



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E
BIOLOGIA CELULAR**

EDMUNDO LUÍS RODRIGUES PEREIRA

EFEITO DO PISOSTEROL EM CULTURA DE ASTROCITOMAS MALIGNOS

**BELÉM
2010**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

EDMUNDO LUÍS RODRIGUES PEREIRA

EFEITO DO PISOSTEROL EM CULTURA DE ASTROCITOMAS MALIGNOS

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, como Requisito Parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Rommel Mario Rodríguez Burbano.

**Belém
2010**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

Pereira, Edmundo Luís Rodrigues

Efeito do Pisosterol em Cultura de Astrocitomas Malignos / Edmundo Luís Rodrigues Pereira; orientador, Rommel Mario Rodríguez Burbano. – Belém, 2010.

90f

Trabalho de Conclusão de Curso (Dissertação) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2010.

1. Pisosterol 2. MYC 3. FISH 4. Linhagens celulares astrocíticas I. Título

CDU: 616-006

Catalogação na Fonte: Luciene Dias Cavalcante - CRB2/1076

EDMUNDO LUÍS RODRIGUES PEREIRA

EFEITO DO PISOSTEROL EM CULTURA DE ASTROCITOMAS MALIGNOS

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, como Requisito Parcial para a Obtenção do Grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Data de aprovação: 28 de janeiro de 2010

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr.Rommel Mario Rodríguez Burbano - Orientador

Prof. Associado Instituto de Ciências Biológicas UFPA
Universidade Federal do Pará

Prof. Dr.Wallace Gomes Leal

Prof. Adjunto Instituto de Ciências Biológicas UFPA
Universidade Federal do Pará

Profª. Dra.Edna Franco

Professora Adjunta Instituto de Ciências Biológicas UFPA
Universidade Federal do Pará

“Esse é o trabalho da minha vida. As dificuldades forneceram a motivação necessária para gerá-lo. Para Deus, fonte de luz e sabedoria universal, à família, pelo incentivo, a mulher que amo, e aos filhos, pela alegria e sentido que dão a minha vida, dedico com alegria essa obra.”

AGRADECIMENTOS

Para Deus, fonte contínua e perfeita de ordem, energia, e informação.

Ao meu orientador, Profº Dr. Rommel Burbano, pela dedicação, experiência científica, confiança, e amizade durante os meses de confecção deste estudo.

Ao Pai, José Edmundo (*in memorian*), à Mãe, Dona Carmen, ao irmão José Almir, à irmã Carmen, pelos anos de amizade e tolerância com a profissão que abracei.

Ao meu primeiro professor do curso universitário e inspirador das neurociências, Dr. Cristóvam W. P. Diniz, e para o último mestre do curso de pós-graduação, Dr. Manoel Ayres. Ambos, com seus respectivos exemplos, reforçaram minha inclinação para a docência.

Aos meus pacientes, em especial ao Ulysses, amigo que se foi, mas inspirou esse trabalho como forma de lutar contra a malignidade do corpo.

À Rosa encarnada, que partiu com seus espinhos envenenados, deixando somente seu perfume em minha lembrança.

RESUMO

A caracterização de linhagens celulares é importante para a compreensão da biologia de células neoplásicas e para o desenvolvimento de novas estratégias contra o crescimento e a progressão das células cancerígenas. O objetivo deste trabalho foi caracterizar morfológica e citogeneticamente duas linhagens astrocíticas neoplásicas, a U343 e a AHOL1, esta última estabelecida pelo nosso grupo de pesquisa a partir de um glioblastoma multiforme. Através da Hibridação *In Situ* por Fluorescência quantificamos o número de alelos do gene *MYC*, por célula, nas duas linhagens celulares, antes e após tratamento com Pisosterol (a 0,5, 1,0 e 1,8 µg/mL), um triterpeno isolado de *Pisolithus tinctorius*, um fungo coletado no Nordeste do Brasil. Também avaliamos a citotoxicidade deste produto natural, através do índice mitótico dessas linhagens. As análises revelaram que as duas linhagens tumorais são diplóides e apresentam crescimento em camada única, não organizado, semelhante a fibroblasto, com formação de focos, divisão heterogênea e ciclo celular de aproximadamente 36 horas. Após o tratamento com o Pisosterol, não foi detectada mudança na morfologia das células da linhagem. A deleção do braço longo do cromossomo 7 [del(7)(q32)], na linhagem U343, e a deleção do braço curto do cromossomo 1 [del(1)(p21)], na linhagem AHOL1, foram as principais alterações citogenéticas encontradas neste trabalho. A citotoxicidade do Pisosterol foi significativa somente na concentração de 1,8 µg/ml. Na ausência desse produto natural, 65% e 72% das células das linhagens AHOL1 e U343, respectivamente, apresentaram mais de 2 alelos do gene *MYC*. Após tratamento com 1,8 µg/mL de Pisosterol, somente 15% das células da linhagem AHOL1 e 33% das células da linhagem U343, apresentaram mais de 2 alelos do gene *MYC*, sugerindo que esse triterpeno provavelmente bloqueia células com excesso de proteína *MYC*, antes da fase S do ciclo celular. Nessa hipótese, as células que não apresentaram mais de dois alelos desse gene, conseguiriam suportar a citotoxicidade e continuaram o ciclo celular. Visto que células neoplásicas sem anormalidades numéricas do gene *MYC*, apresentam comportamento menos agressivo e invasivo, representando alvos mais desejáveis para a quimioterapia, concluímos que o Pisosterol pode ser utilizado em combinação com a terapia anti-cancer convencional.

Palavras chave: Pisosterol. *MYC*. FISH. Linhagens celulares astrocíticas.

ABSTRACT

The characterization of cell lines is important for understanding the biology of neoplastic cells and development of new strategies against spread and progression of cancer cells. This study characterizes morphologically and cytogenetically two astrocyte neoplastic lines, the U343 and AHOL1, the latter established by our research group from a glioblastoma multiforme. Through the *In Situ* Hybridization Fluorescence we have quantified the number of alleles of *MYC* gene, per cell, the two cell lines, before and after treatment with pisosterol (0.5, 1.0 and 1.8 mg / mL), a triterpene isolated from *Pisolithus tinctorius*, a fungus collected in northeastern Brazil. We also assessed the cytotoxicity of this natural product, through the mitotic index of these strains. The analysis revealed that the two strains are diploid tumor growth and have a single layer, not organized, similar to fibroblasts, with the formation of foci, heterogeneous division and cell cycle of about 36 hours. After treatment with pisosterol, no change was detected in the morphology of the cell line. The deletion of the long arm of chromosome 7 [del (7) (q32)], in line U343, and deletion of the short arm of chromosome 1 [del (1) (p21)], in line AHOL1, were the main cytogenetic alterations found in this work. The cytotoxicity of pisosterol was significant only at a concentration of 1.8 mg / mL. In the absence of this natural product, 65% and 72% of the cells of strains AHOL1 and U343, respectively, had more than 2 alleles of *MYC* gene. After treatment with 1.8 mg / mL pisosterol, only 15% of the cells of the AHOL1 and 33% of the cell line U343, had more than 2 alleles of *MYC* gene, suggesting that this triterpene probably blocks cells with excess protein *MYC* before the S phase of the cell cycle. In this case, the cells that did not have more than two alleles of this gene could support the cytotoxicity of and continue the cell cycle. Since cancer cells without numerical abnormalities of *MYC* gene have less aggressive behavior and invasiveness, they represent suitable targets for chemotherapy, we can conclude that pisosterol can be used in combination therapy with other conventional anti-cancer drugs.

Keywords: Pisosterol. *MYC*. FISH. Astrocytic cell lineage.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Esquema 1 - Vias genéticas dos subtipos moleculares de GBMs.....	40
Esquema 1 - Vias genéticas para origem de GBMs primários (<i>de novo</i>) e secundários	40
Esquema 2 - Representação dos diferentes processos celulares controlados pelo gene MYC	43
Esquema 3 - Representação da estrutura do gene MYC	44
Esquema 4 - Representação do fator de transcrição MYC	45
Esquema 5 - Modelo da interação da molécula Max com outras proteínas.....	46
Esquema 6 - Estrutura Química do Pisosterol.....	53
 Fotografia 1 - Fungo <i>Pisolithus tinctorius</i>	51
 Imagem 1 - Diagnóstico por imagem (TC/RM) de astrocitoma pilocítico do cerebelo.....	19
Imagem 2 - Diagnóstico histológico (Hematoxilina-eosina) de astrocitoma pilocítico do cerebelo	20
Imagem 3 - Diagnóstico por imagem (TC/RM) de astrocitoma fibrilar do lobo frontal	20
Imagem 4 - Diagnóstico histológico (Hematoxilina-eosina) de astrocitoma fibrilar.....	21
Imagem 5 - Tomografia computadorizada de GBM fronto-temporal	22
Imagem 6 - Ressonância Magnética de GBM fronto-temporal.....	22
Imagem 7 - Diagnóstico histológico (Hematoxilina-eosina) de GBM.....	23
Imagem 8 – Neurônios	29
Imagem 9 - Tumores neuronais.....	31
Imagem 10 – Astrócitos.....	32
Imagem 11 – Micróglia	36
Imagem 12 - Astrocitoma gemistocítico	38
Imagem 13 - Linhagens celulares em cultura. Monocamadas com crescimento desorganizado e algumas aglomerações. Ausência de modificações morfológicas antes e após o tratamento com o Pisosterol.....	63
Imagem 14 - Cariótipos parciais.....	65
Imagem 15 - Células U343 submetidas à Hibridação <i>in situ</i> por Fluorescência.....	67
 Quadro 1 - Classificação dos tumores cerebrais, segundo a OMS.....	15
Quadro 2 – Astrocitomas.....	16
Quadro 3 - Etapas da Hibridação <i>in situ</i> Fluorescente.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição do número cromossômico das linhagens AHOL1 e U343	64
Tabela 2 - Índice Mitótico das culturas celulares das linhagens AHOL1 e U343, tratadas com três concentrações de Pisosterol ou 0.01ug/ml de doxorubicina.....	66
Tabela 3 - Células das linhagens U343 e AHOL1 submetidas à Hibridação <i>in situ</i> Fluorescente para o gene <i>MYC</i> antes e após tratamento com três concentrações de Pisosterol	68

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AHOL1	Astrocitoma Hospital Ofir Loyola N° 1
ATP	Adenosina trifosfato
BO	Bulbo olfatório
BTSC	Brain Tumor Stem Cells
CCNU	Lomustina
CGH	Hibridação Genômica Comparativa
C- MYC	Cell myelocytomatosis
CTD	C-terminal
DNET	Tumor Neuroepitelial Disembrioblástico
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
EGFR	Receptor do Fator de Crescimento Epitelial
EUA	Estados Unidos da América
FISH	Hibridação <i>in situ</i> Fluorescente
GBM	Glioblastoma Multiforme
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida
HE	Hematoxilina-eosina
HGF	Fator de Crescimento do Hepatócito
HLH	Helix-loop-helix
IARC-WHO	Agência Internacional para Pesquisa do Câncer
IDH1	Desidrogenase do Isocitrato
IM	Índice mitótico
LOH	Perda da heterozigosidade
LZ	Leucina
MHC	Complexo de histocompatibilidade humana
MYC	Cell myelocytomatosis
NLS	Localização nuclear
NPSC	Células tronco progenitoras neurais
OMS	Organização Mundial de Saúde
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
QT	Quimioterapia
RPM	Rotações por minuto
RT	Radioterapia
RM	Ressonância Magnética
SGZ	Zona subgranular
SLF	Síndrome de Li-Fraumeni
SNC	Sistema Nervoso Central
SVZ	Zona subventricular
TAD	Transativação N-terminal
TC	Tomografia Computadorizada
T(S)P53	Tumor supressor protein, cellular tumor antigen p53
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	13
1.1.1 Epidemiologia.....	13
1.1.2 Classificação.....	14
1.1.3 Aspectos clínicos.....	16
1.1.3.1 Astrocitomas de baixo grau (grau I e II OMS).....	17
1.1.3.2 Astrocitomas de alto grau (grau III e IV OMS): astrocitomas malignos.....	21
1.1.4 Cirurgia.....	25
1.1.5 Radioterapia.....	25
1.1.6 Quimioterapia.....	27
1.2 NEUROGÊNESE DOS GLIOMAS.....	29
1.2.1 Neurônios.....	29
1.2.2 Astrócitos.....	31
1.2.3 Micrógliã, Neuroinflamação e glioblastomas.....	35
1.3 CITOGÊNESE DOS GLIOBLASTOMAS.....	39
1.3.1 Subtipos de glioblastomas.....	39
1.3.2 Alterações de genes localizados no cromossomo 10.....	41
1.3.3 Gene <i>tp53</i> e gliomas.....	41
1.3.4 Gene <i>c-Myc</i>	43
1.3.5 Gene <i>myc</i> e glioblastomas.....	46
1.4 PRODUTOS NATURAIS COM POTENCIAL ANTINEOPLÁSICO.....	47
1.4.1 Metabólitos isolados de fungos.....	49
1.4.2 Gênero <i>Pisolithus</i> e <i>Pisosterol</i>	50
2 PERGUNTA EXPERIMENTAL.....	54
3 ASPECTOS ÉTICOS.....	55
4 OBJETIVOS.....	56
4.1 OBJETIVO GERAL.....	56
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	56
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	57
5.1 CASO CLÍNICO.....	57
5.2 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DO <i>PISOSTEROL</i>	58
5.3 LINHAGEM <i>U343</i> E CULTIVO DAS LINHAGENS CELULARES DE GLIOMA EXTRAÍDO DO CASO CLÍNICO.....	59
5.4 TRATAMENTO COM <i>PISOSTEROL</i>	59
5.5 CITOGÊNESE E CÁLCULO DO ÍNDICE MITÓTICO.....	59

5.6 BANDEAMENTO GTG	60
5.7 HIBRIDAÇÃO <i>IN SITU</i> FLUORESCENTE	60
 6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	62
 7 RESULTADOS	63
7.1 ANÁLISE MORFOLÓGICA	63
7.2 ANÁLISE CITOGÉNÉTICA CONVENCIONAL	64
7.2.1 Distribuição do número cromossômico	64
7.2.2 Bandamento GTG	64
7.3 ÍNDICE MITÓTICO	66
7.4 HIBRIDAÇÃO <i>IN SITU</i> FLUORESCENTE	66
 8 DISCUSSÃO	69
 9 CONCLUSÃO	74
 REFERÊNCIAS	75
 ANEXO	89

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1.1 Epidemiologia

Nos Estados Unidos da América (EUA), tumores malignos primários do cérebro adulto respondem por 2% de todos os cânceres (CENTRAL BRAIN TUMOR REGISTRY OF THE UNITED STATES, 2009). Nesse país, a taxa de prevalência para todos os tumores encefálicos primários, foi de 130.8/100.000 habitantes, estimando-se que 350.000 pessoas vivas portavam neoplasias intracranianas durante o ano de 2000. Desses, a prevalência de casos considerados malignos foi de 29,5 / 100.000 habitantes, no mesmo período (DAVIS et al., 2001).

A Sociedade Americana do Câncer estima que ocorram mais de 18.000 diagnósticos novos de tumores cerebrais e do sistema nervoso, responsáveis por aproximadamente 13.000 mortes a cada ano (CHANDANA et al., 2008). Segundo relatos da Agência Internacional para Pesquisa Sobre o Câncer (IARC-WHO, 2009), órgão da Organização Mundial de Saúde (OMS) responsável pela coleta de dados sobre a doença, foram detectados em 2002, ao redor do mundo, 189.485 novos casos de tumores malignos primários do cérebro, isto é, lesões proliferativas que se originam em células que constituem o cérebro; esses tumores primários respondem por cerca da metade (55%) dos casos de tumores cerebrais registrados em adultos (McCARTHY et al., 2009). Estima-se que a incidência global dos tumores cerebrais malignos primários do adulto seja da ordem de 3,7 por cada 100.000 homens e 2,6 por cada 100.000 mulheres (SCHWARTZBAUM et al., 2006).

Dentre os tumores cerebrais primários, neoplasias que se originam das células gliais (“gliomas”) são as mais comumente encontradas. Dentre os gliomas, o mais freqüente é aquele que se origina do astrócito (“astrocitoma”) - um dos subtipos celulares das células da glia. Mais da metade dos astrocitomas (59%) são de natureza maligna: astrocitomas anaplásicos (8%), e o restante (51%) representado pelo incurável Glioblastoma Multiforme (GBM) (IDOWU, 2008; BAUCHET, 2009).

Homens e mulheres são afetados em proporções equivalentes, com incidência um pouco mais elevada em homens, na proporção de 3:2 (OHGAKI, 2009). Indivíduos entre a terceira e quinta década de vida são mais acometidos pela doença, sendo que a idade mais comum de surgimento do GBM se localiza próximo dos 60 anos de vida. Isso se deve, em parte, pelo efeito acumulativo de mutações gênicas, que ocorrem ao longo da vida das pessoas (BRANDES et al., 2008). Por outro lado, na faixa pediátrica, os tumores de origem glial são um pouco menos freqüentes. Raros em lactentes, os gliomas são mais encontrados a partir do terceiro ano de vida, momento em que se observa elevação progressiva da incidência até um pico entre 6-9 anos (HOU et al., 2008). Diferente dos adultos, em que tais neoplasias acometem com maior freqüência os lobos cerebrais (espaço supra-tentorial), nas crianças, os gliomas incidem preferencialmente em estruturas localizadas na fossa posterior, isto é, quarto ventrículo (*ependimomas*), cerebelo e tronco cerebral (*astrocitomas*) (SEKER; OZEK, 2006). Em adultos e crianças, o acometimento da medula espinhal por um astrocitoma constitui uma raridade (MATSUMOTO et al., 2008).

Como observado, gliomas malignos são os tumores cerebrais primários mais prevalentes dos adultos, ocasionando severo padecimento individual e familiar, com significativo impacto social e econômico em diversos países. O tumor mais prevalente nesse grupo é também aquele que não admite cura: o GBM, tendo sido observado que sua incidência se encontra em elevação ao longo dos últimos anos, provavelmente pela utilização em larga escala dos exames de Tomografia Computadorizada (TC) e Ressonância Magnética (RM). (SANSON, 2006).

1.1.2 Classificação

Mais que diagnóstica, a importância de agrupar as neoplasias gliais possui relevância prognóstica. Ao exame histológico, podem ser observados distintos graus de diferenciação, variando desde neoplasias pouco celulares, com raras figuras de mitoses, semelhantes ao cérebro normal – conhecidas como ***astrocitomas de baixo grau***, até as formas malignas, os ***astrocitomas de alto grau***, onde predominam sinais de anaplasia, freqüentes figuras de mitose, proliferação vascular e necrose típica, chamada de “necrose em pseudopaliçada”, decorrente de hipóxia (RONG et al., 2006; DURAN et al., 2007).

Astrocitomas de baixo grau costumam ter curso lento ao longo de meses ou anos, com sobrevida prolongada, acometendo adultos mais jovens. Ao contrário, astrocitomas de alto grau possuem curso clínico rapidamente progressivo, levando a curto tempo de sobrevida, limitada a poucos meses após o diagnóstico (WESSELS et al., 2003).

A classificação mais utilizada para caracterizar os tumores cerebrais é aquela estabelecida pela OMS, originalmente publicada em 1979, atualmente na quarta edição, última vez revista em 2007 (LOUIS et al., 2007); essa classificação se baseia na possível origem celular das neoplasias (ex: epêndima = ependimomas, oligodendrócito = oligodendrogliomas, astrócito = astrocitomas), associando a origem aos achados histológicos observados nas lâminas de parafina coloradas com hematoxilina-eosina (HE) e com imunohistoquímica (Quadro 1) (PIEPMEIER, 2009). A classificação da OMS agrupa as neoplasias em quatro graus crescentes de malignidade (Quadro 2): grau I a grau IV (NAKAZATO, 2008).

