que pacientes com maior expressão de COX-2 apresentam uma menor sobrevida. Portanto, COX-2

tem sido relatado como marcador de valor preditivo, independentemente de outras variáveis analisadas.

Apesar do mecanismo de alteração maligna durante a tumorigênese astrocítica não estar bem clara, estudos *in vitro* indicam que a super expressão de COX-2 resulta na perda de diferenciação e adesão a matriz extracelular, além da inibição da apoptose (BHAT et al., 2014).

Esta enzima parece modular uma gama de processos relacionado ao tumor, inclusive associado ao gene p53. SUBBARAMAIAH et al. observou que a forma selvagem de TP53 pode ser responsável, em parte, pela inibição da expressão do gene COX-2 protegendo, assim, o genoma. Por outro lado, o aumento na síntese da proteína anti apoptótica bcl-2 está correlacionada com o aumento na expressão de COX-2 (EL-SAYED, M TAHA, 2010).

Os estudos que objetivam avaliar a expressão de marcadores moleculares em tumores cerebrais têm como proposta básica, compreender o comportamento biológico dessas neoplasias, associado aos aspectos clínicos. Podem também, apontar opções terapêuticas àquelas existentes (CAMBRUZZI, et al.2010, ZHAO et al., 2015, GARAY et al., 2003).

Baseado em informações moleculares, drogas têm sido investigadas em triagens clínicas direcionadas a alvos moleculares. Por exemplo, é sabido que, a existência de altas concentrações de COX-2 em células de meningiomas e astrocitomas criam ambiente favorável para a produção de eicosanóides, em relação às células nervosas normais. Assim, medicamentos inibindo especificamente essas substâncias podem mudar a abordagem no tratamento desses tumores, adicionando benefícios em sinergismo com os tratamentos citotóxicos convencionais (NATHOO, BARNET, GOLUBIC, 2004, MAHZOUNI, SARMADI, 2014, BHAT et al., 2014).

Em adição, a compreensão das diferenças relacionadas ao sexo na incidência do câncer e na sua resposta terapêutica exige adaptação das abordagens atuais de triagem e tratamento. Os programas de prevenção devem considerar, portanto, as diferenças sexuais, sociais e comportamentais, além das biológicas nos mecanismos moleculares do câncer (BHAT et al., 2014).

Essa dissertação pretendeu, desse modo, contribuir na compreensão dos aspectos biológicos em tumores cerebrais de pacientes atendidos na Santa Casa de Belo Horizonte, MG. Ainda há muito que se investigar, sob a ótica de outras análises na determinação do perfil biológico/molecular desses pacientes.

Em última análise, progressos substanciais têm sido feitos na caracterização molecular nos meningiomas e astrocitomas fornecendo informações úteis sobre o desenvolvimento de terapias direcionadas mais eficazes e da elucidação da biologia tumoral. Assim, o perfil de expressão de determinadas proteínas como COX-2 e p53 podem estratificar os tumores em subgrupos com prognósticos distintos, auxiliando no manejo desses indivíduos.

CONCLUSÕES

As proteínas COX-2 e p53, em meningiomas e astrocitomas, apresentaram expressão imuno-histoquímica positiva membranar e nuclear, respectivamente, ressaltando-se a intensidade forte de imunomarcacão na quase totalidade dos casos, independente do subtipo tumoral. O perfil de marcação dessas proteínas, marcadores típicos de inflamações e tumores, não se correlacionam com os parâmetros clínicos de sexo e idade analisados no estudo.

