

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

**Expressão da Galectina-3 e Avaliação do Índice de
Proliferação Celular e da Densidade Microvascular
em Ependimomas**

Aluno: Elder Francisco Latorraca

Orientador: Prof. Dr. Luciano Neder

Ribeirão Preto

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ELDER FRANCISCO LATORRACA

**Expressão da Galectina-3 e Avaliação do Índice de
Proliferação Celular e da Densidade Microvascular
em Ependimomas**

Dissertação apresentada ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Área de concentração: Patologia Experimental.

Orientador Prof. Dr. Luciano Neder Serafini.

Ribeirão Preto

2009

FOLHA DE APROVAÇÃO

Elder Francisco Latorraca

Expressão da Galectina-3 e Avaliação do Índice de Proliferação Celular e da Densidade Microvascular em Ependimomas

Dissertação apresentada ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Área de concentração: Patologia Experimental.

Aprovado em: __/__/____

Banca examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Ao meu amado pai, **Aldo Francisco Latorraca**, que, apesar da triste ausência, sempre me guiou como exemplo a ser seguido.

À minha querida mãe, **Maria Amélia Tasso Latorraca**, pela sua paciência durante meu percurso no mestrado, estando sempre ao meu lado.

Ao meu avô, **Vicente de Paula Latorraca**, que sempre foi um pai para mim, um modelo de honestidade e bondade.

À minha avó **Zelinda Cova Latorraca**, com seu amor incondicional, sempre dotada de muita paciência e carinho.

À **Florita Covas**, minha tia querida, que sempre esteve presente nas horas difíceis e sempre acreditou em minhas capacidades.

À minha tia **Maria Silvia Latorraca Horácio**, minha melhor amiga, a quem tantas saudades e tantas boas lembranças deixou.

À minha madrinha, **Maria do Carmo Latorraca**, que nos deixou tantas saudades.

Agradecimentos

Ao **Professor Doutor Luciano Neder Serafini** pelo incentivo, dedicação e paciência e que me possibilitou essa maravilhosa oportunidade de crescimento.

À **Maria Paula Montiani Scandar**, por tudo que me ensinou e me ajudou, pela paciência e pela grande amiga que é.

À **Deise Simões** pelo auxílio, ensinamentos e paciência a mim destinados, sem os quais não conseguiria finalizar meu trabalho.

À **Patrícia Alves Ponte Monteiro**, por sua amizade, apoio e auxílio nos ensaios imunohistoquímicos.

À **Viviane de Cássia Oliveira**, também por sua amizade, apoio e pelos preciosos conselhos.

Ao **Doutor Fabiano Pinto Saggioro**, pela ajuda no exame das lâminas.

Ao **Professor Doutor João Norberto Stávale**, pelo empréstimo das amostras de tumores.

À **Ana Maria Anselmi Dorigan** e **Abel Dorigan Neto** pelo auxílio com os ensaios imunohistoquímicos.

À **Camila de Luca Zambonini Gimenes**, **Rosangela Mazzucato Castania de Paiva**, **Neide Terezinha Gonçalves** e **Edna Pio da Silva** (*in memoriam*) por todo auxílio prestado.

“A educação é uma descoberta da nossa própria ignorância.”

(Voltaire)

“A ciência se compõe de erros, que a sua vez, são os passos para a verdade.”

(Julio Verne)

Resumo

Latorraca, E. F. **Expressão da Galectina-3 e Avaliação do Índice de Proliferação Celular e da Densidade Microvascular em Ependimomas.** 2009. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Ependimomas são tumores que se originam de eventos oncogênicos nas células do epêndima ou de células-tronco teciduais que exibem comprometimento e/ou diferenciação ependimária. Em geral, são tumores de crescimento lento e suscetíveis à ressecção cirúrgica radical, dependendo da sua localização no neuroeixo. No entanto alguns ependimomas apresentam transformação anaplásica e prognóstico reservado. Os tumores da fossa posterior podem, ainda, exibir áreas de necrose ou mesmo mitoses em alguns casos, sem que isso signifique prognóstico adverso. A importância de se estudar estes tumores é devido à sua maior prevalência e elevada morbidade em crianças e adultos jovens. Galectinas são proteínas ligantes a carboidratos de mamíferos, composta de quinze membros que desempenham papéis importantes em condições fisiológicas e patológicas. A galectina-3 (Gal-3) tem sido extensivamente estudada devido a sua relação com várias neoplasias e seu valor prognóstico. O presente projeto pretendeu avaliar a expressão de Gal-3 numa série de ependimomas de diferentes graus de malignidade e avaliar as possíveis correlações da expressão desta lectina com o Índice de Proliferação Celular avaliado pelo Ki-67 (IPC-Ki-67) e a Densidade Microvascular, avaliada pela imunomarcagem pelo CD31. Foram levantados os casos de ependimomas de pacientes operados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP) e no Hospital São Paulo da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP/EPM) num período de 18 anos (1990 a 2008). Após revisão diagnóstica e gradação dos tumores, foi realizado o levantamento dos blocos disponíveis em 40 casos. A casuística foi composta de 22 casos do sexo masculino e 18 do sexo feminino. A idade média dos pacientes foi de $19,1 \pm 16,7$ anos, (variação de 6 meses a 55 anos). Embora todos os ependimomas tenham expressado a Gal-3, não se observou correlações significativas entre a expressão desta lectina e a evolução clínica, grau histológico /ou com as demais variáveis clínicas. O IPC-Ki-67 > 3% foi observado nos casos que evoluíram ao óbito, com forte tendência a significância estatística. Nos casos com IPC-Ki-67 < 3% e idade superior a 5 anos foram os que obtiveram maior sobrevida. A localização da neoplasia, grau histológico e DMV não se correlacionaram de forma significativa com a sobrevida dos pacientes. A Gal-3 está expressa de forma ubíqua nos ependimomas, independentemente do grau de malignidade. Dentre os marcadores avaliados, o valor de corte de 3% do IPC-Ki-67 foi o que melhor discriminou os pacientes de acordo com a sobrevida.

Palavras-Chave: Ependimoma – Galectina-3 – Índice de Proliferação Celular – Ki-67 – Densidade Microvascular - Imuno-Histoquímica.

Abstract

Latorraca, E. F. **Expressão da Galectina-3 em ependimomas, estudo da densidade vascular e expressão de Ki-67.** 2009. 82 f. Dissertation (Master's degree) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Ependymomas are rare tumors originated from the cells that cover the ventricles of the CNS and central canal of the spinal cord. Generally they are slow growth tumors and are susceptible to complete surgical resection, depending on the tumor location.. However some ependymomas show anaplastic transformation and a dismal prognosis. Ependymomas in the posterior fossa may show areas of necrosis or even mitosis in some cases with no impact in the prognosis. The study of ependymomas relies of its greater prevalence in children and young adults as well as it's with high morbidity. Galectins are carbohydrate-binding proteins from mammals compounded of fifteen members that play important roles in physiological and pathological conditions. Galectin-3 (Gal-3) has been extensively study due to its relation with several tumors and prognosis. The present study aimed to evaluate the Gal-3 expression in a series of 40 ependymomas of different grades of malignity as well as to evaluate possible correlations of this lectin's expression with the proliferation index measured by Ki-67 (Ki-67 LI) and with Microvascular Density (MVD), evaluated by immunostaining for CD31. Cases were retrieved from patients operated at Clinical Hospital of Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo (HCFMRP-USP) and São Paulo Hospital from Federal University of São Paulo (UNIFESP/EPM) in a period of 18 years (1990 to 2008). After the diagnostic review and tumor grading, tissue blocks were retrieved from the files of our Institutions. The casuistic was composed of 22 males and 18 females. The patient mean age was 19.1 ± 16.7 years (ranging from 6 months to 55 years). All ependymomas were reactive for Gal-3, but its expression did not correlate with the patient outcome or tumor grading as well as to the others clinic variables. The Ki-67 LI $> 3\%$ was observed in cases which followed to death, with a strong tendency to statistical significance. Cases with Ki-67 LI $< 3\%$ and patient's age (> 5 years) were the best predictive of a better patient survival. Tumor location, histopatological grading and MVD did not show any relationship with the patient survival. Gal-3 is ubiquitously expressed in ependymomas of all grades of malignancy. Among the evaluated markers, the Ki-67 LI of 3% (cut-off) was the best value that better discriminate the patient outcome.

Key words: Ependymoma – Galectin-3 – Proliferation Index – Ki-67 – Microvascular Density – Immunohistochemistry.

Lista de figuras

Figura 1 -	Corte de encéfalo evidenciando a camada endimária.....	16
Figura 2 -	Locais de maior incidência dos endimomas.....	20
Figura 3 -	Aspectos histológicos dos endimomas.....	22
Figura 4 -	Ilustração dos três grupos de glectinas e seus respectivos membros.....	27
Figura 5 -	Etapas do processo de angiogênese.....	36
Figura 6 -	Marcações imuno-histoquímicas dos endimomas.....	58
Figura 7 -	Sobrevida média dos pacientes de acordo com o gênero.....	60
Figura 8 -	Sobrevida média de acordo com a faixa etária.....	60
Figura 9 -	Sobrevida média de acordo com o grau histológico.....	61
Figura 10 -	Sobrevida média de acordo com a localização dos tumores.....	61
Figura 11 -	Sobrevida média de acordo com a expressão de Gal-3.....	62
Figura 12 -	Sobrevida média de acordo com o IPC-Ki-67.....	62

Lista de tabelas

Tabela 1 -	Anticorpos utilizados nas reações imuno-histoquímicas.....	47
Tabela 2 -	Relação de tecidos de controles para imuno-histoquímica.....	47
Tabela 3 -	Sumário dos dados clínicos.....	52
Tabela 4 -	Idade dos pacientes segundo a localização da neoplasia, grau histopatológico e evolução clínica.....	54
Tabela 5 -	Distribuição da marcação por Gal-3 nos ependimomas de acordo com o grau histológico.....	55
Tabela 6 -	Expressão de Gal-3 segundo a evolução clínica.....	55
Tabela 7 -	Distribuição da marcação por Ki-67 segundo a evolução.....	56
Tabela 8 -	Distribuição do IPC-Ki-67 de acordo com o grau histológico.....	56
Tabela 9 -	Distribuição da Densidade Microvascular nos ependimomas de acordo com o grau histológico e a evolução clínica.....	57
Tabela 10 -	Sobrevida em semanas pacientes segundo as variáveis clínicas e imuno-histoquímicas.....	59
Tabela 11 -	Resultados das marcações dos anticorpos distribuídos por caso.....	63

Lista de abreviações

AgNOR -	Regiões argirofílicas organizadoras de nucléolos
BrdU -	Bromodeoxiuridina
CDR -	Domínios de Reconhecimento de Carboidrato C-terminal
DAB -	Diaminobenzidina
DMV –	Densidade microvascular
EDTA -	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EMA -	Antígeno de membrana epitelial
FCM -	Citometria de fluxo
Gal-3 –	Galectina-3
GFAP –	Proteína glial fibrilar ácida
HCl –	Ácido clorídrico
H&E -	Hematoxilina-eosina
IT –	Infratentorial
IPC –	Índice de Proliferação Celular.
kDa –	Kilo Dalton
OMS –	Organização Mundial da Saúde
PBS –	Solução salina fosfato-tamponada
PCNA –	Antígeno nuclear de proliferação celular
PECAM-1 -	Molécula de adesão celular endotelial plaquetária-1
SNC –	Sistema Nervoso Central
ST –	Supratentorial
TBST -	Solução salina Tris-tamponada com tampão Tween
VEGF –	Fator de crescimento do endotélio vascular

Sumário

INTRODUÇÃO.....	14
Sistema Nervoso Central e células da glia.....	15
Neoplasias primárias do SNC.....	17
Classificação.....	18
Ependimomas.....	19
Variantes de classificação.....	20
Ependimoma mixopapilar (grau I)	21
Subependimoma (OMS grau I)	21
Ependimoma (OMS grau II)	21
Ependimoma anaplásico (OMS grau III)	22
Ependimoblastomas.....	23
Aspectos Morfológicos dos Ependimomas.....	23
Ependimomas Ectópicos.....	24
Sintomatologia.....	25
Galectinas.....	26
Galectina-3.....	27
Galectina-3 e gliomas.....	28
Diferenciação de gliomas.....	29
Ki-67.....	31
Ki-67 e Ependimomas.....	32
CD31 e Densidade Microvascular.....	35
Angiogênese.....	35
Moduladores da Angiogênese.....	36
Angiogênese e neoplasias.....	37
Densidade microvascular e ependimomas.....	37
GFAP.....	38
Hipótese Operacional.....	39
OBJETIVOS.....	40
Gerais.....	41
Específicos.....	41
Delineamento Experimental.....	42
METODOLOGIA.....	43

Material.....	44
Crêterios de inclusão.....	44
Casuística.....	45
Método.....	46
Morfometria.....	48
Galectina-3.....	48
�ndice de Prolifera�o Celular determinado pelo Ki-67.....	48
CD31.....	49
Análise Estatística.....	49
RESULTADOS.....	50
Casuística.....	51
Achados Imuno-Histoquímicos.....	55
Expressão da galectina-3.....	55
IPC-Ki-67.....	56
Densidade Microvascular.....	57
Análise da sobrevida.....	59
Expressão de galectina-3 e a Sobrevida.....	61
IPC-Ki-67 e a Sobrevida.....	62
DISCUSSÃO.....	64
CONCLUSÕES.....	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
ANEXOS.....	80
Anexo A.....	81
Anexo B.....	81

INTRODUÇÃO

Sistema Nervoso Central e células da glia

O Sistema Nervoso Central (SNC), diretamente relacionado ao Sistema Endócrino é o responsável pela regulação da maior parte das funções do corpo humano. De complexidade inigualável, o encéfalo recebe milhões de informações dos diferentes órgãos sensoriais, integrando-as e, assim, determinando a resposta a ser dada. Injúrias ao tecido nervoso podem ocasionar danos irreparáveis ao organismo, acometendo significativamente a saúde do indivíduo.

A principal unidade funcional do SNC é o neurônio. Estima-se que existam 10^{11} neurônios no cérebro humano. As células da glia (astrócitos, oligodendrócitos, células endimárias e do plexo coróide), por sua vez, são responsáveis pela manutenção da integridade e funcionalidade dos neurônios, sendo essenciais para a sobrevivência dos mesmos. Além de serem um dos constituintes da barreira hematoencefálica, as células da glia são as responsáveis pela reparação do tecido nervoso e pela maior parte das neoplasias primárias do SNC (FROSCH, ANTHONY; DE GIROLAMI, 2005).

Dentre as células da glia, destacam-se as células endimárias (Figura 1), que formam uma camada epitelial que reveste as quatro câmaras do sistema ventricular, bem como o canal central da medula espinhal e estendem-se até o *filum terminale*. As células endimárias variam de cuboidais a achatadas, possuem citoplasma visível em colorações de rotina, além de exibirem borda ciliada e microvilos voltados para a superfície ventricular, o núcleo é pálido e vesiculado. Sua principal função é modular a transferência de líquido entre o parênquima do SNC e o líquido cefalorraquidiano (RUBIM *et al.*, 2006). Nos extremos ântero-posteriores das cavidades ventriculares, bem como na medula espinhal de adultos, podem se observadas células endimárias desorganizadas remanescentes e que não devem ser interpretadas como neoplásicas.

A ruptura das células endimárias está associada à uma proliferação local de astrócitos subependimários, produzindo pequenas irregularidades, chamadas de granulações endimárias. Certos agentes infecciosos, em particular o citomegalovírus, podem produzir lesão endimária extensa, podendo encontrar-se inclusões virais nos núcleos das células endimárias (FROSCH *et al.*, 2005). Durante a gestação, algumas infecções virais têm por alvo as células endimárias, um evento responsável, em parte, pela estenose do aqueduto e pela hidrocefalia congênita (RUBIM *et al.*, 2006).

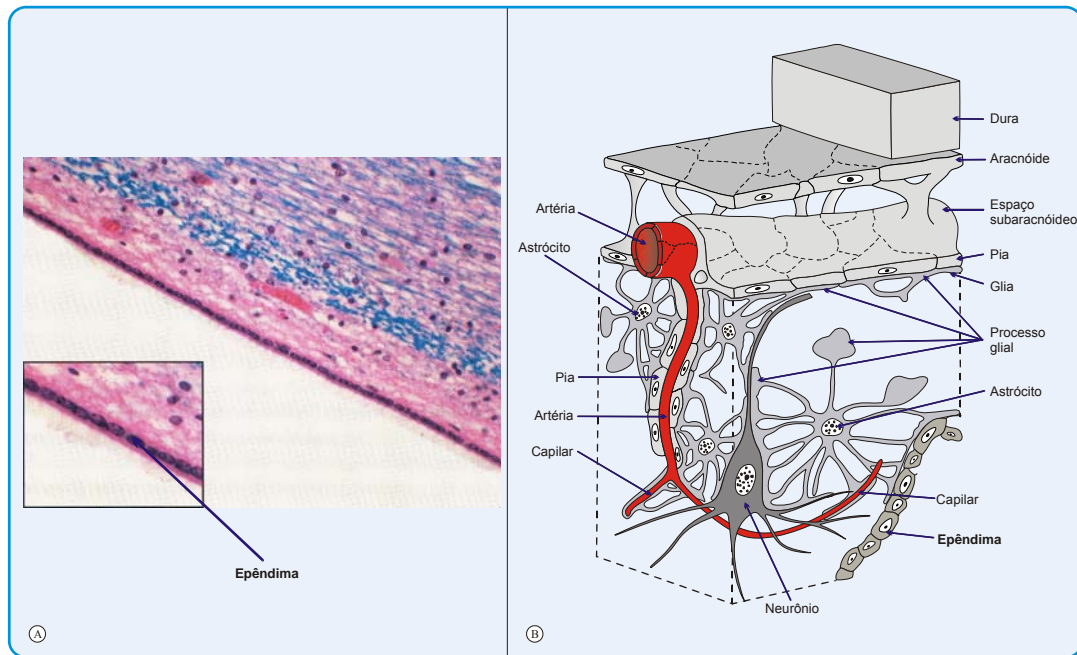


Figura 1 - **A.** Corte de encéfalo evidenciando a camada endimária (coloração de H&E, aumento de 200x na imagem maior e 400x no detalhe).
B. Esquema ilustrativo das células gliais e sua relação com a microvasculatura e envoltórios do SNC Modificado de Brodal (1998).

Do ponto de vista imuno-histoquímico, a célula endimária expressa a proteína S-100, Vimentina. A expressão da proteína gliofibrilar ácida (GFAP), é variável particularmente em pseudorosetas endimárias e nos endimomas de baixo grau (RENI *et al.*, 2007). Caracteristicamente, as células e as neoplasias endimárias de baixo grau exibem imunoreatividade em padrão “dot” para o antígeno de membrana epitelial (EMA), correspondendo a *lumens* intracelulares. Uma variante especial de células endimárias é o tancito, célula afunilada alongada a qual, ao contrário de células endimárias colunares comuns, estende-se, via longo processo basilar, para o interior da camada subendimária (BURGER; SCHEITHAUER, 1994).

Dada à importância crucial à vida humana, as lesões no tecido nervoso geram acometimentos de ordem elevada para homeostasia do organismo em geral. As peculiaridades do SNC acompanham sua vulnerabilidade, visto que os neurônios são incapazes de se multiplicar de formas significativas após o desenvolvimento embrionário. Dependendo da localização, a destruição de determinadas áreas podem ocasionar considerável deficiência orgânica. Por outro lado, a distinção de lesões benignas e malignas é menos evidente no SNC do que em outros tecidos, e o potencial de metástases dos tumores do SNC é inferior em comparação a outras neoplasias (FROSCH *et al.*, 2005).

Pela alta complexidade do SNC tais neoplasias podem ser letais apenas devido a sua localização anatômica, mesmo sem apresentar características histológicas de malignidade. (FROSCH *et al.*, 2005).

Neoplasias primárias do SNC

Os tumores primários do SNC representam a segunda neoplasia mais frequente nos primeiros cinco anos de vida e são mais freqüentes em homens do que em mulheres. Gliomas representam mais de 70% dos tumores do SNC, sendo os glioblastomas os mais frequentes (> 60%). Tumores cerebrais tendem a ser mais frequentes em países desenvolvidos. No oeste Europeu, América do Norte, e Austrália a incidência é de 6 a 11 novos casos de tumores intracraniais primários por 100.000 homens por ano e de 4 a 11 novos casos por 100.000 mulheres por ano (OHGAKI; KLEIHUES, 2005).