<u>Tumores Astrocitários</u> Astrocitoma difuso (grau II) Xantastrocitoma pleomorfo (grau II) Astrocitoma anaplásico (grau III) Glioblastoma (grau IV)	<u>Tumores mistos neuronais-gliais</u> (grau I a III)
<u>Tumores Oligodendrogliais</u> Oligodendroglioma (grau II) Oligodendroglioma anaplásico (grau III)	<u>Tumores da bainha neural</u> Neurofibroma (grau I) Perineuroma (grau I a III) Tumor maligno da bainha neural (grau II a IV)
<u>Tumores Oligoastrogliais</u> Oligoastrocitoma (grau II) Oligoastrocitoma anaplásico (grau III)	<u>Tumores das meninges</u> Meningioma (grau I) Meningioma atípico (grau II) Meningioma anaplásico (grau III)
<u>Tumores de células ependimárias</u> Ependimoma (grau I a III)	<u>Linfomas&neoplasias hematopoéticas</u> Linfoma maligno (baixo e alto grau) Plasmacitoma Sarcoma granulocítico
<u>Tumores do plexo coróide</u> (grau I a III)	<u>Outros</u> Tumores de células germinativas Tumores da região selar (grau I)
<u>Outros tumores neuroepiteliais</u> Glioma angiogênico (grau I) Glioma cordoide do III ventrículo (grau I)	
<u>Tumores neuronais</u> (grau I a III)	

Quadro 1 - Classificação dos tumores cerebrais, segundo a OMS.

Fonte: Louis et al. (2007); Piepmeyer (2009).

GRAU I	PILOCÍTICO
GRAU II	DIFUSO OU FIBRILAR
GRAU III	ANAPLÁSICO
GRAU IV	GLIOBLASTOMA

Quadro 2 – Astrocitomas.

Fonte: Organização Mundial da Saúde (1993 apud NAKAZATO, 2008).

1.1.3 Aspectos clínicos

Considerando os dados epidemiológicos descritos acima, uma pessoa adulta, entre 45 e 60 anos de idade, com diagnóstico recente de tumor encefálico supratentorial, localizado no interior do lobo temporal ou frontal, deverá ser suspeita, até prova em contrário, de ser portadora de um **astrocitoma maligno**. A aparência característica pode ser vista no exame de TC, que revela lesão assestada no interior do cérebro, heterogênea, com realce irregular, mas intenso, após injeção de contraste endovenoso; a presença de efeito de massa, com distorção das estruturas neurais circunjacentes e desvio da linha média é muito característica (Imagem 1); o exame de RM complementa os achados acima, revelando com mais riqueza de detalhes a relação da lesão com as estruturas neurais e vasculares da vizinhança (Imagem 2). (ATLAS, 1990). A correlação desses achados com o exame histológico de amostra da lesão, obtida durante procedimento cirúrgico, (Imagem 3), mostrando aspectos típicos de malignidade em tumor astrocitário, em geral é suficiente para confirmar o diagnóstico, ainda que seja recomendada de rotina complementar a investigação com exame imunohistoquímico e molecular, com o intuito de caracterizar melhor a doença e fornecer informações relevantes, tanto para o programa terapêutico a ser instituído, quanto para a sobrevida e para o prognóstico.

Como regra geral, os gliomas permanecem confinados ao sistema nervoso central, isto é, encéfalo e medula espinhal, que são tecidos constituídos essencialmente por neurônios e células da glia. Astrocitomas medulares, como indicado, são pouco freqüentes e em geral possuem baixo grau de malignidade (ROONPRAPUNT et al., 2006), sendo raridade digna de nota a presença de astrocitoma maligno no interior desse órgão, assim como a ocorrência de

metástases regionais ou a distância representarem, da mesma forma, achados extremamente incomuns (MEDHKOUR et al., 2005; SAAD et al., 2007).

Nos adultos, os astrocitomas acometem com maior frequência (86%) a substância branca dos lobos cerebrais, localizada no espaço supratentorial. Em ordem de frequência, as estruturas mais acometidas no adulto são: lobo frontal (40 %), lobo temporal (29 %), parietal (14%), e occipital (3%); a seguir, acometem estruturas profundas, como tálamo, núcleos da base e cápsula interna (6,4%), cerebelo (1,5%), ventrículos (2 %), tronco cerebral (4,1%) (LARJAVAARA et al., 2007). Meninges, vasos, nervos cranianos não constituem sítios de acometimento, pois são destituídas de astrócitos. Ocasionalmente, pode ocorrer disseminação por contigüidade da neoplasia, através de vias, tratos e comissuras (D'HAENE et al., 2009). Nas crianças, tumores cerebrais representam a segunda causa de morte, perdendo somente para as leucemias. A maioria das neoplasias cerebrais em crianças é primária, e desses, os tumores de linhagem germinativa, de comportamento mais agressivo, são os que predominam. Como observado acima, os tumores cerebrais na infância surgem com maior frequência abaixo da tenda do cerebelo, na fossa posterior. Desses, os astrocitomas são responsáveis por até 40% dos tumores infratentoriais encontrado no segmento pediátrico, e o prognóstico dessas lesões costuma ser um pouco mais favorável do que aquele observado no adulto, considerando que, em sua maioria, se tratam de astrocitomas fibrilares do tipo pilocítico (grau I) ou difusos de baixo grau (grau II) (PFISTER et al., 2009).

1.1.3.1 Astrocitomas de baixo grau (grau I e II OMS)

Sintomas causados pela presença de um astrocitoma no interior do cérebro decorrem do crescimento progressivo, resultado da multiplicação celular desenfreada da massa e aumento de volume progressivo da mesma; quando contém 10^9 células, o tumor terá aproximadamente o peso de 1 grama, ocupando o volume de cerca de 1 mL, a partir do qual em geral já produz sintomas, podendo ser detectado pelos métodos diagnósticos disponíveis. O crescimento progressivo da massa ocupa um espaço, anteriormente inexistente, no interior de uma cavidade cujos limites são inelásticos: o crânio. O efeito expansivo da massa comprime e distorce os componentes intracranianos, i.e, encéfalo (que é uma substância gelatinosa coloidal), vasos sanguíneos e cavidades líquóricas (constituídos essencialmente por água) (NORDEN et al., 2006). Dessa forma, o crescimento tumoral se faz à custa da

compressão, distorção e redução volumétrica desses elementos, com deslocamento dos mesmos de encontro às estruturas intracranianas semi-rígidas e rígidas, como a dura-máter e a tábua óssea interna. Esse fenômeno acarreta aumento do gradiente de pressão existente entre os diferentes compartimentos localizados no interior do crânio, i.e, fossa anterior, média e posterior, separados pelas estruturas durais (foice do cérebro, tenda do cerebelo), levando a hipertensão intracraniana (LEE et al., 2008).

Sintomas que resultam do aumento da pressão no interior do crânio incluem, dentre outros, cefaléias persistentes, vômitos de repetição, sonolência, confusão mental, déficits sensitivo-motores, anormalidades visuais, disfunção de nervos cranianos e epilepsias (SCHANKIN et al., 2007).

Disfunções elétricas do cérebro devido tumores cerebrais representam uma causa significativa de epilepsia – não rara de difícil controle - em crianças e adultos jovens, e, em geral se associam com as lesões de crescimento lento, como ocorre nos astrocitomas de baixo grau, podendo ser também observadas nos astrocitomas de alto grau. Inicialmente, esses astrocitomas “benignos” não apresentam hipertensão intracraniana, e a manifestação neurológica predominante se faz por meio de crises epiléticas, as quais muitas das vezes podem ser controladas com o uso de anticonvulsivantes orais (RUBAN et al., 2009). As epilepsias associadas aos astrocitomas se manifestam mais comumente por crises convulsivas do tipo tônico-clônico generalizadas, crises generalizadas psíquicas (ausência), ou ainda crises parciais focais do tipo sensitivo-motoras (DUPONT, 2008). Em boa parte dos casos de astrocitomas de baixo grau, pode haver controle da epilepsia com uso de medicações orais, como difenilhidantoína e carbamazepina, pelo que alguns autores não preconizam intervenção cirúrgica nesses pacientes (POULSEN, 2006; GILBERT et al., 2007). Não obstante, faz-se necessário criterioso acompanhamento do enfermo, devendo o mesmo ser submetido a exames seriados de imagem – no mínimo, uma tomografia computadorizada a cada seis meses - para detectar transformações de forma e volume ou indícios de modificação anaplásica do tumor, já que os pacientes portando astrocitomas de baixo grau podem sofrer de hipertensão intracraniana devido o aumento progressivo do volume tumoral, mesmo na ausência de anaplasia, ou ainda experimentar transformação anaplásica do tumor para alto grau, o que usualmente ocorre após um intervalo médio de 4-5 anos (MCCORMACK et al., 1992).

Uma vez que ocorre transformação maligna da neoplasia, é comum surgirem sintomas decorrentes da elevação da pressão intracraniana, pelo que o enfermo deverá ser submetido a imediata intervenção cirúrgica para redução da massa, diagnóstico histológico e restauração da pressão intracraniana (SINGHI, 2009).

Na classificação preconizada pela OMS, revista em 2008 (NAKAZATO, 2008), os astrocitomas considerados “benignos” são agrupados de acordo com os achados histológicos, com os graus 1 e 2 correspondendo a lesões consideradas “benignas”, de baixo grau, sem a presença de evidências histológicas de malignidade, com número de células levemente aumentado em relação ao cérebro normal, com predomínio de fibras e citoplasma alongados, raras figuras de mitose e comportamento biológico estável ao longo do tempo; o **Astrocitoma pilocítico** representa o grau I da OMS, sendo uma variedade encontrada com frequência entre fibras da substância branca de vias neurais (ex. cerebello, diencéfalo, trato e nervo óptico); ao exame de tomografia computadorizada (Imagem 1a.), observa-se imagem hipodensa, tipicamente arredondada ou oval, bordas bem delimitadas, com realce à injeção de contraste, e formação cística com a presença de nódulo mural que sofre intensa captação de contraste. O exame de RM mostra com mais detalhes as alterações encontradas no exame de TC (Imagem 1b.).

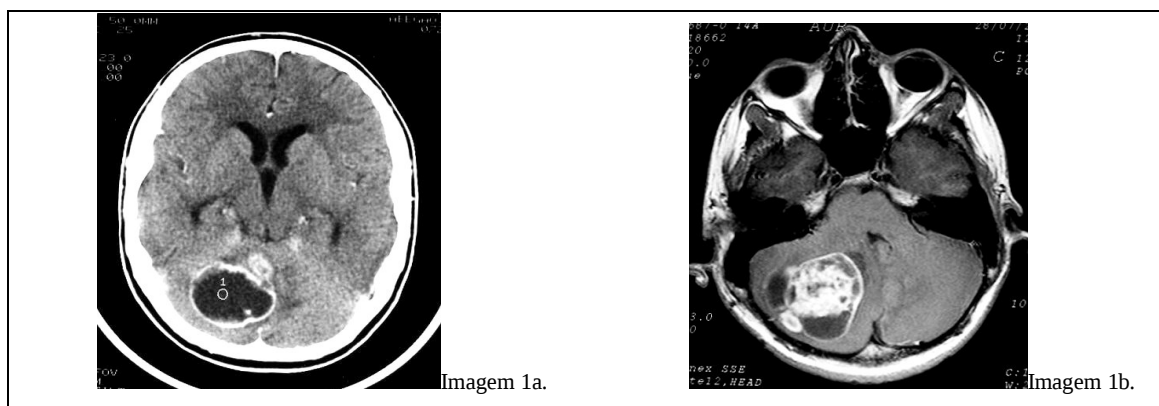


Imagem 1 - Diagnóstico por Imagem (TC/RM) de astrocitoma pilocítico do cerebello:

1a.: TC de crânio demonstrando astrocitoma pilocítico do cerebello,

1b.: RM de crânio demonstrando astrocitoma pilocítico do cerebello.

Fonte: Universidade Estadual de Campinas, 2009.

O exame histológico dessas lesões habitualmente revela células neoplásicas com aspecto regular, núcleos regulares e fibras alongadas, com pouca variação de volume e cromatismo, com a cromatina bem distribuída, não se encontrando mitoses nem proliferação vascular (Imagem 2a), encontrando-se ainda corpúsculos alongados e hialinos, fortemente eosinófilos, típicos dessa variante, conhecidos como **Fibras de Rosenthal**, que são constituídas por proteína α -B cristalina (Imagem 2b).

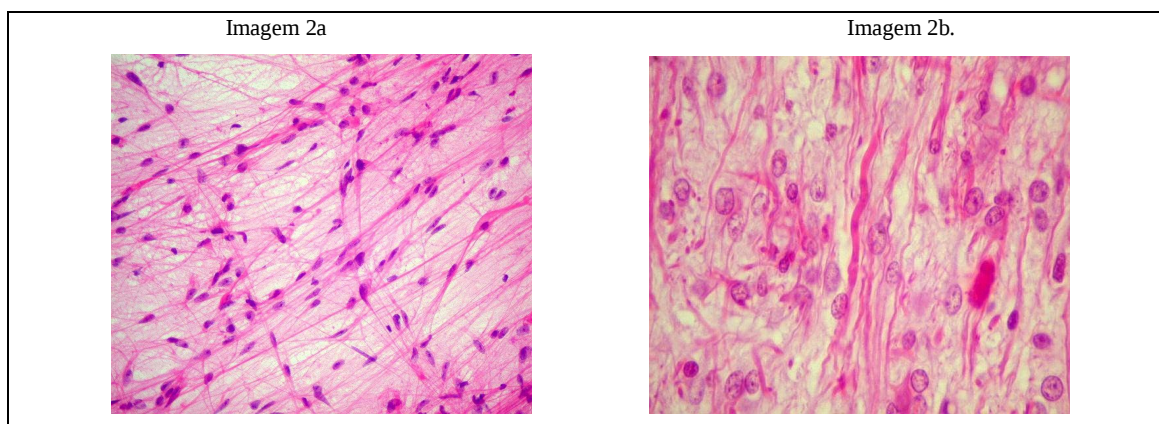


Imagem 2 - Diagnóstico histológico (Hematoxilina-eosina) de astrocitoma pilocítico do cerebello:

2a.- Fibras alongadas e núcleos regulares de astrocitoma pilocítico do cerebello,

2b.- Fibras de Rosenthal em astrocitoma pilocítico de cerebello.

Fonte: Universidade Estadual de Campinas, 2009.

Astrocitoma ditos *difusos* representam os demais graus previstos na classificação da OMS (grau II a IV). No caso dos astrocitomas de baixo grau, o *Astrocitoma fibrilar* representa o grau II das neoplasias gliais portando baixo número de células (astrócitos fibrilares), onde tipicamente se encontram núcleos pequenos em contraste com nucléolos proeminentes, podendo ser encontradas (escassas) atípicas (Imagem 3a-d).

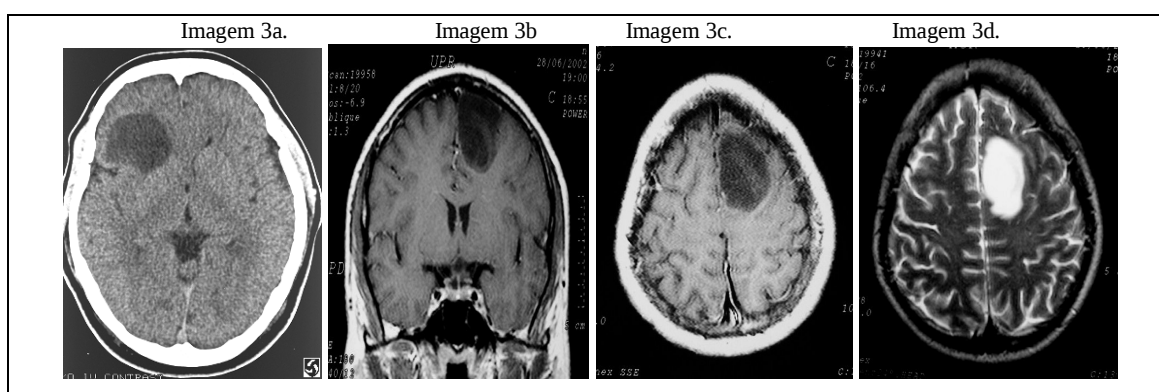


Imagem 3 - Diagnóstico por imagem (TC/RM) de astrocitoma fibrilar do lobo frontal:

3a: TC de crânio de astrocitoma fibrilar em lobo frontal,

3b, 3c, 3d: RM de crânio de astrocitoma fibrilar em lobo frontal,

3b: T1 coronal, ausência de efeito de massa,

3c: axial T1, sem realce após injeção do contraste (gadolinio),

3d: axial T2, ausência de edema perilesional.

Fonte: Universidade Estadual de Campinas, 2009.

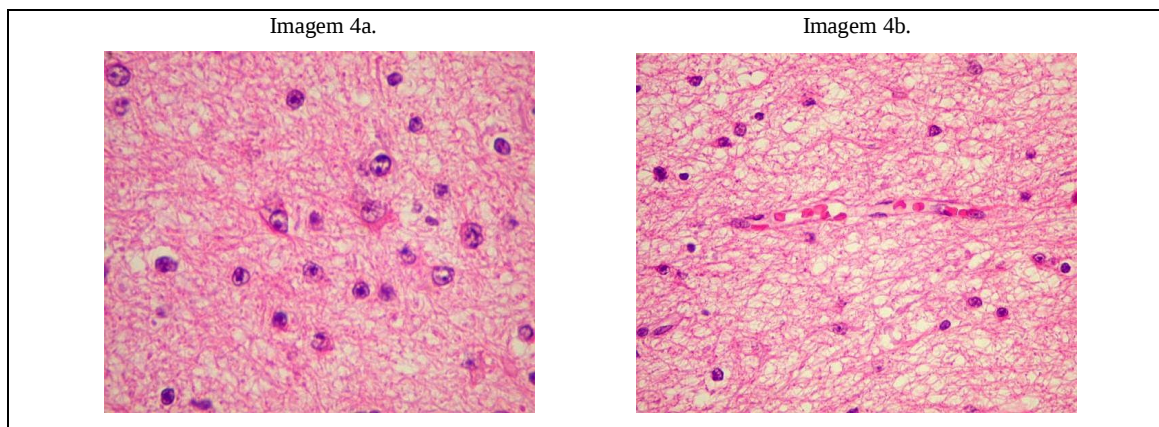


Imagem 4 - Diagnóstico histológico (Hematoxilina-eosina) de astrocitoma fibrilar:

4a:baixa celularidade, núcleos pequenos e escassas atipias em fundo fibrilar,

4b: capilares normais, ausência de proliferação endotelial vascular.

Fonte: Universidade Estadual de Campinas, 2009.

1.1.3.2 Astrocitomas de alto grau (grau III e IV OMS): astrocitomas malignos

No outro extremo do espectro das neoplasias astrocitárias, localizam-se as lesões de apresentação aguda, que se manifestam logo no início por hipertensão intracraniana descompensada ou por quadros neurológicos onde a deterioração clínica é rapidamente progressiva. Representam as neoplasias cerebrais mais prevalentes do adulto – aproximadamente 59% de todos os tumores do adulto são astrocitomas de alto grau, (graus III e IV OMS), representados, respectivamente, pelo **astrocitoma anaplásico** – responsável por cerca de 8% dos tumores primários do cérebro adulto - e pelo mais freqüente tumor cerebral do adulto (51%), o maligno e incurável **GBM** (IDOWU, 2008; BAUCHET, 2009). Logo que surgem os primeiros sintomas, podem ser prontamente detectados pelo exame de TC do crânio (Imagem 5), e por meio de RM (Imagem 6a - c), que demonstram a presença de formação expansiva heterogênea, limites poucos precisos, captação intensa e irregular de contraste endovenoso, deslocando estruturas e levando a desvios da linha média com herniação do giro do cíngulo e, caracteristicamente, grande quantidade de edema perilesional (NISHI et al., 2009).



Imagem 5 - Tomografia computadorizada de GBM fronto-temporal

Fonte: Universidade Estadual de Campinas, 2009.