- ALMEIDA, J. et al. Perda de amostras em tissue microarray: comparação entre técnicas com uso de fita adesiva comercial, lâminas silanizadas pelo método tradicional ou por método modificado. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v. 44, n. 5, p. 359-365, Oct. 2008.
- ANDRADE, V. et al. Tissue microarrays: high throughput and low cost available for pathologists. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** Rio de Janeiro, v. 43, n. 1, p. 55-60, Feb. 2007.
- BENNETT, S. et al. Investigating the impact of headaches on the quality of life of patients with glioblastoma multiforme: a qualitative study. **BMJ Open**, 2016.
- BERGOGLIO, M. et al. Symptomatic meningioma induced by cross-sex hormone treatment in a male-to-female transsexual. **Endocrinologia y nutricion: organo de la Sociedad Espanola de Endocrinologia y Nutricion**60:264–267, 2013.
- BHAT, A. et al. Histological-subtypes and anatomical location correlated in meningeal brain tumors (meningiomas). **Journal of Neurosciences in Rural Practice**.5(3):244-249, 2014.
- BORIN, A. Intracanalicularmeningioma: diagnosticbyimmunohistochemistry. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.**, São Paulo, v. 74, n. 1, p. 158, Feb, 2008.
- BORRESEN-DALE, AL. TP53 and breast cancer.**Hum Mutat** 21(3): 292-300, 2003.
- BUCCOLIERO, A. et al. Cyclooxygenase-2 (COX-2) overexpression in meningiomas: real time pcr and immunohistochemistry. **Appl Immunohistochem Mol Mofphol**, vol 15,2 june, 2007.
- BURGER, P et al. Pilocytic astrocytoma. in Kleihues P &Cavenee WK (eds). Tumours of the Nervous System.Pathology and Genetics.WHO Classification of Tumours.IARC Press, Lyon, p. 45-5, 2000.
- CAMBRUZZI, E et al. Perfil e prevalência dos tumores primários do sistema nervoso central no Grupo Hospitalar Conceição, de Porto Alegre, RS. **Revista da AMRIGS**. 54(1):7-12, 2010.
- CASARES, J et al . Meningioma ventricular presentacióninfrecuente y revisión de la literatura. **Rev. chil. neuro-psiquiatr.**, Santiago, v. 49, 4, 361-366, 2011.
- CBTRUS (Central Brain Tumor Registry of the United States) Statistical Report: Primary Brain Tumors in the United States 1992-1997. Chicago: Central Brain Tumor Registry of the United States, 2000.
- CEA-SORIANO, L, WALLANDER, M, GARCIA, L Epidemiology of meningioma in the United Kingdom. **Neuroepidemiology** 39:27–34, 2012.
- CEBULA, H et al. Regression of meningiomas after discontinuation of cyproterone acetate in a transsexual patient. **Acta Neurochir (Wien)** 152:1955–1956, 2010.
- CHAURASIA, A. et al. Immunohistochemical Analysis of ATRX, IDH1 and P53 in Glioblastoma and

Their Correlations With Patient Survival. **J Korean MedSci** 31 (8), 1208-1214. May 30 2016.

CIMINO, P. Malignant progression to anaplastic meningioma: Neuropathology, molecular pathology, and experimental models. **Experimental and Molecular Pathology**. São Paulo, vol 99, Issue 2, pages 354-359, october 2015.

CINTRA, E.; NISHIDE, V.; NUNES, W. Acidente Vascular Cerebral, Trauma Cranioencefálico, Trauma Raquimedular, Neuromiopatias – Aspectos Gerais. **Assistência de enfermagem ao paciente gravemente enfermo** 2.ed. São Paulo: Editora Ateneu, 23, 391- 406, 2008.

CORREIA, J et al. Glioblastoma multiforme – A propósito de um caso Clínico. vol.16; .1; jan/mar 2009.

DE NARDI, A. **Correlação da Ciclooxygenase-2 com Ki-67, p53 e caspase-3 nas neoplasias de mama em cadelas**. 110 f. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) Universidade de São Paulo, Jaboticabal, 2007.

ENDO, T. et al. A Study of Prognostic Factors in 45 Cases of Atypical Meningioma. **Acta Neurochir (Wien)** 158 (9), 1661-1667, Jul 28, 2016.

FETT-CONTE, A.; SALLES, A. The importance of the p53 gene in human carcinogenesis. **Rev.bras. hematol.hemoter**. 24(2):85-89, 2002.

FIECHTER, M et al. Adult anaplastic pilocytic astrocytoma – a diagnostic challenge? A case series and literature review. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, 147, 98–104, 2016.

GARAY, H. M. et al. Degradação seletiva de proteínas e suas implicações no câncer. **Rev. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 30, jan./jun. 2003.

GOMES, F.; TORTELLI, V.; DINIZ, L. Glia: dos velhos conceitos às novas funções de hoje e as que ainda virão. **Estud. av.**, São Paulo , v. 27, n. 77, p. 61-84, 2013.

GRANT, R. Overview: brain tumour diagnosis and management: Royal College of physicians guidelines. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**. 75(Suppl II):S18-S23, 2004.