Dentre os tumores cerebrais os tumores endimários compreendem o terceiro tipo histológico mais frequente, seguido dos tumores astrocíticos e tumores embrionários (incluindo meduloblastomas). Embora endimomas representem 2,1% de todos os tumores cerebrais desconsiderando a idade, eles representam 6,4% dos pacientes entre 0 e 14 anos e 5% entre pacientes de 15 a 19 anos de idade (GODFRAIND, 2009).

As neoplasias do sistema nervoso central (SNC) exibem elevada morbiletalidade, podendo acometer crianças e adultos jovens (WECHSLER-REYA; SCOTT, 2001). Os tumores primários do SNC correspondem à 20% do total de cânceres na infância (FROSCH *et al.*, 2005).

Com exceção das síndromes neoplásicas herdadas, a radiação é o principal fator relacionado ao aparecimento de tumores cerebrais. A exposição ocupacional, campos elétricos e magnéticos, imunossupressão, linfomas cerebrais primários, tabagismo, componentes N-nitrosos na dieta, trauma, infecções virais e barbitúricos são outros fatores possivelmente relacionados à gênese dos tumores cerebrais por alguns autores (GRAHAM; LANTOS, 2002), mas que ainda não estão bem estabelecidos.

A incidência anual em países da América do Sul, Central e Ásia é menor que 2 casos por milhão. Na América do Norte, Oceania e maior parte da Europa o índice varia de 2 a 4 casos por milhão. Aproximadamente 500 novos casos de endimomas são diagnosticados na Europa por ano (RENI *et al.*, 2007).

Classificação

De acordo com a classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) há mais de 120 tipos distintos de neoplasias primárias no SNC, com amplo espectro morfológico e de comportamento biológico muito variável. Os gliomas constituem a neoplasia primária cerebral mais freqüente. Por gliomas entendem-se as neoplasias das células da glia: astrócitos, oligodendrócitos, células ependimárias em diferentes graus de malignidade.

Embora as células do plexo coróide sejam consideradas como subtipo das células da glia, os tumores do plexo coróide são considerados um grupo à parte dos gliomas.

Desde a primeira classificação dos tumores cerebrais por Bailey e Cushing em 1926, os tumores são denominados em relação à semelhança morfológica da célula neoplásica com a sua contraparte "normal", vista tanto no desenvolvimento embrionário/fetal como no cérebro adulto (GRAHAM; LANTOS, 2002). Embora a imuno-histoquímica seja de grande auxílio na prática diagnóstica, tanto na definição de entidades pouco diferenciadas, bem como na gradação histológica, não existem anticorpos que identifiquem única e exclusivamente determinado tipo de neoplasia, isto é, que a imunoexpressão seja específica para determinado tipo celular ou tumor. No entanto a determinação de novos marcadores imuno-histoquímicos e o aperfeiçoamento dos exames de neuroimagem são de grande auxílio na classificação de tumores no SNC (COLLINS, 2004).

O critério histopatológico para a malignidade em ependimomas não está claramente definida e a reprodutibilidade do diagnóstico entre observadores permanece frágil. Por exemplo, em contraste com tumores supratentoriais, necrose não é uma característica útil para o diagnóstico de malignidade em ependimomas de fossa posterior na ausência de proliferação celular ou aumento da atividade mitótica. De fato, o diagnóstico e a classificação dos ependimomas é deveras subjetiva e estudos clínicos mostram uma relação fraca entre características histopatológicas e a evolução clínica dos pacientes (PREUSSER *et al.*, 2008).

Com o desenvolvimento de novas terapêuticas, sobretudo a possibilidade de se atingir determinados alvos terapêuticos como receptores de fatores de crescimento na membrana celular ou bloqueadores hormonais, etc., o conhecimento das alterações genéticas tem assumido papel cada vez mais relevante. Atualmente, para a determinação de uma nova entidade ou confirmação diagnóstica de casos polêmicos é fundamental a caracterização das alterações genéticas. Desde a classificação da OMS de 2000, além da morfologia, foram incorporados os aspectos genético-moleculares para a denominação e classificação os tumores primários do SNC (COLLINS, 2004).

Ependimomas

São tumores que se originam de eventos oncogênicos nas células do epêndima ou de células-tronco teciduais que exibem comprometimento e/ou diferenciação endimária. C .

Os endimomas podem ocorrer em qualquer sitio no SNC, mas os principais locais de incidência são a linha mediana do quarto ventrículo, a partir do assoalho ou do teto, medula sacrolombar, *filum terminale* e cauda eqüina (Figura 2). Podem ser encontrados no interior do parênquima cerebral ou mesmo fora do neuroeixo (partes moles, tecido subcutâneo), como resultado de restos de células endimárias fetais migrantes de áreas periventriculares (RENI *et al.*, 2007).

Nas primeiras décadas de vida originam-se principalmente no quarto ventrículo, com pico de incidência por volta dos 6 anos de idade. Em adultos, ocorrem principalmente na medula espinhal, com maior incidência na 4ª década de vida. Os endimomas supratentoriais afetam crianças e adultos em proporções semelhantes. Em relação ao gênero, há leve preponderância do sexo masculino (MCLENDON *et al.*, 2007). Tais tumores na infância são altamente celulares e exibem rosetas endimárias em grande quantidade. Em adultos são localizadas mais frequentemente na medula espinhal, especialmente na região lombo-sacral, surgindo do *filum terminale* (Figura 2).

São tumores de crescimento lento e frequentemente suscetíveis à completa ressecção cirúrgica (RENI *et al.*, 2007). A disseminação de tumores endimários está estimada em cerca de 11%, estando associada ao aumento da mortalidade, o que evidencia a necessidade de tratamento intensivo e efetuação da ressecção cirúrgica sempre que possível (REZAI *et al.*, 1996).

A importância de se estudar tais tumores reside na sua maior prevalência em crianças e em jovens, principalmente àqueles com transformação anaplásica, por exibirem elevada morbiletalidade (RILLIET; VERNET, 2000).

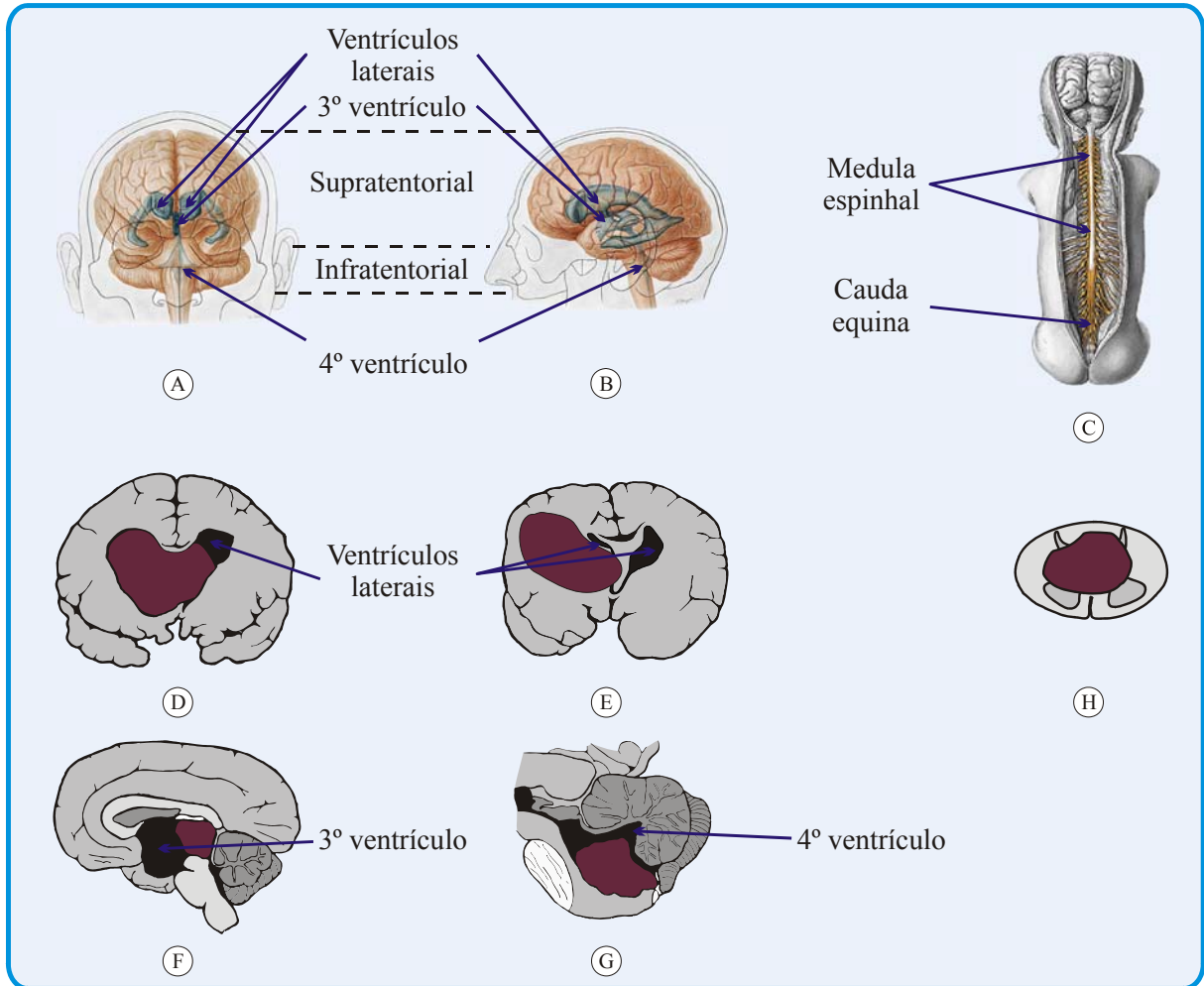


Figura 2. Locais de maior incidência dos ependimomas. **A.** Projeção sobre o encéfalo; vista lateral. **B.** Projeção sobre o encéfalo; vista superior. **C.** Vista posterior da medula espinhal. **D.** Ependimoma no ventrículo lateral. **E.** Ependimoma no hemisfério cerebral. **F.** Ependimoma no terceiro ventrículo. **G.** Ependimoma no quarto ventrículo. **H.** Ependimoma na medula espinhal.

Em relação aos tumores ependimários, os mesmos foram corretamente diagnosticado por Virchow em 1863. e sua origem nas células ependimárias foi sugerida por Mallory, que encontrou blefaroplastos típicos – pontos citoplasmáticos minúsculos corados em escuro, relacionados com a ciliação dessas células (GONZALEZ-GOMES; GILLES, 1995). A classificação atual da OMS dos tumores do SNC divide os ependimomas em quatro categorias e em três graus de malignidade (MCLENDON *et al.*, 2007):

Variantes de classificação

- Ependimoma mixopapilar (OMS grau I)
- Subependimoma (OMS grau I)
- Ependimoma (OMS grau II)

- Ependimoma anaplásico (OMS grau III)

Ependimoma mixopapilar (OMS grau I)

Tumor benigno e de bom prognóstico que se apresenta de preferência no cone medular ou no *filum terminale*. Histologicamente é constituído por células ependimárias cúbicas ou cilíndricas baixas, circundado por vasos sanguíneos em uma matriz mucóide (Figura 3B). Os ependimomas mixopapilares espinhais geralmente estão localizados na região lombo-sacral, raramente ocorrendo primariamente na região intracraniana (YUCESDY, OZER; KOYUNCUOGLU, 2001; LIM; JANG, 2006; PITTELLA *et al.*, 2006).

Subependimoma (OMS grau I)

Benigno, exibe crescimento lento e de forma expansiva, sendo frequentes os focos de microcalcificação (FROSCHE *et al.*, 2005; PITTELLA *et al.*, 2006) Exibem consistência firme, superfície externa nodular de cor nacarada e limites nítidos. Microscopicamente apresenta núcleos isomórficos em meio à abundante matriz fibrilar (Figura 3A). As mitoses são raras ou ausentes (RENI *et al.*, 2007).

Ependimoma (OMS grau II)

Possui celularidade moderada, as mitoses são raras ou ausentes e a morfologia nuclear é monomórfica. As características histológicas principais são: pseudo-rosetas perivasculares e as rosetas ependimárias (RENI *ET AL.*, 2007) (Figura 3C)

Distinguem-se quatro variantes histológicas: celular, papilar, de células claras e tanicítica: a variante celular exibe grande celularidade e poucas pseudo-rosetas ou rosetas verdadeiras. O subtipo papilar apresenta células neoplásicas arranjadas em papilas separadas por delicado estroma glial pouco vascularizado sem lâmina basal entre as células neoplásicas e os vasos sanguíneos. A variante de “células claras” (“*clear cells*”) apresenta células com citoplasma claro com halo perinuclear e a variante tanicítica exibe células neoplásicas com prolongamentos que se estendem à luz dos ventrículos sendo baixa a celularidade e escassas

as pseudo-rosetas vasculares (PITTELLA *et al.*, 2006).

Ependimoma anaplásico (OMS grau III)

Representa cerca de 5% dos ependimomas e ocorre principalmente nos hemisférios cerebrais de crianças e adultos jovens, onde compreende aproximadamente 25% dos ependimomas. Os ependimomas anaplásicos são identificados por sua alta atividade mitótica, densidade celular elevada, proliferação endotelial, atipias nucleares, figuras de mitoses, podendo ser encontradas células gigantes uni e multinucleadas e necrose (PITTELLA *et al.*, 2006; MCLENDON *et al.*, 2007) (Figura 3D). Segundo alguns autores, uma das características mais marcantes dos ependimomas anaplásicos é a presença de rosetas perivasculares (RENI *et al.*, 2007).

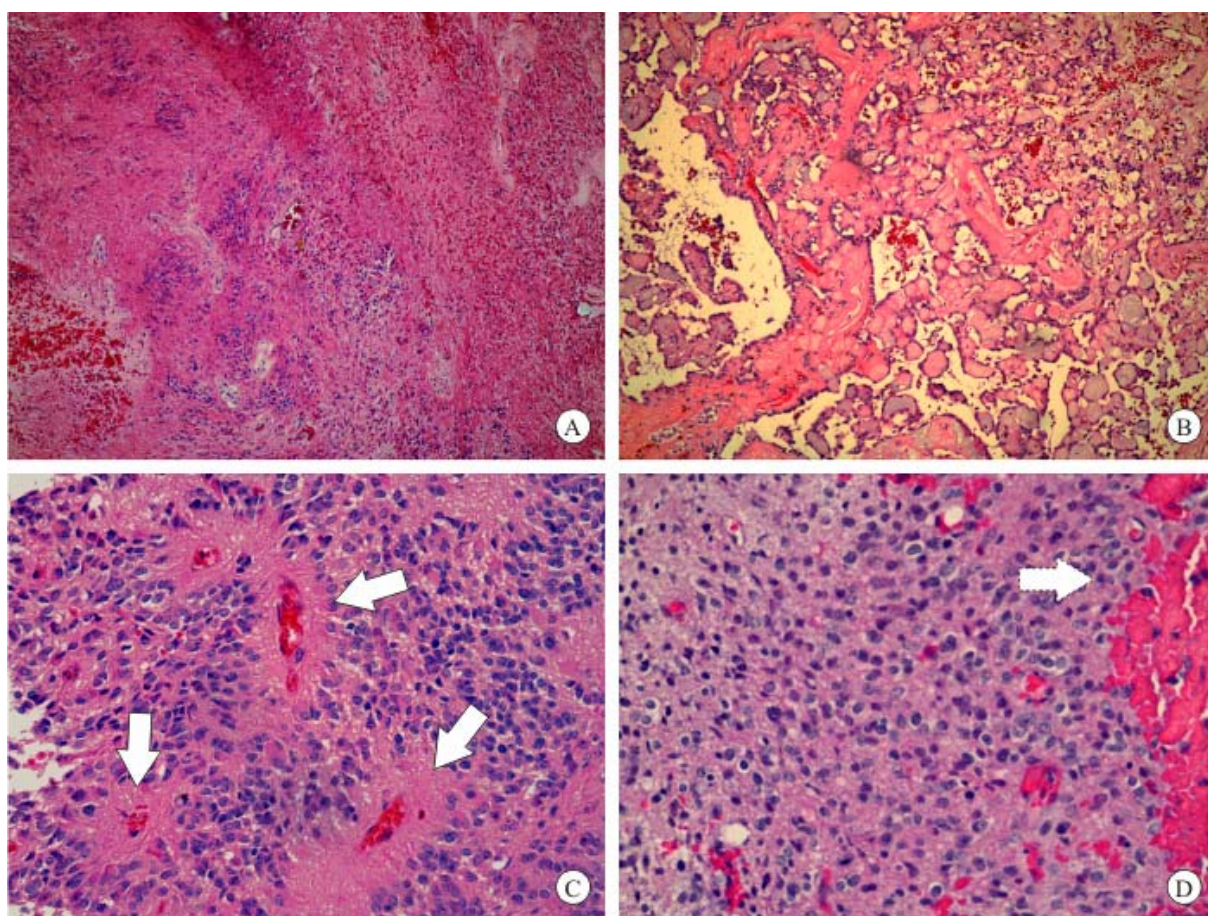


Figura 3: Aspectos histológicos dos ependimomas. A: Subependimoma (100x). B: Ependimoma Mixopapilar (100x). C: Ependimoma; setas cheias – pseudo-rosetas vasculares. D: Ependimoma anaplásico; setas tracejadas – foco hemorrágico. (H&E).

Ependimoblastomas

Classificado dentre os tumores embrionários, os ependimoblastomas foram primeiramente reconhecidos por Bailey e Cushing (1926) em localização sacral. Os ependimoblastomas são tumores neuroectodérmicos raros que ocorrem em crianças na primeira infância, sendo distintos dos ependimomas anaplásicos (LANGFORD, 1986). O ependimoblasto representa um estágio intermediário na diferenciação da célula meduloepitelial para o ependimócito maduro. As células do ependimoblastoma foram comparadas ao estágio em que células ventriculares primitivas residuais, que revestem o tubo neural, adquirem progressivamente características de células ependimárias adultas (MORK; RUBINSTEIN, 1985). O ependimoblastoma é caracterizado por células neuroepiteliais uniformes, rosetas ependimoblásticas, pseudorosetas perivasculares e numerosas figuras de mitoses. Citologicamente apresenta pequenas células com citoplasma escasso, núcleos hiper cromáticos, arredondados e cromatina dispersa (LORENTZEN; HAGERSTRAND, 1980). Esta característica de multicamadas assemelha-se às rosetas de Flexner-Wintersteiner dos retinoblastomas, diferindo ainda daquelas encontradas nos ependimomas, onde as rosetas são circundadas por apenas uma ou duas camadas celulares, cujas figuras de mitoses freqüentemente demonstram posição justaluminal (MORK; RUBINSTEIN, 1985).

Aspectos Morfológicos dos Ependimomas

Macroscopicamente apresenta-se como um tumor sólido, acinzentado, não encapsulado e de limites relativamente definidos. Quando se desenvolve em uma cavidade ventricular, tende a ocupá-la por completo. Sua superfície externa é lisa, micronodular ou papilar, especialmente no *filum terminale*, mais raramente nas formas intraventriculares. O parênquima neoplásico é homogêneo, acinzentado, às vezes com cistos e áreas de calcificação. O estroma é escasso e é formado por vasos de aspecto normal, algumas vezes com áreas de calcificação. A maioria dos ependimomas é bem diferenciada e a invasão extensiva de estruturas adjacentes do SNC é incomum (PITTELLA *et al.*, 2006).

Microscopicamente exhibe massas celulares sólidas ou papilares. Histologicamente é constituído por células de núcleos regulares redondos ou ovais, com cromatina granular abundante (FROSCH *et al.*, 2005). Geralmente o número de mitoses é baixo e o

pleomorfismo celular é discreto (RICHARDS *et al.*, 2004). Caracteristicamente exibem as chamadas “pseudorosetas” perivasculares, que podem ser raramente observadas em outros tumores gliais (CHOW; BRITTINGHAM, 1987; PITTELLA *et al.*, 2006) (Figura 3C).

Em relação aos aspectos genéticos, aproximadamente 30% dos ependimomas apresentam monossomia do cromossomo 22, sendo que em alguns casos há deleção ou translocação envolvendo o 22q. A maior parte das desordens genéticas está relacionada a este cromossomo, porém monossomias dos cromossomos 6, 7, 9, 10, 11, 13, 17 já foram descritas na literatura (HAMILTON; POLLACK, 1997).

Ependimomas Ectópicos

Ependimomas podem se desenvolver em outros locais fora do neuroeixo, como a região pélvica, ovários, ligamento largo do útero, partes moles, mediastino e pulmão (ESTROZI *et al.*, 2006). São incomuns e postula-se que se originem de restos de células endimárias heterotópicas ou de vestígios medulares do tubo neural embrionário na região coccígea (DUGGAN *et al.*, 1989). Raramente, tais tumores podem também originar-se através da disseminação vascular e mesmo implante direto após excisão cirúrgica.