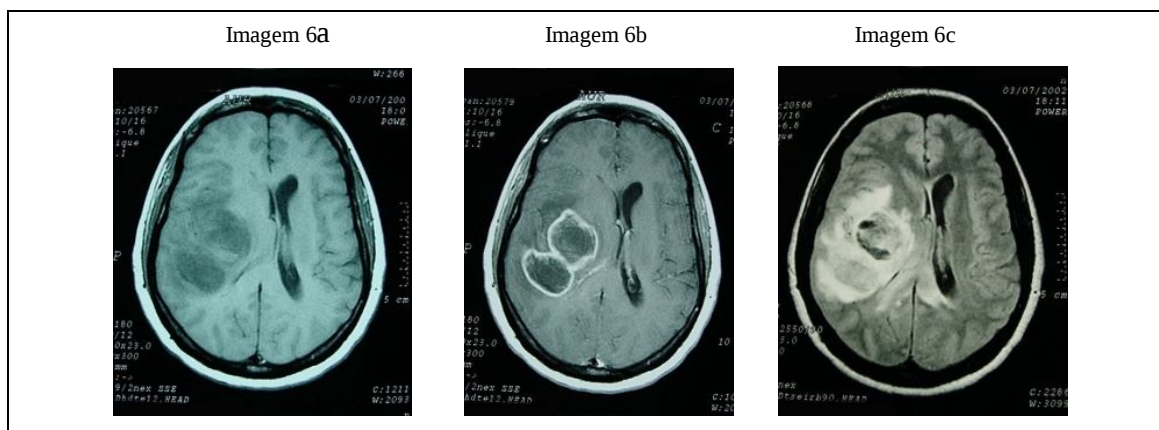


Imagem 6 - Ressonância Magnética de GBM fronto-temporal:

6a: T1 sem contraste, lesão heterogênea hipointensa,

6b: T1 com contraste, realce periférico e necrose central,

6c: T2 significativo edema perilesional; herniação do cíngulo.

Fonte: Universidade Estadual de Campinas, 2009.

Histologicamente, tanto o grau III quanto o GBM se caracterizam por conter em seu interior concentração de células muito superior à do tecido nervoso normal, constituídas por astrócitos atípicos com núcleos hiper cromáticos, pleomorfismo (variação de forma e tamanho), perda da relação núcleo-citoplasma, proliferação vascular (neoformação endotelial), sinais de invasão cerebral (padrão infiltrativo) e, no caso do GBM, necrose

(Imagem 7). O achado de vasos anômalos no leito tumoral e em suas imediações ocorre devido indução da proliferação vascular, criando vasos com função alterada, de paredes espessas (devido ao maior número de células endoteliais), criando o aspecto glomerulóide (*pseudoglomérulos*). O principal achado que diferencia o grau III do GBM é a presença de necrose, ausente no primeiro. A trombose de pequenos vasos leva a áreas de necrose coagulativa com contornos geográficos e adensamento dos núcleos na periferia, conhecidas como necrose em '*pseudopaliçada*', que são características do GBM (Imagem 7a-d).

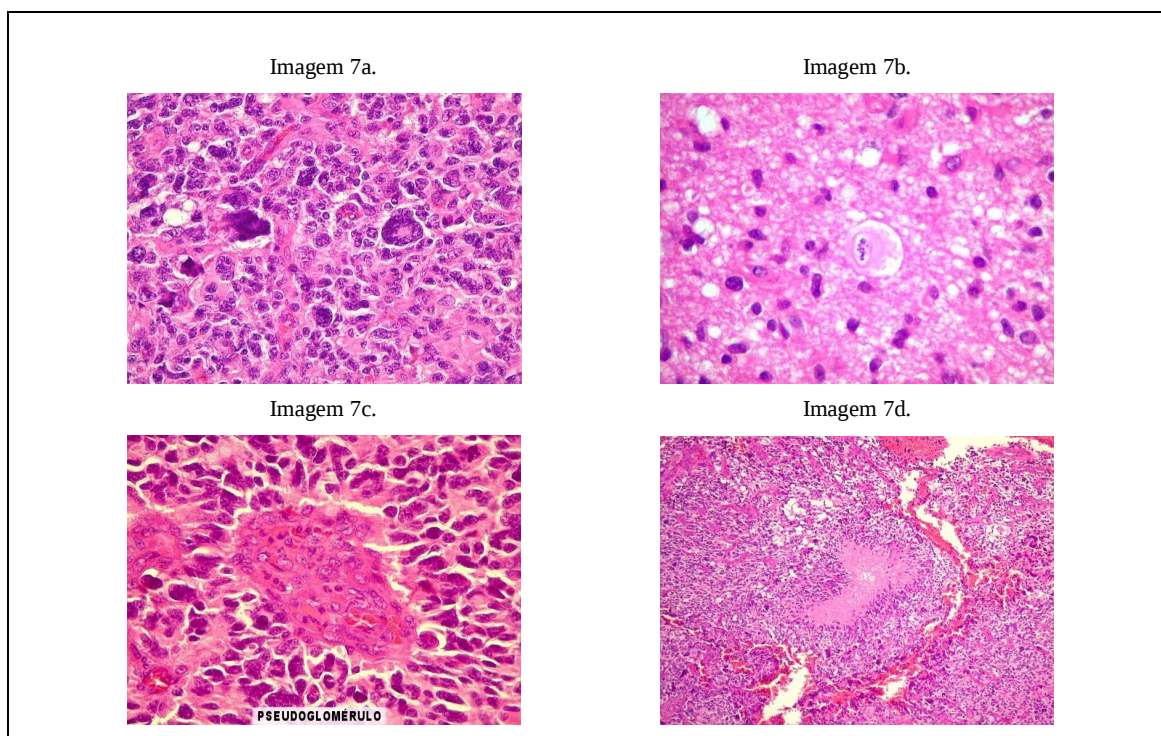


Imagem 7 - Diagnóstico histológico (Hematoxilina-eosina) de GBM:

- 7a: Hipercelularidade e pleomorfismo celular,
- 7b: Mitose,
- 7c: Proliferação endotelial (pseudoglomérulos),
- 7d: Necrose em pseudopaliçada.

Fonte: Universidade Estadual de Campinas, 2009.

A presença de edema é quase que universal nos astrocitomas malignos. O tipo de edema encontrado na substância branca circunjacente aos gliomas é vasogênico, isto é, devido a disfunção do endotélio dos capilares recentemente formados. Para sustentar seu crescimento acelerado, o tumor necessita continuamente de aporte de metabólitos, estimulando a formação de novos vasos sanguíneos por meio de um processo secretório que envolve a presença do **Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF)**. Essa substância provoca a formação de vasos sanguíneos para nutrir o próprio tumor. Entretanto, esses vasos neoformados possuem

estrutura e função anormal, permitindo extravasamento de fluído para o cérebro, o que explica a usual associação dos astrocitomas com esse fenómeno (JAIN et al., 2007). A descoberta do importante papel do VEGF na seleção de células cancerígenas, crescimento e manutenção do microambiente dos gliomas levou a utilização de substâncias bloqueadoras do VEGF, como estratégia no tratamento adjuvante do câncer cerebral (MILETIC et al., 2009). Ainda, a presença do edema é um fator agravante, pois agrava a hipertensão intracraniana e piora o quadro de disfunção neural, contribuindo também para o surgimento de sintomas, como cefaléia persistente, vômitos de repetição, e também de sintomas focais, como diplopia, déficit motor, confusão mental (PAPADOPOULOS et al., 2001).

Os astrocitomas malignos representam uma urgência neurocirúrgica, fundamentalmente pelo quadro de hipertensão intracraniana, que acarretam iminente risco de morte. O tratamento cirúrgico se presta para controlar a pressão intracraniana, fornecer diagnóstico histológico e realizar redução volumétrica. O diagnóstico precoce e remoção tumoral propiciam também um efeito mais eficaz da terapia adjuvante (químico e radioterapia) (PATCHELL et al., 1997). O comportamento biológico agressivo e resistente à terapêutica situa os astrocitomas malignos como a quarta causa de morte por câncer no adulto, e somente uma pequena fração de pacientes portando gliomas malignos sobrevive por mais de 36 meses. A análise desses pacientes com sobrevivência prolongada encontrou alguns fatores implicados com um prognóstico mais favorável: idade mais jovem e boa performance clínica (escala de Karnofsky) no momento do diagnóstico (KREX et al., 2007). Como alguns pacientes com o mesmo diagnóstico histológico possuem tempo variável de sobrevida, tem-se procurado detectar marcadores prognósticos, para, dessa forma, prever o comportamento e a resposta ao tratamento de cada tumor em particular (FRENEL et al., 2009). Para pacientes com gliomas de baixo-grau, o tipo histológico, o volume tumoral, a idade e a performance clínica na escala de Karnofsky são todos fatores prognósticos da evolução do paciente. Nos casos de astrocitomas de alto grau, a descoberta de marcadores moleculares trouxe ainda dados adicionais capazes de prever resposta terapêutica. Assim, como no caso dos oligodendrogliomas, a perda combinada *1p* e *19q* está fortemente correlacionada com o fenótipo de um oligodendroglioma anaplásico (grau III), estando associada tanto com melhor resposta terapêutica quanto com sobrevida mais prolongada nesses casos; no caso dos GBMs, além dos mesmos critérios prognósticos utilizados para astrocitomas de baixo grau, tem-se empregado também marcadores moleculares, como a co-expressão do receptor mutante de Receptor do Fator de Crescimento Epitelial (EGFR) do subtipo EGFRvIII e o estado de metilação do gene O-6-metilguanina-metiltransferase (MGMT).MINEO et al., 2007).

1.1.4 Cirurgia

A ressecção cirúrgica continua sendo a terapia isolada mais importante no tratamento dos gliomas. A presença de sinais de hipertensão intracraniana associada a um processo expansivo intracraniano requer pronta intervenção cirúrgica, com objetivo de restaurar o gradiente de pressão no interior do crânio, encaminhar amostra para análise e histopatologia e reduzir o volume da lesão, removendo a maior quantidade possível de tecido neoplásico para propiciar, assim, um melhor efeito da terapêutica adjuvante com radio e quimioterapia pós-operatória (OLSON et al., 2009). Porém, a infiltração no interior da substância branca, a ausência de interfaces e de limites precisos entre neoplasia e cérebro circunjacente, impedem a remoção completa das lesões, mesmo contando com modernos recursos, como coagulador bipolar, aspirador ultrassônico, microscópio, neuronavegador e mais recentemente o uso pré-operatório do **ácido aminolevulínico fluorescente (5-ALA)**, método em que, após injeção endovenosa da substância, as células do tumor são coradas, o que permite melhor visualização e distinção da neoplasia do cérebro normal, e conseqüente retirada segura do tumor pelo cirurgião (GAUTSCHI et al., 2009; SIMON et al., 2009).

1.1.5 Radioterapia

Trabalhos realizados na década de 80 revelaram o comportamento biológico do GBM, fornecendo dados que possibilitaram a normatização do tratamento desse câncer, com poucas modificações ao longo dos anos, sendo válida nos dias de hoje. O esquema clássico de tratamento inclui, além da cirurgia, mais duas modalidades de tratamentos auxiliares ou adjuvantes: a RT e a QT (LAIGLE-DONADEY et al., 2009). Trabalhos randomizados duplo-cego em grupos de enfermos com neoplasias gliais malignas demonstraram que a radioterapia, administrada no leito tumoral, praticamente duplica a expectativa de vida de uma pessoa submetida a tratamento cirúrgico por GBM, sendo, por isso, considerada como o tratamento adjuvante isolado mais eficaz no combate aos tumores cerebrais primitivos (WALKER et al., 1980). Essa constatação levou a um esforço concentrado para melhorar a eficácia dos agentes

citotóxicos, procurando reduzir efeitos adversos observados pela administração dos mesmos. As principais modificações incluíram otimização da dose total, modificação do fracionamento e uso de diferentes partículas energéticas. Um dos efeitos observados, que levaram a significativa melhora do método, foi o fato de que, apesar do aumento da radiação acima de 5.000 cGy prolongar a sobrevivência a curto prazo (por incrementar o número de pacientes que sobrevivem ao primeiro ano após a cirurgia), a sobrevida média em dois anos não se alterava (FULTON et al., 1992). De forma semelhante, acelerar ou hiperfracionar as doses não oferece vantagem em termos de sobrevivência sobre o regime convencional de 6.000 cGy, administrados em 30 sessões durante 6 semanas (NELSON et al., 1988).

Além disso, a natureza infiltrativa do GBM induziu à idéia da necessidade de irradiação de todo o cérebro. Esse método, além de ocasionar importante deterioração cognitiva, desconsiderou a evidência de que 90% das recidivas tumorais ocorrem somente nas margens ou nas proximidades da localização inicial do tumor (HOCHBERG et al., 1980). Essa evidência, comprovada com a evolução dos métodos de diagnóstico por imagem, levou centros especializados no tratamento dessas neoplasias a reduzir os campos de radiação, focando a radiação ao leito tumoral, com uma margem de 2-3 cm ao redor do cérebro aparentemente normal. Uma evolução a mais ocorreu com a aquisição de métodos estereotáxicos, desenvolvendo a radioterapia tridimensional dita “conformacional”, por se adequar com mais precisão às características espaciais da tumoração no interior do cérebro (MCDERMOTT et al., 2004). Essa modalidade de radioterapia direciona os fótons de acordo com a configuração tridimensional do tumor, que, quase sempre, é irregular. Adicionalmente, o emprego de aparelhos mais modernos, portando colimadores multi-laminares, variando a intensidade da dose em cada campo de tratamento e a administração de uma dose mais homogênea dos fótons em todo o leito tumoral manteve a taxa de sobrevida esperada, minimizando os efeitos colaterais indesejáveis, levando ao conceito de “sobrevida com qualidade” na terapia do enfermo com tumores cerebrais malignos.

Além da radioterapia externa descrita acima, alguns autores sugerem que a **braquiterapia**, com implante de sementes radioativas contendo ^{192}Ir ou ^{125}I no leito tumoral, ofereça algumas vantagens na sobrevida, em particular nos casos de recorrência do processo neoplásico. Mesmo com todos esses avanços, o principal fator limitante permanece sendo a escassa margem entre o efeito terapêutico e a toxicidade local (KOOT et al., 2000).

1.1.6 Quimioterapia

A real eficácia prática da quimioterapia sistêmica no combate ao GBM ainda permanece controversa, pois os resultados de ensaios clínicos randomizados demonstram diferenças de pouca significância entre os dois grupos (SPIEGEL, 2007). A maioria dos estudos relata uma taxa de resposta média variando entre 5-15% de eficácia. Apesar disso, um estudo de meta-análise incluindo 12 ensaios clínicos contendo cerca de 3.000 pacientes foi claramente favorável ao emprego da quimioterapia sistêmica no combate ao GBM (STEWART, 2002). Logo, a despeito desses resultados conflitantes, a quimioterapia sistêmica faz parte da rotina de tratamento dos pacientes submetidos a intervenção cirúrgica para redução dos astrocitomas malignos na quase totalidade dos serviços (SEE et al., 2007). Nos últimos anos foi desenvolvido um agente alquilante de segunda geração para uso oral, a Temozolamida®, cuja utilização em conjunto com a cirurgia e radioterapia revela um aumento estatisticamente significativo da sobrevida estimada (HART et al., 2008). Buscando entender melhor o comportamento clínico diverso, observado nos astrocitomas malignos com histologia semelhante, pesquisadores investigaram a cinética de crescimento celular e a atividade proliferativa presente nesses tumores; um dos primeiros resultados foi a descoberta de um anticorpo monoclonal da classe IgG1, que reconhece um antígeno nuclear, presente em células com atividade proliferativa, ausente nas células em estado de quiescência ou repouso, conhecido como **Ki-67**. A identificação do Ki-67 em cortes histológicos corados em parafina é possível com a utilização de um outro anticorpo, o **MIB-1**. Esse método é conhecido como **índice de proliferação Ki-67/MIB-1 (MIB-1 Li)**. Apesar de não diferenciar o astrocitoma anaplásico (grau III) do GBM (grau IV), consegue fazer uma distinção apropriada entre o astrocitoma difuso grau II de um AA (grau III) e/ou GBM (grau IV) (JOHANNENSSSEN et al., 2006). Um dos fatores limitantes da sobrevida dos pacientes é o caráter infiltrativo da neoplasia, o que faz com que o tratamento cirúrgico – por mais agressivo que seja – sempre deixe restos celulares nas margens da ressecção. Essas células serão responsáveis pelo recrescimento e recorrência do tumor, utilizando um sistema autócrino de sinalização que emprega fatores de invasão secretados pelas próprias células cancerígenas, como por exemplo, o **fator de crescimento e transformação-alfa (TGF- α)** (HOELZINGER et al., 2007). Outro fator, não menos importante, que influencia para o mau prognóstico dessas lesões, é a resistência adquirida das células neoplásicas aos agentes citotóxicos (MOUSSEAU, 1994). Os agentes alquilantes, incluindo as cloroetilnitrosurêias (carmustina

[BCNU], lomustina) e procarbazona são os quimioterápicos com melhor ação sobre os gliomas malignos. Esses agentes causam dano ao DNA pela adição de grupos **alquil** ao DNA, desencadeando os mecanismos de reparo do DNA, e induzindo, dessa forma, a apoptose (HEGI et al., 2008).

O principal mecanismo conhecido de resistência dos gliomas aos agentes quimioterápicos se deve a presença de uma enzima reparadora do DNA, a **O⁶-metil-guanina-metil-transferase (MGMT)**. O gene MGMT, se localiza no **cromossomo 10**, e codifica uma proteína capaz de reverter prontamente o estado de alquilação (e metilação) do DNA, induzida pelos quimioterápicos, neutralizando, desse modo o efeito citotóxico esperado. Níveis elevados de atividade do MGMT no tumor estão associados a uma maior resistência aos agentes alquilantes. Em contraste, o silêncio epigenético do gene MGMT em promover metilação resulta em decréscimo do mesmo nas células tumorais, conferindo uma melhor resposta ao tratamento. Esse efeito “protetor” da atividade do MGMT contra o efeito tóxico dos agentes alquilantes vem sendo demonstrado em vários estudos, e fornece um dado importante para o prognóstico (FRIEDMAN, 1998). Aproximadamente a metade dos pacientes com GBM são portadores de silêncio transcripcional desse gene promotor de hipermetilação, que incapacita as células neoplásicas reparar o dano ao DNA acarretado pelo uso das drogas citotóxicas (MELLAI et al., 2009). Assim, o estado de metilação do gene MGMT se constitui, atualmente como o único marcador molecular identificado com possível significado clínico (SONODA et al., 2009).

Recentes investigações acrescentaram evidências da existência de pelo menos três subclasses biomoleculares distintas de astrocitomas de alto-grau: **subtipo PN (proneural)**, **PRLF (proliferativo)** e **MES (mesenquimal)**; o subtipo MES tem sido associado com pior prognóstico, sendo encontrado com frequência em casos de recorrência precoce do tumor (PHILLIPS et al., 2006).

Aproximadamente 12% dos Glioblastomas são portadores de mutações no gene que codifica a Desidrogenase do Isocitrato (IDH1), uma enzima que participa do ciclo do ácido cítrico (PARSONS et al., 2008). Uma análise mais detalhada revelou que essa mutação surge precocemente na formação dos astrocitomas de baixo grau (88%), nos astrocitomas anaplásicos (82%), assim como em oligodendrogliomas (79%) e oligoastrocitomas (94%), sendo menos freqüente em astrocitomas pilocíticos (10%) e glioblastomas primários (5%), além de estar ausente em ependimomas. Esses achados reforçam o conceito de que, apesar das semelhanças histológicas, esses subtipos de neoplasias são entidades distintas do ponto de vista genético e clínico (WATANABE et al., 2009).

1.2 NEUROGÊNESE DOS GLIOMAS

1.2.1 Neurônios

Os **Neurônios** (Imagem 8) são os elementos computacionais do cérebro; células altamente diferenciadas e especializadas no processamento e transmissão de sinais elétricos, que constantemente induzem e modulam mensagens químicas, cujo produto final poderá ser um pensamento ou um ato motor. Possuem corpo (soma), cujo tamanho varia de 4 a 100 micrômetros de diâmetro, contendo o núcleo (3-18 micrômetros de diâmetro), onde se processam a síntese protéica e vários dendritos, responsáveis pela recepção de estímulos provenientes de outras células. O axônio, uma estrutura alongada, responsável pela retransmissão de informações, possui na sua extremidade inúmeras vesículas sinápticas que contém neurotransmissores, as substâncias que ao serem liberadas darão continuidade ao impulso ou efetuam a reação final no órgão ou músculo alvo. (MILLER,1984).