GUEVARA, P. et al. Angiogenesis and expression of estrogen and progesterone receptors as predictive factors for recurrence of meningioma. **J Neurooncol** 98:379–384, 2010.

HANAHAN, D; WEINBERG, R. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell** 144:646–674, 2011.

HANEL, R et al. Meningiomas em pacientes pediátricos: relato de 2 casos. **Arq. Neuro-Psiquiatr**, São Paulo, v. 59, n. 3A, p. 623-62, Sept. 2001.

HARRIS, G et al. Survival Outcomes of Elderly Patients With Glioblastoma Multiforme in Their 75th Year or Older Treated With Adjuvant Therapy. **International Journal of Radiation Oncology Biology**, 9, 4 802 – 810, 2017.

HERRERA, F. et al. Glioblastoma multiforme in children: experience at Hospital Infantil de Mexico Federico Gomez. **Childs Nerv Syst** 25: 551, 2009.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estimativa da incidência do câncer no Brasil, 2016.

JAWHAR, N. Tissue Microarray: A rapidly evolving diagnostic and research tool. **Annals of Saudi Medicine**.;29(2):123-127, 2009.

- JOHANNESSEN, T et al. Trends in incidence of brain and central nervous system tumors in Norway, 1970-1999. **Neuroepidemiology**. 23(3):101-9, 2004.
- JUNIOR, et al. Comparative analysis of p53 protein immunostaining (antibodies DO-7 and PAb-240) in oral cavity and lip squamous cell carcinomas. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** Rio de Janeiro, v. 45, n. 4, p. 335-342, aug. 2009.
- KATO, Y. et al. Clinicopathological evaluation of cyclooxygenase-2 expression in meningioma: immunohistochemical analysis of 76 cases of low and high-grade meningioma. **Brain Tumor Pathol.** 31(1):23-30, jan 2014.
- KETTENMANN, H.; RANSOM, B. Neuroglia. New York; Oxford: Oxford University Press, 2005
- KORHONEN, K et al. Exogenous sex hormone use and risk of meningioma: a population-based case-control study in Finland. **Cancer Causes Control CCC** 21:2149–2156, 2010.
- KUNIMATSU, A. et al. Variants of meningiomas: a review of imaging findings and clinical features **Jpn J Radiol** 34: 459, 2016.
- LIN, C. et al. Cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in human meningioma as a function of tumor grade. **Am J Clin Oncol**. ;26(4):S98-102, aug, 2003.
- LINSLER, S. et al. Prognosis of meningiomas in the early 1970s and today. **Klinik für Neurochirurgie, Universitätsklinikum des Saarlandes**. 66421 Homburg, Saar, Germany, 2016.
- LOUIS, D et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Acta Neuropathol** 131:803-820. 2016.
- MACHADO, A.; HAERTEL, L. **Neuroanatomia funcional**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2006.
- MAHZOUNI, P.; SARMADI, T. An observational study on the expression of cyclooxygenase-2 in meningioma. **Advanced Biomedical Research**. 3:211, 2014.
- MATSUO M, et al: Expression of prostaglandin H synthase-2 in human brain tumors. **Acta Neuropathol** 102:181–187, 2001.
- MESKAL, I. et al. Cognitive functioning in meningioma patients: a systematic review. **Journal of Neuro-Oncology**. 128:195-205, 2016.
- MONTGOMERY, R. et al. EGFR, p53, IDH-1 and MDM2 immunohistochemical analysis in glioblastoma: therapeutic and prognostic correlation. **Arq. Neuro-Psiquiatr.** São Paulo, v. 73, n. 7, p. 561-568, july 2015.
- NARLA, S et al. Assessment of expression of epidermal growth factor receptor and p53 in meningiomas. **Neurol India**, 62:37-4, 2014.
- NATHOO, N, BARNETT, G, GOLUBIC, M. The eicosanoid cascade: possible role in gliomas and meningiomas. **Journal of Clinical Pathology**. 57(1):6-13, 2004.
- OBER, C; LOISEL, D; GILAD, Y. Sex-specific genetic architecture of human disease. **Nat Rev Genet** 9:911–922, 2008.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, **Relatório mundial de saúde**, 2016.
- PASQUALE, B. et al. Postoperative Infection May Influence Survival in Patients With Glioblastoma: Simply a Myth? **Neurosurgery** 69 (4): 864-869, 2011.