Ependimomas pélvicos originam-se no ovário, ligamento largo, mesovário e omento tendo sido descritos apenas em mulheres, principalmente durante a fase reprodutiva. A histogênese de ependimomas pélvicos é ainda discutida. Acredita-se que os ependimomas no ovário podem representar o desenvolvimento parcial de um teratoma. Outra explicação para origem desta neoplasia no peritônio seria a possibilidade dos tumores nesta área se diferenciarem em novos tipos de tecidos, como neuroectoderma, habitualmente ausente nesta área. O diagnóstico baseia-se nas características morfológicas básicas dos ependimomas, como presença de pseudorosetas, rosetas endimárias verdadeiras, além dos achados imunohistoquímicos (DUGGAN *et al.*, 1989).

Sintomatologia

Dentre os principais achados clínicos na ocorrência de ependimomas a cefaléia representa o principal sintoma, seguido por náuseas, vômitos e disfunções cerebelares,

dependendo da localização. No IV ventrículo a ocorrência de ependimomas pode ocasionar obstrução da drenagem de liquor céfalorraquidiano levando a hidrocefalia com hipertensão intracraniana (CARELLI; BORGES, 2006).

Galectinas

Galectinas são proteínas ligantes a carboidratos, compreendendo quinze membros filogeneticamente conservados de lectinas encontrada em organismos multicelulares que abrangem desde fungos a mamíferos (HERNANDEZ; BAUM, 2002; RUMILLA *et al.*, 2006). As galectinas reconhecem resíduos de açúcar que revestem as glicoproteínas e glicolípídeos celulares (β -galactosídeos), desempenhando papéis importantes em condições fisiológicas, como proliferação, apoptose, regulação transcricional, sinalização intracelular, adesão e migração celular. Em condições patológicas exerce papel na tumorigênese, progressão, disseminação e sobrevivência das células neoplásicas (STILLMAN; MISCHEL; BAUN, 2005).

As Galectinas são compostas de um ou dois Domínios de Reconhecimento de Carboidrato C-terminal (CDR) com aproximadamente 130 aminoácidos cada, que consiste em duas cadeias β agrupadas, responsáveis pela ligação a β -galactosídeos (PIETERS, 2006). De acordo com a estrutura bioquímica, as galectinas são divididas em três grupos: *i*) as galectinas prototípicas, em repetição” e quiméricas (Figura 4); *ii*) as galectinas “em repetição”, onde cada membro possui dois CDRs conectados por uma curta região de ligação (Galectina-4, -6, -8, -9 e -12); e *iii*) grupo quimérico onde seu único membro é a galectina-3 (Gal-3), que possui apenas um CDR e uma região de domínio não-lectina envolvida na oligomerização desta proteína. O grupo das Galectinas prototípicas é, ainda, dividido em dois subgrupos, as *monoméricas*, que contêm apenas um CDR (Galectina-5, -7, -10 e -15) e as *diméricas*, que contêm dois CDRs idênticos (Galectina-1, -2, -11, -13 e -14 (HERNANDEZ; BAUM, 2002). Sugere-se que a multivalência das Galectinas e suas propriedades de ligações cruzadas podem determinar diferentes respostas biológicas muito possivelmente pela indução da agregação de glicorreceptores específicos da superfície celular que estão associados a diferentes sinais de transdução de sinais celulares (RABINOVICH *et al.*, 2002).

A ampla distribuição das galectinas na natureza está associada à dualidade das suas funções. São encontradas tanto no espaço intra como no extracelular. No espaço extracelular possui ligação cruzada com glicanos e estão relacionadas à transdução de sinais que levam à morte celular (HERNANDEZ; BAUM, 2002). No espaço intracelular, as galectinas foram identificadas como fatores de união aos pré-RNA_m (Gal-1 e Gal-3) e por exercerem influência na regulação do crescimento celular e apoptose (Gal-3, -7 e -12) (LIU, PATTERSON; WANG, 2002). Determinados tipos de galectinas podem atuar em múltiplos tipos celulares e múltiplas galectinas podem atuar numa mesma célula (HERNANDEZ;

BAUM, 2002).

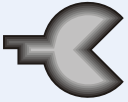
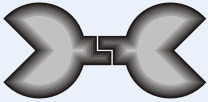
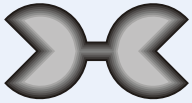
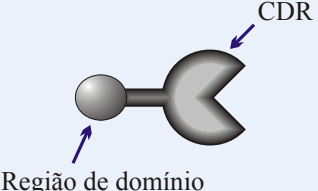
Galectinas Prototípicas			
Monoméricas		Diméricas	
	Gal-5, -7, -10, -15		Gal-1, -2, -11, -13, -14
Galectinas “em repetição”			
		Gal-4, 6, 8, 9, 12	
Galectina Quimérica			
		Gal-3	

Figura 4. Ilustração dos três grupos de Galectinas e seus respectivos membros.

Galectina-3

Molécula ligante ao β -galactosídeo animal, também conhecida como proteína ligante a IgE, Mac-2, CBP-30, CBP-35, ml-34, RL29, L-29, hL-31, L-31, L-34, LBL e CBP (BARONDES *et al.*, 1994; NANGIA-MAKKER *et al.*, 2000; TAKENAKA, FUKUMORI; RAZ, 2004). É o membro da família das Galectinas mais estudado, principalmente pelo seu papel na tumorigênese. Localizada no espaço intra e extracelular, possui peso molecular de 31 kDa e liga-se a componentes da matriz extracelular, incluindo laminina e fibronectina. Sua estrutura possui três domínios: um NH₂-terminal, uma seqüência repetida ligada ao colágeno rica em glicina, prolina e tirosina, e o CDR (TAKENAKA *et al.*, 2004). O domínio NH₂-terminal contém apenas 12 aminoácidos que controlam a especificidade da célula-alvo.

A galectina-3 exerce funções tanto em condições fisiológicas como patológicas. Sua participação fisiológica principal é na inflamação, exercendo efeitos nas células inflamatórias, como aumento da atividade oxidativa em neutrófilos e quimiotaxia em monócitos. A galectina-3 também está associada à tumorigênese e progressão do câncer. Alguns papéis

desempenhados por esta lectina são os de aumentar o crescimento do tumor ao inibir a apoptose, promover angiogênese e/ou diminuir a adesão celular (STILLMAN, MISCHER; BAUM, 2005).

A expressão da Gal-3 está aumentada nas neoplasias gástricas (LOTAN *et al.*, 1994), hepáticas (HSU *et al.*, 1999) e da tireóide (XU, EL-NAGGAR; LOTAN, 1995); estando diminuída nas neoplasias de cabeça e pescoço (CHOUFANI *et al.*, 1999), sarcomas uterinos (SCHWARZ *et al.*, 1999) e carcinomas da próstata (ELLERHORST *et al.*, 1999).

O aumento da expressão de galectina-3 está correlacionado ao potencial metastático de várias células neoplásicas por afetar a mobilidade celular e facilitar a invasão da matriz extracelular (NANGIA-MAKKER *et al.*, 2000). Sua função pode ser determinada pela sua localização na célula. Em células do câncer da próstata, por exemplo, a localização das galectinas no citoplasma está associada à invasão, crescimento independente de ancoragem, angiogênese e inibir a apoptose. Quando localizada no núcleo da célula o efeito é oposto, atuando em favor da inibição da invasão, redução do crescimento dependente de ancoragem e promoção da apoptose (STILLMAN *et al.*, 2005). Apresenta-se na forma não fosforilada, situada apenas no núcleo, e fosforilada, situada no núcleo e citoplasma (NEDER *et al.*, 2004b; LE MERCIER *et al.*, 2009).

Como será discutido adiante, a Gal-3 possui, além das propriedades tumorigênicas, a capacidade de induzir a formação de capilares sanguíneos, aumentando o suporte de nutrientes para a neoplasia (NANGIA-MAKKER *et al.*, 2000).

Galectina-3 e gliomas

O papel da galectina-3 em tumores cerebrais tem sido amplamente estudado. As funções relacionadas à patogênese dos tumores, como proliferação celular, perda da adesão celular e indução da angiogênese, são indicativas de modificar a patobiologia dos tumores do SNC. Por exemplo, o potencial invasivo, uma das marcas dos gliomas difusos, aparentemente está sujeito à ação desta lectina, visto que a Gal-3 modula a motilidade de células de glioblastoma humano em cultura por influenciar a organização citoesqueleto e a expressão das integrinas- $\alpha 6$ e $-\beta 1$ (DEBRAY *et al.*, 2004).

Mais recentemente a galectina-3 tem sido utilizada como marcador tumoral. Por exemplo, a galectina-3 tem sido utilizada na diferenciação entre os glioblastomas e oligodendrogliomas, que podem exibir semelhanças histopatológicas em alguns casos e

também ser de auxílio na distinção de astrocitomas pilocíticos e astrocitomas difusos (NEDER *et al.*, 2004b).

Diferenciação de gliomas

Bresalier *et al.* (1997) investigaram a imunomarcção da Gal-3 em 42 tumores primários do SNC: oligodendrogliomas (n = 4); meningiomas (n = 4); ependimomas (n = 2); astrocitomas (n = 12); astrocitomas anaplásicos (n = 4) e glioblastomas (n = 16), e em 29 tumores metastáticos provenientes do pulmão (n = 22), mama (n = 2), cérvix (n = 1), sarcoma (n = 1), cólon (n = 1) e de origem desconhecida (n = 2). Seus achados demonstram que os astrocitomas difusos expressam a proteína proporcionalmente ao grau de malignidade do tumor, isto é, os astrocitomas grau I não a expressam, enquanto todos os glioblastomas a expressam. A apresentação da Gal-3 nos meningiomas foi fraca e ausente nos oligodendrogliomas e ependimomas. Amostras de cérebro normal não expressaram Gal-3. Os autores concluíram haver forte correlação entre o aumento da expressão desta lectina com o aumento do grau de malignidade. Não houve associação a imunexpressão da Gal-3 com a localização das lesões. Todas as metástases no cérebro expressaram Gal-3, sendo esta expressão muito mais pronunciada nas metástases do que nos tumores primários.

Gordower *et al.* (1999) estudaram uma série de 84 tumores astrocíticos, dentre eles: astrocitomas grau II (n = 22), grau III (n = 21) e grau IV (n = 41), além de 7 tecidos cerebrais não neoplásicos como controle. Utilizando-se de microscopia assistida por computação avaliaram o padrão de expressão da galectina-3, do anticorpo anti-galectina-3 e dos sítios de ligação à galectina-3, este último avaliado pela presença do molécula laminina, um forte sítio de ligação da Gal-3. Os autores descreveram que a medida que a área marcada pelo anticorpo anti-galectina-3 e a quantidade de astrócitos tumorais imunomarcados pelo Gal-3 diminuem em relação ao aumento da malignidade a intensidade da imunomarcção não se alterou significativamente. A marcação dos sítios de ligação para Gal-3 não apresentou diferenças significativas em relação ao aumento da malignidade. A diminuição das marcações em relação ao aumento do grau histológico foi correlacionada com a ação das proteases (por exemplo MMP-2 e MMP-9) expressas nos tumores astrocíticos (apud ROMANIC; MADRI, 1994). Estas proteases clivam a Gal-3, e têm sua expressão aumentada no aumento da malignidade (apud OCHIENG *et al.*, 1998).

Neder *et al.* (2004b) realizaram um estudo com o intuito de se avaliar a expressão da

Gal-3 em gliomas. Foram avaliados astrocitomas pilocíticos (n = 15), astrocitomas difusos grau II (n = 14), astrocitomas anaplásicos (n = 10), glioblastomas (n = 15), oligodendrogliomas grau II (n = 10), oligodendrogliomas anaplásicos (n = 14) e oligoastrocitomas (1 caso de cada grau). Os pesquisadores observaram níveis de RNAm significativamente elevados nos glioblastomas e astrocitomas pilocíticos, com baixa expressão nos astrocitomas difusos e oligodendrogliomas. Na avaliação imuno-histoquímica não houve expressão da Gal-3 em oligodendrogliomas, independentemente do grau de malignidade. Os astrocitomas pilocíticos expressaram difusamente esta lectina, em contraste com os astrocitomas difusos grau II. Os glioblastomas exibiram marcação heterogênea, porém intensa para Gal-3, principalmente próximo às áreas de necrose. Não se observou a imunomarcação do endotélio para Gal-3 nos vasos tumorais nos astrocitomas pilocíticos e glioblastomas, em contraste com os vasos do parênquima cerebral adjacente e os dos astrocitomas difusos e oligodendrogliomas. Desta forma, uma vez que a Gal-3 expressou-se diferencialmente nos glioblastomas em comparação aos oligodendrogliomas anaplásicos e mesmo entre os astrocitomas pilocíticos e os astrocitomas difusos, os autores postularam que a avaliação imuno-histoquímica deste marcador pode ser de auxílio na diferenciação entre estes gliomas.

Rodriguez *et al.* 2008 avaliaram a expressão de Gal-3 em 201 casos de tumores do SNC e da região selar, incluindo 7 casos de ependimomas (4 grau II e 3 grau III). Exceto por um caso, os ependimomas graus III exibiram expressão de Gal-3 variando de < 10% a 50% das células neoplásicas. Recentemente, Cho *et al.* (2009), utilizando um painel de anticorpos em tumores condróides do SNC (cordomas, condrosarcomas, ependimomas mixopapilares e meningiomas cordóides), descreveram a expressão de Gal-3 em 4 de 9 ependimomas. Os mesmos descreveram ainda que a Gal-3 é um sensível marcador, mas não específico, para os cordomas.

Ki-67

É um antígeno nuclear não-histona presente unicamente nas fases ativas do ciclo celular. Sua produção inicia-se na fase G1 do ciclo celular e aumenta no decorrer do processo de duplicação. Todas as células em divisão expressam Ki-67 em todas as fases do ciclo celular, exceto G0. O antígeno é composto por um complexo biomolecular de 345 e 397 KDa cujos genes envolvidos estão localizados no cromossomo 10 (SCHONK *et al.*, 1989).

O Ki-67 tem sido utilizado para determinar a taxa de células em proliferação nas mencionadas fases G1, S, G2 e M do ciclo celular em praticamente todos os campos da patologia. É aplicado ao estudo de fração de crescimento e atividade citocinética em vários carcinomas (KATORI, NOZAWA; TSUKUDA, 2007).

Para a estimativa do potencial proliferativo de tumores existem diversas ferramentas possíveis, que vão desde simples contagens de figuras de mitose em lâminas coradas pela hematoxilina e eosina (H&E) a métodos imuno-histoquímicos, como a pesquisa do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), regiões argirofílicas organizadoras de nucléolos (AgNOR) e bromodeoxiuridina (BrdU), além da utilização de citometria de fluxo. A técnica mais utilizada é a da imuno-histoquímica, onde o Ki-67 é o marcador mais utilizado para a determinação do Índice de Proliferação Celular (IPC) nos tumores cerebrais (QUINONES-HINOJOSA *et al.*, 2005). A pesquisa de figuras de mitoses exibe várias desvantagens em relação aos marcadores de proliferação celular. Por exemplo, as figuras de mitoses representam apenas uma pequena fração do ciclo celular, as mitoses podem ser facilmente confundidas com cariorréxis e picnoses nucleares, além do fato de que figuras de mitoses podem desaparecer mesmo após a remoção do tumor (QUINN; WRIGHT, 1990). No caso de outros marcadores imuno-histoquímicos a possibilidade de erros é devido a tais técnicas detectarem células em proliferação apenas na fase S do ciclo celular, apresentando apenas uma fração do processo (SALLINEN *et al.*, 1994). A utilização da citometria de fluxo, apesar de ser amplamente utilizada é substituída pelo Ki-67 por este utilizar apenas uma pequena fração de tecido e possibilitar a avaliação morfológica das células analisadas (SPYRATOS *et al.*, 2002). O MIB-1 é um dos anticorpos monoclonais que reage com o antígeno Ki-67 em tecido fixado, sendo outro, o anti-Ki-67 (QUINONES-HINOJOSA *et al.*, 2005).

Ki-67 e Ependimomas

Rezai *et al.*, (1996) avaliaram o IPC pelo Ki-67 em ependimomas com e sem disseminação tumoral no período de 1986 a 1994. Foram avaliados 16 pacientes com disseminação (idade média 16,8 anos), e 35 sem disseminação tumoral (idade média 28,3 anos), sendo diferença de idade entre grupos estatisticamente significativa ($p = 0,02$). Entre os pacientes com ressecção radical 83% não apresentaram disseminação tumoral, enquanto 71% dos pacientes com ressecção parcial desenvolveram neoplasia disseminada, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p = 0,02$). A avaliação do IPC pelo MIB-1 não foi significativa entre os graus I e II, mas foi significativa para o ependimomas grau III comparado aos outros ($p = 0,0003$). Neste estudo os ependimomas grau I exibiram média de IPC de 1,6%, os grau II exibiram 2,4% e o grau III exibiram 21,0. Houve significância estatística na avaliação dos tumores considerando todas as regiões de desenvolvimento tumoral, sendo o IPC-Ki-67 o grupo dos pacientes com disseminação tumoral com média de IPC de 2,06% e o grupo sem disseminação tumoral com média de 13,14% ($p = 0,02$). Também foi encontrada significância estatística entre os tumores localizados na região intracraniana, com valor de IPC de 31% para pacientes com disseminação tumoral e 4,8% para pacientes sem disseminação tumoral ($p = 0,014$). O valor de *cut-off* não foi determinado. A forte associação demonstra a qualidade do Ki-67 como instrumento de prognóstico para recorrência de ependimomas.

Bennetto *et al.* (1998) avaliaram o IPC em crianças com tumores grau II e III localizados na fossa posterior, 54% sendo do sexo masculino, idade média de 32 meses (variação de idade de 5 meses a 16 anos), no período de 1976 a 1994. O IPC-Ki-67 médio foi de $20,6 \pm 15,6\%$ e mediana 17,3%. Os valores de IPC-Ki-67 não se correlacionaram com o grau histológico. O estudo utilizou um *cut-off* de 25%. A correlação entre o IPC_Ki-67 e a sobrevida foi efetuada utilizando a curva de Kaplan-Meier, que exibiu $p = 0,036$, demonstrando diferença significativa na sobrevida.

Ritter *et al.* (1998) avaliaram o IPC-MIB-1 em 34 pacientes, 19 homens e 15 mulheres, de 1972 a 1996, com média de 14,5 anos (variação de 1 a 59 anos). Destes casos, 10 tumores estavam localizados na região supratentorial, 18 na infratentorial e 6 na região medular. 21 pacientes foram submetidos à ressecção total, 10 submetidos à ressecção parcial e em 10 pacientes que não foi possível obter o grau ressecção. Utilizando um *cut-off* de 20% de imunomarcção tumoral os autores encontraram correlação do IPC pelo MIB-1 com indivíduos maiores de 20 anos, sendo pacientes com mais de 20 anos apresentam IPC inferior

a 20%, e com gênero, sendo o sexo masculino apresentando IPC relativamente maior. Observou-se um significativo decréscimo na sobrevida em casos com IPC >20%, onde apenas 46% e 12% dos pacientes com tal índice permaneceram vivos após 1 e 5 anos, respectivamente, comparados aos 91% e 69% dos pacientes que permaneceram vivos no mesmo intervalo.

Prayson (1999) avaliou 61 casos de tumores ependimários encefálicos e medulares provenientes de 1968 a 1996, de graus II e III, compreendendo 36 homens e 25 mulheres. Ao término do estudo 20 pacientes permaneceram vivos e sem sinal de lesão residual, 17 com lesão residual e 12 evoluíram a óbito. Seis pacientes faleceram sem causas relacionadas ao tumor e em dois não foi evidenciada a *causas mortis*. Em 50 destes casos foi estudado o IPC pelo MIB-1, com média de 4,37% e mediana 1,1%. O grupo geral de pacientes vivos exibiu média de 3,6% e mediana 1,1%. O grupo de pacientes que evoluíram a óbito exibiu amplitude de 0,1 a 34,0% com média 5,9 e mediana 0,4. Os autores relataram que a porcentagem de pacientes com tumores recorrentes ou que evoluíram a óbito que exibiram IPC maiores ou iguais a 4,0% (46% e 30%, respectivamente) foi significativamente maior do que pacientes vivos cujo tumores exibiram o mesmo IPC (24%).