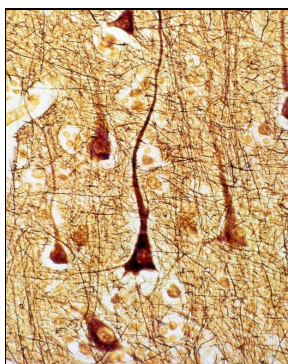


Imagem 8 - Neurônios

Fonte: Universidade Estadual de Campinas, 2009.

Estima-se que o cérebro humano possua ao redor de 100 bilhões (10^{11}) de neurônios (WILLIAMS et al., 1988), apesar de estudos empregando contagem estereológica de células demonstrarem a existência de um número um pouco menor: 86 bilhões, 16,3% dos quais estão localizados no córtex cerebral e 69% no cerebelo; há uma quantidade desigual de células gliais e de neurônios: 84,6 bilhões de células da glia para 86,1 bilhões de neurônios,

números que se mantêm aparentemente inalterados ao longo da vida do indivíduo (LARSEN et al., 2006). A relação glia/neurônios no córtex cerebral é de 3,72 (60,84 bilhões glia, 16,34 bilhões de neurônios), no cerebelo 0,23 (16,04 bilhões células da glia; 69,03 bilhões de neurônios), e na substância cinzenta do córtex cerebral 1,48 (a substância branca é constituída essencialmente de prolongamentos e fibras, e possui poucos neurônios). A relação combinada glia & neurônios nos gânglios da base, diencéfalo e tronco cerebral é de 11,35 (AZEVEDO et al., 2009). Como o cérebro requer uma rede estável de neurônios ao longo da existência do indivíduo, admite-se que os mesmos não sofram divisão celular após a maturação, ou ainda, processos de divisão que levem a multiplicação celular. Apesar disso, existem pelo menos duas regiões específicas do cérebro onde novos neurônios nascem continuamente durante a vida adulta: a **zona subventricular (SVZ - Subventricular Zone)**, uma região limítrofe aos ventrículos laterais, onde células recentemente formadas migram para o bulbo do nervo olfatório através de uma via migratória própria (**Via migratória rostral**), que conecta essas duas estruturas e a **zona subgranular (SGZ - Subgranular Zone)**, parte do giro dentado da formação hipocampal (GHASHGHAIE et al., 2007). Muitas dessas células morrem imediatamente após serem geradas, mas um número significativo das mesmas sobrevive e se torna funcionalmente integrada ao tecido cerebral circunjacente ao bulbo olfatório e hipocampo.

Ainda que reconhecessem o potencial patológico das células da glia, anatomistas e histologistas como Rudolf Virchow, Santiago Ramón y Cajal e Pio Del Rio-Ortega consideravam o sistema nervoso incapaz de regenerar, e esse conceito permaneceu inalterado até a década de 70, quando surgiram evidências de neurogenese pós-natal no núcleo caudato e núcleo accumbens de ratos (ALTMAN et al., 1970). Nas décadas seguintes, esses resultados não só foram confirmados como também foram realizadas descobertas adicionais, confirmando assim a existência de neurogênese pós-embrionária em mamíferos roedores. (KAPLAN, 1981). Mais recentemente, foram encontradas também evidências de atividade neurogênica em neurônios do cerebelo de coelhos adultos (PONTY et al., 2008), medula espinhal e córtex cerebral, sendo essa notável capacidade das células neuronais, um fato bem estabelecido na literatura atual. (GOMES-LEAL, 2009).

Apesar de todas essas evidências de multiplicação neuronal após a infância, as neoplasias cerebrais oriundas de neurônios são muito pouco frequentes, e somente 1% de todos os tumores cerebrais de adultos contém elementos neuronais. Essa classe de tumor costuma ter um prognóstico um pouco mais favorável que aquele observado nos tumores de linhagem glial (NAIR et al., 2004). Do ponto de vista histológico, essas neoplasias originadas

a partir de neurônios são agrupadas em duas classes: **tumores neuronais puros** – representados por gangliocitomas (Imagem 9), doença de Lhermitte-Duclos [gangliocitoma cerebelar displásico], neurocitoma central e **tumores neuronais mistos, ou neuronais-gliais** (ganglioglioma, ganglioglioma desmoplásico infantil, tumores neuronais disemбриoblásticos (DNETs), ganglioneuromas) (Carrasco-González et al., 2008). Comumente são tumores de crescimento lento, acometendo lobo temporal e que se manifestam na adolescência através de crises epiléticas (FRANKS et al., 1997).

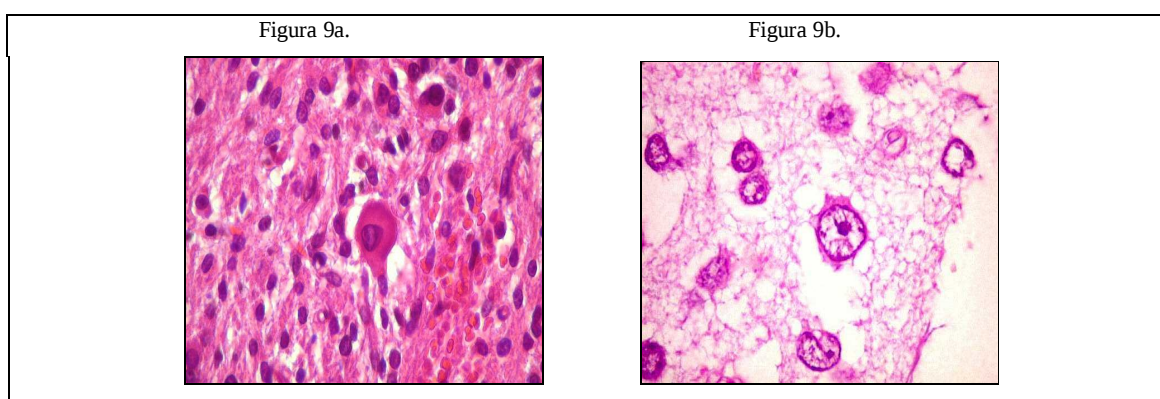


Imagem 9 - Tumores neuronais:

9a.: gangliocitomas,

9b.: DNET.

Fonte: Universidade Estadual de Campinas, 2009.

1.2.2 Astrócitos

A maior parte das células gliais localizadas no neocórtex cerebral é constituída por oligodendrócitos (75,6%), seguida por astrócitos (17,3%) e por microglia (6,5%) (PELVIG et al., 2008). Admite-se que os astrócitos (Imagem 10) superem em número os neurônios, em uma proporção de 10:1, ocupando cerca de 40% do volume total do cérebro (O'KUSKY et al., 1982). Estas células representam um grupo de células heterogêneas, mas que podem ser identificadas histologicamente por expressar um filamento intermediário, a **proteína ácida fibrilar glial (GFAP)**, uma proteína tipo III IF, cujo gene está presente no **cromossomo 17q21**. A **GFAP** se relaciona com a resistência e a forma das células, além de participar do processo de divisão celular (TARDY et al., 1990). Há 03 tipos de astrócitos, similares em função, mas distintos em morfologia e distribuição. **Astrócitos protoplasmáticos** possuem prolongamentos ramificados e curtos, espessos, localizam-se em maior número na substância cinzenta; **Astrócitos fibrosos**, com prolongamentos longos e

finos, predominantes na substância branca e **astrócitos radiais**, residentes na retina e cerebelo (OBERHEIM et al., 2009). Além dessas diferenças morfológicas e de distribuição territorial, diferem também por suas propriedades fisiológicas: potencial de membrana, condutância ao potássio, transporte de glutamato, expressão de receptores e de proteínas, e imunorreatividade para GFAP. Em comum, possuem um importante papel na regulação do microambiente químico ao redor dos neurônios, removendo excesso de íons – principalmente o íon potássio – e reciclando neurotransmissores liberados durante a transmissão sináptica. A junção dos astrócitos com os capilares cerebrais representam o fundamento anatômico da barreira hemato-encefálica, permitindo a regulação do tônus da camada muscular dos vasos e alterando o diâmetro do capilar cerebral, levando a vasoconstrição ou vasodilatação e, alteração do fluxo sanguíneo cerebral (HAWKINS, 2005). Os astrócitos sinalizam entre si por meio da liberação de cálcio. Sinapses elétricas (“junções gap”) entre as mesmas permitem que o segundo mensageiro **inositol 1,4,5 trifosfato (IP3)** seja difundido de um astrócito para outro, ativando os canais de cálcio existentes em organelas intracelulares, liberando esse íon para o citoplasma, onde estimula a produção de mais IP3, promovendo uma “onda de cálcio” que se propaga de célula para célula, cujo resultado final será uma resposta tissular mediada pela **Adenosina trifosfato (ATP)**, e conseqüente ativação de receptores purinérgicos, localizados na membrana dos próprios astrócitos. (SIMARD et al., 2003). Outra característica funcional relevante dos astrócitos é que o glicogênio (a forma de armazenamento da glicose), maior fonte de energia utilizada pelo cérebro, está quase que exclusivamente localizado no interior dos astrócitos (MAGISTRETTI, 2006).

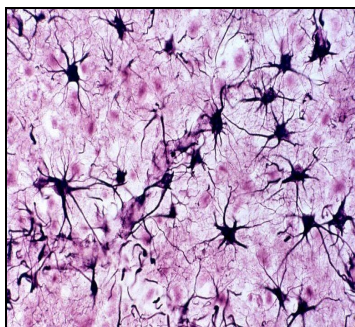


Imagem 10 - Astrócitos

Fonte: Universidade Estadual de Campinas, 2009.

As células responsáveis pela origem e desenvolvimento dos astrocitomas ainda não estão perfeitamente identificadas, mas evidências indicam sua origem a partir de células-tronco precursoras dos astrócitos (HOLLAND et al., 2000). Estudos realizados nas últimas

décadas reforçam a idéia de que os astrocitomas humanos são compostos por uma coleção de células capazes de alterar o potencial de início do tumor (ZAIDI et al., 2009). Somente um determinado grupo dessas células, partilhando características em comum e isoladas de vários tipos de tumores sólidos, possuem a habilidade de iniciar a formação dos tumores (AL-HAJJ et al., 2003; RICCI-VITIANI et al., 2007). Essa coleção distinta de células é conhecida como Células-tronco de tumores cerebrais, ou **BTSC**, do inglês **Brain Tumor Stem Cells**. Quando implantada em cobaias, as mesmas possuem habilidade para iniciar a progressão de tumores cerebrais primários (IGNATOVA et al., 2002). Alguns autores sugerem que as células BTSC se originem a partir de mutações que ocorrem em células-tronco progenitoras neurais (**NPSC - Neural Progenitor Stem Cell**) (SANAI et al., 2005). A origem controversa das **BTSC** admite pelo menos três teorias sobre o surgimento das mesmas: (1) mutações adquiridas em células gliais maduras induziriam um comportamento de células-tronco com propriedades patológicas, (2) mutações adquiridas em progenitores neurais, que normalmente se diferenciam terminalmente após sucessivas divisões, levariam a um comportamento de células-tronco com propriedades igualmente patológicas e (3) mutações adquiridas em células **NPSCs** adultas, que normalmente possuem regulações internas de divisão e proliferação, induziriam, da mesma forma, a um comportamento de células-tronco com propriedades tumorigênicas. (ZAIDI, 2009). Independente da origem, as células **BTSC** se distinguem das demais por exibirem algumas propriedades tradicionais de células-tronco neurais, como habilidade para se renovar em longos períodos de tempo, capacidade de transformação multipotencial (em neurônios, em astroglia), além de gerar tumores cerebrais com invasão e padrão histológico semelhante ao tumor original, quando adicionadas a ratos imunocomprometidos (GALLI et al., 2004). Além do mais, tudo indica que as **BTSC** sejam responsáveis também pelo comportamento altamente invasivo, pela resistência a radioterapia e aos agentes citotóxicos utilizados no tratamento adjuvante, além da capacidade de migração a longas distâncias, propriedade muito encontrada na maioria dos tumores cerebrais humanos primários de natureza maligna (XIE et al., 2008). Como descrito acima, essas células progenitoras, no cérebro adulto de mamíferos, estão presentes em dois sítios germinativos: a **SGZ**, localizada no giro denteado do hipocampo e ao longo das paredes dos ventrículos laterais, a **SVZ** (JACKSON et al., 2008). Estudos demonstram que células-tronco encontradas na **SVZ** em adultos derivam da glia radial, as células tronco presentes no cérebro em desenvolvimento, que são derivadas, por sua vez, do neuroepitélio primitivo (MERKLE et al., 2004). No mamífero desenvolvido, novos neurônios são continuamente formados na camada endimária (ou germinativa) localizada nas margens dos ventrículos laterais, e migram

anteriormente para o bulbo olfatório (BO), onde se diferenciam em interneurônios locais, pelo que a **SVZ** é um reservatório significativo de células progenitoras neurais do adulto (MENEZES et al., 2002).

A zona endimária da **SVZ** contém pelo menos quatro tipos distintos de células: neurônios jovens (neuroblastos) que migram para outras regiões do cérebro (tipo A), um tipo especial de glia radial, células pouco ramificadas semelhantes a astrócitos (tipo B), células esféricas e altamente proliferativas (tipo C) e uma camada de células endimárias, contendo longos cílios (tipo E), que separam a **SVZ** da cavidade ventricular (ALVAREZ-BUYLLA et al., 1995). Assim como as células C, os neurônios e astrócitos existentes nesta região também se dividem. É possível que a multiplicação celular que ocorre nas células do tipo B e C origine as células A que, por sua vez, são capazes também de sofrer divisão. Alguns trabalhos confirmam as células B como as principais células-tronco neurais do cérebro adulto (DOETSCH et al., 1999).

As células-tronco da **SVZ** representam, na verdade, uma das etapas do desenvolvimento do neuroepitélio, evoluindo para as células radiais que sofrem diferenciação em astrócitos, embora, essa propriedade de célula-tronco permaneça quiescente ou presente apenas em uma parcela restrita de astrócitos no cérebro adulto. Além disso, células-tronco encontradas na **SVZ** expressam receptores para o ***Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF)***, sugerindo que a habilidade para responder a estímulos de crescimento específicos, como o do **PDGF**, esteja relacionada a origem e ao crescimento das neoplasias, pois a ativação dessas vias de sinalização é reconhecidamente implicada na formação, sobrevivência, migração e invasão de tumores, inclusive dos gliomas (BROCKMANN et al., 2003).

A descoberta de células embrionárias em sítios onde predomina a divisão, multiplicação e migração celular (**ZSV, SGZ**) no cérebro adulto de mamíferos leva a crer que essas células possam ser responsáveis pela gênese e formação das neoplasias cerebrais de origem astrogliol. Mais ainda, estudos experimentais em culturas, demonstram que a ativação das vias **PDGF/EGF** confere, nessas células embrionárias, propriedades celulares semelhantes aquelas observadas nas células dos gliomas (JACKSON et al., 2008). Além disso, a análise celular do GBM demonstra que se trata de neoplasia heterogênea, composta predominantemente por células pouco diferenciadas, cujo fenótipo é similar ao encontrado em células-tronco normais, constituído por uma fração menor de células embrionárias com índice de proliferação reduzido, mas com alto potencial tumorigênico (ALTANER, 2008).

1.2.3 Micróglia, Neuroinflamação e glioblastomas

O cérebro e a medula espinhal são considerados órgãos “privilegiados” do ponto de vista imunológico, pois são separados do resto do corpo por um endotélio especializado, representado pela junção dos prolongamentos astrocitários com o capilar cerebral, formando uma rede conhecida como a **barreira hematoencefálica**, que impede o livre acesso dos agentes agressores e macromoléculas (incluindo anticorpos) para o interior do SNC. (LEBEDEV et al. 2007).

A **Micróglia** normal (Imagem 11a.) representa os macrófagos residentes, sendo a primeira e principal forma de defesa imune do SNC (PERRY et al., 1992). São diferenciadas na medula óssea, a partir de células-tronco hematopoéticas, e levadas ao cérebro, onde sofrem novo processo de diferenciação até se transformarem na micróglia residente. Além disso, durante o período fetal e até a segunda semana de vida, é encontrada na substância branca subventricular a forma nascente da micróglia ramificada que persiste no cérebro adulto, chamada de “células microgliais amebóides” (do inglês *Amoeboid microglial cells* – **AMC**). (KAUR et al.2007).

Esse tipo de macrófago representa cerca de 10% do total de células existentes no cérebro, estando distribuídas ao longo de todo o SNC, em constante patrulha buscando agentes externos agressores ou resíduos celulares. (HARRY, 2008). Alterações da homeostase cerebral levam a modificação fenotípica da micróglia, a qual altera sua forma e passa a expressar antígenos de superfície celular (RANSOHOFF et al., 2009). Em casos de lesão do tecido nervoso, as células microgliais perdem os prolongamentos e assumem forma arredondada, constituindo macrófagos com capacidade fagocitária, chamados de **células grânulo-adiposas** (Imagem 11b.). Essa pronta modificação frente a ambiente hostil se deve em parte à existência de canais de iônicos e receptores de membrana extremamente sensíveis, permitindo, em questão de horas, uma reação celular em resposta a modificações do ambiente, como ocorre na presença de agentes agressores (vírus, bactérias) (BLOCK, 2007). Quando modifica seu estado fenotípico, a micróglia é chamada de **ativada**, pois se torna imunologicamente competente - positiva para classes 1 e 2 do complexo de histocompatibilidade humana (MHC) -, iniciando atividade mitótica, com função de reconhecimento antigênico, e emissão de pseudópodes (atividade de fagocitose), além de realizar a apresentação de antígenos aos linfócitos T; esses eventos são idênticos aos

observados nos macrófagos que participam de processos inflamatórios em outros locais do organismo. A produção de radicais livres e citotoxicidade local é uma das consequências desse estado de ativação (KREUTZBERG, 1995).

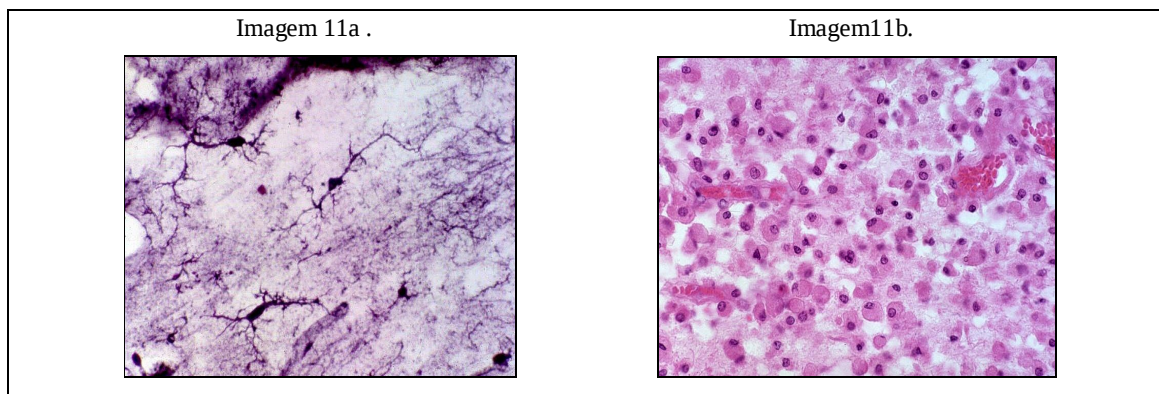


Imagem 11 – Micróglia:

11a: micróglia normal,

11b: micróglia ativada.

Fonte: Universidade Estadual de Campinas, 2009.