- PARK, et al. The influence of age on the histological grading of meningiomas. **Neurosurg Rev** Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 37:425–429 2014.
- PERRY, A. Meningiomas. **Practical Surgical Neuropathology**. Churchill Livingstone Elsevier, p 185-217, 2010.
- PERRY, A.; MAWRIN, C. Pathological classification and molecular genetics of meningiomas. **Journal of Neuro-Oncology**, Volume 99, Issue 3, pp 379–391, 2010.
- PIMENTEL, F. Epidemiological profile study of patients with brain meningioma of the high Tietê Region. Faculdade de Medicina da Universidade de Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes- SP, Brasil, 2015.
- POLLACK et al. Age and TP53 mutation frequency in childhood malignant gliomas: results in a multi-institutional cohort. **Cancer Res**; 61:7404-7407, 2001.
- RAGEL, B.; JENSEN, R.; COULDWELL, W. Inflammatory Response and Meningioma Tumorigenesis and the Effect of Cyclooxygenase-2 Inhibitors. **Neurosurg Focus.**;23(4):E7, 2007.
- RIVOIRE, W. et al. Biomolecular bases of cervical oncogenesis. **Revista Brasileira de Cancerologia**.v. 47, n. 2. 179-184, 2001.
- ROBBINS E COTRAN: Patologia - Bases patológicas das doenças. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 1458 p, 2010.
- SCHOUSBOE, A. et al. Role of astrocytic transport processes in glutamatergic and GABAergic neurotransmission. **NeurochemInt** 45, 521-527, 2004.
- SEER. Cancer Statistics Review, 1975–2011. **National Cancer Institute**. 2013.
- SHARMA, S. et al. Tumor Cyclooxygenase 2-dependent Suppression of Dendritic Cell Function. **Clin Cancer Res**, march 1 (9) (3) 961-968, 2003.
- SHONO, T. et al. Cyclooxygenase-2 expression in human gliomas: prognostic significance and molecular correlations. **Cancer Res**, 1:61(11):4375-81, 2001.
- SIROMA, M.; BARACAT, F. Associação entre a presença da proteína p53 e o grau de diferenciação em carcinomas ductais invasivos de mama. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 5, p. 298-303, may 2006.
- STIPURSKY, J. et al. Neuron-astroglial interactions in cell fate commitment in the central nervous system. *Stem Cells: from tools for studying mechanism of neuronal differentiation towards therapy*. **Ulrich, A.H. Org**. Springer, v.1, p.145-164, 2010.
- SUBBARAMAIAH, et al. Increased levels of COX-2 and prostaglandin E2 contribute to elevated aromatase expression in inflamed breast tissue of obese women. **Cancer discovery**, 2:356-365, 2016.
- SUN, T. et al. Sexually dimorphic RB inactivation underlies mesenchymal glioblastoma prevalence in males. **J Clin Invest**, 2014.
- TELUGU, R. et al. Histopathological and Immunohistochemical Evaluation of Meningiomas with Reference to Proliferative Markers p53 and Ki-67. **J Clin Diagn Res.** ;10(1) jan, 2016.
- TRINDADE, V et al., Gliomas: marcadores tumorais e prognóstico. Divisão de Clínica Neurocirúrgica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. **Arq Bras Neurocir** 31(2): 91-4 ;2012.

TROTT, G. et al. Abundant immunohistochemical expression of dopamine D2 receptor and p53 protein in meningiomas: follow-up, relation to gender, Age, tumor grade, and recurrence. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**.48(5), 415-419, 2015.

TUREL, M; KIEHL, T; GENTILI, F. Delayed hemorrhage after surgery and radiation in suprasellar pilocytic astrocytomas. **Journal of Pediatric Neurosciences**. 11(3):170-174, 2016.

VALENTE, V.; MASSABKI, P. Marcadores tumorais de câncer de ovário: o que há de novo? **Rev. Bras. Clin Med**. São Paulo set-out; 9 (5): 377-81, 2011.

ZHAO, P. et al. Immunohistochemical and Genetic Markers to Distinguish Hemangiopericytoma and Meningioma. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine** 8.3 3291–3299, 2015.

WRENSCH, et al., Epidemiology of primary brain tumors: Current concepts and review of the literature. **Neuro-Oncology**, University of California at San Francisco, San Francisco, CA 2002.

YANG, L. et al. Comparison of chemoradiotherapy with radiotherapy alone for “biopsy only” anaplastic astrocytoma. **Oncotarget**. Apr 26, 2017.