Figarella-Branger *et al.* (2000), em um estudo de tumores ependimários de graus histológicos II e III, avaliaram 37 pacientes, sendo 21 homens e 16 mulheres, de idade de 3 meses a 168 meses, com média de 48 meses. Doze tumores estavam localizados na região supratentorial e 25 na infratentorial. 15 pacientes sofreram ressecção radical da neoplasia e 22 ressecção parcial, sendo que ao término do estudo 18 pacientes estavam vivos e 19 foram a óbito devido à neoplasia. Estipulou-se um *cut-off* 1% (devido a fixação do tecido, como explicado pelos próprios autores). A análise univariada demonstrou que o IPC maior que 1% esteve relacionado a diminuição da sobrevida livre de doença por mais de cinco anos. A análise multivariada encontrou uma significativa associação entre sobrevida livre de doença por mais de cinco anos com ressecção radical, IPC pelo Ki-67 <1% e idade superior a 4 anos.

Suzuki *et al.* (2001) avaliaram o IPC pelo Ki-67 em tumores ependimários de grau I, II e III em 29 pacientes, 18 do sexo masculino e 11 do sexo feminino, com idade média de 29,2 anos (variação de 1 ano a 64 anos), num período de 25 anos (1974 a 1999). Quanto à localização 6 tumores situavam-se na região supratentorial, 13 tumores na região infratentorial e 9 tumores na região medular. Ki-67 exibiu IPC de 0,8% em tumores mixopapilares (apenas um espécime coletado), marcação geral para ependimomas grau II exibiu IPC de $3,1 \pm 2,6\%$. Para variantes de grau II o IPC foi de $2,3 \pm 2,0\%$ para celular e

papilar agrupados, $4,0 \pm 2,6\%$, para células claras e $1,0 \pm 0,8\%$ para tunicítico. O IPC de endimomas anaplásicos foi de $13,0 \pm 12,6\%$. Os autores encontraram uma forte correlação entre a sobrevida com a marcação de cada tipo histológico, sendo os endimomas anaplásicos com o menor tempo de sobrevida comparado a todo grupo grau II. Entre as variantes foi encontrada uma maior sobrevida para os pacientes com endimomas tunicíticos e menor para endimomas de células claras. Os valores da análise estatística não foram exibidos neste estudo.

Suri *et al.* (2004) avaliaram o IPC-Ki-67 em 70 pacientes (idades de 1 ano a 61 anos), 50 homens e 20 mulheres com endimomas grau I (n = 3), II (n = 57) e III (n = 9), coletados no período compreendido entre 1994 a 2001. Vinte tumores estavam localizados na região supratentorial, 38 na região infratentorial e 12 na região medular. Dentre os casos de endimomas grau III, os autores incluíram um “ependimoblastoma”. O IPC-Ki-67 médio foi de 0,6%, 0,9% e 5,1% para os tumores grau I, II e III, respectivamente. Neste estudo, o IPC-Ki-67 correlacionou-se significativamente com o grau de malignidade das neoplasias, porém não foi avaliada a correlação do IPC com a sobrevida.

Wolfsberger *et al.* (2004) avaliaram o IPC-Ki-67 em 103 casos de endimomas intracranianos (75 grau II e 28 grau III). Os pacientes foram divididos em dois grupos em relação a um valor de corte do IPC de 20,5% (*cut-off*). No grupo de pacientes que apresentou $IPC < 20,5\%$ a sobrevida de 5 anos foi observada em 79% dos casos, enquanto no grupo de pacientes que exibiu $IPC \geq 20,5\%$, cerca de 70% dos pacientes apresentaram sobrevida inferior a 5 anos. Neste estudo, não foram encontradas correlações significativas entre a evolução clínica e a localização da neoplasia ou com a idade do pacientes.

Kurt *et al.* (2006) estudaram o IPC-Ki-67 apenas em endimomas grau II em 69 pacientes, 38 pacientes do sexo masculino e 31 do sexo feminino, com idade média de 26,7 anos (de recém-natos a 65 anos). Ao término do estudo 29 estavam vivos, 23 evoluíram ao óbito pela neoplasia, sendo 12 óbitos no período pós-operatório. Os tumores dividiam-se em 34 endimomas celulares, 8 endimomas de células claras, 20 endimomas papilares e 7 endimomas tunicíticos. A ressecção radical foi obtida em 24 casos e a parcial em 42 casos. Em apenas 3 casos foram realizadas biópsias para fins de diagnóstico. Utilizando um valor de corte do IPC de 1% a análise univariada demonstrou que o IPC- Ki-67 correlacionou-se com a sobrevida ($p = 0,014$). No entanto, a análise multivariada demonstrou apenas que o índice mitótico (até 1 figura de mitose por campo de 40x) e o IPC- Ki-67 ($IPC < 1\%$) correlacionaram-se significativamente com a sobrevida ($p = 0,027$ e $p = 0,023$, respectivamente).

CD31 e Densidade Microvascular

CD31, ou molécula plaquetária de adesão celular endotelial 1 (PECAM-1) é uma glicoproteína que pertence à família de moléculas transmembrana de adesão celular tipo 1, que, por sua vez, são membros da superfamília das imunoglobulinas. Possui peso molecular de 130-140 kDa e é altamente expressa na membrana das células endoteliais, nas plaquetas, monócitos, neutrófilos, subgrupos de células T e, em menor grau, nas células hematopoéticas. É o principal constituinte da junção entre as células endoteliais (AROCA *et al.*, 1999). PECAM-1 está relacionada com diversos fenômenos fisiológicos e patológicos como: migração leucocitária, angiogênese, apoptose, agregação plaquetária, trombose (WOODFIN, VOISIN; NOURSHARGH, 2007). A mensuração da densidade microvascular (DMV) tem como objeto avaliar a quantidade de vasos formados na neoplasia através do fenômeno da angiogênese.

Angiogênese

Angiogênese, também conhecida como neoformação vascular pode ser definido como o processo complexo compreendendo uma série de eventos celulares que levam a formação de vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes (RISAU, 1997) (Figura 5).

A formação de vasos no organismo divide-se em dois processos fundamentais:

1. *Vasculogênese*: formação da rede vascular durante o período embriônico, onde grandes vasos originam-se *in situ* a partir de células endoteliais primordiais;
2. *Angiogênese*: formação e crescimento de novos vasos a partir da vasculatura existente.

A angiogênese ocorre numa ampla gama de processos tanto fisiológicos como patológicos. Dentre os fisiológicos destacam-se o desenvolvimento pós-parto, a cicatrização e o ciclo menstrual. Nos processos patológicos, a formação desordenada de vasos está presente em processos como a aterosclerose, degeneração macular, psoríase, endometriose, artrite reumatóide, doença de Crohn e o crescimento neoplásico, tanto em neoplasias sólidas como nas hematológicas ((GRIFFIOEN; MOLEMA, 2000).

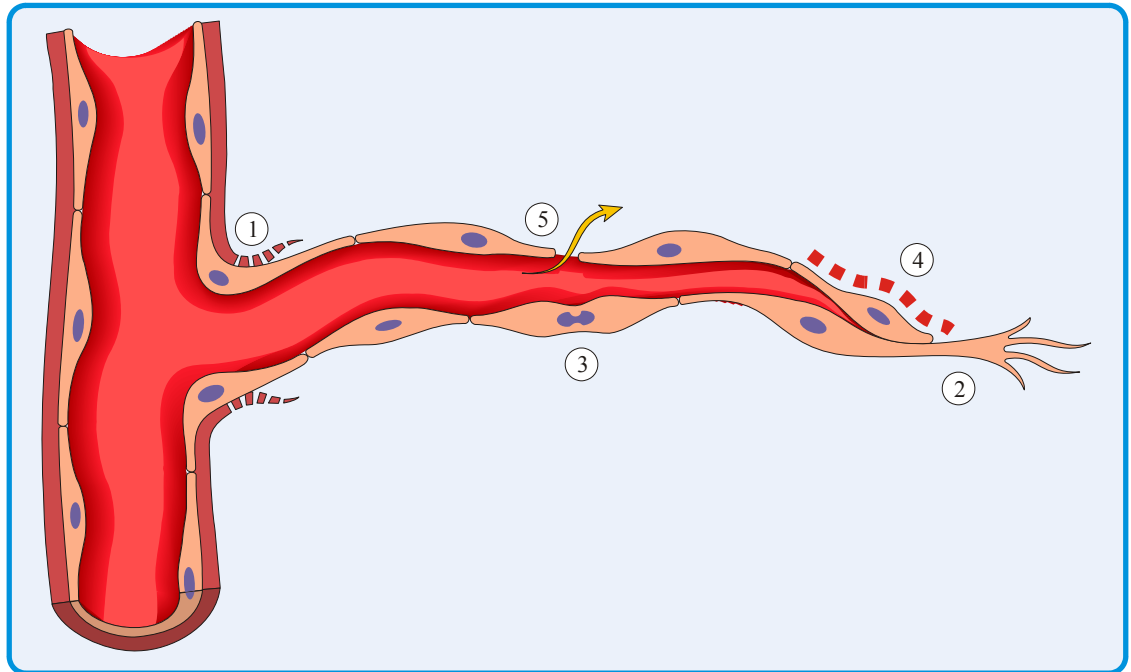


Figura 5. Etapas do processo de angiogênese. **1.** Proteólise da membrana extracelular. **2.** Migração e quimiotaxia. **3.** Proliferação endotelial. **4.** Formação da luz, maturação e inibição do crescimento. **5.** Aumento da permeabilidade e transcitose (SAGE, 1997).

Durante a angiogênese as células endoteliais inicialmente respondem a alterações no meio local e migram em direção ao tumor crescente (SAGE, 1997). As células endoteliais, então, migram agrupadas formando estruturas tubulares que são finalmente encapsuladas pelo recrutamento de células periendotheliais de suporte que estabilizam a rede vascular e, em situações patológicas, facilitam o crescimento tumoral e metástase (HUSS *et al.*, 2001).

Moduladores da Angiogênese

O processo da angiogênese é regido pelo balanço entre fatores promotores e inibidores do crescimento. Fatores de crescimento são moléculas secretadas de forma autócrina e parácrina pelas células tumorais (HUSS *et al.*, 2001), células endoteliais e células do sistema imunológico que participam dos processos de reparação tecidual, envolvendo principalmente a angiogênese (BROOKS, CLARK; CHERESH, 1994).

Formas solúveis de proteínas ligantes a carboidratos (por exemplo: E-selectina, molécula de adesão a células vasculares e P-selectina) promovem a migração celular endotelial e a morfogênese após ligação aos seus ligantes glicoconjugados específicos.

Finalmente, Nangia-Makker *et al.* (2000), após observar a formação de vasos após injeção de células que expressam Gal-3 em de ratos, demonstraram que a Gal-3 possui potencialidade angiogênica ao induzir formação de tubos capilares endoteliais *in vitro*, sem causar proliferação das células endoteliais, e angiogênese *in vivo*.

Angiogênese e neoplasias

O estabelecimento e a manutenção de uma rede vascular é um quesito essencial para o crescimento tumoral e sua posterior dissipação, isto é, a formação de metástases no organismo. A proliferação de células tumorais isenta de angiogênese dará origem a um tumor microscópico e dormente de 1 mm³, ou menos, em média. Tais neoplasias *in situ* são inofensivas para o hospedeiro (FOLKMAN, 2006).

No processo de progressão neoplásica o processo de neoformação vascular é crucial para o estabelecimento da metástase. A angiogênese aumenta a entrada de células mutadas na circulação sanguínea por promover um aumento de vasos sanguíneos imaturos e altamente permeáveis que apresentam pequena membrana basal e menos complexos de junção intercelulares (ZETTER, 1998).

A difusão dos vasos neoformados ainda imaturos, e, assim, impotentes para o bloqueio de agentes invasivos, aumenta a superfície para a dissipação de células tumorais na circulação. Sua importância é reforçada pelo fato de que na ausência de neovascularização, as células cancerígenas raramente invadem os vasos sanguíneos (FILHO, PEREIRA; GUIMARÃES, 2006). Segundo Folkman (2006) o controle da atividade angiogênica no organismo poderá permitir um decréscimo no aparecimento de colônias metastáticas ou o aparecimento de apenas uma massa tumoral ínfima que será, como dito antes, inofensiva ao hospedeiro e até suscetível à destruição pelo sistema imunológico.

Densidade microvascular e ependimomas

Tumores gliais exibem grande potencial de neovascularização. Gliomas de alto grau são caracterizados por uma maior proliferação microvascular em relação à gliomas de baixo grau histológico e também o cérebro sadio. Glioblastomas estão entre os maiores indutores de

angiogênese entre todos os tumores (LOPES, 2003).

A mensuração da densidade microvascular pelo CD31 foi avaliada em diversos tumores do SNC. Apesar da determinação da DMV em gliomas ter sido alvo de discordância entre os pesquisadores, a determinação da DMV é aceita como um fator relevante na gradação de vários tumores cerebrais e indicador de evolução clínica desfavorável.

Em ependimomas a DMV foi analisada por Duda-Szymanska; Papierz, (2007) através da expressão dos anticorpos CD31, fator FVIII (fator *von Willebrand*) em 51 casos grau II (e suas variantes histológicas) e III, totalizando 26 homens e 25 mulheres, com idades de 3 meses a 68 anos (média 34 anos). Os valores da densidade microvascular variaram de 18 a 62 vasos/mm² (média 34,4 vasos/mm²). No subtipo celular os valores foram de 18 a 59 (média 31,7); no subtipo “clássico”, 19 a 50 (média 32,4); nos mistos, 28 a 50 (média 39,1) e nos ependimomas anaplásicos, 55 a 62 (média 59). Os autores observaram diferença significativa entre os valores da DMV entre os tumores grau II e os III ($p < 0.0001$), mas não observaram diferença com relevância estatística entre os valores de DMV para as variantes de grau II.

GFAP

Proteína glial fibrilar ácida (GFAP) é o principal filamento intermediário em astrócitos maduros do SNC. Consiste em uma proteína intracitoplasmática de 50 kD e 8-9 nm. Evidências sugerem que a GFAP participa como colaborador em processos que controlam a morfologia, adesão e proliferação de astrócitos. O filamento estabiliza o citoesqueleto do astrócito e mantém seu formato celular através da interação entre a membrana nuclear e a membrana plasmática além de formar uma estrutura ligante entre as membranas. Técnicas de supressão do gene decodificador do GFAP indicam que o filamento está diretamente envolvido na interação astrócito-neurônio, onde os astrócitos desempenham um papel vital na modulação da eficácia sináptica no SNC. Participa também de processos regenerativos, onde, no SNC de vertebrados evoluídos, resultantes pré-lesionais de trauma, doença, desordens genéticas ou dano químico ocorre o fenômeno da astrogliose (RUTKA *et al.*, 1997; ENG, GHIRNIKAR; LEE, 2000).

O aumento da expressão de GFAP em astrócitos ocorre gradualmente durante o aumento da idade. Curiosamente essa expressão diminui com o aumento da malignidade de tumores astrocíticos (RUTKA *et al.*, 1997).

A GFAP e outros filamentos intermediários compartilham algumas propriedades

químicas e domínios polipeptídicos intramoleculares comuns.No entanto, a GFAP possui alguns epítomos únicos, altamente imunogênicos, tendo provado ser um marcador altamente específico para as células de linhagem glial normal ou neoplásica. A imunoreatividade do anticorpo anti-GFAP no SNC adulto está restrita a filamentos gliais dentro dos astrócitos protoplasmáticos na substância cinzenta, astrócitos fibrosos na substância branca, glia radial no cerebelo e astrócitos subependimários adjacentes aos ventrículos cerebrais. Na superfície do cérebro sua reatividade está restrita aos astrócitos que formam a membrana limitante externa (ENG; GHIRNIKAR; LEE, 2000).

Hipótese Operacional

De acordo com as características da galectina-3 partimos da hipótese que a mesma estivesse diferencialmente expressa nos ependimomas de acordo com o grau de malignidade.

O presente estudo tem ainda como propósito a validação deste marcador para tumores ependimários e a determinação de um valor do índice de proliferação celular avaliado pelo Ki-67 que melhor discriminasse os ependimomas de baixo grau dos de alto grau ou que fosse capaz de melhor predizer a evolução do neoplasia.

OBJETIVOS

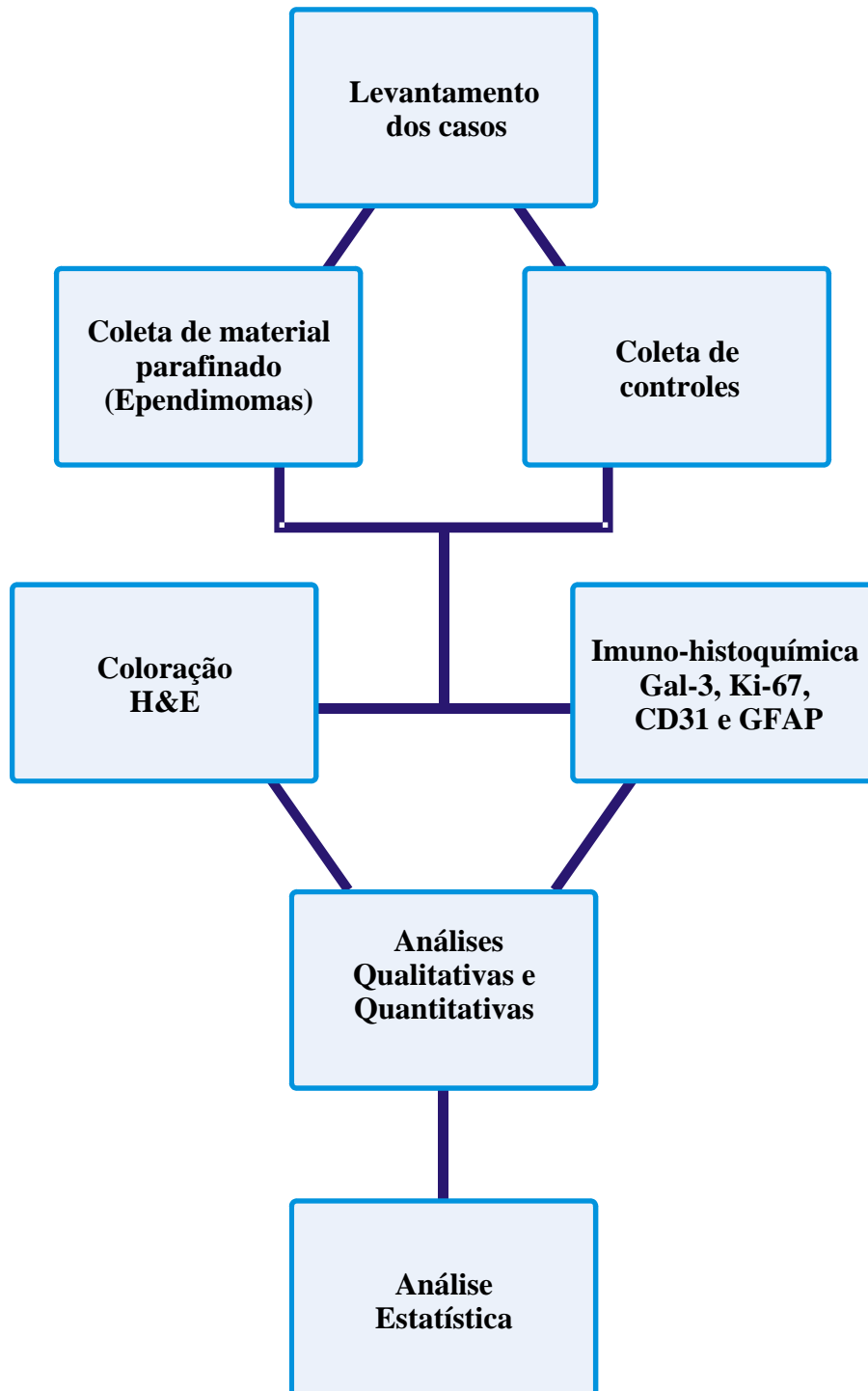
Gerais

- Avaliar a expressão de galectina-3 em ependimomas de diferentes graus de malignidade.
- Determinação de um valor do índice de proliferação celular avaliado pelo Ki-67 que melhor discriminasse os ependimomas de baixo grau dos de alto grau ou seja capaz de predizer com mais acurácia a evolução do paciente.

Específicos

- Correlacionar a expressão da galectina-3 com a evolução clínica.
- Correlacionar a expressão da galectina-3 com o índice de proliferação celular avaliado pelo Ki-67 e com a densidade microvascular.

Delineamento Experimental



METODOLOGIA

Material

Casos de tumores ependimários foram obtidos a partir dos bancos de dados do Serviço de Arquivo Médico (SAME) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP/USP) e do arquivo do setor de Neuropatologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP/EPM), no período compreendido entre 1990 à 2008. A seguir os mesmos foram revistos independentemente por neuropatologista experiente e regraduados quando necessário de acordo com a Classificação mais recente para os tumores do SNC (MCLENDON *et al.*, 2007). Após a escolha das áreas mais representativas, foram separados os blocos correspondentes a fim de se realizar as reações imuno-histoquímicas.