O papel das células microgliais e dos macrófagos cerebrais na gênese e desenvolvimento de gliomas ficou relegado até que investigadores demonstraram aumento da população dessas linhagens celulares nas vizinhanças e no interior de gliomas, onde produzem, dentre outros, o fator estimulante de colônia de macrófagos (*Macrophage colony-stimulator factor* - *CSF*), um potente indutor da polarização de macrófagos reativos, que influenciam no crescimento da massa tumoral. Essas alterações levam a crer que a micróglia participe da gênese dos gliomas (KOMOHARA, 2008).

Dentre os tumores cerebrais, gliomas anaplásicos e glioblastomas são os que possuem a maior quantidade de macrófagos/micróglia, representando até 30% da massa efetiva de células (ROGGENDORF et al., 1996). A densidade da micróglia no interior do tumor é seguramente maior que a observada no cérebro normal, havendo relação da abundância dessas células com o grau de malignidade da neoplasia. A maioria da micróglia encontrada no interior de gliomas possui forma amebóide, uma forma encontrada mais freqüentemente na substância branca e corpo caloso no período perinatal, sendo morfológicamente distinta das formas comumente encontradas no cérebro adulto (STREIT et al., 2005; GRAEBER et al., 2002). Apesar de se encontrarem no estado **ativado**, as evidências demonstram que as células de defesa encontradas no interior de gliomas são disfuncionais, e tudo indica que a eficácia de apresentação dos antígenos tumorais encontrados nas células dos

GBMs seja anormalmente baixa. O papel dessas células de defesa como mediadores de resposta imune na presença de gliomas é, portanto, avaliado como “deficiente” (ANAN’EVA et al., 2007), e aparentemente a microglia residente é controlada pelo próprio tumor, que se beneficia delas para crescer e invadir o cérebro, um processo que pode ser inibido *in vitro* pelo emprego da Ciclosporina A (MARKOVIC et al., 2007). Tudo indica que, apesar da microglia / macrófago cerebral representarem significativa parcela de células imunes no interior dos gliomas, estas atuam por um mecanismo regulatório inerente e favorável ao tumor, onde uma rápida expansão das células T é evitada, afetando negativamente a resposta imunológica adaptativa inata esperada frente a uma neoplasia de potencial antigênico, como é o caso dos gliomas malignos. Além disso, dentre os gliomas de baixo potencial proliferativo (difusos, grau II OMS), a variante **gemistocítica** (Imagem 12) costuma possuir comportamento muito agressivo, levando a um prognóstico surpreendentemente desfavorável para aqueles portadores dessa classe de tumor. Um dos fatores que explicam essa inesperada agressividade reside na presença elevada de mutações **p53** encontrada nessa variante, quando comparada com os demais astrocitomas (KÖSEL et al., 2001). Entretanto, foi constatado que os astrocitomas gemistocíticos possuem ainda um número anormalmente elevado de células microgliais em seu interior (GERANMAYEH et al., 2007), tendo sido demonstrado *in vitro* que uma das funções das células microgliais, que é a de apresentar os antígenos extraídos de uma linhagem cultivada de glioma, estão severamente comprometidas também nessa variante de glioma. Em conclusão, as células microgliais constituem uma rede de células endógenas imunocompetentes em constante atividade, cuja função primordial é proteger e defender o SNC de agressões. Entretanto, as evidências indicam que, frente a uma neoplasia astrocitária maligna, essa função primordial esteja severamente comprometida, e que essas células, ao contrário, possam até beneficiar o crescimento e a perpetuação da neoplasia, por não combater sua presença e, por outro lado, favorecer o tumor, por facilitar alguns processos de expansão, como o crescimento da massa e a invasão do tumor no interior do tecido afetado (FLÜGEL et al., 1999). A manutenção da homeostase de oxigênio é crítica para a sobrevivência da célula. Por outro lado, a hipóxia é uma condição comumente encontrada nos tecidos cancerosos, consequência do rápido crescimento do tumor, acompanhada por angiogênese inadequada, onde vasos sanguíneos estruturalmente aberrantes se formam continuamente. Tais vasos neoformados, apresentam endotélio defeituoso, com alteração de diâmetro e permeabilidade capilar, e o fluxo sanguíneo no câncer em crescimento acelerado acaba por se tornar deficitário para suprir as necessidades do próprio tumor, sendo a formação de edema e necrose, a regra. A neoformação vascular aberrante com padrão glomerulóide e necrose do

tipo “pseudopaliçada” são características histológicas típicas do glioblastoma multiforme (MURAT et al., 2009).

A existência de hipóxia/necrose tissular ativa o sistema imune residente (microglia), recrutando esses macrófagos para a área hipóxica, onde passam a exercer efeito promotor da proliferação celular através da expressão de genes com propriedades mitogênicas, angiogênicas e de migração/invasão, tais como *VEGF*, *Fator de Crescimento Epidérmico (EGF)* e *Fator de Crescimento do Hepatócito (HGF)*. Isso explica o fato de que o mais comum gene amplificado nos GBMs é o *Receptor do Fator de Crescimento Epitelial (EGFR)*, que se encontra amplificado em cerca de um terço dos casos (FULLER et al., 1992). A presença da hipóxia é considerada como fator que implica em maior agressividade tumoral e é visto como prognóstico adverso em muitas neoplasias malignas, devido seu papel como fator de seleção de células neoplásicas de maior malignidade e resistência a terapêuticas (FLYNN et al., 2008).

A invasão de células tumorais no tecido cerebral constitui outra característica dos gliomas difusos II-IV (OMS), e contribui de forma significativa para encurtar a sobrevivência observada nesses pacientes. Proteases secretadas por células cancerígenas degradam a matriz celular, permitindo que células neoplásicas se infiltrem e se espalhem por difusão no interior do tecido cerebral afetado. Possivelmente as células neoplásicas invasoras desencadeiam fenômenos imunes que levam à ativação da micróglia (DEMUTH et al., 2004).

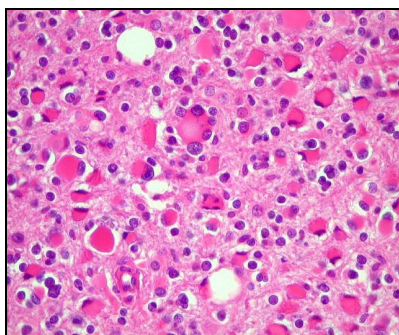
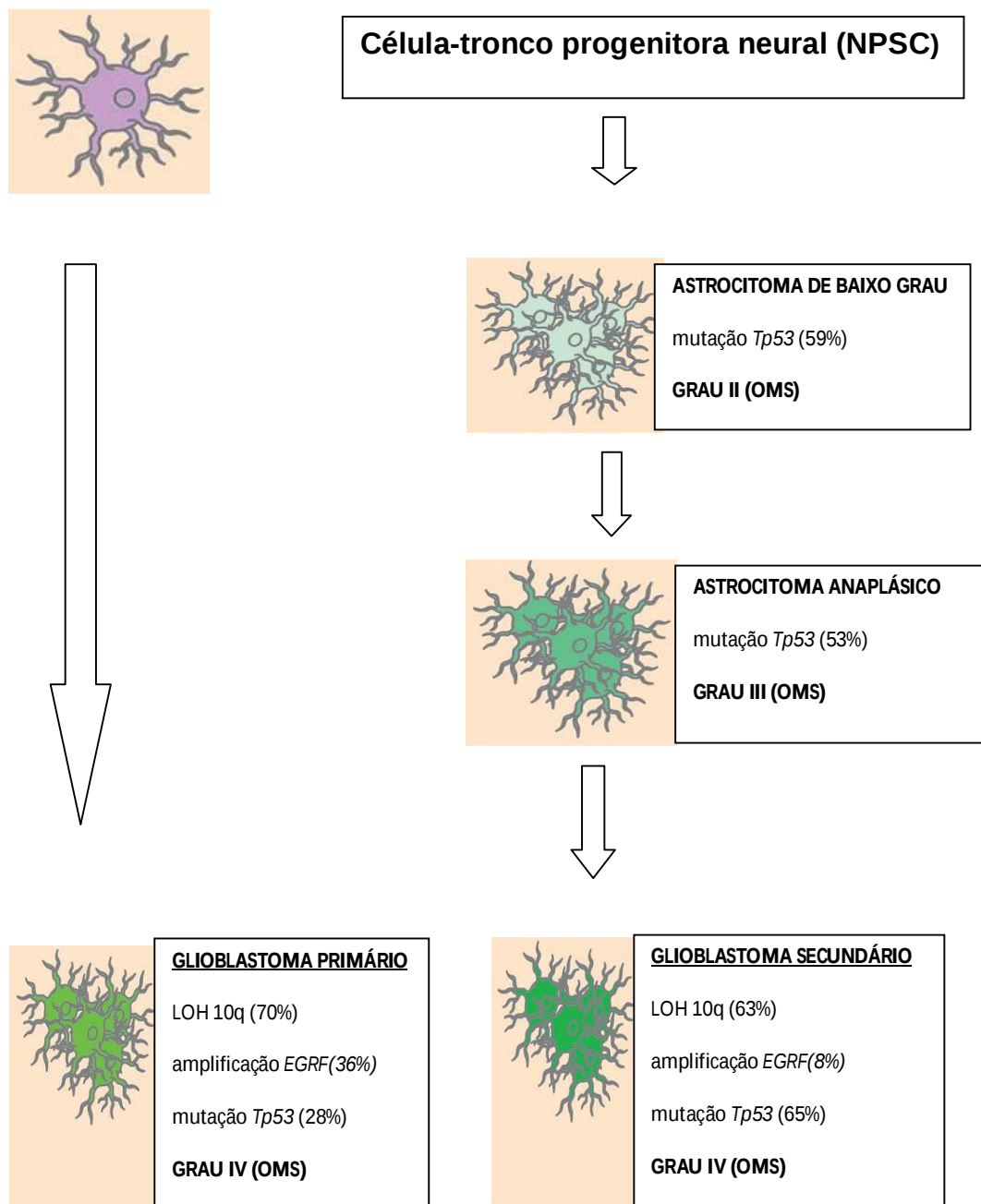


Imagem 12 - Astrocitoma gemistocítico
Fonte: Universidade Estadual de Campinas, 2009.

1.3 CITOGENÉTICA DOS GLIOBLASTOMAS

1.3.1 Subtipos de glioblastomas

Baseados nas alterações moleculares e gênicas há dois subtipos distintos de GBMs, que afetam pacientes de diferentes idades e se desenvolvem a partir de diferentes vias genéticas (Esquema 1). Na maioria dos casos (90%) são GBMs que se desenvolvem rapidamente ***de novo (primários)***, na ausência de evidência clínica de lesão precursora com menor grau de malignidade. Esse grupo costuma afetar pacientes de maior idade (60-70 anos) e são geneticamente caracterizados pela perda da heterozigosidade do braço longo do **cromossomo 10 (10q)** (70% dos casos) e amplificação do ***EGFR*** (36%), enquanto que os GBMs ***secundários*** se desenvolvem pela progressão de um astrocitoma difuso de baixo grau ou do astrocitoma anaplásico, e costuma se manifestar em pacientes mais jovens (40-50 anos), sendo que a alteração genética mais freqüente e precoce é a mutação no gene ***TP53***, presente em até 60% dos pacientes portando a lesão precursora. Durante a progressão, mutações adicionais ocorrem, sendo a mais significativa – da mesma forma que acontece nos GBMs primários – a perda da heterozigosidade do cromossomo 10q (63%), que se constitui, desse modo, a mais freqüente alteração gênica observada nos GBMs (OHGAKI et al., 2007).



Esquema 1- vias genéticas dos subtipos moleculares de GBMs

Esquema 1- Vias genéticas para origem de GBMs primários (*de novo*) e secundários

Fonte: Ohgaki e Kleihues, 2007.

1.3.2 Alterações de genes localizados no cromossomo 10

Como observado acima, a alteração gênica mais freqüente encontrada nos GBMs é a perda da heterozigosidade (**LOH**) em **10q25-qter** sendo que a freqüência dessa alteração é similar em ambos os subtipos: 70% nos **primários** e em 63% nos **secundários** (WARE et al., 2003; PERSHOUSE et al., 1993). Em contraste, **LOH** em 10p e perda completa do cromossomo 10 ocorre quase que exclusivamente nos **GBMs primários** (NAKAMURA et al., 2001). Dentre os genes localizados no cromossoma 10, inclui-se a **ALOX5 (Arachidonate 5-Lipoxygenase)**, enzima responsável pela transformação de ácidos graxos essenciais em **leucotrienos**. Esses possuem importante papel na resposta inflamatória, além de facilitarem o desenvolvimento e manutenção de células-tronco cancerígenas. Outro gene localizado no cromossoma 10 que possui relevância na fisiopatologia dos gliomas cerebrais é o **phosphatase and tensin homolog (PTEN)**, um gene supressor que atua como regulador do ciclo celular, por meio da ação de uma proteína fosfatase, cuja função é evitar que as células cresçam e sofram divisão de forma rápida e precipitada. A mutação desse gene é reconhecida em uma grande variedade de neoplasias, incluindo neoplasias de próstata, câncer de células renais, meningiomas malignos e nos próprios gliomas (STECK et al., 1997).

1.3.3 Gene *tp53* e gliomas

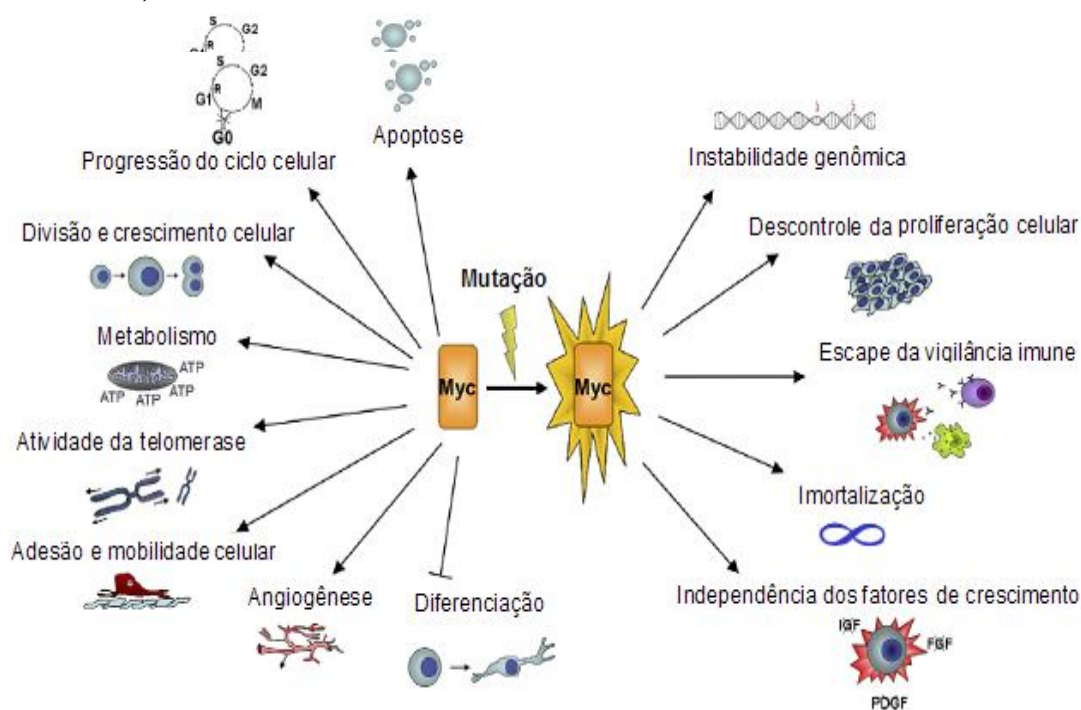
Conhecido como “o guardião do genoma”, o gene **Tumor supressor protein, cellular tumor antigen p53 (T(S)P53)** é definitivamente o gene mais significativo no que concerne ao surgimento de tumores sólidos no organismo sadio. Em humanos, se localiza no braço curto do **cromossomo 17** (17p13.1) e é responsável por codificar uma proteína (**p53**) de 393 aminoácidos com sete domínios. Um desses domínios (**DBD**, número 4) contém um átomo de Zinco e vários aminoácidos arginina. As mutações que desativam a **p53** usualmente ocorrem nesse sítio, destruindo a habilidade da proteína de se ligar aos seus alvos nas seqüências de DNA, fazendo com que deixe de ocorrer ativação transcripcional desses genes. Moléculas **p53** portadoras dessa mutação têm um efeito dominante negativo sobre algumas de suas funções. O principal efeito negativo é a inativação permanente das proteínas de reparo do DNA, fazendo com que o ciclo celular siga adiante mesmo na presença de um DNA

defeituoso (deixa de ocorrer o reparo obrigatório do DNA nos pontos de regulação, como a fase G1/S); adicionalmente, deixa de ocorrer o sinal necessário para ativar os fenômenos necessários a apoptose. Como resultado, a supressão da divisão de uma célula defeituosa é interrompida, permitindo, dessa forma, que ocorra multiplicação indefinida e desordenada de células aberrantes no tecido afetado (ROYDS et al., 2006). Mutações ***TP53*** são encontradas em cerca de 30% dos GBMs primários, e em 89% dos precursores do GBM, enquanto ainda são gliomas difusos de baixo grau, sendo a alteração gênica mais precoce e freqüente nesse subtipo (WATANABE et al., 1997).

As mutações ***TP53*** associadas com a formação dos GBMs se relacionam com uma disfunção do telômero. O substrato molecular dessa disfunção telomérica é a ocorrência de um dano (erosão) no telômero, resultante de sucessivas divisões, sem que ocorram os fenômenos de reparo de DNA, acima descritos. A telomerase é uma enzima (transcriptase reversa) presente em células embrionárias e tumores que possui a sua própria molécula de RNA, que é empregada como molde para o material gênico ali existente, permitindo alongamento dos telômeros logo após cada ciclo de replicação celular e é responsável por adicionar seqüências específicas de DNA nas regiões do telômero, encontradas nas extremidades dos cromossomos eucarióticos. Os telômeros contêm material gênico (DNA) condensado, e fornecem estabilidade estrutural aos cromossomos. Em cada divisão celular, os telômeros são ligeiramente encurtados levando, com o passar de sucessivos ciclos de divisão, a uma perda gênica significativa e finalmente incapacidade da célula se dividir; esses eventos estão relacionados tanto com o envelhecimento quanto com o surgimento do câncer (OLOVNIKOV, 1973; BLACKBURN, 1990). Logo, está bem estabelecido que a perda da função somática desse gene permite o desenvolvimento de inúmeras neoplasias epiteliais malignas, como o câncer de mama, neoplasias coloretais e o próprio GBM, além da ***Síndrome de Li-Fraumeni (SLF)***, uma desordem autossômica dominante causada por mutações no gene ***TP53***, a qual favorece o surgimento precoce do câncer em indivíduos portadores dessa anormalidade. O espectro de neoplasias associadas a essa síndrome é bem distinto daquele observado em pessoas portadoras de mutações somáticas do ***TP53***. Desse modo, ao invés de neoplasias malignas de natureza epitelial, os portadores da ***SLF*** são acometidos por tumores raros, como sarcomas, carcinomas adrenocorticais e leucemias (LI; FRAUMENI, 1969).

1.3.4 Gene c-Myc

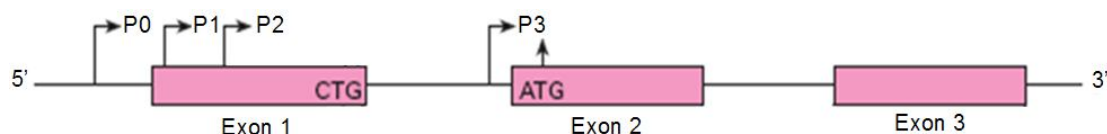
Cell myelocytomatosis (C- MYC ou MYC) é um gene implicado na regulação de várias atividades biológicas, como crescimento e divisão celular, progressão do ciclo celular; metabolismo, apoptose e perda da diferenciação. De modo semelhante, está relacionado com a proliferação e sobrevivência daquelas células tronco dos gliomas que possuem potencial tumorigênico (WANG et al., 2008). Como esperado para um gene que participa de múltiplos canais regulatórios, alterações na expressão do gene **MYC**, resultam em inúmeras desordens no programa celular, como instabilidade genômica, descontrole da proliferação celular, escape de vigilância imune e imortalização (Esquema 2), o que torna este gene associado a uma ampla variedade de malignidades hematológicas e tumores sólidos, incluindo os cânceres de estômago, cólon, carcinoma de pulmão, osteosarcomas, melanomas e o próprio GBM, sendo implicado em mais de 80% dos cânceres humano e uma variedade de neoplasias animais (MO et al., 2006).