Anexo I: Protocolo para estudo imuno-histoquímico

1 | Desparafinização e Hidratação:

- Lâminas em estufa à 50 °c *overnight*.
- Banhos de imersão sequenciais em Xilol:
- Xilol I: manter as lâminas em repouso por 30 minutos.
- Xilol II: manter as lâminas em repouso por 15 minutos.
- Xilol III: manter as lâminas em repouso por 15 minutos.
- Xilol IV: manter as lâminas em repouso por 15 minutos.

Realizar 20 passadas de lâminas em cada um, entre cada banho em Xilol.

- Banhos de imersão sequenciais em Álcool absoluto:
- Álcool absoluto I: sem repouso, realizar 20 passadas de lâminas.
- Álcool absoluto II: sem repouso, realizar 20 passadas de lâminas.
- Álcool absoluto II: manter as lâminas em repouso por 3 minutos.

Após o ultimo banho de Álcool Absoluto, realizar 20 passadas de lâminas.

- Banhos de imersão seqüenciais em Água destilada:
- Água destilada I: manter as lâminas em repouso por 5 minutos.
- Água destilada II: manter as lâminas em repouso por 5 minutos.

Realizar 20 passadas de lâminas em cada um, entre cada banho em Água destilada.

Antes da reação imuno-histoquímica, as lâminas devem estar totalmente desparafinizadas, para que seja removido todo o meio de impregnação, e assim serão rehidratadas. Uma vez que, a presença de resíduos de meio de impregnação implicarão aumento de coloração não-específica.

Todos os banhos de imersão são realizados em temperatura ambiente.

2 | Recuperação antigênica:

- Aquecimento da solução Retrieval com os tampões Citrato de sódio (pH 6) e EDTA (pH 9), em recipientes distintos, em panela a vapor.
- Após atingir a temperatura de 95°C, a solução Retrieval adquire um aspecto turvo, e assim as lâminas são emergidas por 30 minutos nestes recipientes.

Nesta etapa, é importante, que se cubra estes recipientes com uma tampa, para estabilização da temperatura e evitar a evaporação da solução.

- Posteriormente, permitir o resfriamento das lâminas por 20 minutos à temperatura ambiente no recipiente com a solução Retrieval.
- Água destilada I: manter as lâminas em repouso por 3 minutos.
- Água destilada II: manter as lâminas em repouso por 3 minutos.

Realizar 20 passadas de lâminas em cada um, entre cada banho em Água destilada.

3 | Bloqueio da enzima Peroxidase:

- Retira-se lâmina por lâmina, retirando o excesso de água destilada da mesma, e faz-se o contorno do corte histológico com a Dako Pen.
- Posteriormente, aplica-se 3 gotas de Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) à 3% em cada lâmina, e as mantém de 3 à 5 minutos em câmara úmida.
- Lava-se, suavemente as lâminas, com auxílio de almotolia, com solução tampão.
- Coloca-se as lâminas em Solução tampão I por 4 minutos.
- Coloca-se as lâminas em Solução tampão II por 4 minutos.

Realizar 5 passadas de lâminas, entre cada solução tampão, e guardar o último tampão (Solução tampão II).

4 | Anticorpos primários:

- Retira-se o excesso de tampão das lâminas, e aplica-se 100 ml dos anticorpos diluídos, de anti-COX-2 e anti-p53 em cada uma das lâminas. Incuba-se as mesmas em câmara úmida por 60 minutos.
- Após incubação com os anticorpos primários, lava-se suavemente as lâminas, com o auxílio de almotolia, com solução tampão.
- Coloca-se as lâminas em Solução tampão II por 4 minutos (tampão que já havia sido utilizado).
- Colocar as lâminas em Solução tampão III por 4 minutos.

Realizar 5 passadas de lâminas, entre cada Solução tampão, e guardar o último

tampão (Solução tampão III).

5 | Sistema de Detecção HiDef:

- Retira-se o excesso de Solução tampão das lâminas, e aplica-se o Amplificador, do Sistema de DetecçãoHiDef, em câmara úmida por 11 minutos.
- Lava-se, suavemente as lâminas, com auxílio de almotolia, com solução tampão.
- Colocar as lâminas em Solução tampão III por 4 minutos.
- Colocar as lâminas em Solução tampão IV por 4 minutos.