Os prontuários dos pacientes estudados foram revistos sendo anotados gênero, idade, sexo, localização do tumor, número e tipos de procedimentos cirúrgicos, extensão das ressecções (radical, parcial), tratamentos auxiliares (quimioterapia e radioterapia), datas da primeira e última consultas, tempo de sobrevivência e evolução clínica.

Por definição foi considerada extensão radical cirúrgica quando na mesma foram removidos mais de 90% do tumor. A ressecção parcial foi considerada quando foi removido menos de 90% da neoplasia.

O intervalo de sobrevivência foi determinado a partir da data da 1ª cirurgia até a data de óbito ou a da data de conclusão do estudo, 30 de abril de 2009.

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em 30/07/2007 (Processo HCRP nº 6487/2007) em anexo.

Critérios de inclusão

Foram aceitos os casos com as seguintes características:

- Ependimomas contidos no neuroeixo;
- cirurgias efetuadas após 1990;
- casos que possuíam blocos de tecido em parafina em quantidade suficiente para o estudo;
- pacientes com seguimento clínico.

Casuística

A pesquisa reuniu 57 casos de ependimomas primários, destes 14 foram excluídos da pesquisa por não ter sido possível avaliar o prontuário médico. Outros 3 casos foram reclassificados como cisto glio-ependimario, meduloblastoma e astrocitoma pilocítico, sendo assim excluídos da pesquisa. Dos 40 casos estudados, 26 apresentaram dados sobre o grau de ressecção cirúrgica.

Para fim de análise estatística foi considerada a idade dos pacientes na data da primeira cirurgia. A idade média dos pacientes foi de 19,1 anos, mediana de 15 anos e desvio padrão 16,7 anos, com variação de 6 meses a 55 anos.

Em relação ao gênero 22, pacientes eram do sexo masculino (idade média de 21,5 anos, mediana de 13,5 anos e desvio padrão de 20) e 18 pacientes do sexo feminino (idade média de 17,5 anos, mediana de 13,5 anos, desvio padrão de 14,2 anos).

Utilizando um valor de corte de 5 anos para determinação de grupos de risco relacionados à idade observou-se que 10 pacientes pertencem à faixa etária abaixo de 5 anos de vida (média de 2,31 anos, mediana de 1,8 ano, desvio padrão de 1,6) e 30 pacientes pertencem à faixa etária acima de 5 anos (média de 25,6 anos, mediana de 20 anos e desvio padrão de 16,7) (Tabela 3).

Para fim de análise estatística foram considerados os diagnósticos da primeira intervenção cirúrgica, mesmo quando a recidivas subsequentes apresentaram tumores de maior ou menor malignidade.

Foram reunidos 4 tumores ependimários de grau I, sendo 2 subependimomas e 2 ependimomas mixopapilares. Em relação aos tumores grau I a idade média foi de $22 \pm 16,8$ anos e mediana de 16 anos. Foram diagnosticados 26 ependimomas grau II (idade média de $21 \pm 17,1$ anos e mediana de 16,5 anos) e 10 ependimomas anaplásicos grau III (idade média de $15,4 \pm 18,9$ anos e mediana de 4 anos).

No presente estudo a evolução clínica dos pacientes foi ordenada segundo os dados clínicos obtidos, classificando o paciente em “vivo sem lesão” quando o paciente não apresenta seqüelas ou não apresenta lesões posteriores ao ato cirúrgico, estas confirmadas pelos relatos clínicos e radiográficos. Os pacientes “vivos com lesão” são todos aqueles que o quadro clínico adota os critérios supracitados. Os pacientes que evoluíram a “óbito” são todos aqueles que faleceram em decorrência direta da doença estudada ou de eventos secundários.

O tempo médio de seguimento foi de 549,5 semanas (variação de 1 semana a 1098 semanas).

Método

Dos blocos correspondentes às áreas mais representativas foram obtidos 7 cortes com espessura de 4 μm a fim de realizar nova coloração de hematoxilina-eosina e as reações imuno-histoquímicas (galectina-3, Ki-67, CD31, GFAP e dois cortes de reserva).

Os cortes obtidos foram colocados em estufa de aquecimento à temperatura de 60°C por uma hora. Em seguida, os mesmos foram imersos em xilol I (solvente portador de terminação dimetil benzênica) pré-aquecido e colocados em estufa a 60°C por 10 minutos. Posteriormente, as lâminas foram colocadas em soluções sucessivas de xilol por 10 minutos cada (xilol II e III). Seguindo a bateria de hidratação, as lâminas foram sucessivamente imersas por 1 minuto em solução álcool-xilol, álcool absoluto (2x), álcool 95% (1x), álcool 80% (1x), álcool 70% (1x) e por fim, imersos em água deionizada.

As reações imuno-histoquímicas foram efetuadas segundo a técnica da Avidina-Biotina-Peroxidase descrita por Hsu; Raine e Fanger (1981), adaptada às condições do Laboratório de Neuropatologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Foram utilizados os anticorpos para galectina-3, Ki-67, CD31 e GFAP.

A recuperação antigênica foi realizada em *Steamer* por 40 minutos à 98°C em tampão citrato pH 6,0 para os anticorpos Gal-3, Ki-67 e GFAP, e em tampão EDTA pH 8,0 para o anticorpo CD31. Em seguida, os cortes foram resfriados em temperatura ambiente por 20 a 30 minutos. Os cortes lavados em solução de PBS, pH 7,4 por 5 minutos. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado através de solução de água oxigenada por 10 minutos (15 ml de PBS pH 7,4 com 15 ml de metanol e 500 μl de peróxido de hidrogênio). A seguir, os cortes foram imersos por 3 minutos em soluções de PBS (2x) e TBST (2x).

O bloqueio dos anticorpos inespecíficos foi realizado através de solução de BSA (soro albumina bovina, 2 gramas), PBS (100 ml, pH 7,4) e tampão *Tween* 20 (50 μl) por 5 minutos. A lavagem seguinte foi realizada com TBST. As lâminas foram incubadas a 4°C por 12 horas com os anticorpos primários (Tabela 1). Os mesmos foram diluídos em solução de BSA 1% (PBS, pH 7,4 em tampão *Tween* a 0.05%) conforme descrito na Tabela 1:

Tabela 1. Anticorpos utilizados nas reações imuno-histoquímicas.

Anticorpo	Diluição	Marca, Clone
Ig de rato anti-galectina-3 humano	1:1000	(Novocastra, 9C4)
Ig de rato anti-Ki-67 humano	1:750	(Novocastra, MM1)
Ig de rato anti-CD31 humano	1:750	(Novocastra, 1A10)
Ig de rato anti-GFAP humano	1:1200	(Novocastra, GA5)

Todos os anticorpos estavam em estado sólido, liofilizado, sendo adicionado 1ml de água destilada deionizada em cada frasco para a diluição. Para cada anticorpo foi corada uma lâmina com corte de tecido humano usado para fins de controle positivo e outra para fins de controle negativo, em que foi omitido o anticorpo secundário (Tabela 2). Os tecidos foram obtidos no Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. A relação dos tecidos usados para controle encontra-se na tabela abaixo.

Tabela 2. Relação de tecidos-controle para imuno-histoquímica

Anticorpo	Controle positivo	Controle negativo
galectina-3	Próstata	Tireóide
Ki-67	Amígdala	Cerebelo normal
CD31	Amígdala	Músculo normal
GFAP	Cérebro	-

A seguir, os cortes foram lavados em TBST (3x, 4 minutos cada) a fim de ser aplicado o reagente pós-primário do Kit (utilizado para facilitar a penetração do polímero) por 30 minutos. Posteriormente os cortes foram lavados novamente em TBST (3x) com 4 minutos de intervalo.

O polímero *Novolink* (Novocastra) foi aplicado por 30 minutos à temperatura ambiente. A seguir as lâminas foram lavadas em TBST (3x, 4 minutos) e posteriormente em Tris HCl pH 7.6 (4 minutos). A revelação foi feita em solução de Diamonobenzidina (DAB) por 6 minutos [Tris HCl (6,0 ml, pH 7,6), DAB (250 µl) e de H₂O₂ (1,9 µl, Merck®)]. Os cortes foram então lavados em água destilada e imediatamente imersos em solução de hematoxilina de Harris por 15 segundos. Posteriormente, os cortes foram rapidamente imersos em água contendo baixa concentração de amônia, desidratados e diafanizados através de imersões sucessivas em soluções de álcool 70%, álcool 80%, álcool 95%, em álcool absoluto (3x) e xilóis I, II e III. A montagem das lamínulas foi efetuada com aplicação de *Permount* (Fisher Scientific®).

Morfometria

Galectina-3

A análise da galectina-3 foi semiquantitativa usando como parâmetro a percentagem de células imunomarcadas, segundo descrito por. NEDER *et al.* (2004b). A análise foi realizada no aumento de 400 vezes em microscópio de luz Olympus CX31. Estipulou-se cinco níveis de imunomarcação:

- 0 → negativo (sem marcação);
- + → até 10% de células imunomarcadas;
- ++ → de 11% a 25% de células imunomarcadas;
- +++ → de 26% a 75% de células imunomarcadas;
- ++++ → de 76% a 100% de células imunomarcadas.

Para a análise estatística os casos com imunomarcação +/+ foram classificados como marcação “focal” e os com imunomarcação +++/++++ como marcação “difusa”.

Índice de Proliferação Celular determinado pelo Ki-67

Foram obtidas imagens de quatro campos consecutivos e não coincidentes de cada lâmina nas áreas de maior marcação (“*hot spots*”). Para tanto, foi utilizado microscópio Olympus CX31 acoplado à câmera fotográfica digital Olympus Evolt E-330. A contagem foi realizada com o auxílio do software *Image J*, Wayne Rasband National Institutes of Health, USA. Para a determinação do Índice de Proliferação Celular (IPC), fez-se a contagem núcleos marcados entre 1.000 células neoplásicas, sendo desconsideradas as células endoteliais, leucócitos e hemácias entre outras e as áreas de necrose. O IPC foi então obtido pela razão entre o número de células neoplásicas totais pelo número de células neoplásicas imunorreativas ao Ki-67 (NEDER *et al.*, 2004a). As áreas foram contadas sem que se soubesse da identificação da lâmina.

CD31

Com a utilização do microscópio óptico Olympus CX31, no aumento de 400 vezes, contou-se todos os vasos em 10 campos em zonas de *hot spot* previamente analisadas em menor aumento (40x). Para a obtenção da medida da Densidade Microvascular (DMV) dividiu-se o número por dois, pois a somatória da área de 5 campos no aumento de 400 vezes corresponde a 1 milímetro quadrado, conforme descrito por (LEBELT *et al.*, 2008). As áreas também foram contadas sem que o autor soubesse a procedência da lâmina.

Análise Estatística

Nos pacientes que apresentaram mais de uma intervenção cirúrgica as análises estatísticas foram realizadas com os dados obtidos da primeira cirurgia. Os dados referentes às biópsias subsequentes foram utilizados para avaliação da progressão da neoplasia e evolução dos casos.

Para todas as variáveis numéricas foi executado o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, não se observando distribuição Normal, sendo então utilizados métodos não-paramétricos na análise.

Os testes utilizados seguiram a seguinte lógica: quantitativo versus quantitativo utilizou-se o teste de Sperman; quantitativo versus qualitativo utilizou-se o teste Kruskal-Wallis; qualitativo versus qualitativo utilizou-se o teste exato de Fisher. Para as análises de sobrevida foi utilizado o método de Kaplan-Meier. Para os cálculos estatísticos foi utilizado o software SPSS[®] versão 17.

O nível de significância adotado para os testes foi $p = 0,05$.

RESULTADOS

Casuística

Os dados dos 40 casos de ependimomas estão sumariados na Tabela 3. Do total de casos, trinta e cinco pacientes sofreram apenas uma cirurgia. Destes 22 apresentaram dados em relação ao grau de ressecção da neoplasia, sendo 9 cirurgias com ressecção radical e 13 casos com ressecção parcial. Dos pacientes restantes 4 deles sofreram duas intervenções cirúrgicas sendo 2 deles com ressecção radical e 2 com ressecção parcial. O caso 27 sofreu 7 intervenções cirúrgicas, todas com ressecção radical, no entanto em apenas 3 intervenções havia material disponível para a histopatologia ser avaliada.

Dos 26 pacientes em que foi possível obter a evolução clínica completa, 12 apresentaram recidivas. O grupo de pacientes que estavam vivos ao término do estudo apresentava idade média 19,1 anos (mediana de 12 anos, DP \pm 16,2). Os pacientes que evoluíram ao óbito (n = 14) apresentaram idade média de 20,7 anos (mediana de 15 anos e DP \pm 20,2).

Os casos 1, 5, 11, 23 corresponderam a pacientes que apresentaram crescimento da neoplasia no local da cirurgia pelos exames de neuroimagem e com queixas de náuseas e cefaléia, porém não foram submetidos a outras intervenções cirúrgicas. O caso 7 recebeu doses de radioterapia (54 Gy), mas sem resposta satisfatória. No caso 12 houve o relato do aparecimento de “metástase” subcutânea em região pré-auricular e de “sarcoma”, mas não houve biopsias ou confirmação histopatológica. O caso 13 desenvolveu infecções recorrentes após a cirurgia, tratadas com antibioticoterapia. O caso 14 necessitou de derivação ventrículo-peritoneal (DVP) para controlar a hidrocefalia. O caso 30 desenvolveu paralisias nos membros, grau IV proximal e grau I distal. O caso 31 desenvolveu tetraparesia, sem sinais de melhora após a cirurgia. No caso 36 observou-se dificuldade de deambular após a intervenção cirúrgica e o caso 38 desenvolveu quadro de depressão, tonturas e cervicalgia pós-cirúrgicas.

Dentre os casos reincidentes dois pacientes não apresentaram aumento do grau de malignidade nas cirurgias subsequentes (caso 7 e 18), sendo que ambos apresentaram evolução favorável. Dois pacientes apresentaram aumento do grau de malignidade no decorrer da evolução (grau II para grau III) – um permanecendo vivo (caso 23) e outro evoluindo ao óbito (caso 4).

Tabela 3. Sumário dos dados clínicos.

Casos	Sexo	Idade	Tumor	Localização	Ressecção	Sobrevida	Evolução
Caso 1	Feminino	27 anos	Ependimoma grau II	Infratentorial	NI	391	Vivo com lesão
Caso 2	Feminino	49 anos	Ependimoma grau II	Infratentorial	NI	386	Vivo sem lesão
Caso 3	Masculino	51 anos	Ependimoma anaplásico	Infratentorial	NI	189	Óbito
Caso 4	Masculino	16 anos	Ependimoma grau II	Infratentorial	NI	262	Óbito
		21 anos	Ependimoma anaplásico	Infratentorial	Parcial	-	
Caso 5	Feminino	46 anos	Ependimoma grau II	Medular	Parcial	318	Vivo com lesão
Caso 6	Masculino	55 anos	Ependimoma grau II	Infratentorial	Radical	1	Óbito
Caso 7	Masculino	22 anos	Ependimoma grau II	Supratentorial	NI	226	Vivo com lesão
		22 anos	Ependimoma grau II	Supratentorial	Parcial		
Caso 8	Masculino	33 anos	Ependimoma grau II	Medular	Parcial	63	Óbito
Caso 9	Feminino	14 anos	Ependimoma grau II	Infratentorial	Radical	105	Óbito
Caso 10	Feminino	8 anos	Ependimoma grau II	Infratentorial	Parcial	109	Vivo sem lesão
Caso 11	Feminino	10 anos	Ependimoma anaplásico	Infratentorial	Parcial	111	Vivo com lesão
Caso 12	Feminino	19 anos	Ependimoma grau II	Supratentorial	Parcial	107	Vivo com lesão
Caso 13	Masculino	6 anos	Ependimoma anaplásico	Infratentorial	Parcial	87	Vivo com lesão
Caso 14	Feminino	6 anos	Ependimoma grau II	Infratentorial	NI	1098	Vivo com lesão
Caso 15	Feminino	31anos	Ependimoma grau II	Infratentorial	Parcial	1032	Vivo sem lesão
Caso 16	Masculino	1 ano	Ependimoma grau II	Infratentorial	NI	78	Óbito
Caso 17	Masculino	3 anos	Ependimoma grau II	Infratentorial	NI	2	Óbito
Caso 18	Feminino	6 anos	Ependimoma grau II	Supratentorial	Radical	872	Vivo sem lesão
		10 anos	Ependimoma grau II	Supratentorial	NI	-	
Caso 19	Masculino	4 anos	Ependimoma grau II	Infratentorial	NI	260	Óbito
Caso 20	Feminino	3 anos	Ependimoma grau II	Infratentorial	Parcial	1027	Vivo sem lesão
Caso 21	Masculino	4 anos	Ependimoma grau II	Supratentorial	NI	722	Vivo sem lesão
Caso 22	Feminino	1 ano	Ependimoma grau II	Infratentorial	Radical	108	Óbito
Caso 23	Feminino	2 meses	Ependimoma grau II	Infratentorial	Radical	501	Vivo com lesão
		16 anos	Ependimoma anaplásico	Infratentorial	NI	-	
Caso 24	Masculino	11 meses	Ependimoma grau II	Infratentorial	Radical	459	Vivo sem lesão
Caso 25	Masculino	17 anos	Ependimoma anaplásico	Infratentorial	NI	17	Óbito

Tabela 3. Sumário dos dados clínicos (continuação).

Casos	Sexo	Idade	Tumor	Localização	Ressecção	Sobrevida	Evolução
Caso 26	Feminino	18 anos	Ependimoma anaplásico	Infratentorial	Radical	377	Vivo sem lesão
Caso 27	Masculino	19 anos	Ependimoma grau II	Supratentorial	Radical	211	Óbito
		16 anos	Ependimoma anaplásico	Infratentorial	NI	-	
Caso 28	Feminino	49 anos	Subependimoma grau I	Medular	Radical	324	Vivo sem lesão
Caso 29	Masculino	37 anos	Subependimoma grau I	Infratentorial	NI	2	Óbito
Caso 30	Masculino	33 anos	Ependimoma grau II	Medular	Parcial	317	Vivo com lesão
Caso 31	Masculino	12 anos	Ependimoma anaplásico	Infratentorial	Parcial	325	Vivo com lesão
Caso 32	Masculino	13 anos	Ependimoma grau II	Infratentorial	Parcial	286	Vivo sem lesão
Caso 33	Feminino	31 anos	Ependimoma grau II	Medular	Radical	28	Vivo sem lesão
Caso 34	Feminino	21 anos	Ependimoma mixopapilar	Supratentorial	NI	259	Vivo sem lesão
Caso 35	Masculino	1 ano	Ependimoma anaplásico	Medular	NI	308	Óbito
Caso 36	Feminino	21 anos	Ependimoma mixopapilar	Medular	Parcial	204	Vivo com lesão
Caso 37	Masculino	1 ano	Ependimoma anaplásico	Infratentorial	Radical	103	Óbito
Caso 38	Masculino	49 anos	Ependimoma grau II	Infratentorial	Parcial	136	Vivo com lesão
Caso 39	Masculino	8 anos	Ependimoma grau II	Supratentorial	Radical	128	Vivo sem lesão
Caso 40	Masculino	6 meses	Ependimoma anaplásico	Infratentorial	NI	46	Vivo sem lesão

NI – Não informado

Ao se analisar a relação entre as variáveis, não foram observadas correlações entre a idade dos pacientes e a localização da neoplasia (supratentorial vs infratentorial, $p = 0,53$) ou entre idade e grau histopatológico do tumor, sendo $p = 0,90$ (Tabela 4).

De modo similar, não se observou correlação entre idade dos pacientes e evolução clínica dos mesmos (vivo ou óbito), sendo $p = 0,79$. Para fins estatísticos, entre os pacientes vivos ao término do estudo ($n = 26$) não foram considerados se os mesmos apresentavam ou não lesão residual.

A gradação histológica dos tumores não apresentou correlação significativa com a evolução dos pacientes pelo teste exato de *Fisher* ($p = 0,69$).

Tabela 4. Idade dos pacientes segundo a localização da neoplasia, grau histopatológico e evolução clínica.

	n	1°.Quartil	Mediana	3°.Quartil	Média	DP	Valor <i>p</i>
Local							
Infratentorial	26	2	8,5	32,75	17,70	19,16	$p = 0,53$
Supratentorial	7	8	13	19	13,71	5,88	
Grau							
I	4	7,75	16	42,25	22,00	19,41	$p = 0,90$
II	26	6	16,5	33,25	21,04	17,49	
III	10	1,53	4	39	15,42	19,94	
Evolução							
Vivo	26	6	12	31,75	19,20	16,55	$p = 0,79$
Óbito	14	1,75	15	44	20,71	21,02	

DP – Desvio padrão.