Esquema 2 - Representação dos diferentes processos celulares controlados pelo gene MYC.

Fonte: Vita et al., 2006.

O gene **MYC** faz parte da família de oncoproteínas **MYC**, constituída pelos seguintes genes: **N-MYC** e **L-MYC**, também amplificados em muitas neoplasias humanas (**N-MYC** nos neuroblastomas e **L-MYC** nos carcinomas do pulmão), além dos genes **B-MYC** e **S-MYC**, identificados somente em roedores, diferindo dos genes **MYC**, **N-MYC** e **L-MYC**, uma vez que não participam de nenhum tipo conhecido de carcinogênese. O conjunto desses cinco genes é denominado genericamente como **família de oncogenes MYC** (EILERS, 1999). O gene **MYC** se localiza no braço longo do **cromossomo 8q24**, estendendo-se por 5359 pares de bases nucleotídicas, e é estruturalmente constituído por três éxons e quatro regiões promotoras que codificam três diferentes isoformas de fosfoproteínas nucleares altamente conservadas e com a propriedade de interagir diretamente com o DNA: **MYC-1**, **MYC-2** e **MYC-3**, também conhecidas por p64, p67 e MYC-S, respectivamente (Esquema 3). Essas três isoformas são expressas em quantidades variáveis de acordo com o tecido avaliado (SPOTTS et al., 1997).

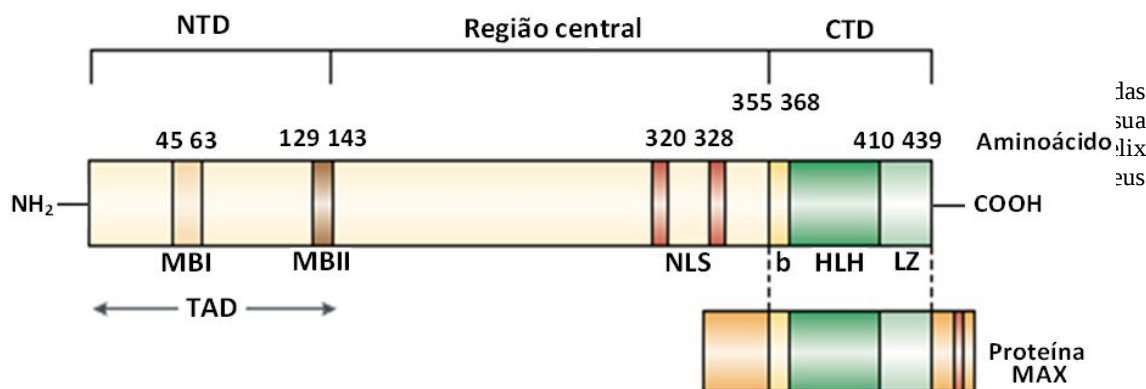


Esquema 3 - Representação da estrutura do gene **MYC**.

Fonte: Ryan e Birnie (1997).

A transcrição do gene é iniciada nas regiões promotoras P1 e P2, que contribuem com 75-90% e 10-25%, respectivamente, da transcrição do mRNA das proteínas **MYC**. O promotor P3, posterior aos promotores P1 e P2, contribui somente com 5% da transcrição do mRNA e com similar atividade, mas somente presente no gene **MYC** humano, o quarto promotor P0 localizado em torno de 550-650 pb acima dos promotores P1 e P2, ainda não tem um significado conhecido (KERPPOLA et al., 1988).

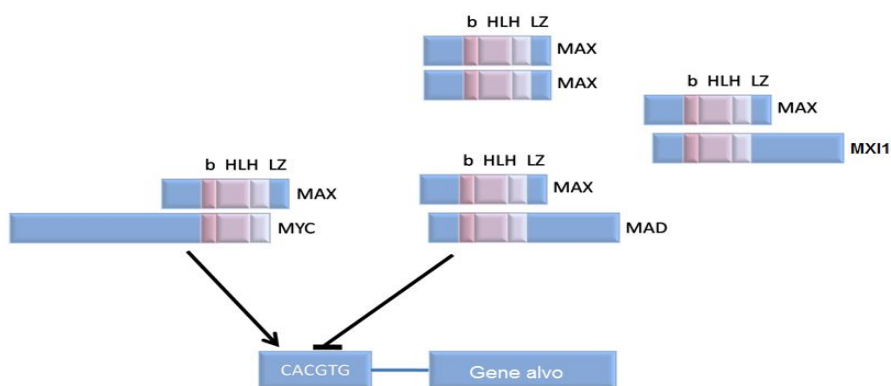
A proteína codificada pelo proto-oncogene **MYC** é um fator de transcrição envolvido na ativação de diversos genes. Esta proteína apresenta estrutura comum aos fatores de transcrição, sendo composto pelo domínio de transativação N-terminal (TAD), necessário para a ativação transcricional da proteína, que contém as regiões denominadas **MYC boxes** MBI e MBII e duas seqüências de localização nuclear (NLS), responsáveis pela entrada da proteína no núcleo logo após sua tradução. Sua estrutura também compreende uma região central e uma região C-terminal (CTD), esta última contém três importantes domínios estruturais, o motivo zíper de leucina (LZ), o motivo helix-loop-helix (HLH), e uma região rica em aminoácidos do tipo básico (b) (Esquema 4) (RYAN et al., 1997).



Esquema 4 - Representação do fator de transcrição MYC.

Fonte: Latchman (1997).

Outro fator de transcrição reconhecido como essencial para a atividade exercida pela **MYC** é a **proteína Max** (Esquema 5). Esta proteína, quando dimerizada com **MYC**, ativa o processo de transcrição e promove a proliferação celular. Dependendo do equilíbrio dessas proteínas, a transcrição de genes alvos envolvidos na proliferação celular é ativada ou inibida (WAGNER et al., 1992). A proteína **MYC** também interage com outras proteínas celulares, porém são incapazes de formar homodímeros. A dimerização do complexo **MYC/Max** é viabilizada pelas seqüências conservadas presentes na região C-terminal de ambas as proteínas (b-HLH-LZ), em ligações específicas com DNA que contenha a seqüência CACGTG denominada elemento E-box, encontrada na região promotora dos genes (ADHIKARY et al., 1999). A proteína Max, ao contrário de **MYC**, é expressa constitutivamente e também forma heterodímeros com outras proteínas que possuem os domínios estruturais b-HLH-LZ, como é o caso das proteínas da família Mad e Mx1, além de formar homodímeros consigo mesma. Os complexos Max/Mad, Max/Mx1 e Max/Max formam-se do mesmo modo como o complexo **MYC/Max**, entretanto atuam como repressor transcrricional da proliferação celular mediada pelo proto-oncogene **MYC** (Esquema 5) (GRANDORI et al., 2001).



Esquema 5 - Modelo da interação da molécula Max com outras proteínas

Fonte: Calcagno et al. (2008b).

A expressão de **MYC** é estritamente regulada por sinais externos, como fatores de crescimento e componentes da matriz extracelular além de sinais internos do controle do ciclo celular. Células diferenciadas e quiescentes normalmente expressam baixos níveis de **MYC**, favorecendo a formação de homodímeros de Max e conseqüentemente repressão transcricional. Por outro lado, em resposta a estímulos de crescimento celular, a expressão de **MYC** é rapidamente elevada, e conduz a formação de heterodímeros **MYC/Max**. Por analogia, a queda do nível de expressão de **MYC** volta a inibir o estágio de crescimento (CIEMERYCH et al., 2002).

O proto-oncogene **MYC** pode induzir a malignidade celular por diferentes mecanismos, incluindo: amplificação gênica, translocação cromossômica e mutações. Estas alterações desregulam a expressão do gene, e levam a proliferação celular descontrolada, como a exemplo do que ocorre nas células leucêmicas da linhagem HL60 apresentam como marcador genético a amplificação do proto-oncogene **MYC** em seu genoma (SPENCER et al., 1991). O esforço no desenvolvimento de fármacos ou o isolamento de produtos naturais com atuação sobre o **MYC**, buscando eliminar ou reduzir a amplificação do proto-oncogene **MYC** poderá ser de muita utilidade no tratamento de pacientes com câncer, incluindo aqueles de linhagem glial, como é o caso dos astrocitomas (BURBANO et al., 2008a).

1.3.5 Gene *myc* e glioblastomas

A amplificação do gene **MYC** pode ser encontrada em muitas neoplasias malignas, onde uma expressão descontrolada de muitos genes leva a proliferação celular e

formação do câncer. Ao contrário, a ativação do **MYC** resulta em numerosos efeitos biológicos, como a capacidade de dirigir adequadamente a proliferação celular, a regulação do crescimento das células, apoptose e diferenciação de células-tronco, motivo pelo qual o **MYC** é reconhecido como um forte *proto-oncogene*. As principais células formadoras dos GBMs costumam expressar o gene **MYC** amplificado em até 40% dos casos (FULLER et al., 1992), e essa amplificação gênica tem sido relacionada com a progressão e modificação do grau de malignidade nos gliomas, por afetar primariamente as células precursoras dos gliomas (**BTSC**) (COLLINS, 1995). Essa linhagem de células expressa um nível elevado do gene **MYC** (amplificado). Nas neoplasias, o papel do gene **MYC** é, além de regular a proliferação das células, atuar também na sobrevivência das células **BTSC** (HERMS et al., 1999).

1.4 PRODUTOS NATURAIS COM POTENCIAL ANTINEOPLÁSICO

A utilização de produtos naturais, obtidos principalmente de plantas e fungos, para tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal, e a sua utilização, inclusive no câncer, se relaciona a influência significativa sobre os aspectos sócio-econômicos e culturais das sociedades contemporâneas (LINS et al., 2009). Segundo dados da OMS, 80 % da população mundial dependem da medicina de produtos naturais, seja para suprir a ausência de uma política pública de saúde ou pela própria cultura de determinados povos no uso desses produtos (KINGSTON et al., 2005). O Brasil, com sua abundante biodiversidade, principalmente pela enorme diversidade botânica encontrada nas Regiões Norte e Nordeste, onde a peculiar diversidade cultural ali encontrada permite o conhecimento de produtos naturais utilizados pela população como “remédios” na profilaxia, tratamento e cura de diferentes tipos de sintomas e enfermidades, constitui-se importante fonte para investigação de produtos oriundos da natureza com possível ação terapêutica (YOUNES et al., 2007). Um programa de pesquisa multidisciplinar envolvendo o conhecimento da medicina popular aliado aos modernos ensaios tecnológicos e químicos, com a intenção de isolar novos princípios bioativos derivados de produtos naturais, principalmente de fungos e plantas pode ser factível e de útil aplicabilidade terapêutica, e importância da identificação, extração ou síntese de novos princípios ativos oriundos de fungos que possam vir a ser pesquisados e estudados como futura fonte medicamentosa no

tratamento e cura de patologias, torna-se evidente diante da perspectiva de sua aplicação terapêutica, pois ao lado da cirurgia e da radioterapia, a quimioterapia ainda continua sendo uma das principais formas de tratamento de determinados tipos de tumores malignos (BALBANI et al., 2009). Drogas anticancerígenas atualmente utilizadas são bastante tóxicas e pouco específicas, sendo que a quimioterapia convencional é limitada pelo desenvolvimento de resistência do tumor à droga e pela dificuldade do enfermo em suportar os efeitos adversos gerados pela toxicidade sistêmica. Uma nova forma de terapia contra o câncer potencialmente menos tóxica, envolvendo o uso de agentes naturais, por via de modificação do estado de diferenciação e crescimento de células cancerígenas tem sido desenvolvido (LESZCZYNIECKA et al., 2001), tornando esses recursos naturais renováveis encontrados em plantas, e certas cepas de fungos, fontes extremamente importantes no combate ao câncer e outras doenças (WALL et al., 1996).

A Indução de diferenciação como estratégia terapêutica pode ter um poderoso impacto em malignidades hematopoiéticas, principalmente em leucemias, uma vez que a deficiência das células leucêmicas em sofrerem diferenciação representa um exemplo protótipo de maturação desregulada como a característica fundamental de transformação neoplásica. A observação de que certas drogas podem restaurar o programa de diferenciação normal dessas células representa o primeiro exemplo de diferenciação como estratégia terapêutica. Esses novos compostos capazes de induzir a diferenciação celular são considerados agentes candidatos para a prevenção e/ou tratamento de câncer (LUYENGI et al., 1996).

Estima-se que 61% dos medicamentos disponíveis na terapêutica atual foram desenvolvidas direta ou indiretamente a partir de fontes naturais. Dentre as substâncias isoladas destas fontes, encontramos os chamados **metabólitos secundários**, uma classe química que se destaca pelo grande potencial farmacológico. Estes produtos dividem-se em diversas classes estruturais: **terpenos, lignanas, taninos, lactonas, esteróides, chalconas, flavonas, flavanonas, alcalóides e quinonas**, dentre outros. Muitos desses produtos constituem modelos para o desenvolvimento de medicamentos sintéticos, tais como os fármacos anticâncer atualmente em uso (DENNIS et al., 2009).

1.4.1 Metabólitos isolados de fungos

Os fungos estão entre o segundo maior grupo de espécies encontrados na natureza, apresentam grande diversidade de habitat, podem ser encontrado em ambientes terrestres e aquáticos, possuindo tanto função benéfica quanto patológica. Há cerca de 1,5 milhões de espécies de fungos no planeta, mas somente cerca de 100 mil espécies foram estudadas e identificadas (HAWKSWORTH, 1997).

Metabólitos secundários, derivados de modificação química de produtos de microorganismos, representam potencial fonte de combinações químicas com atividade biológica (DONADIO et al., 2002).

Importantes fármacos de uso clínico em várias patologias foram obtidos de fungos. Dentre os medicamentos de maior repercussão terapêutica para doenças infecciosas destacam-se os antibióticos penicilinas e cefalosporinas, e muitas substâncias com outras atividades farmacológicas também tem sido produzidas a partir de metabólitos fúngicos, mas a descoberta da utilização de metabólitos fúngicos como real fonte medicamentosa somente se desenvolveu em finais dos anos 20, com o reconhecimento das propriedades antibacterianas da penicilina. Esta classe terapêutica representou significativo avanço na medicina e deveu-se a Alexander Fleming que, detectou a inibição do crescimento de placas de cultura semeadas com colônias de estafilococos contaminadas com fungos, posteriormente identificado como pertencente ao gênero *Penicillium*, do qual foi isolada a penicilina, responsável direta pela atividade bactericida dos fungos contaminantes. Anos após os resultados com a penicilina, outras classes de antibióticos, igualmente isolados de metabólitos oriundos de fungos, passaram a ser estudados, com larga utilidade no combate a agentes infecciosos de origem bacteriana (DEMAIN, 1999).

Metabólitos obtidos de cepas de fungos têm sido testados com sucesso em câncer de mama (HO et al., 2005), e dezenas de medicamentos obtidos de metabólitos fúngicos, destinados aos mais variados tipos de patologias, estão disponíveis nos mercados farmacêuticos do mundo inteiro. Os principais gêneros e espécies de fungos estudados e utilizados como fontes na produção de medicamentos pelas indústrias químico-farmacêuticas, principalmente no tratamento de infecções causadas por bactérias e alguns tipos de cânceres são os *Aspergillus (moniliaceae)*, *Penicillium*, *Aphilllophorales*, *Streptomices*, *Ascomycota* e *Pisolithus* (TING et al., 2008). Dentre os inúmeros agentes quimioterápicos de origem natural extraídas de fungos são empregados no tratamento de cânceres, destacam-se as

Antracilclinas, Bleomicinas, Actinomicinas e Mitomicinas (KIDD, 2000). Esses compostos naturais, com atividade antineoplásica ou citotóxica, exercem seus efeitos farmacológicos inibindo a proliferação celular cancerígena, parando e inibindo o crescimento tumoral através de diferentes mecanismos de ação. Esses mecanismos envolvem interferência da formação do citoesqueleto, prevenção da replicação do DNA ou induzindo diferenciação das células cancerígenas (SETZER et al., 2003).

1.4.2 Gênero *Pisolithus* e Pisosterol

O gênero *Pisolithus* pertence à classe dos fungos Basidiomycetes, família Sclerodermataceae. São fungos ectomicorrízicos representados por algumas espécies, sendo que dessas poucas se apresentaram como fonte na produção de medicamento, não somente no tratamento do câncer, mas também de outras patologias principalmente na infecção por bactérias. Os fungos ectomicorrízicos ocorrem em um grupo restrito de plantas (aproximadamente 5%), sendo economicamente importantes para o setor florestal, por apresentarem uma associação mutualística entre hifas fúngicas e raízes de plantas à quais ambos os organismos obtém nutrientes (MARTIN et al., 1999). Esses fungos, além de melhorar a eficiência de absorção de alguns nutrientes, podem proporcionar um significativo aumento da tolerância à acidez, toxicidade por metais pesados, temperaturas elevadas do solo, aumento expressivo na resistência contra afecções do sistema radicular e defesa contra invasores microbianos. Desse modo, espera-se que as plantas hospedeiras apresentem uma condição nutricional mais favorável ao seu estabelecimento, desenvolvimento e produção (KOPE et al., 1991).

A espécie de fungo *Pisolithus tinctorius* (Fotografia 1) é comumente encontrada na natureza, em simbiose com muitas espécies de árvores de pinheiros e eucaliptos. Essa associação é essencial para a planta hospedeira em condições de deficiências hídricas e nutricionais, pois melhora a absorção e o transporte de água e nutrientes do solo para as raízes da planta. Esse fungo é de importante interesse econômico por habilitar criações arborizadas artificiais (BINDER et al., 2006).



Fotografia 1 - Fungo *Pisolithus tinctorius*
Fonte: Montenegro, 2004.

As substâncias denominadas ***Pisolitina A*** e ***Pisolitina B***, dois compostos antibióticos, foram os primeiros isolados químicos de basidiocarpos do fungo *P. tinctorius* (KOPE et al., 1991). Tais substâncias são capazes, em ensaios laboratoriais, de inibir e impedir a germinação de determinados esporos da *Truncatella hartigii*, presentes em algumas plantas. Dentre os principais fito e dermatopatógenos que tiveram o seu crescimento inibidos, temos os *Phytophthora sp*, *Verticillium dahliare*, *Pyrenochaeta terrestris*, *Microsporum gypseum* e *Trichpyton equinum* (BAUMERT et al., 1997). Estudos adicionais com isolados de *P. tinctorius* conduziram a descoberta de seus principais metabólitos secundários, os quais foram caracterizados como ***triterpenos lanostanos*** (substâncias químicas que apresentam em sua estrutura o grupamento ***terpeno***) e os derivados do ácido tritalenoides pulvínicos (HARALAMPIDIS, 2002). Os ***terpenos*** formam uma diversificada família de substâncias naturais, e são hidrocarbonetos compostos apenas por carbono e hidrogênio, produzidos por uma grande variedade de plantas, em particular coníferas do gênero ***Pinus*** (pinheiros, abetos, chamaciparis, sequóias, cedros, ciprestes e araucárias) e alguns insetos, como térmitas (cupins) e borboletas. (LI et al., 2009). Os ***terpenos*** são os principais componentes das resinas e de seus derivados, constituindo-se como a principal matéria-prima de praticamente toda criatura viva, originando diversos compostos essenciais, como vitaminas, colesterol e hormônios esteróides e quando modificados quimicamente, por oxidação ou rearranjo do esqueleto carbonado, os compostos resultantes são conhecidos como ***terpenóides*** (ABE, 2007). Alguns ***terpenos*** são precursores de vitaminas (A, K, E), e outros fazem parte da clorofila e carotenóides e grande parte de azeites aromáticos, como mentol e glicerol, sendo encontrados em sementes, flores, folhas, raízes e madeiras de plantas superiores, assim como em musgos, algas e líquens. Inicialmente pensava-se que seu precursor fosse o ***isopreno***, no

entanto, estudos posteriores demonstraram que a real origem dos **terpenos** é o **ácido mevalônico**, que, por sua vez, provém da **acetil coenzima A**. Esse ácido orgânico é o precursor de uma importante via biossintética, conhecida como **Via do mevalonato**, a qual produz, dentre outros, os **terpenos** e os **esteróides**. Pela pretensa origem no composto **isopreno**, a classificação dos **terpenos** ainda leva em consideração o número de cadeias de **isopreno** presentes no composto (KUZUYAMA, 2009). A importância dos **terpenóides** como constituintes primários dos **óleos essenciais** encontrados em vários tipos de plantas e flores tem sido ressaltada por inúmeras fontes, considerando as inúmeras utilidades desses compostos na vida moderna, como o emprego em aditivos para alimentos, fragrâncias em perfumaria e medicina. Os **terpenos** são produzidos e liberados com maior intensidade pelas árvores em condições de clima quente, atuando como indutores naturais de precipitação (chuva) (ADAM, 2008).