Realizar 5 passadas de lâminas, entre cada solução tampão, e guardar o último tampão (Solução tampão IV).

- Retira-se o excesso de tampão das lâminas, e aplica-se o Detector do Sistema de Detecção, em câmara úmida por 11 minutos.
- Lava-se suavemente as lâminas, com auxílio de almotolia, com solução tampão.
- Coloca-se as lâminas em Solução tampão IV por 4 minutos.
- Coloca-se as lâminas em Solução tampão V por 4 minutos.

Realizar 5 passadas de lâminas entre cada Solução tampão.

O HiDef é um sistema de polímero livre de biotina, por esta razão, torna-se desnecessário o bloqueio da biotina endógena.

6 | Solução de substrato-cromogênio (DAB)

- Realiza-se a diluição do DAB na proporção de 1:20.
- Retira-se o excesso de tampão das lâminas, e aplica-se o DAB diluído em todas as lâminas, em câmara úmida por 5 minutos.

O DAB proporciona uma coloração marrom, que irá fornecer um bom contraste com a contra-coloração da Hematoxilina.

É necessário que se faça o descarte da solução DAB em um recipiente apropriado para materiais perigoso.

7 | Contra coloração com Hematoxilina

- Lava-se as lâminas em água corrente por alguns minutos.
- Mergulhar as lâminas em Hematoxilina por 2 segundos, para que as estruturas não marcadas também possam ser vistas ao microscópio.
- Realizar 10 passadas de lâminas em água comum

- Lava-sesuavemente as lâminas em água corrente, por 5 minutos, para melhor diferenciação do corante.

8 | Montagem das lâminas

- Realizar 20 passadas de lâminas em Álcool Absoluto III
- Realizar 20 passadas de lâminas em Álcool Absoluto II
- Realizar 20 passadas de lâminas em Álcool Absoluto I
- Realizar 20 passadas de lâminas em Xilol III
- Realizar 20 passadas de lâminas em Xilol II
- Realizar 20 passadas de lâminas em Xilol I
- Com o auxílio de lamínulas, adequadas ao tamanho do corte histológico, realiza-se por fim a montagem das lâminas com o meio de montagem Entellan e espera-se secar para a visualização ao microscópio.

Anexo II: Termo de Consentimento livre e esclarecido (TCLE)

Eu _____, documento nº _____, estado civil _____, idade _____, ou pais ou responsável pelo paciente _____ documento nº _____, tenho conhecimento de minha participação como voluntário no projeto de pesquisa desenvolvido sob a responsabilidade da Pesquisadora **Dra. Renata Toscano Simões**, que tem a finalidade de investigar as características genéticas das lesões do cérebro para melhor diagnosticar e tratar os indivíduos com esse problema.

- A minha participação é voluntária e será restrita à doação de material biológico, como sangue, e biópsia (somente por indicação do meu médico médica) para o desenvolvimento da pesquisa. Este material biológico também poderá ser estocado em coleções amostras biológicas do Laboratório de Biologia Molecular da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte, podendo ser utilizado em estudos posteriores, também relacionados com o perfil genético, diagnóstico e desenvolvimento de melhores tratamentos para a doença.
- Tenho consciência de que a minha participação como voluntário não me trará nenhum privilégio ou benefício de caráter financeiro ou de tratamento preferencial.
- Os exames e procedimentos aplicados são gratuitos e seguirei o tratamento orientado pelo meu médico para a minha recuperação, independente da pesquisa.

- Fui informado de que não sofrerei riscos e desconfortos adicionais no momento da coleta e que todo o procedimento será feito com material estéril e descartável. Também não serão necessárias novas coletas durante o desenvolvimento do trabalho.
- O pesquisador me informou que os resultados obtidos com a pesquisa serão confidenciais, assegurando a minha privacidade e anonimato.
- Poderei a qualquer momento me retirar do projeto de pesquisa por qualquer motivo, sem que isso prejudique no meu tratamento, no de minha família ou de outros pacientes.