Dos 40 tumores primários 7 se localizavam na região supratentorial (idade média de 13,7 anos, mediana de 13 anos, desvio padrão 5,4), sendo 5 tumores situados nos hemisférios cerebrais, 1 tumor situado no ventrículo lateral e 1 tumor situado no III ventrículo. Vinte e seis tumores localizaram-se na região infratentorial (idade média de 17,6 anos, mediana 8,5 anos, desvio padrão 18,7), sendo 25 ependimomas de fossa posterior e apenas um situado no ângulo ponto-cerebelar. Sete ependimomas localizavam-se na região medular (idade média de 33,2 anos, mediana de 34 anos, desvio padrão 15,0). Não houve alteração da localização dos tumores nos casos com recidivas.

Achados Imuno-Histoquímica

Expressão da galectina-3

Todos os endimomas exibiram marcação para Gal-3 (Tabela 5) (Figura 6A, B e C).

Tabela 5. Distribuição da marcação por Gal-3 nos endimomas de acordo com o grau histológico.

Grau Histológico	Gal-3		Total
	Focal	Difuso	
I	0	4	4
	-	100%	100%
II	7	19	26
	26,9%	73,1%	100%
III	1	9	10
	10%	90%	100%
Total	32	8	40
	80%	20%	100%

A imunomarcção para Gal-3 foi categorizada em “focal” e “difuso”. Os graus histológicos foram correlacionados de acordo com a expressão de Gal-3. A análise foi executada através do teste exato de Fisher. Nenhuma correlação entre os graus histológicos exibiu significância estatística, sendo a correlação entre endimomas grau I com endimomas grau II exibiu $p = 0,57$; correlação entre endimomas grau I com endimomas grau III exibiu $p = 1,00$; e correlação entre endimomas grau II com endimomas grau III exibiu $p = 0,40$. A comparação mostra que a marcação por Gal-3 não diferenciou os tumores de histologia distinta.

Ao se analisar a evolução clínica e a imunomarcção para Gal-3 pelo teste do Qui-quadrado não se observou correlação com significância estatística entre estas duas variáveis, sendo $X^2 = 0,03$, $p = 0,87$, como pode ser evidenciado na Tabela abaixo.

Tabela 6. Expressão de Gal-3 segundo a evolução clínica

Evolução	Gal-3 - padrão		Total
	Focal	Difuso	
Vivo	5	21	26
	19,2%	80,8%	100%
Óbito	3	11	14
	21,4%	78,6%	100%
Total	8	32	40
	20,0%	80,0%	100%

IPC-Ki-67

A média geral do IPC-Ki-67 foi de 10,60% \pm 9,45 (variação de 0,44% a 35,19%) (Figura 6D, E e F). Em relação à distribuição dos casos, o primeiro quartil (25° percentil) foi de 3,08%, a mediana (50° quartil) foi de 7,26% e o terceiro quartil (75° percentil) foi de 17,34%.

A média de IPC-Ki67 dos ependimomas grau I foi de 3,12% \pm 2,19, mediana 3,13%, dos ependimomas grau II foi de 8,27% \pm 6,72, mediana 5,08% e dos ependimomas grau III foi de 19,23% \pm 11,48, mediana 20,50%.

A média de IPC-Ki-67 para indivíduos que permaneceram vivos foi 9,79% \pm 10,41, mediana 5,17% e para indivíduos que evoluíram a óbito foi de 12,12% \pm 10,67, mediana 7,10%.

Ao se correlacionar-se o IPC-Ki-67 com a evolução clínica, observou-se tendência à significância estatística, sendo $p = 0,07$, teste exato de Fisher. Os dados estão sumariados na Tabela 7.

Tabela 7. Distribuição da marcação por Ki-67 segundo a evolução

Evolução	Ki-67 categorizado		Total
	<3%	>3%	
Vivo	9 34,6%	17 65,4%	26 100%
Óbito	1 7,1%	13 92,9%	14 100%
Total	10 25%	30 75%	40 100%

Os tipos histológicos foram confrontados entre si quanto à imunomarcação por Ki-67 categorizada em <3% e >3% aplicando-se o teste exato de Fisher (Tabela 8), sendo: correlação grau I com grau II exibiu $p = 1,00$; correlação grau I com grau III exibiu $p = 0,51$; e correlação grau II com grau III exibiu $p = 0,39$. Desta forma o IPC-Ki-67 não exibiu diferenças significativas entre os graus de malignidade.

Tabela 8. Distribuição do IPC-Ki-67 de acordo com o grau histológico

Grau	IPC-Ki-67		Total
	≤3%	>3%	
I	1 25%	3 75%	4 100%
II	8 30,8%	18 69,2%	26 100%
III	1 10%	9 90%	10 100%
Total	10 25%	30 75%	40 100%

Densidade Microvascular

A DMV média foi de $19,83 \text{ vasos/mm}^2 \pm 11,79$, com variação de 4 vasos/ mm^2 a 68,25 vasos/ mm^2 . O primeiro quartil (25º percentil) foi de 12,94, a mediana (50º quartil) foi de 16,25 e o terceiro quartil (75º percentil) de 25,94% (Figura 6G, H e I).

A média da DMV para ependimomas grau I foi $13,63 \text{ vasos/mm}^2 \pm 8,36$, a média para o grau II foi de $20,73 \text{ vasos/mm}^2 \pm 13,03$ e a média para o grau III foi de $19,95 \text{ vasos/mm}^2 \pm 10,15$ (Tabela 9).

A DMV não se correlacionou com o grau da neoplasia ($p = 0,35$, teste de Kruskal-Wallis) ou com a evolução clínica ($p = 0,31$, teste Mann-Whitney), como pode ser observado na Tabela 9.

Tabela 9. Distribuição da Densidade Microvascular nos ependimomas de acordo com o grau histológico e a evolução clínica.

	n	Mediana	1º.Quartil	3º.Quartil	Média	D. padrão
Grau						
I	4	11,56	7,28	22,03	13,63	8,36
II	26	16,62	13,38	27,31	20,73	13,03
III	10	16,38	13,88	30,13	19,95	10,15
Evolução						
Vivo	26	16,25	11,38	24,00	18,89	13,16
Óbito	14	16,00	14,25	29,59	21,56	9,48

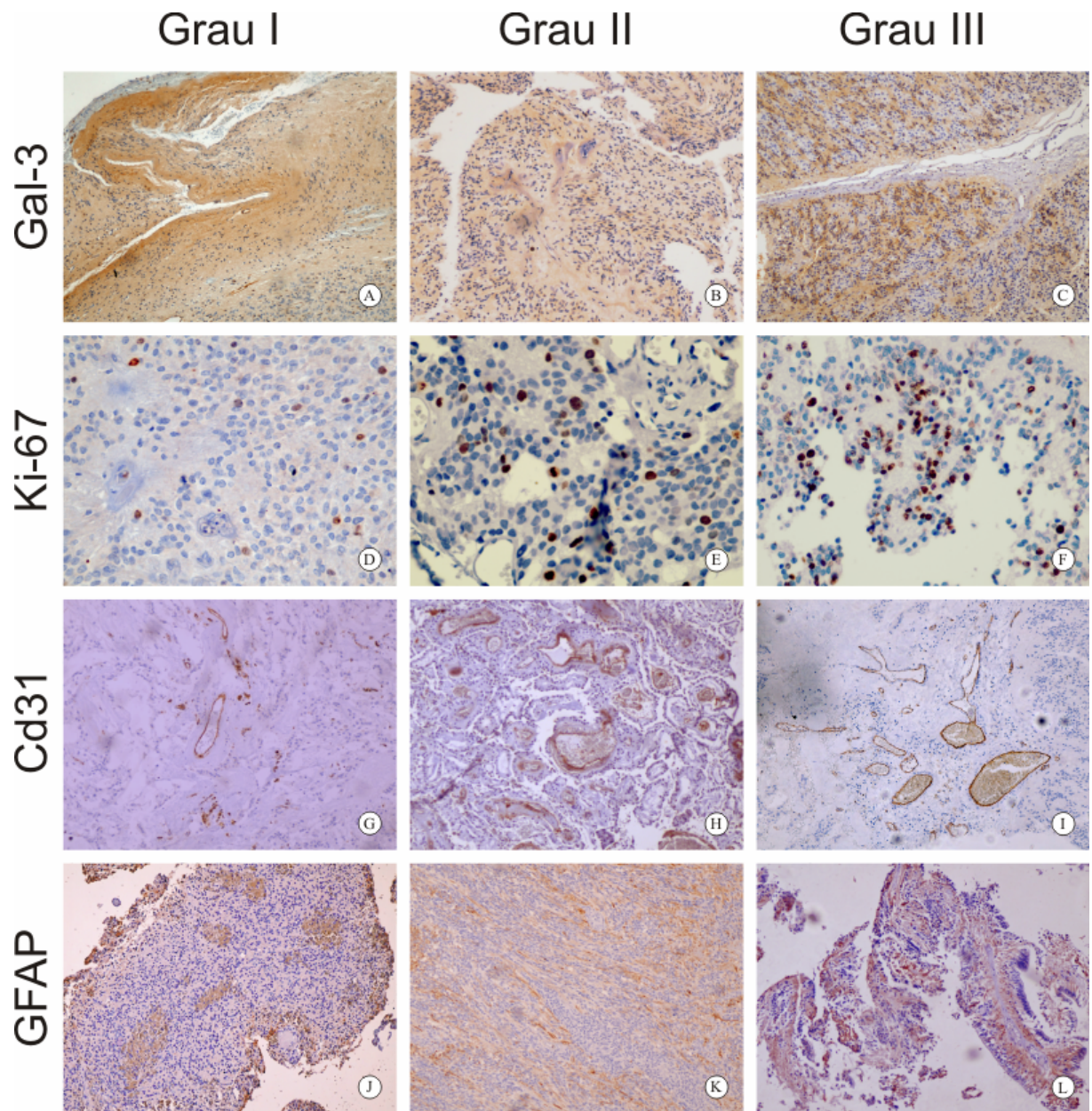


Figura 6: Marcações imuno-histoquímicas dos ependimomas. A, B e C - marcação para Gal-3 (100x). D, E e F - marcação para Ki-67 (400x). G, H e I - marcação para CD31 (100x). J, K e L - marcação para GFAP (100x)

Análise da sobrevida

A sobrevida média geral dos pacientes foi de 289,62 semanas (mediana = 218,5 semanas, DP \pm 284,92). Como os dados foram obtidos pelo método Mann-Whitney para elaboração das curvas de sobrevida obteve-se o erro padrão e não o desvio padrão (Tabela 10).

Tabela 10: Sobrevida dos pacientes segundo as variáveis clínicas e imuno-histoquímicas (semanas).

	Média	Erro padrão	I.C. de 95% para a média
Gênero			
Feminino	977,47	80,00	820,67 – 1134,27
Masculino	336,20	68,73	174,02 – 345,98
Localização			
Infratentorial	627,68	104,84	422,18 – 833,17
Supratentorial	739,80	118,24	508,04 – 971,56
Medular	256,35	39,53	178,88 – 333,82
Grau			
I	243,50	69,72	106,86 – 380,14
II	713,14	101,48	514,25 – 912,04
III	323,51	65,45	195,24 – 451,79
Idade			
≤ 5 anos	236,41	67,23	104,64 – 368,19
> 5 anos	776,53	94,44	590,78 – 962,27
Gal-3			
Focal	635,96	173,57	295,76 – 976,15
Difuso	699,65	94,71	514,06 – 885,27
Ki-67			
≤ 3%	924,33	101,51	725,38 – 1123,29
> 3%	577,23	102,74	221,69 – 394,31

I.C. = Intervalo de confiança.

A média de sobrevida do sexo feminino foi de 977,47 semanas e do sexo masculino foi de 336,20 semanas. No teste para análise de sobrevida para gênero, o *Log-Rank* foi de 8,44 e $p = 0,004$. Como pode ser observado na Figura 7, mais de 80% dos pacientes femininos permaneceram vivos após 21 anos a partir do dia da primeira cirurgia, sendo que no sexo masculino mais de 30% dos pacientes estavam vivos após 6 anos e meio da primeira cirurgia.

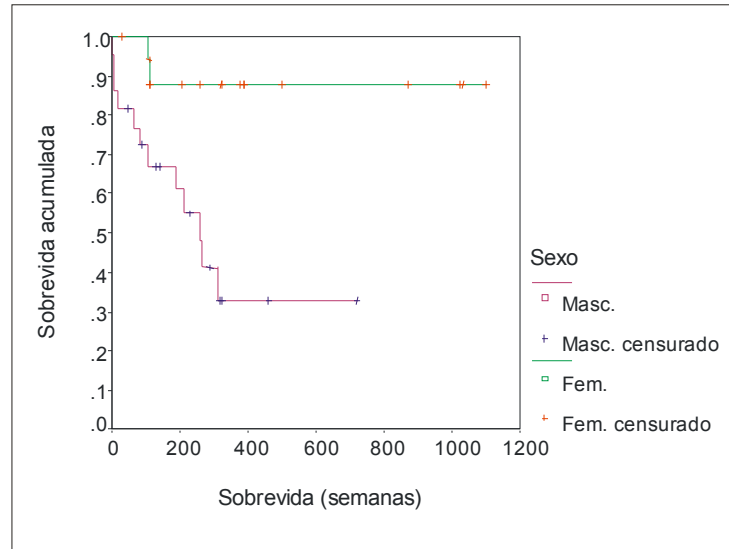


Figura 7: Sobrevida média dos pacientes de acordo com o gênero.

A sobrevida média dos pacientes menores de 5 anos foi de 236,41 meses e dos pacientes maiores de 5 anos foi de 776,53 meses (Figura 8). O *Log-Rank* foi de 4,12 e $p = 0,04$.

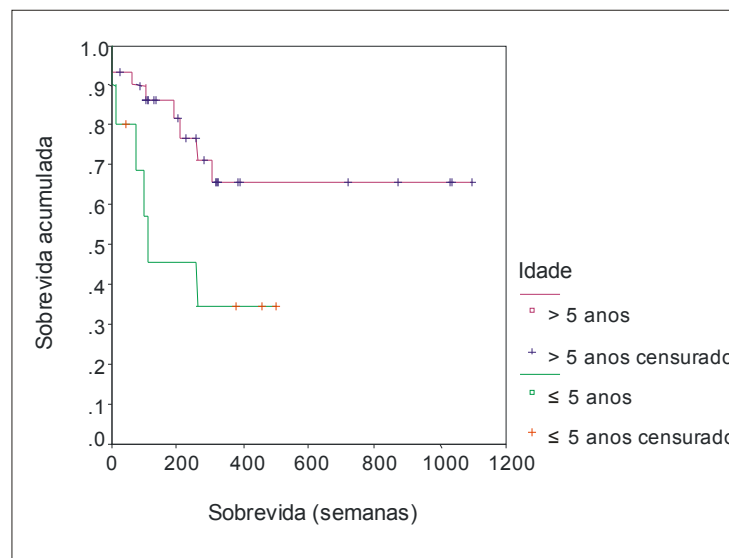


Figura 8. Sobrevida média de acordo com a faixa etária.

Em relação ao grau histopatológico, a sobrevida média dos pacientes com ependimomas grau I (subependimomas e ependimomas mixopapilares) foi de 243,50 semanas, a dos pacientes com grau II foi de 713,14 semanas e a dos pacientes com grau III foi de 323,51 semanas (Figura 9). O *Log-Rank* foi de 0,24 e $p = 0,89$.

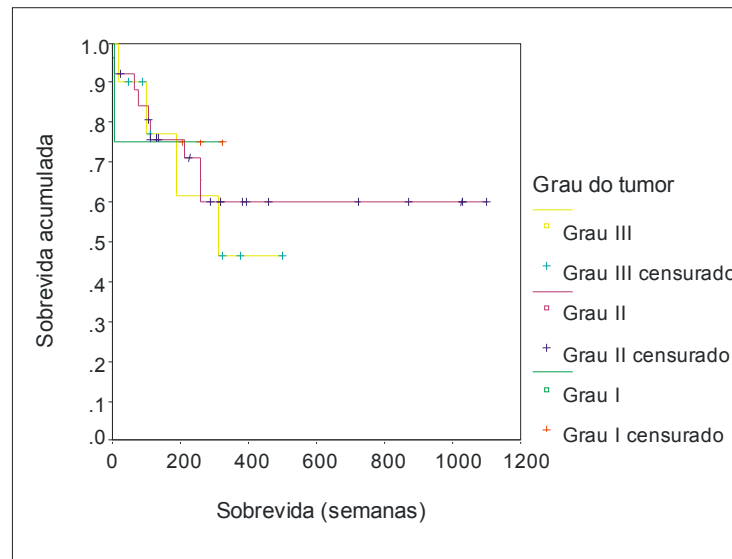


Figura 9. Sobrevida média de acordo com o grau histológico.

Em relação à localização, a sobrevida média dos pacientes com tumores localizados na região supratentorial foi de 739,80 semanas e a dos pacientes com tumores na região infratentorial foi de 627,68 semanas (Figura 10). O Log-Rank foi de 1,55 e $p = 0,21$.

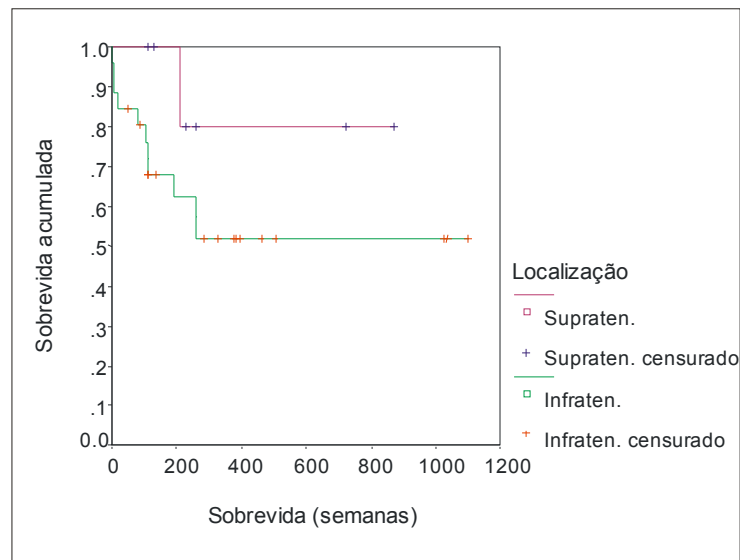


Figura 10. Sobrevida média de acordo com a localização da neoplasia.

Expressão de galectina-3 e a Sobrevida

A sobrevida média dos pacientes cujos ependimomas exibiam imunomarcção “focal”

para Gal-3 foi de 635,96 semanas e para os pacientes com imunomarcaco “difusa” foi de 699,65 semanas (Figura 11). O Log-Rank foi 0,01 e $p = 0,92$.

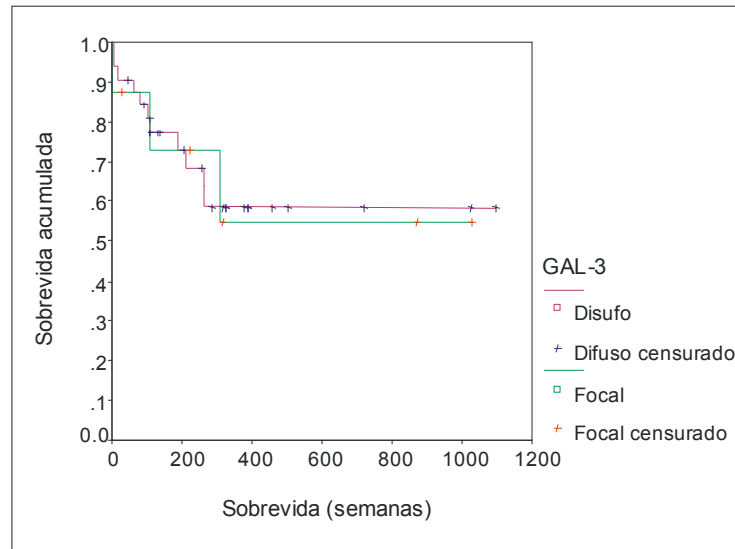


Figura 11. Sobrevida média de acordo com a expressão de Gal-3.

IPC-Ki-67 e a Sobrevida

A sobrevida média para os pacientes com IPC-Ki-67 $< 3\%$ foi de 924,33 semanas e para os pacientes cujos tumores exibiam IPC-Ki-67 $> 3\%$ foi de 577,23 semanas (Figura 12), O Log-rank foi de 3,70 e $p = 0,05$.