Evidências demonstrando atividade inibitória de alguns **triterpenos** sobre vírus (IKEDA et al., 2005; MAYAUX, 2008) levaram alguns pesquisadores brasileiros a investigar esses compostos. Logo, uma série de triterpenos conhecidos associados a um novo triterpeno lanostano, até então inédito, denominado de **Pisosterol** (nome químico é 3 β ,22,23-triidroxi-22-acetoxi-24-metil-lanosta-8,24(28)-dieno-31-al), foram isolados do fungo **Pisolithus tinctorius**, coletado de uma plantação de **Eucalyptus** (ZAMUNER et al., 2005). Ensaio microbiológicos subsequentes demonstraram atividade microbida do extrato bruto do *P. tinctorius* contra a cepa de *Bacillus subtilis*. Após diversos fracionamentos bioquímicos desse extrato, verificou-se, entre outros, a presença de uma substância química, identificada como 3 β ,22,23-triidroxi-22-acetoxi-24-metil-lanosta-8,24(28)-dieno, Pisosterol (GILL et al., 1989). Estes lanostanóides possuem grande variedade de propriedades biológicas, incluindo atividade citotóxica e antitumoral em determinados tipos de células neoplásicas (LI, 2005), especialmente em linhagens celulares de melanomas leucemias. As células leucêmicas HL60 em cultivo, quando tratadas com Pisosterol, apresentam diferenciação celular em monócitos (MONTENEGRO et al., 2007).

2 PERGUNTA EXPERIMENTAL

Os resultados limitados das terapêuticas disponíveis atualmente no manejo das neoplasias gliais estimulam continuamente a procura de novos agentes terapêuticos para o combate do câncer cerebral. O comportamento biológico de tais neoplasias, manifestado através de elevadas taxas de recidiva em curto período de tempo após a manifestação inicial, advém principalmente do caráter infiltrativo, da desenfreada cinética de proliferação celular e do fenômeno de resistência celular comumente observado frente aos agentes quimioterápicos disponíveis. Isso torna os resultados do tratamento de gliomas malignos frustrantes em se tratando de cura ou mesmo controle ao longo do tempo.

Levando-se em conta os aspectos citogenéticos, onde se confirma a existência do gene *c-MYC* amplificado em até 40% dos casos dos gliomas (FULLER et al., 1992), assim como comprovada influência da substância ***Pisosterol*** como inibidor *in vitro* de agentes biológicos e de células neoplásicas leucêmicas (MONTENEGRO et al., 2007), indaga-se, no presente estudo, sobre o efeito do ***Pisosterol*** sobre o gene *c-Myc* presente nas células neoplásicas de gliomas malignos: **“*Pisosterol* possui atividade sobre a expressão aumentada do gene *c-Myc* em gliomas malignos ? “** Buscando responder o questionamento, realizou-se trabalho conjunto entre o Serviço de Neurocirurgia Oncológica do Hospital Ophir Loyola e o Laboratório de Citogenética Humana da Universidade Federal do Pará, onde a coleta de amostras tumorais oriundas de pacientes submetidos a tratamento cirúrgico para extirpação da neoplasia naquela instituição, era encaminhada para cultivo da amostra no Laboratório da UFPA, local da realização do experimento.

3 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética e referendado pelo Serviço de Neurocirurgia do Hospital Ophir Loyola. Pacientes, familiares e responsáveis envolvidos foram esclarecidos quanto aos procedimentos de fornecimento da amostra para análise histopatológica de rotina e para cultivo em laboratório como finalidade de pesquisa científica, bem como dos objetivos da presente pesquisa, tendo sido realizado registro formal com o consentimento dos mesmos (anexo I).

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Analisar, comparativamente, o efeito do Pisosterol sobre a proliferação de células em linhagem U343 e em amostra cultivada de Glioblastoma Multiforme Humano, portadora de amplificação do proto-oncogene *MYC*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar, por Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH) o número de alelos do proto-oncogene *MYC*, nas células das linhagens de glioma das amostras em estudo;
- b) Investigar, por Hibridação *in situ* Fluorescente, a possível redução do número de alelos do proto-oncogene *MYC*, após tratamento com diferentes concentrações de Pisosterol nas amostras;
- c) Comparar as anormalidades cromossômicas encontradas na passagem celular das linhagens de glioma estudadas com as alterações descritas na literatura para este tipo histológico de tumor;
- d) Determinar a citotoxicidade, através do cálculo do **índice mitótico**, das diferentes concentrações de Pisosterol utilizadas no tratamento das células das linhagens de glioma.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 CASO CLÍNICO

U.S. 40 anos, masculino, em dezembro de 2005 sofreu episódio convulsivo tipo generalizado com abalos motores tônicos e clônicos. Alguns dias depois, manifestou cefaléia persistente, confusão mental, e alguns episódios de vômitos sem relação com alimentos. Investigado com exame de TC do crânio, que demonstrou a existência de processo expansivo localizado em região temporal direita. O exame de Ressonância magnética aumentou a suspeita de que se tratava de lesão expansiva primária e maligna do cérebro, devido a localização no interior da substância branca do lobo temporal, com significativo efeito de massa e intenso realce à injeção de contraste endovenoso. Internado na Clínica Neurológica do Hospital Ophir Loyola, onde foi submetido a tratamento microcirúrgico com remoção macroscópica total da lesão. No pós-operatório imediato, observou-se leve hemiparesia esquerda, de predomínio braquial, recuperada completamente com auxílio de fisioterapia. O exame de RM para controle da ressecção mostrou cavidade líquórica sem sinais de neoplasia residual, e o resultado da análise histológica da tumoração revelou que se tratava de “**astrocitoma anaplásico (grau III)**”. Com esse diagnóstico, foi encaminhado para o setor de oncologia clínica, onde iniciou terapêutica adjuvante com *Lomustina (CCNU)*, *Procarbazina* e *Vincristina* concomitante com *radioterapia* convencional. Houve satisfatória, evolução, e seis meses após o procedimento cirúrgico, o paciente retornou para atividades gerais de sua vida, apresentando dependência parcial de terceiros para algumas poucas atividades do cotidiano. Acompanhado em nível ambulatorial, com exames semestrais de RM, permaneceu livre de sintomas e sem sinais de recidiva, até o mês de setembro de 2008, quando apresentou crise convulsiva generalizada. Foi prontamente submetido a investigação com TC e RM, confirmando surgimento de massa tumoral no local do leito cirúrgico, caracterizando recidiva da neoplasia. Internado no mesmo hospital, sendo mais uma vez submetido a tratamento cirúrgico, com ressecção radical do tumor; dessa vez, o resultado do exame anatomopatológico revelou evolução desfavorável da neoplasia, com transformação da mesma em “**Glioblastoma multiforme (astrocitoma grau IV)**”. O paciente apresentou quadro de disartria, confusão mental e completa hemiparesia esquerda, permanecendo

acamado e dependente de terceiros para a maior parte das atividades cotidianas. O exame de RM mostrou remoção completa da lesão, e foi optado por iniciar novo ciclo de quimioterapia sistêmica por via oral, com Temozolamida; em junho de 2009, houve piora do quadro, com rebaixamento da consciência, coma e morte por insuficiência respiratória. A curta sobrevivência observada no caso está relacionada ao diagnóstico histológico de astrocitoma maligno, cuja evolução característica de “astrocitoma anaplásico” até “Glioblastoma multiforme”, favorece o diagnóstico de “**Astrocitoma secundário**” do cérebro. A amostra colhida no segundo ato operatório, com o diagnóstico histológico de “Glioblastoma multiforme”, foi encaminhada para processamento e cultivo, tendo sido desenvolvida uma linhagem celular cultivada, que foi submetida a tratamento no presente estudo, e que foi denominada de linhagem **Astrocitoma Hospital Ofir Loyola N° 1 (AHOL1)**.

5.2 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DO *PISOSTEROL*

O *Pisosterol* utilizado no presente estudo é cortesia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, em parceria com o Laboratório de Citogenética Humana, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará. Este composto químico, isolado do fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius*, foi coletado de uma plantação de eucaliptos no Nordeste do Brasil. O material obtido de *P.tinctorius* foi pulverizado em ar seco (370g), e extraído com acetona a temperatura fechada, resultando 21g de extrato após evaporação do solvente sob reduzida pressão. O extrato de acetona (4g) sofreu cromatografia em gel sílico, com um eluído de acetona/metanol em mistura binária (100:0-0:100), rendendo assim uma maior concentração (120g). A estrutura do Pisosterol foi determinada por meios espectroscópicos (ZAMUNER et al., 2005).

5.3 LINHAGEM *U343* E CULTIVO DAS LINHAGENS CELULARES DE GLIOMA EXTRAÍDO DO CASO CLÍNICO

A linhagem astrocítica *U343 MG-a (U343)* foi originalmente estabelecida a partir da ressecção cortical de um astrocitoma primário de adulto, sendo deficiente para o *gene p16* e proficiente para *Tp53* (DIRKS, 1997). As linhagens celulares *U343* e *AHOL1* foram cultivadas em frascos de cultura de 25-cm² (0.25 x 10⁷ células/ 5 mL de meio de cultura) em meio de cultura HAM F-10 suplementado com 20% de soro bovino fetal, 2 mM de glutamina, contendo 100/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina. As células foram incubadas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. O crescimento celular foi observado com auxílio do microscópio de imersão, a cada 24 horas, e foram realizados repique de células em meio de cultura novo em um intervalo de três dias (HIYAMA et al., 1999).

5.4 TRATAMENTO COM **PISOSTEROL**

Após 50 ciclos contínuos em cultura estável, as células são consideradas em estado proliferativo. A partir de então, passam a fase de tratamento com diferentes concentrações de **Pisosterol** (dissolvido em 1% de DMSO). Esta substância química foi repetidamente adicionada às culturas, até que se obteve a concentração final de 0,5, 1,0 e 1,8 µg/mL. Estas concentrações foram escolhidas levando-se em consideração o valor do IC₅₀ do Pisosterol, para a linhagem celular *U343*. Cada frasco de cultura foi incubado, na presença do Pisosterol, por três dias (72h) (MONTENEGRO et al., 2004).

5.5 CITOGENÉTICA E CÁLCULO DO ÍNDICE MITÓTICO

Após o tempo de cultivo, as células das linhagens *U343* e *AHOL1* foram submetidas a sincronização celular conforme protocolo preconizado por Yunis et al. (1981), para obtenção de metáfases. O material foi transferido para tubos de centrífuga e centrifugado por 8 minutos a 1000 rotações por minuto (RPM). Em seguida o sobrenadante foi desprezado,

e as células ressuspensas em solução hipotônica (KCl 0,075M) à 37°C por 20 minutos. Logo após, o material foi centrifugado por 8 minutos a 1000 RPM. O sobrenadante desprezado e 5 ml de fixador Carnoy (metanol e ácido acético na proporção de 3:1) adicionado ao sedimento. O fixador foi trocado mais duas vezes, deixando apenas o material suficiente para a confecção das lâminas.

5.6 BANDEAMENTO GTG

A técnica de coloração empregada foi a de obtenção de bandas GTG (SCHERES, 1972), onde as lâminas são imersas em solução de tripsina 0,01% diluída em tampão fosfato 0,06M durante poucos segundos. A ação da tripsina será interrompida mergulhando-se a lâmina em água destilada. Após este procedimento as preparações foram coradas em Giemsa tampão fosfato 0,006M (1:30) durante 5 minutos, lavadas em água e secas.

A análise das preparações cromossômicas submetidas ao bandamento GTG foi realizada ao microscópio óptico com objetiva de 100X, pelo *software Bandview EXPO 3.0.1* da *Applied Spectral Imaging*. Os cromossomos foram identificados e classificados segundo as recomendações do comitê do *Sistema Internacional de Nomenclatura em Citogenética Humana* (ISCN, 1995). Foram analisadas 30 metáfases de cada concentração controle.

O critério para determinação de clone citogenético utilizado foi o definido pelo ISCN (SCHRECK et al., 2001), que considera duas ou mais metáfases com o mesmo cromossomo adicional ou anomalia estrutural, e três ou mais metáfases com a perda de um mesmo cromossomo.

5.7 HIBRIDAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE

Núcleos interfásicos tumorais antes e depois do tratamento com *Pisosterol* foram hibridados com sonda única diretamente marcada para a região do gene **MYC** (8q24) da *Qbiogene* (PINKEL et al., 1986). As etapas da hibridação estão descritas de forma detalhada no Quadro 1.

A hibridação foi visualizada por microscópio de fluorescência **Olympus BX41** com filtro duplo FITC/TRICT e um sistema de captura e análise de imagem **Applied Spectral Imaging®**. Foram avaliados 200 núcleos por lâmina e os sinais conferidos de acordo com critérios preconizados por Hopman et al. (1981) para esta técnica.

Etapa	Centroméricas
Preparação da lâmina	- Lavagem em 2xSSC, TA^a, por 2'. - Desidratação em etanol 70%, 80% e 95% , TA^a, 2'cada. - Secagem ao ar livre.
Preparação da sonda	- Remoção do -20°C para TA^a, uniformizar. - 10 µL /test, sendo 3µL cada sonda + 7 µL solução de hibridação (Hibrizol).
Desnaturação	- Pré-aquecer lâmina a 37°C por 5'. - Aplicar 10 µL de sonda, 24 x 24 mm. - Selar com cimento rubber. - Amostra e sonda em placa quente à 75°C por 2'.
Hibridação	- De 1h até overnight, 37°C, em câmara úmida, sem luz.
Lavagem pós-hibridação	- Remover lamínula, tirar todo cimento. - Lavar lâmina em 0,25X SSC, 72°C, pH7, 2'sem agitar. - Lavar lâmina em 2X SSC/0,05% Tween 20, TA^a, pH 7, 30" sem agitar.
Contracoloração	- Aplicar 10 µL de DAPI/Antifade. - Aplicar lamínula, manter no escuro por 10'.

Quadro 3 - Etapas da Hibridação *in situ* Fluorescente

Fonte: Temperatura ambiente

A citotoxicidade das diferentes concentrações do Pisosterol foi analisada através do **índice mitótico (IM)**, que representa a proporção de células na fase de mitose do ciclo celular.

O **IM** é determinado pela contagem do número de metáfases em 2000 núcleos /cultura. O **IM** é calculado usando-se a seguinte fórmula:

$$IM = \frac{\text{Número de metáfases} \times 100}{\text{Número total de células neoplásicas}}$$

Os grupos controles negativos receberam a mesma quantidade de **DMSO** que as culturas tratadas com **Pisosterol**. Como controle positivo, utilizamos o agente citotóxico e mutagênico doxorubicina, na concentração de 0,01 µg/mL (DHAWAN et al., 2003).

6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O *teste t de Student* foi utilizado para comparar as frequências de alterações encontradas nas células expostas às diversas concentrações de **Pisosterol** em relação ao controle.

O *teste F (ANOVA)* foi utilizado para detectar diferenças significativas no valor do IM entre as células expostas às diversas concentrações de Pisosterol e seus respectivos controles.

O *teste do Chi-quadrado (χ^2)* foi utilizado para relacionar a distribuição dos resultados obtidos pelas duas variáveis empregadas na técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH).

Em todas as análises foi estabelecido em 5% o nível de significância.

7 RESULTADOS

7.1 ANÁLISE MORFOLÓGICA

As passagens das duas linhagens tumorais (U343 e AHOL1) apresentaram crescimento em camada única não organizado, semelhante a fibroblasto, com formação de focos (Imagem 13a, b), divisão heterogênea [bipolar e multipolar] e ciclo celular de aproximadamente 36 horas com confluência máxima de 72 horas. Após o tratamento com as três concentrações de Pisosterol, utilizadas neste estudo (0,5, 1,0 e 1,8 $\mu\text{g/ml}$), não foi detectada mudança na morfologia das células da linhagem (Imagem 13c, d).

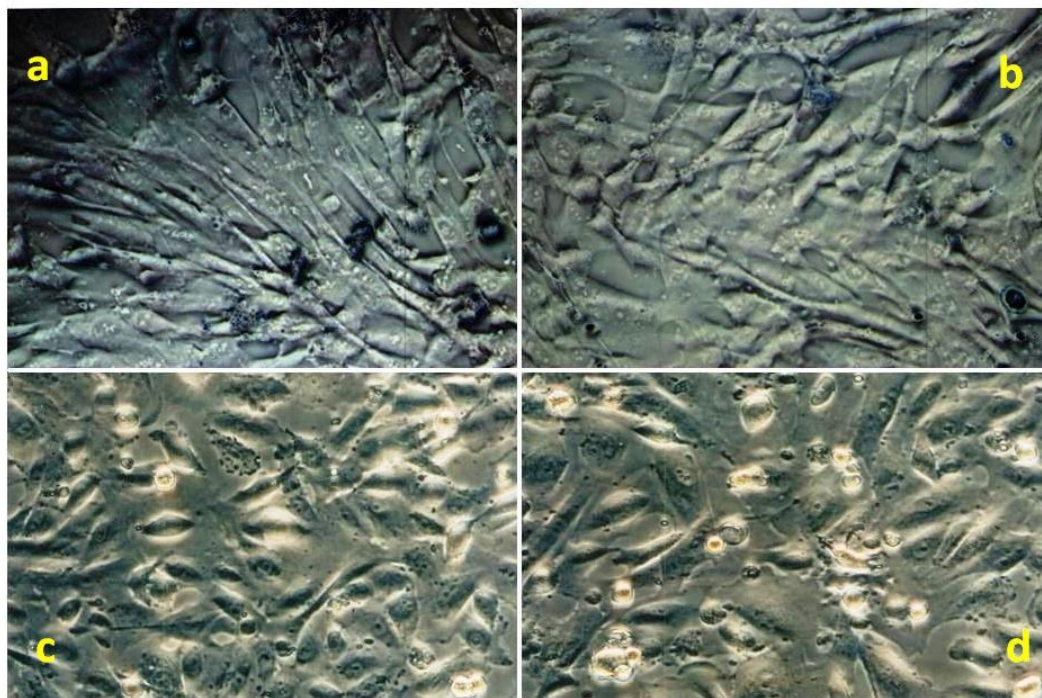


Imagem 13 - Linhagens celulares em cultura. Monocamadas com crescimento desorganizado e algumas aglomerações. Ausência de modificações morfológicas antes e após o tratamento com o Pisosterol

- a. Linhagem AHOL1 antes do tratamento com Pisosterol.
- b. Linhagem AHOL1 após tratamento com 1.8 $\mu\text{g/ml}$ pisoterol.
- c. Linhagem U343 antes do tratamento com pisoterol.
- d. Linhagem U343 após tratamento com 1.8 $\mu\text{g/ml}$ Pisosterol (Magnificação de 400X).