Local e data _____

Assinatura do voluntário

Dra. Renata Toscano Simões

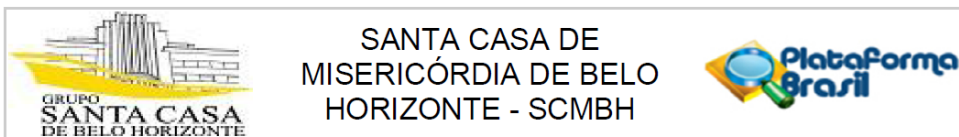
Dr. Paulo Christo Pereira

Dr. Gervásio Teles C. Carvalho

Pesquisadores Responsáveis

Núcleo de Pós-Graduação da Santa Casa de Belo Horizonte

ANEXO III: Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo da Relação da Expressão do Gene HLA-G com os Índices de Proliferação Celular (Ki67) e dos Receptores de Progesterona (PgR) em Pacientes com Meningeomas.

Pesquisador: Gervásio Teles Cardoso de Carvalho

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 30758114.4.0000.5138

Instituição Proponente: INSTITUTO DE ENSINO E PESQUISA DA SANTA CASA DE BELO HORIZONTE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 806.819

Data da Relatoria: 24/09/2014

Apresentação do Projeto:

Comparar o padrão da expressão protéica do gene Antígeno Leucocitário Humano (Human Leukocyte Antigens-G: HLA-G) com o índice de proliferação celular (IPC) através do Ki 67 e dos receptores de progesterona (PgR) para avaliar se existe uma correlação sistemática entre os mesmos em 104 meningeomas classificados conforme a OMS (Organização Mundial da Saúde) de 2007, operados na Santa Casa de Belo Horizonte (SCBH), o que poderia contribuir para a análise do prognóstico e recidivas desses tumores. Já foi demonstrado que a expressão do HLA-G está aumentado em vários tumores malignos, incluindo o GBM quando comparado com os meningeomas encefálicos (Silva KR et al 2013). Porém, não se sabe se existe uma correlação entre os graus dos meningeomas (I, II, III) conforme a classificação da OMS e a expressão do HLA-G, assim como, a correlação com os índices de proliferação celular (Ki 67) e dos receptores de progesterona (PgR). O conhecimento da relação entre a histopatologia dos meningeomas com os índices de proliferação celular (Ki 67) e os receptores de progesterona, e a expressão do HLA-G,

Endereço: Rua Domingos Vieira 590
Bairro: Santa Efigênia **CEP:** 30.150-240
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3238-8933 **Fax:** (31)3238-8838 **E-mail:** cep@santacasabh.org.br



SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE BELO HORIZONTE - SCMBH



Continuação do Parecer: 806.819

provavelmente pode contribuir para determinar o comportamento biológico desses tumores, o que poderia justificar uma cirurgia mais radical e o tratamento complementar pós cirúrgico naqueles meningiomas mais agressivos, os quais teriam maiores possibilidades de recidivas. Não existe ainda até o momento nenhuma publicação científica sobre o a expressão do HLA-G nos meningiomas.

Objetivo da Pesquisa:

Comparar o padrão da expressão protéica do gene Antígeno Leucocitário Humano (Human Leukocyte Antigens-G: HLA-G) com o índice de proliferação celular (IPC) através do Ki 67 e dos receptores de progesterona (PgR) para avaliar se existe uma correlação sistemática entre os mesmos em 104 meningiomas classificados conforme a OMS (Organização Mundial da Saúde) de 2007, operados na Santa Casa de Belo Horizonte (SCBH), o que poderia contribuir para a análise do prognóstico e recidivas desses tumores

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não há riscos, observada a privacidade do participante da pesquisa.

Benefícios:

O conhecimento da relação entre a histopatologia dos meningiomas com os índices de proliferação celular (Ki 67) e os receptores de progesterona, e a expressão do HLA-G, provavelmente pode contribuir para determinar o comportamento biológico desses tumores, o que poderia justificar uma cirurgia mais radical e o tratamento complementar pós cirúrgico naqueles meningiomas mais agressivos, os quais teriam maiores possibilidades de recidivas. Não existe ainda até o momento nenhuma publicação científica sobre o a expressão do HLA-G nos meningiomas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de apresentação de emenda ao projeto já aprovado pelo CEP-SCBH. A emenda coloca alterações administrativas e procedimentais, que não alteram os resultados ou trazem riscos aos participantes da pesquisas ou colocam em cheque o andamento do projeto. Palavras do investigador: " Não houveram alterações substanciais no projeto. As amostras já estão coletadas e

Endereço: Rua Domingos Vieira 590
Bairro: Santa Efigênia **CEP:** 30.150-240
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3238-8933 **Fax:** (31)3238-8838 **E-mail:** cep@santacasabh.org.br

Página 02 de 04



Continuação do Parecer: 806.819

armazenadas no biorrepositório do Laboratório de Biologia Molecular do IEP/SCBH, sob a responsabilidade da Dra. Renata Toscano Simões, orientadora dos projetos. As alterações realizadas foram somente na parte de descrição da coleta de amostras e a inserção de uma nova técnica de análise molecular das amostras, como descrito abaixo.