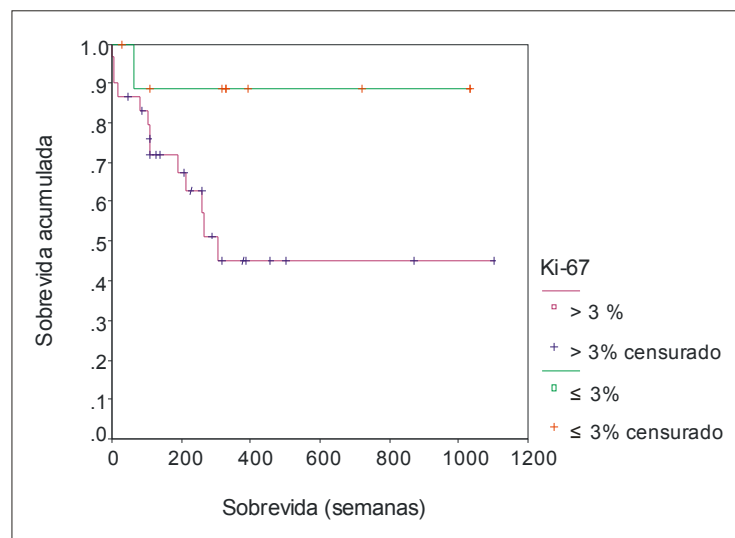


Figura 12. Sobrevida média de acordo com o IPC-Ki-67.

Tabela 11: Resultados das marcações dos anticorpos distribuídos por caso.

Casos	Gal-3	IPC-Ki-67 (%)	CD31 (vasos/mm²)
Caso 1	Difuso	2,606	27,25
Caso 2	Difuso	3,162	16,25
Caso 3	Difuso	7,182	16,5
Caso 4	Difuso	20,970	38,5
Caso 5	Focal	1,870	8
Caso 6	Focal	8,012	10,5
Caso 7	Focal	3,430	11
Caso 8	Difuso	2,925	15,5
Caso 9	Focal	16,645	15,5
Caso 10	Difuso	1,100	23,5
Caso 11	Difuso	35,180	35
Caso 12	Difuso	17,650	68,25
Caso 13	Difuso	24,165	21,25
Caso 14	Difuso	15,680	13,5
Caso 15	Focal	2,257	5
Caso 16	Difuso	21,000	24,75
Caso 17	Difuso	3,154	14,25
Caso 18	Focal	3,273	20,625
Caso 19	Difuso	18,660	32,875
Caso 20	Difuso	2,920	14
Caso 21	Difuso	1,309	16
Caso 22	Difuso	5,617	28,5
Caso 23	Difuso	6,889	12,75
Caso 24	Difuso	17,236	6
Caso 25	Difuso	21,285	28,5
Caso 26	Difuso	29,193	16,25
Caso 27	Difuso	8,546	35,083
Caso 28	Difuso	0,438	5,875
Caso 29	Difuso	3,125	11,625
Caso 30	Difuso	8,820	18
Caso 31	Difuso	0,740	4
Caso 32	Difuso	11,820	27,5
Caso 33	Focal	1,650	17
Caso 34	Difuso	5,790	11,5
Caso 35	Focal	12,790	15,5
Caso 36	Difuso	7,347	25,5
Caso 37	Difuso	19,718	14,25
Caso 38	Difuso	10,163	13
Caso 39	Difuso	4,540	18,75
Caso 40	Difuso	35,190	35,5

DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a expressão de galectina-3 em tumores endimários de diferentes graus de malignidade e sua relação com o Índice de Proliferação Celular avaliado pelo Ki-67, a densidade microvascular (CD31) e a evolução dos pacientes. Para a avaliação da preservação da antigenicidade tecidual foi avaliada a expressão da GFAP. O nosso principal achado foi que embora a Gal-3 tenha sido expressa de forma ubíqua nos endimomas, independentemente do grau de malignidade, a mesma não se correlacionou com as demais variáveis. Por outro lado, o IPC-Ki-67 > 3% correlacionou-se significativamente com uma pior evolução dos pacientes.

A incidência dos endimomas foi maior na região infratentorial, o que está de acordo com o relatado na literatura (TEO *et al.*, 2003; RENI *et al.*, 2007), embora alguns autores tenham relatado uma maior incidência na região medular (MCGUIRE, SAINANI; FISHER, 2009; RODRIGUEZ *et al.*, 2009). Diferentemente ao relatado por Rodriguez *et al.* (2009) e Mansur *et al.* (2005), que descreveram uma maior sobrevida nos pacientes com tumores infratentoriais em comparação aos supratentoriais, não observamos diferenças na evolução clínica entre pacientes no que se refere à localização das neoplasias. Para fins de análise estatística não foi considerado os tumores de localização medular, devido ao pequeno número dos mesmos e por necessitarem de distinta intervenção cirúrgica e tratamento pós-operatório.

No presente trabalho encontramos uma sobrevida significativamente maior nos pacientes do sexo feminino. A diferença entre sexos é objeto de discordância entre pesquisadores. Rodriguez *et al.* (2009) e Mcguire *et al.* (2009) descreveram uma pequena diferença na proporção entre os gêneros nos pacientes com endimomas, relatando uma maior sobrevida no sexo feminino. Uma possível explicação para tal ocorrência seria o pequeno número de amostras nos trabalhos efetuados, dando origem à vieses. Outra explicação seria uma verdadeira diferença entre os grupos ocasionada por possíveis diferenças ambientais, de estilo de vida ou de mutações oncológicas (BENVENUTI *et al.*, 2008). No entanto, é possível que outras variáveis, como a extensão da ressecção cirúrgica, que foi maior nos pacientes do sexo feminino seja a verdadeira razão da maior sobrevida nos pacientes deste sexo.

A avaliação histopatológica não se correlacionou com a evolução clínica. Apesar dos tumores endimários grau II poderem exibir transformação anaplásica e dos endimomas anaplásicos possuírem maior capacidade infiltrativa, ambos exibindo rápido crescimento acarretando em desordens orgânicas como hidrocefalia entre outros distúrbios, a evolução clínica foi homogênea entre os grupos estudados. Uma das possíveis explicações para tal fato pode ser devido à presença do maior número de pacientes com endimomas de fossa

posterior – cuja classificação histopatológica ainda é assunto controverso na literatura – não obstante tenhamos utilizado os critérios atuais da Classificação da OMS. Outra explicação seria o pequeno número de pacientes com grau I e o fato de não termos conseguido obter a evolução clínica completa de muitos pacientes. De qualquer forma, nossos dados são similares aos descritos por Mansur *et al.* (2007), onde o confronto entre tumores grau II com tumores grau III não exibiram diferenças significativas na sobrevida. No entanto, num trabalho com maior número de casos e que englobava todas as faixas etárias, Rodriguez *et al.* (2009) maior sobrevida foi relatada entre pacientes com ependimomas grau II em relação ao grau III.

Por tratar-se de um estudo retrospectivo, alguns inconvenientes foram deparados ao longo do percurso. Assim, devido à impossibilidade de obtenção dos dados clínicos de todos os casos não foi possível avaliar a incidência dos ependimomas nas diferentes faixas etárias. Observamos um número maior de casos nos indivíduos maiores de 5 anos – o que tornou impraticável a comparação da idade média dos pacientes com outros trabalhos publicados. Em relação aos ependimomas é fato bem conhecido que a idade menor que 3 anos e ressecção incompleta do tumor são indicadores de prognóstico adverso (HORN *et al.*, 1999). Para alguns, a predominância de tumores mais agressivos entre os infantes é devido a existência de tecidos neurais mais imaturos nesse grupo, com alta proliferação celular (RENI *et al.*, 2007).

De qualquer forma, ao término do estudo, a maioria dos pacientes apresentava-se com vida, sendo que a percentagem de pacientes vivos com lesão foi idêntica a dos pacientes vivos sem lesão.

Na comparação entre a evolução dos pacientes cerca de um terço dos mesmos evoluíram a óbito (35%). Andrade *et al.* (2009) relataram percentagem de óbitos diferente nos ependimomas por eles estudados, localizando-se tanto nas regiões ST e IT, quanto na região medular, onde 18% dos casos evoluíram a óbito.

O presente estudo avaliou a expressão da Gal-3 pela reação imuno-histoquímica. Por ser muito subjetivo e pouco reprodutível, a intensidade de marcação do anticorpo não foi avaliada. A mesma questão foi relatada por Strik (2001).

A pesquisa da expressão de Gal-3 em ependimomas não encontrou correlações com as variáveis clínicas pesquisadas.

A apreciação do padrão de marcação da Gal-3 nos três graus histológicos mostrou que o padrão “difuso” preponderou nos três tipos histológicos de similar maneira (tabela 5) não sendo tal diferença significativa a ponto de permitir diferenciação malignidade histológica.

A diferença com a evolução demonstrou padrões muito parecidos de expressão não

havendo, assim, correlação. A análise de sobrevida entre pacientes também não foi significativa, tendo os dois grupos evolução muito semelhante.

Na literatura foram encontrados quatro estudos que descreveram a expressão da Gal-3 em ependimomas (BRESALIER *et al.*, 1997; PARK *et al.*, 2008; RODRIGUEZ *et al.*, 2008; CHO *et al.*, 2009), embora a quantidade das amostras seja significativamente inferior à por nós obtida. Estes estudos foram realizados com o objetivo de distinguir os ependimomas em relação a outros tipos de tumores neuroepiteliais, sem endereçar a avaliação da expressão desta lectina nos diferentes graus de ependimomas.

Nossos achados diferem dos de Bresalier *et al.* (1997) que descreveram ausência da expressão de Gal-3 nos dois casos de ependimomas avaliados. O trabalho de Cho *et al.* (2009) também impossibilita a comparação minuciosa por tratar-se de apenas a variante mixopapilar ser analisada, esta qual apresenta pequeno número de amostras no presente estudo.

Nosso estudo assemelha-se com os achados de Park *et al.* (2008) e Rodriguez *et al.* (2008), onde, apesar do número de amostras de tumores tenha sido menor em ambos, os autores também encontraram padrões difusos de expressão de Gal-3 em ependimomas, embora não tenham sido mostrados confrontos estatísticos entre os graus histológicos.

Não foram observadas diferenças significativas entre a média dos índices dos ependimomas grau II e III. Tal achado está em desacordo com alguns trabalhos publicados onde houve diferença do IPC-KI-67/MIB-1 entre os ependimomas de diferentes graus histológicos. Por exemplo, Suri *et al.* (2004) encontraram correlações significativas entre tumores grau II e grau III, com médias de IPC de 0,9% e 5,1% respectivamente ($p < 0,0001$). Os autores não estipularam um valor de corte (*cut-off*) que melhor distinguisse os tumores de baixo e alto grau. Rezai *et al.* (1996) não encontraram diferenças significativas entre tumores mixopapilares e ependimomas grau II (IPC de 1,6% e 2,4%, respectivamente, valor de p não exibido), mas encontraram correlação entre os tumores de baixo grau (I e II) quando comparados a tumores grau III (IPC de 21,0%, $p = 0.0003$). Em comparação aos nossos achados os valores para graus não malignos foram menores que os observados por nós (grau I: $3,12\% \pm 2,19$; grau II: $8,27\% \pm 6,72$; grau III: $19,23\% \pm 11,48$), porém a média dos ependimomas anaplásicos foi ligeiramente maior, o que, em nossa análise possibilitou tal distinção de graus histológicos dos tumores.

Nesta avaliação da expressão da Gal-3 com tumores ependimários apenas a marcação das células neoplásicas foi observada não considerando o padrão da marcação dos núcleos, exatamente por estes exibirem total reatividade em todos os casos. Outra característica

histológica, a marcação vascular, também não foi avaliada devido ao endotélio das zonas neoplásicas exibirem total positividade ao anticorpo.

Os tumores de baixa malignidade (grau I e II) exibiram médias de IPC próximas, e apesar dos tumores grau III exibirem IPC maior, os confrontos de graus não foram significativos para estabelecer a diferenciação histológica.

No entanto, embora os valores do IPC-Ki-67 não tenham demonstrado correlação significativa com a sobrevida dos pacientes, os valores foram muito próximos do nível de significância adotado, havendo forte tendência do grupo com evolução ao “óbito” de apresentar um IPC-KI-67 > 3%. Por outro lado, observou-se forte associação com significância estatística entre um IPC-Ki-67 < 3% e maior sobrevida dos pacientes.

Apesar de não encontrarmos valores de *cut-off* similares ao uso no neste trabalho, todos os trabalhos que utilizaram o Ki-67 para avaliar a sobrevida encontraram correlação do valor de IPC menor que o valor censurado com o aumento na sobrevida dos pacientes.

Bennetto *et al.* (1998) utilizando um *cut-off* de 25% verificou significância estatística na comparação com a sobrevida ($p = 0,036$) onde 50% dos pacientes exibindo IPC abaixo do *cut-off* sobreviveram após 200 meses pós-cirúrgicos, contra menos de 30% de pacientes com IPC > 25% vivos após 50 meses. Ritter *et al.* (1998), utilizando um *cut-off* de 20% observou que apenas 12% dos casos com IPC acima desse valor de corte permaneceram vivos após 5 anos de seguimento.

O valor de corte mais próximo ao nosso adotado pertence ao estudo de Prayson (1999) (*cut-off* = 4%). A amplitude dos valores de IPC geral do citado estudo (variação de 1% a 34%) assemelha-se aos nossos achados. Nesta obra os autores defendem a relação do IPC com a evolução clínica, onde os pacientes que permaneceram vivos exibiram média de IPC de 3,6% (variação de 0,1% a 22,8%) e os pacientes que evoluíram a óbito exibiram média de IPC de 5,9% (variação de 0,1% a 34,0%), valores estes menores que os por nós observados, embora a comparação com nosso estudo é feita sob cautela, já que os autores não confrontaram os dados estatisticamente. Neste estudo não foi realizada a correlação com o tempo de sobrevivência.

A estipulação do valor de *cut-off* também não traz consenso na literatura médica. Utilizamos o valor de casos com IPC maiores e menores que 3%, valor estes utilizado por Neder *et al.* (2004a) em tumores astrocíticos de diferentes graus de malignidade. Alguns autores utilizaram valores de *cut-off* para avaliação em ependimomas muito próximos ao nosso, como Prayson (1999) com *cut-off* de 4%, Figarella-Branger *et al.* (2000) e Kurt *et al.* (2005) ambos com *cut-off* de 1%. A diferença de valores de corte (variação de 1% a 20%)

pode ser explicada pelo fato de comumente esses valores serem baseados no valor da mediana do IPC, a utilização de diferentes metodologias e diferentes clones de anticorpos. Uma futura padronização dos métodos imuno-histoquímicos pode trazer luz a estas discordâncias.

A estipulação de um valor de corte para o IPC-Ki-67 que melhor diferencie os ependimomas de baixo e alto grau é de grande valia, principalmente ao se analisar biopsias com escasso material.

No presente estudo a DMV avaliada não exibiu correlação com o grau histopatológico dos tumores ou com a evolução clínica dos pacientes. Nossos dados diferem com os descritos por Duda-Szymanska e Papierz (2007), que relataram correlação entre a DMV e o grau dos ependimomas. No entanto, estes autores não incluíram os subependimomas e ependimomas mixopapilares na casuística.

A fim de avaliar a preservação da antigenicidade do tecido e para confirmação diagnóstica, realizamos em todos os casos, reação imuno-histoquímica para GFAP, que se mostrou positiva na totalidade dos casos. Ainda, para fins acadêmicos, avaliamos se a imunomarcção para a GFAP se correlacionava com o grau histológico dos tumores e o tempo de sobrevida dos pacientes, não existindo correlação entre as variáveis.

CONCLUSÕES

- A galectina-3 expressa-se de forma ubíqua nos ependimomas, não apresentando diferenças na sua expressão entre os diferentes graus de malignidade.
- A expressão da galectina-3 não se correlacionou com o IPC-Ki-67, com a densidade microvascular e/ou com a sobrevida dos pacientes.
- O IPC-Ki-67 de 3% foi o valor de corte que melhor discriminou os pacientes cujos ependimomas evoluíram de forma adversa
- Pacientes com idade superior a 5 anos apresentaram melhor evolução.

REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, F. G.; P. H. DE AGUIAR; H. MATUSHITA; M. A. TARICCO; S. M. OBA-SHINJO; S. K. MARIE; M. J. TEIXEIRA. Intracranial and spinal ependymoma: series at Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 67, n. 3A, Sep, p.626-632. 2009.
- AROCA, F.; W. RENAUD; C. BARTOLI; C. BOUVIER-LABIT; D. FIGARELLA-BRANGER. Expression of PECAM-1/CD31 isoforms in human brain gliomas. **J Neurooncol**, v. 43, n. 1, May, p.19-25. 1999.
- BARONDES, S. H.; V. CASTRONOVO; D. N. COOPER; R. D. CUMMINGS; K. DRICKAMER; T. FEIZI; M. A. GITT; J. HIRABAYASHI; C. HUGHES; K. KASAI; H. HAKON LEMER; I. F. T. LIU; R. LOTQ; A. M. MERCURI; M. MONSLGNY; I. S. PILLAIL; F. POLRER; A. RAZ; P. W. J. RIGBY; J. M. RINI; J. L. WANGI. Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. **Cell**, v. 76, n. 4, Feb 25, p.597-598. 1994.
- BENNETTO, L.; N. FOREMAN; B. HARDING; R. HAYWARD; J. IRONSIDE; S. LOVE; D. ELLISON. Ki-67 immunolabelling index is a prognostic indicator in childhood posterior fossa ependymomas. **Neuropathol Appl Neurobiol**, v. 24, n. 6, Dec, p.434-440. 1998.
- BENVENUTI, S.; M. FRATTINI; S. ARENA; C. ZANON; V. CAPPELLETTI; D. CORADINI; M. G. DAIDONE; S. PILOTTI; M. A. PIEROTTI; A. BARDELLI. PIK3CA cancer mutations display gender and tissue specificity patterns. **Hum Mutat**, v. 29, n. 2, Feb, p.284-288. 2008.
- BRESALIER, R. S.; P. S. YAN; J. C. BYRD; R. LOTAN; A. RAZ. Expression of the endogenous galactose-binding protein galectin-3 correlates with the malignant potential of tumors in the central nervous system. **Cancer**, v. 80, n. 4, Aug 15, p.776-787. 1997.
- BROOKS, P. C.; R. A. CLARK; D. A. CHERESH. Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. **Science**, v. 264, n. 5158, Apr 22, p.569-571. 1994.
- BURGER, P. C.; B. W. SCHEITHAUER. Ependymal neoplasms. In: P. C. BURGER; B. W. SCHEITHAUER. **Tumors of the central nervous system**. Washington, D.C.: Armed forces institute of pathology, v. 10, 1994, p.120-135
- CARELLI, E. F.; G. BORGES. Tumores primários e metastáticos do sistema nervoso. In: C. A. LOPES. **Tratado de clínica médica**. São Paulo: Roca, v. 2, 2006, p.2310-2316
- CHO, H. Y.; M. LEE; H. TAKEI; J. DANCER; J. Y. RO; Q. J. ZHAI. Immunohistochemical comparison of chordoma with chondrosarcoma, myxopapillary ependymoma, and chordoid meningioma. **Appl Immunohistochem Mol Morphol**, v. 17, n. 2, Mar, p.131-138. 2009.
- CHOUFANI, G.; N. NAGY; S. SAUSSEZ; H. MARCHANT; P. BISSCHOP; M. BURCHERT; A. DANGUY; S. LOURVAN; I. SALMON; H. J. GABIUS; R. KISS; S. HASSID. The levels of expression of galectin-1, galectin-3, and the Thomsen-Friedenreich antigen and their binding sites decrease as clinical aggressiveness increases in head and neck cancers. **Cancer**, v. 86, n. 11, Dec 1, p.2353-2363. 1999.
- CHOW, C. W.; J. BRITTINGHAM. Perivascular pseudorosettes in childhood brain tumours: an ultrastructural and immunohistochemical study. **Pathology**, v. 19, n. 1, Jan, p.12-16. 1987.