No tópico de "Material e Métodos", item "Coleta das Amostras" acrescentamos a descrição das coletas de fragmentos do tumor no reagente RNA Later e Solução Salina 0,9%, assim descrita "...1 pequeno fragmento foi colocado em RNA later, outro em soro fisiológico 0,9% e o terceiro em formol 10%. As amostras em RNA later e soro fisiológico 0,9% foram armazenadas no Biobanco em freezer -80c. A amostra acondicionadas em formol 10% foram enviadas para estudo anátomopatológico no Departamento de Patologia da SCBH."

Além disso, nesse mesmo tópico acrescentamos um novo item denominado "Análise de Expressão Gênica e MicroRNAs por PCR em Tempo Real" que está assim descrita "A análise da expressão gênica das moléculas não clássicas e dos microRNAs será realizada nas amostras de tecido armazenadas em RNA later. O RNA será extraído com o kit mirVana® (Life technologies), seguindo as recomendações do fabricante.

As análises de expressão gênica e de miRNAs, serão realizadas após a reação da transcriptase reversa (RNA – cDNA), por ensaios comercialmente padronizados TaqMam® (Life technologies) através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real.". Essa técnica, assim como a imunohistoquímica (IHQ) já descrita no projeto aprovado, também visa avaliar os níveis de expressão de moléculas. A diferença é que a IHQ mostra a expressão gênica local (reação atigênica, baseada em receptores) enquanto a técnica PCR em Tempo Real avalia a quantidade de RNA produzida pelo gene no tumor (avaliação molecular). Com isso nosso objetivo será comparar os níveis de RNA mensageiro produzido e de microRNAs com a expressão proteica tecidual. Com isso poderemos ver se os níveis de RNA do HLA-G produzido estão realmente refletindo na expressão tecidual ou se está sendo silenciado pelos miRNAs.

Quanto a Parte de Análise Estatística, ela foi somente mudada de local para uma melhor apresentação."

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram devidamente apresentados, conforme os pré requisitos deste CEP.

Endereço: Rua Domingos Vieira 590
Bairro: Santa Efigênia **CEP:** 30.150-240
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3238-8933 **Fax:** (31)3238-8838 **E-mail:** cep@santacasabh.org.br



SANTA CASA DE
MISERICÓRDIA DE BELO
HORIZONTE - SCMBH



Continuação do Parecer: 806.819

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

BELO HORIZONTE, 25 de Setembro de 2014

Assinado por:
Francisco das Chagas Lima e Silva
(Coordenador)

Endereço: Rua Domingos Vieira 590
Bairro: Santa Efigênia **CEP:** 30.150-240
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3238-8933 **Fax:** (31)3238-8838 **E-mail:** cep@santacasabh.org.br

Página 04 de 04

SOBRE A AUTORA

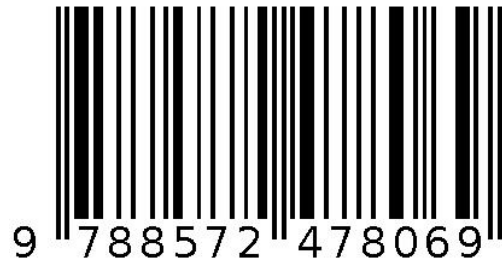
SOBRE A AUTORA

Isadora Moreira Costa do Nascimento Nogueira - Graduação em Biomedicina com habilitação em Análises Clínicas pela Universidade Fumec (2014) com atuação em Citogenética.

Mestrado em Biomedicina - Medicina pelo Instituto de Ensino e Pesquisa (IEP) da Santa Casa de Belo Horizonte (SCBH) (2017) com ênfase em marcadores imunohistoquímicos para avaliação do comportamento de tumores do sistema nervoso central (SNC).

Professora titular da Faculdade Santa Rita - Fasar.

Agência Brasileira do ISBN
ISBN 978-85-7247-806-9



9 788572 478069