- COLLINS, V. P. Brain tumours: classification and genes. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 75 Suppl 2, n., Jun, p.ii2-11. 2004.
- DEBRAY, C.; P. VERECKEN; N. BELOT; P. TEILLARD; J. P. BRION; M. PANDOLFO; R. POCHET. Multifaceted role of galectin-3 on human glioblastoma cell motility. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 325, n. 4, Dec 24, p.1393-1398. 2004.
- DUDA-SZYMANSKA, J.; W. PAPIERZ. Morphological analysis of vascular density in ependymomas. **Folia Neuropathol**, v. 45, n. 3, p.115-119. 2007.
- DUGGAN, M. A.; J. HUGH; J. G. NATION; D. I. ROBERTSON; G. C. STUART. Ependymoma of the uterosacral ligament. **Cancer**, v. 64, n. 12, Dec 15, p.2565-2571. 1989.
- ELLERHORST, J.; P. TRONCOSO; X. C. XU; J. LEE; R. LOTAN. Galectin-1 and galectin-3 expression in human prostate tissue and prostate cancer. **Urol Res**, v. 27, n. 5, Oct, p.362-367. 1999.
- ENG, L. F.; R. S. GHIRNIKAR; Y. L. LEE. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). **Neurochem Res**, v. 25, n. 9-10, Oct, p.1439-1451. 2000.
- ESTROZI, B.; E. QUEIROGA; C. E. BACCHI; V. FARIA SOARES DE ALMEIDA; J. LUCAS DE CARVALHO; G. M. LAGEMAN; M. ROSADO-DE-CHRISTENSON; S. SUSTER. Myxopapillary ependymoma of the posterior mediastinum. **Ann Diagn Pathol**, v. 10, n. 5, Oct, p.283-287. 2006.
- FILHO, G. B.; F. E. L. PEREIRA; R. C. GUIMARÃES. Distúrbios do crescimento e da diferenciação celular. In: G. B. FILHO. **Bogliolo: patologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v., 2006, p.175-236
- FOLKMAN, J. Angiogenesis. **Annu Rev Med**, v. 57, n., p.1-18. 2006.
- FROSCH, M. P.; D. C. ANTHONY; U. DE GIROLAMI. The central nervous system. In: V. KUMAR; A. K. ABBAS; N. FAUSTO. **Robbins and Cotran: Pathologic basis of disease**. Philadelphia: Elsevier Saunders, v., 2005, p.1347-1419
- GODFRAIND, C. Classification and controversies in pathology of ependymomas. **Childs Nerv Syst**, v. 25, n. 10, Oct, p.1185-1193. 2009.
- GONZALEZ-GOMES, I.; F. H. GILLES. The pathology of benign ependymomas. In: M. L. J. APUSSO. **Benign cerebral glioma**. Illinois: American Association of Neurological Surgeons, v. 1, 1995, p.95-114
- GORDOWER, L.; C. DECAESTECKER; Y. KACEM; A. LEMMERS; J. GUSMAN; M. BURCHERT; A. DANGUY; H. GABIUS; I. SALMON; R. KISS; I. CAMBY. Galectin-3 and galectin-3-binding site expression in human adult astrocytic tumours and related angiogenesis. **Neuropathol Appl Neurobiol**, v. 25, n. 4, Aug, p.319-330. 1999.
- GRAHAM, D. I.; P. L. LANTOS. **Greenfield's Neuropathology**. 7. Londres: Arnold. 2002

- GRIFFIOEN, A. W.; G. MOLEMA. Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. **Pharmacol Rev**, v. 52, n. 2, Jun, p.237-268. 2000.
- HAMILTON, R. L.; I. F. POLLACK. The molecular biology of ependymomas. **Brain Pathol**, v. 7, n. 2, Apr, p.807-822. 1997.
- HERNANDEZ, J. D.; L. G. BAUM. Ah, sweet mystery of death! Galectins and control of cell fate. **Glycobiology**, v. 12, n. 10, Oct, p.127R-136R. 2002.
- HORN, B.; R. HEIDEMAN; R. GEYER; I. POLLACK; R. PACKER; J. GOLDWEIN; T. TOMITA; P. SCHOMBERG; J. ATER; L. LUCHTMAN-JONES; K. RIVLIN; K. LAMBORN; M. PRADOS; A. BOLLEN; M. BERGER; G. DAHL; E. MCNEIL; K. PATTERSON; D. SHAW; M. KUBALIK; C. RUSSO. A multi-institutional retrospective study of intracranial ependymoma in children: identification of risk factors. **J Pediatr Hematol Oncol**, v. 21, n. 3, May-Jun, p.203-211. 1999.
- HSU, D. K.; C. A. DOWLING; K. C. JENG; J. T. CHEN; R. Y. YANG; F. T. LIU. Galectin-3 expression is induced in cirrhotic liver and hepatocellular carcinoma. **Int J Cancer**, v. 81, n. 4, May 17, p.519-526. 1999.
- HSU, S. M.; L. RAINE; H. FANGER. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. **J Histochem Cytochem**, v. 29, n. 4, Apr, p.577-580. 1981.
- HUSS, W. J.; C. F. HANRAHAN; R. J. BARRIOS; J. W. SIMONS; N. M. GREENBERG. Angiogenesis and prostate cancer: identification of a molecular progression switch. **Cancer Res**, v. 61, n. 6, Mar 15, p.2736-2743. 2001.
- KATORI, H.; A. NOZAWA; M. TSUKUDA. Increased expression of cyclooxygenase-2 and Ki-67 are associated with malignant transformation of pleomorphic adenoma. **Auris Nasus Larynx**, v. 34, n. 1, Mar, p.79-84. 2007.
- KURT, E.; P. P. ZHENG; W. C. HOP; M. VAN DER WEIDEN; M. BOL; M. J. VAN DEN BENT; C. J. AVEZAAT; J. M. KROS. Identification of relevant prognostic histopathologic features in 69 intracranial ependymomas, excluding myxopapillary ependymomas and subependymomas. **Cancer**, v. 106, n. 2, Jan 15, p.388-395. 2006.
- LANGFORD, L. A. The ultrastructure of the ependymoblastoma. **Acta Neuropathol**, v. 71, n. 1-2, p.136-141. 1986.
- LE MERCIER, M.; S. FORTIN; V. MATHIEU; R. KISS; F. LEFRANC. Galectins and Gliomas. **Brain Pathol**, v., n., Apr 7. 2009.
- LEBELT, A.; J. DZIECIOL; K. GUZINSKA-USTYMOWICZ; D. LEMANCEWICZ; L. ZIMNOCH; E. CZYKIER. Angiogenesis in gliomas. **Folia Histochem Cytobiol**, v. 46, n. 1, p.69-72. 2008.
- LIM, S. C.; S. J. JANG. Myxopapillary ependymoma of the fourth ventricle. **Clin Neurol Neurosurg**, v. 108, n. 2, Feb, p.211-214. 2006.

- LIU, F. T.; R. J. PATTERSON; J. L. WANG. Intracellular functions of galectins. **Biochim Biophys Acta**, v. 1572, n. 2-3, Sep 19, p.263-273. 2002.
- LOPES, M. B. Angiogenesis in brain tumors. **Microsc Res Tech**, v. 60, n. 2, Feb 1, p.225-230. 2003.
- LORENTZEN, M.; I. HAGERSTRAND. Congenital ependymoblastoma. **Acta Neuropathol**, v. 49, n. 1, p.71-74. 1980.
- LOTAN, R.; H. ITO; W. YASUI; H. YOKOZAKI; D. LOTAN; E. TAHARA. Expression of a 31-kDa lactoside-binding lectin in normal human gastric mucosa and in primary and metastatic gastric carcinomas. **Int J Cancer**, v. 56, n. 4, Feb 15, p.474-480. 1994.
- MANSUR, D. B.; A. PERRY; V. RAJARAM; J. M. MICHALSKI; T. S. PARK; J. R. LEONARD; L. LUCHTMAN-JONES; K. M. RICH; P. W. GRIGSBY; M. A. LOCKETT; S. H. WAHAB; J. R. SIMPSON. Postoperative radiation therapy for grade II and III intracranial ependymoma. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 61, n. 2, Feb 1, p.387-391. 2005.
- MCGUIRE, C. S.; K. L. SAINANI; P. G. FISHER. Incidence patterns for ependymoma: a surveillance, epidemiology, and end results study. **J Neurosurg**, v. 110, n. 4, Apr, p.725-729. 2009.
- MCLENDON, R. E.; D. SHIFFER; M. K. ROSENBLUM; O. D. WIESTLER. Ependymal tumours. In: N. D. LOUIS; H. OHGAKI; O. D. WIESTLER; W. K. CAVENEE. **WHO classification of tumours of the central nervous system**. Lyon: International Agency for Research on Cancer, v., 2007, p.69-80
- MORK, S. J.; L. J. RUBINSTEIN. Ependymoblastoma. A reappraisal of a rare embryonal tumor. **Cancer**, v. 55, n. 7, Apr 1, p.1536-1542. 1985.
- NANGIA-MAKKER, P.; Y. HONJO; R. SARVIS; S. AKAHANI; V. HOGAN; K. J. PIENTA; A. RAZ. Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis. **Am J Pathol**, v. 156, n. 3, Mar, p.899-909. 2000.
- NEDER, L.; B. O. COLLI; H. R. MACHADO; C. G. CARLOTTI, JR.; A. C. SANTOS; L. CHIMELLI. MIB-1 labeling index in astrocytic tumors--a clinicopathologic study. **Clin Neuropathol**, v. 23, n. 6, Nov-Dec, p.262-270. 2004a.
- NEDER, L.; S. K. MARIE; C. G. CARLOTTI, JR.; A. A. GABBAI; S. ROSEMBERG; S. M. MALHEIROS; R. P. SIQUEIRA; S. M. OBA-SHINJO; M. UNO; P. H. AGUIAR; F. MIURA; R. CHAMMAS; B. O. COLLI; W. A. SILVA, JR.; M. A. ZAGO. Galectin-3 as an immunohistochemical tool to distinguish pilocytic astrocytomas from diffuse astrocytomas, and glioblastomas from anaplastic oligodendrogliomas. **Brain Pathol**, v. 14, n. 4, Oct, p.399-405. 2004b.
- OHGAKI, H.; P. KLEIHUES. Epidemiology and etiology of gliomas. **Acta Neuropathol**, v. 109, n. 1, Jan, p.93-108. 2005.
- PARK, S. H.; H. S. MIN; B. KIM; J. MYUNG; S. H. PAEK. Galectin-3: a useful biomarker

- for differential diagnosis of brain tumors. **Neuropathology**, v. 28, n. 5, Oct, p.497-506. 2008.
- PIETERS, R. J. Inhibition and detection of galectins. **Chembiochem**, v. 7, n. 5, May, p.721-728. 2006.
- PITTELLA, J. E. H.; S. ROSENBERG; M. D. HAHN; L. CHIMELLI; M. B. M. ARAÚJO. Sistema nervoso. In: G. B. FILHO. **Bogliolo: patologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v., 2006, p.854-958
- PRAYSON, R. A. Clinicopathologic study of 61 patients with ependymoma including MIB-1 immunohistochemistry. **Ann Diagn Pathol**, v. 3, n. 1, Feb, p.11-18. 1999.
- PREUSSER, M.; H. HEINZL; E. GELPI; R. HOFTBERGER; I. FISCHER; I. PIPP; I. MILENKOVIC; A. WOHRER; F. POPOVICI; S. WOLFSBERGER; J. A. HAINFELLNER. Ki67 index in intracranial ependymoma: a promising histopathological candidate biomarker. **Histopathology**, v. 53, n. 1, Jul, p.39-47. 2008.
- QUINN, C. M.; N. A. WRIGHT. The clinical assessment of proliferation and growth in human tumours: evaluation of methods and applications as prognostic variables. **J Pathol**, v. 160, n. 2, Feb, p.93-102. 1990.
- QUINONES-HINOJOSA, A.; N. SANAI; J. S. SMITH; M. W. MCDERMOTT. Techniques to assess the proliferative potential of brain tumors. **J Neurooncol**, v. 74, n. 1, Aug, p.19-30. 2005.
- RABINOVICH, G. A.; L. G. BAUM; N. TINARI; R. PAGANELLI; C. NATOLI; F. T. LIU; S. IACOBELLI. Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? **Trends Immunol**, v. 23, n. 6, Jun, p.313-320. 2002.
- RENI, M.; G. GATTA; E. MAZZA; C. VECCHT. Ependymoma. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 63, n. 1, Jul, p.81-89. 2007.
- REZAI, A. R.; H. H. WOO; M. LEE; H. COHEN; D. ZAGZAG; F. J. EPSTEIN. Disseminated ependymomas of the central nervous system. **J Neurosurg**, v. 85, n. 4, Oct, p.618-624. 1996.
- RICHARDS, A. L.; J. V. ROSENFELD; M. F. GONZALES; D. ASHLEY; C. MC LEAN. Supratentorial tanyctic ependymoma. **J Clin Neurosci**, v. 11, n. 8, Nov, p.928-930. 2004.
- RILLIET, B.; O. VERNET. Gliomas in children: a review. **Childs Nerv Syst**, v. 16, n. 10-11, Nov, p.735-741. 2000.
- RISAU, W. Mechanisms of angiogenesis. **Nature**, v. 386, n. 6626, Apr 17, p.671-674. 1997.
- RITTER, A. M.; K. R. HESS; R. E. MCLENDON; L. A. LANGFORD. Ependymomas: MIB-1 proliferation index and survival. **J Neurooncol**, v. 40, n. 1, Oct, p.51-57. 1998.
- RODRIGUEZ, D.; M. C. CHEUNG; N. HOUSRI; A. QUINONES-HINOJOSA; K. CAMPHAUSEN; L. G. KONIARIS. Outcomes of malignant CNS ependymomas: an examination of 2408 cases through the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER)

database (1973-2005). **J Surg Res**, v. 156, n. 2, Oct, p.340-351. 2009.

RODRIGUEZ, F. J.; B. W. SCHEITHAUER; F. RONCAROLI; A. I. SILVA; K. KOVACS; D. J. BRAT; L. JIN. Galectin-3 expression is ubiquitous in tumors of the sellar region, nervous system, and mimics: an immunohistochemical and RT-PCR study. **Am J Surg Pathol**, v. 32, n. 9, Sep, p.1344-1352. 2008.

RUBIM, E.; F. GORSTEIN; R. RUBIM; R. SCHARTING; P. STRAYER. **Rubim Patologia: Bases clinicopatológicas da medicina**. 4. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2006

RUMILLA, K. M.; L. A. ERICKSON; A. K. ERICKSON; R. V. LLOYD. Galectin-4 expression in carcinoid tumors. **Endocr Pathol**, v. 17, n. 3, Fall, p.243-249. 2006.

RUTKA, J. T.; M. MURAKAMI; P. B. DIRKS; S. L. HUBBARD; L. E. BECKER; K. FUKUYAMA; S. JUNG; A. TSUGU; K. MATSUZAWA. Role of glial filaments in cells and tumors of glial origin: a review. **J Neurosurg**, v. 87, n. 3, Sep, p.420-430. 1997.

SAGE, E. H. Pieces of eight: bioactive fragments of extracellular proteins as regulators of angiogenesis. **Trends Cell Biol**, v. 7, n. 5, May, p.182-186. 1997.

SALLINEN, P. K.; H. K. HAAPASALO; T. VISAKORPI; P. T. HELEN; I. S. RANTALA; J. J. ISOLA; H. J. HELIN. Prognostication of astrocytoma patient survival by Ki-67 (MIB-1), PCNA, and S-phase fraction using archival paraffin-embedded samples. **J Pathol**, v. 174, n. 4, Dec, p.275-282. 1994.

SCHONK, D. M.; H. J. KUIJPERS; E. VAN DRUNEN; C. H. VAN DALEN; A. H. GEURTS VAN KESSEL; R. VERHEIJEN; F. C. RAMAEKERS. Assignment of the gene(s) involved in the expression of the proliferation-related Ki-67 antigen to human chromosome 10. **Hum Genet**, v. 83, n. 3, Oct, p.297-299. 1989.

SCHWARZ, G., JR.; M. REMMELINK; C. DECAESTECKER; I. GIELEN; V. BUDEL; M. BURCHERT; F. DARRO; A. DANGUY; H. J. GABIUS; I. SALMON; R. KISS. Galectin fingerprinting in tumor diagnosis. Differential expression of galectin-3 and galectin-3 binding sites, but not galectin-1, in benign vs malignant uterine smooth muscle tumors. **Am J Clin Pathol**, v. 111, n. 5, May, p.623-631. 1999.

SPYRATOS, F.; M. FERRERO-POUS; M. TRASSARD; K. HACENE; E. PHILLIPS; M. TUBIANA-HULIN; V. LE DOUSSAL. Correlation between MIB-1 and other proliferation markers: clinical implications of the MIB-1 cutoff value. **Cancer**, v. 94, n. 8, Apr 15, p.2151-2159. 2002.

STILLMAN, B. N.; P. S. MISCHER; L. G. BAUM. New roles for galectins in brain tumors - from prognostic markers to therapeutic targets. **Brain Pathol**, v. 15, n. 2, Apr, p.124-132. 2005.

STRIK, H. M.; M. H. DEININGER; B. FRANK; H. J. SCHLUESENER; R. MEYERMANN. Galectin-3: cellular distribution and correlation with WHO-grade in human gliomas. **J Neurooncol**, v. 53, n. 1, May, p.13-20. 2001.

SURI, V. S.; M. TATKE; D. SINGH; A. SHARMA. Histological spectrum of ependymomas

and correlation of p53 and Ki-67 expression with ependymoma grade and subtype. **Indian J Cancer**, v. 41, n. 2, Apr-Jun, p.66-71. 2004.

SUZUKI, S.; H. OKA; N. KAWANO; S. TANAKA; S. UTSUKI; K. FUJII. Prognostic value of Ki-67 (MIB-1) and p53 in ependymomas. **Brain Tumor Pathol**, v. 18, n. 2, p.151-154. 2001.

TAKENAKA, Y.; T. FUKUMORI; A. RAZ. Galectin-3 and metastasis. **Glycoconj J**, v. 19, n. 7-9, p.543-549. 2004.

TEO, C.; P. NAKAJI; P. SYMONS; V. TOBIAS; R. COHN; R. SMEE. Ependymoma. **Childs Nerv Syst**, v. 19, n. 5-6, Jun, p.270-285. 2003.

WECHSLER-REYA, R.; M. P. SCOTT. The developmental biology of brain tumors. **Annu Rev Neurosci**, v. 24, n., p.385-428. 2001.

WOLFSBERGER, S.; I. FISCHER; R. HOFTBERGER; P. BIRNER; I. SLAVC; K. DIECKMANN; T. CZECH; H. BUDKA; J. HAINFELLNER. Ki-67 immunolabeling index is an accurate predictor of outcome in patients with intracranial ependymoma. **Am J Surg Pathol**, v. 28, n. 7, Jul, p.914-920. 2004.

WOODFIN, A.; M. B. VOISIN; S. NOURSHARGH. PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 27, n. 12, Dec, p.2514-2523. 2007.

XU, X. C.; A. K. EL-NAGGAR; R. LOTAN. Differential expression of galectin-1 and galectin-3 in thyroid tumors. Potential diagnostic implications. **Am J Pathol**, v. 147, n. 3, Sep, p.815-822. 1995.

YUCESOY, K.; E. OZER; M. KOYUNCUOGLU. Parenchymal brain metastasis of a spinal myxopapillary ependymoma after extradural manipulation. **Acta Neurochir (Wien)**, v. 143, n. 10, Oct, p.1071-1072. 2001.

ZETTER, B. R. Angiogenesis and tumor metastasis. **Annu Rev Med**, v. 49, n., p.407-424. 1998.

ANEXOS

Anexo A

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

www.hcrp.fmrp.usp.br



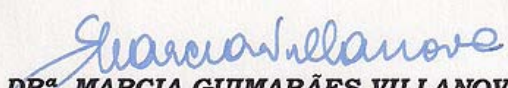
Ribeirão Preto, 01 de agosto de 2007

Ofício n°. 2568/2007
CEP/ MGv

Prezado Senhor,

O trabalho intitulado **“EXPRESSÃO DA GALECTINA-3 EM EPENDIMOMAS, ESTUDO DA DENSIDADE VASCULAR E EXPRESSÃO DE KI-67”** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em sua 251ª Reunião Ordinária, realizada em 30/07/2007, e enquadrado na categoria: **APROVADO**, de acordo com o Processo HCRP n°. 6487/2007.

Atenciosamente.


DRª. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimo Senhor
ELDER FRANCISCO LATORRACA
PROF. DR. LUCIANO NEDER SERAFINI (Orientador)
Departamento de Patologia – FMRP-USP

Anexo B**CERTIFICADO**

Certificamos que o trabalho

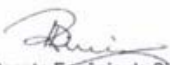
"ESTUDO DA EXPRESSÃO DE GALECTINA-3 EM EPENDIMOMAS E AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO CELULAR E DA DENSIDADE MICROVASCULAR."

De autoria de

LATORRACA, E. F.; SAGGIORO, F. P.; MALHEIROS, S.; STAVALE, J. N.; PITTELA, J. E. H.;
NEDER, L.

foi apresentado na forma de painel no 12º Encontro Nacional de Biomedicina, realizado no período de 29 a 31 de outubro de 2009.

Botucatu, 31 de outubro de 2009


Prof. Dr. Renato Eugênio da Silva Diniz
Diretor do Instituto de Biociências
Profa. Dra. Juliana Irani Fratucci de Gobbi
Organização

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)