7.2 ANÁLISE CITOGENÉTICA CONVENCIONAL

7.2.1 Distribuição do número cromossômico

A análise do número modal revelou que a ploidia das linhagens é igual a $2n$ (diplóide). A análise da variação cromossômica das duas linhagens encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Distribuição do número cromossômico das linhagens AHOL1 e U343

Linhagens	U343	AHOL1
VNC¹	42 – 49	43 – 50
Haplóide 23-34 (%)	0%	0%
Diplóide 35-57 (%)	93%	97%
Triplóide 58-80 (%)	4%	2%
Tetraplóide 81-103	3%	1%
Número modal (NM)	44	44
Nº TMA²	30	30

Nota:

1 - Variação do Número cromossômico.

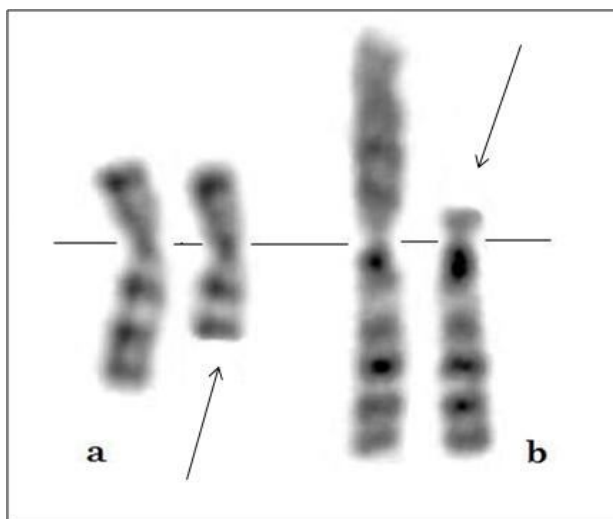
2- Número Total de Metáfases Analisadas por Bandamento GTG.

Após o tratamento com as três concentrações de Pisosterol, utilizadas neste estudo (0.5, 1.0 e 1.8 µg/ml), não foi detectada mudança na distribuição do número cromossômico das linhagens.

7.2.2 Bandamento GTG

Até a data do presente estudo, não foram encontrados relatos na literatura com descrições citogenéticas da linhagem celular U343-MG-a (U343). No presente trabalho foram analisadas 30 células por bandamento GTG e não foram encontradas alterações numéricas ou estruturais envolvendo o cromossomo 8 ou a região cromossômica 8q24, local onde encontra-se mapeado o gene *MYC*. As principais alterações encontradas nessa linhagem foram a deleção do braço longo do cromossomo 7 del(7) (q32), em 80 % das células (Imagem 14a) e as aneuploidias do cromossomo X e 1 em 90% das células.

Na linhagem celular AHOL1, após análise de 30 metáfases por bandamento GTG, e da mesma forma que a linhagem U343, não se encontrou alterações citogenéticas na região do gene *MYC* (8q24). As principais alterações cromossômicas foram a deleção do braço curto do cromossomo 1 del(1)(p21), em 100% das células (Imagem 14b), e as aneuploidias dos cromossomos X e Y, em 80% das células analisadas.



**Imagem 14 - Cariótipos parciais da linhagem U343(a)
e AHOL1(b)**

Nota: As setas indicam:

- a. Deleção do braço longo do cromossomo 7 del(7)(q32).
- b. Deleção do braço curto do cromossomo 1 del(1) (p21).

Após o tratamento com as três concentrações de Pisosterol, utilizadas neste estudo (0,5, 1,0 e 1,8 µg/ml), não detectamos aumento ou diminuição das alterações supracitadas. Novas alterações cromossômicas também não surgiram após o tratamento com esta substância.

7.3 ÍNDICE MITÓTICO

A citotoxicidade do Pisosterol foi testada pelo IM nas concentrações de 0,5, 1,0 e 1,8 µg/ml. Houve uma significativa diminuição do IM somente na concentração de 1,8 µg/ml (Tabela 2). Esta concentração corresponde ao DL50, isto é, a dose letal, neste caso a concentração de Pisosterol necessário para provocar a morte celular de 50% da população de células em estudo (MONTENEGRO et al., 2004).

Utilizou-se a concentração de 0,01 µg/ml de doxorubicina como controle positivo de citotoxicidade celular. Como controle negativo foi usado DMSO puro, na mesma quantidade na qual foi diluído o Pisosterol.

Tabela 2 - Índice Mitótico das culturas celulares das linhagens AHOL1 e U343, tratadas com três concentrações de Pisosterol ou 0,01µg/ml de doxorubicina

Tratamento*	Controle Negativo	Doxorubicina	0,5 µg/ml Pisosterol	1,0 µg/ml Pisosterol	1,8µg/ml Pisosterol
AHOL1	4,2±0,15	1,6**±0,1	3,8±0,21	2,9±0,17	1,4**±0,26
U343	3,7±0,21	1,4**±0,26	3,0±0,15	2,5±0,15	1,2**±0,1

Nota:

*Foram examinadas 2000 células/concentração.

** $P < 0.05$. *t*-test

7.4 HIBRIDAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE

Núcleos interfásicos das linhagens U343 e AHOL1 foram analisados por FISH, antes e após o tratamento com 0,5, 1,0 e 1,8 µg/mL de Pisosterol. Antes do tratamento (Imagem 15a), 65% e 72% das células das linhagens AHOL1 e U343, respectivamente, apresentaram mais de 2 alelos do gene *MYC*.

Após o tratamento com Pisosterol, nas concentrações de 0,5 ou de 1,0 µg/mL, não foi observada diferença estatisticamente significativa no número de células com mais de 2 alelos do gene *MYC*, em relação às células dessas duas linhagens antes do tratamento ($P > 0.05$) (Tabela 3). Porém na concentração de 1,8 µg/mL de Pisosterol, somente 15% e 33% das células das linhagens AHOL1 e U343, respectivamente, apresentaram mais de 2 alelos do gene *MYC* (Tabela 3), indicando uma diminuição, estatisticamente significativa, de células com alterações numéricas do *MYC* após o tratamento com 1,8 µg/mL de Pisosterol (Imagem

15.1b), do que antes do mesmo. Como controle negativo foram utilizados linfócitos do sangue periférico, 98,5 % destas células apresentaram duas marcações fluorescentes para o gene *MYC*.

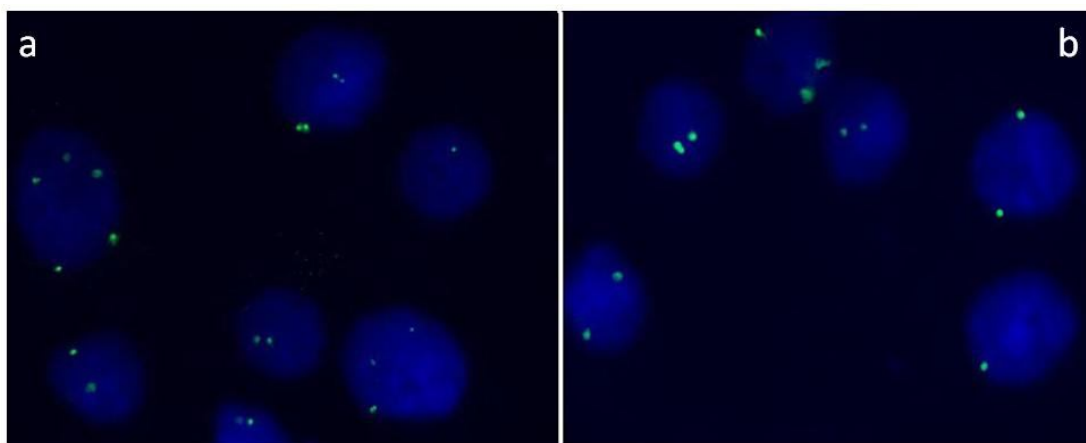


Imagem 15 - Células U343 submetidas à Hibridação *in situ* por Fluorescência

a: Antes do tratamento com Pisosterol (controle negativo). Os pontos verdes correspondem a alelos do gene *MYC*.

b. Após o tratamento com Pisosterol: redução do número de alelos do gene *MYC*.

Tabela 3 - Células das linhagens U343 e AHOL1 submetidas à Hibridação *in situ* Fluorescente para o gene *MYC* antes e após tratamento com três concentrações de Pisosterol

Grupos	Concentração (µg/mL)	Controle Negativo ^a					AHOL1					U343				
		Número de sinais / % de núcleos					Número de sinais / % de núcleos					Número de sinais / % de núcleos				
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Sem tratamento	–	1	98,5	0,5	–	–	0,5	34,5	39,5	24,5	1	0,5	27,5	45	23	4
Pisosterol	0.5	-	-	-	-	-	0	35,5	38	23	3,5	0	28,5	42	24	5,5
	1.0	-	-	-	-	-	0,5	39,5	39	19	2	0,5	33,5	49	15	2
	1.8*	-	-	-	-	-	0,5	84,5	7	8	0	1,5	65,5	25	8	0

Nota:

^a Linfócitos não tratados.

* $P < 0.05$, teste de qui-quadrado.

8 DISCUSSÃO

A caracterização de linhagens celulares é importante para a compreensão da biologia das células neoplásicas e para o desenvolvimento de novas estratégias contra o crescimento e a progressão de células cancerígenas (HU et al., 2000).

Apesar da alta incidência de gliomas, existem relativamente poucas linhagens celulares dessa neoplasia disponíveis para estudo. A dificuldade técnica na manipulação e no cultivo de amostras de tumores cerebrais pode refletir o modesto número de linhagens na literatura, comparado ao de outras linhagens, como por exemplo, do câncer colo-retal (ALTANER, 2008).

Neste trabalho foi utilizado como substrato de análise duas linhagens astrocíticas, a U343 (KHACHIGIAN et al., 1991) e a AHOL1, esta última desenvolvida pelos grupos de pesquisa a partir de um glioblastoma multiforme (astrocitoma grau IV). Até a presente data, não foram encontradas referências sobre a constituição cariotípica destas duas linhagens.

As passagens das duas linhagens tumorais (U343 e AHOL1) apresentaram morfologia semelhante, com crescimento em camada única, não organizada e formação de focos. A divisão celular é heterogênea e o ciclo celular é de aproximadamente 36 horas. Estas características em comum, das linhagens AHOL1 e U343, sendo consequência da sua origem em comum, a partir de um mesmo tipo histológico de tumor.

O tratamento com as três concentrações de Pisosterol, utilizadas neste estudo (0,5, 1,0 e 1,8 $\mu\text{g/ml}$), não alterou a morfologia das células em ambas as linhagens. Esta observação é um indicativo de que o Pisosterol não induz a diferenciação de células de astrocitoma, ao contrário do que é observado na linhagem HL60, onde o Pisosterol diferencia as células transformadas dessa linhagem em monócitos (MONTENEGRO et al., 2007). Tratamentos com concentrações superiores a 1,8 $\mu\text{g/mL}$ não tiveram sucesso, visto que o Pisosterol apresentou citotoxicidade incompatível com o tipo de análise deste trabalho.

A toxicidade do Pisosterol, nas mesmas concentrações do presente trabalho (0,5, 1,0, 1,8 $\mu\text{g/mL}$), foi avaliada anteriormente através do cálculo do MI na linhagem leucêmica HL60 (BURBANO et al., 2008b). Constata-se, no estudo atual, que houve uma significativa diminuição deste índice no tratamento com 1,8 $\mu\text{g/mL}$ de Pisosterol, de aproximadamente 50%, em comparação com o controle negativo. O controle positivo (0,01 $\mu\text{g/mL}$ de doxorubicina) apresentou um índice mitótico com valor similar ao encontrado no tratamento com 1,8 $\mu\text{g/mL}$ de Pisosterol. Não houve decréscimo do IM nas concentrações de 0,5 e 1,0

µg/mL de Pisosterol.

Nas linhagens U343 e AHOL1, como no experimento realizado na linhagem HL60, também houve uma significativa redução do IM, somente na concentração de 1,8 µg/ml (Tabela 2). Ao compararmos o IM dessas três linhagens, tanto para os controles negativos e positivos, como para o tratamento com diferentes concentrações de Pisosterol, não encontramos diferença significativa ($P > 0,05$). Os nossos resultados confirmam os de Montenegro et al. (2004), que determinaram em sete linhagens celulares neoplásicas, inclusive na linhagem HL60, que a concentração de 1,8 µg/ml de Pisosterol corresponde ao DL50 (Dose Letal). Em conjunto, esses resultados indicam que o Pisosterol possui, efetivamente, atividade antiproliferativa sobre células neoplásicas de gliomas.

A análise do número modal revelou que a ploidia das linhagens U343 e AHOL1 é diplóide ($2n$). Através de citometria de fluxo, foi verificado que cinco linhagens de astrocitomas apresentavam distribuições diferentes do seu número cromossômico, porém a maioria das células se encontrava na faixa diplóide. Os gliomas humanos, de forma geral, apresentam constituição cromossômica na faixa diploide (35-57 cromossomos por célula) ou na faixa triploide (58-80 cromossomos por célula). (SHITARA, 1983)

Estudos *in vitro* sugerem uma correlação entre o fenótipo celular e o padrão cariotípico das células de gliomas. Shapiro e Shapiro (1985) revelaram que células diplóides, provenientes de gliomas, são mais viáveis em cultura que células triploides, além de apresentarem resistência às nitrosoureas. Os autores sugerem, que as culturas com células tumorais diplóides de glioma devem apresentar na sua população células tronco tumorais, o que explicaria a sua vantagem adaptativa *in vitro*, em relação aos tumores de constituição triploide.

Para Bigner et al. (1985), a alta proporção de gliomas na faixa diplóide é um indicativo de que tumores que apresentam número cromossômico modal entre 35-57 podem ser catalogados como de alto grau de malignidade biológica. Segundo esses autores, a diploidia dos gliomas não estaria necessariamente relacionada com a ausência de aberrações do DNA nuclear, pelo contrário, anormalidades numéricas e estruturais são freqüentes, como constatados no presente estudo.

As principais alterações encontradas na linhagem U343 foram a deleção do braço longo do cromossomo 7 del(7)(q32), e as aneuploidias do cromossomo X e 1 em 90% das células. Adicionalmente, na linhagem celular AHOL1, as principais alterações cromossômicas foram a deleção do braço curto do cromossomo 1 del(1)(p21), em 100% das células, e as aneuploidias dos cromossomos X e Y, em 80% das células analisadas.

As alterações acima citadas já foram descritas em astrocitomas primários, o que confirma a origem histológica das linhagens U343 e AHOL1. Nenhuma dessas linhagens tem sua caracterização cariotípica descrita na literatura. Podemos inferir que tumores primários que apresentem estas aberrações podem ser caracterizados como de alto grau de malignidade. É possível também que estas alterações tenham surgido durante a fase de imortalização da célula tumoral *in vitro*.

Uma forma de investigar o papel das alterações cromossômicas, encontradas nas linhagens U343 e AHOL1, seria cariotipar astrocitomas de baixo grau de malignidade. Se for constatada a presença de alguma das alterações numéricas (nos cromossomos X, Y e 1) ou estruturais (deleções do braço curto do cromossomo 1 e braço longo do cromossomo 7) encontradas nas linhagens U343 ou AHOL1, nesses tumores, poderíamos identificar um marcador etiológico da malignidade astrocítica. Por outro lado, a possível ausência dessas alterações cromossômicas, em astrocitomas de baixo grau de malignidade, identificaria marcadores associados somente a processo de malignização celular.

Após o tratamento com as três concentrações de Pisosterol, utilizadas neste estudo (0,5, 1,0 e 1,8 µg/ml), não detectamos aumento ou diminuição da frequência das alterações encontradas nas linhagens antes dos tratamentos. Novas alterações cromossômicas também não surgiram após o tratamento com essa substância. Esta última observação é um indicativo de que o Pisosterol não apresenta efeito clastogênico (substância que causa quebra cromossômica) e/ou aneugênico (substância que pode levar à aneuploidia). A ausência desses efeitos também foi observada quando se utilizou as mesmas concentrações de Pisosterol em células da linhagem HL60 (BURBANO et al., 2008b).

Entre os marcadores presentes no cariótipo celular da linhagem HL60, o cromossomo 8 apresenta as regiões homogeneamente coradas (HSRs). Este rearranjo envolve a região cromossômica onde está mapeado o proto-oncogene *MYC* (MISAWA et al., 1987). HSRs são anormalidades intracromossômicas, onde regiões do cromossomo, que apresentam amplificação gênica, são coradas de maneira uniforme, diferente do padrão característico de bandamento GTG. Proto-oncogenes amplificados podem ser localizados na estrutura do cromossomo, nas HSRs, ou extracromossomicamente, como elementos sub-microscópicos denominados de episomos ou como microcromossomos denominados de *double minutes* (DMs) (CARROLL et al., 1988; VON HOFF et al., 1990).

Nas células das linhagens U343 e AHOL1 não foram detectados HSRs ou DMs, embora Bacciocchi et al. (1992) descreveram, em duas linhagens de glioblastoma multiforme, a presença de DMs com concomitante amplificação do gene *MYC*.

O câncer surge quando clones de células mutadas sobrevivem e proliferam inapropriadamente, desequilibrando a balança entre crescimento celular, proliferação, apoptose e diferenciação terminal. Os genes que tem uma função crucial na regulação do ciclo celular são alvos dos estudos em câncer (KNOEPFLER, 2007). Na proliferação celular, a proteína MYC é um importante fator de transcrição e embora os mecanismos não estejam totalmente esclarecidos, é conhecido o seu envolvimento na progressão do ciclo celular da fase G1 para a fase S (BERNARD, 2006). Esse gene codifica um fator de transcrição que regula a expressão de aproximadamente 15% de todos os genes (GEARHART, 2007).

No presente trabalho, núcleos interfásicos das linhagens U343 e AHOL1 foram analisados por FISH para o gene *MYC*, antes e após o tratamento com 0,5, 1,0 e 1,8 µg/mL de Pisosterol. Antes do tratamento, 65% e 72% das células das linhagens AHOL1 e U343, respectivamente, apresentaram mais de 2 alelos do gene *MYC*. Após o tratamento com Pisosterol, nas concentrações de 0,5 ou de 1,0 µg/mL, não foi observada diferença significativa no número de células com mais de 2 alelos do gene *MYC*, em relação às células dessas duas linhagens antes do tratamento ($P > 0.05$). Porém na concentração de 1.8 µg/mL de Pisosterol, somente 15% e 33% das células das linhagens AHOL1 e U343, respectivamente, apresentaram mais de 2 alelos do gene *MYC* (Tabela 3), indicando uma diminuição, estatisticamente significativa, de células com alterações numéricas do *MYC* após o tratamento com 1.8 µg/mL de Pisosterol, do que antes do mesmo.

A diminuição do número de células com cópias extras do gene *MYC*, provavelmente se deva a alguma propriedade do Pisosterol que bloqueia células com excesso de proteína MYC, antes da fase S do ciclo celular. Nesta hipótese, as células que não apresentaram mais de dois alelos desse gene, 35% e 28% das células das linhagens AHOL1 e U343, respectivamente, conseguiriam suportar a citotoxicidade do Pisosterol e continuar no ciclo celular.

Um dos propósitos dos estudos moleculares em neuro-oncologia é estabelecer uma relação entre parâmetros histopatológicos e alterações moleculares, as quais podem ser usadas como marcadores da progressão tumoral e alvos para a terapia (NAKAMURA et al., 2007; COLLINS, 2007). Nossos resultados, de forma semelhante ao da literatura, sugerem que o gene *MYC* é um alvo promissor, em tumores astrocíticos por ter um papel crítico na proliferação celular, crescimento e apoptose (SEARS; NEVINS 2002; FARIA et al., 2006).

Nossa hipótese é reforçada por outro trabalho do nosso grupo de pesquisa, que detectou a expressão da proteína MYC em 65% de 140 tumores astrocíticos humanos, de

diferentes graus histológicos. As análises por FISH destes espécimes revelaram que essa expressão é consequência de amplificação gênica do MYC (FARIA et al., 2008). Evidências da amplificação do gene *MYC*, em astrocitomas, foram previamente apresentadas por Trent et al. (1986) em cultura de células proveniente de um paciente com glioblastoma. Adicionalmente, a amplificação da região 8q24, onde o gene *MYC* está mapeado, foi observado em astrocitomas pela análise da Hibridação Genômica Comparativa (CGH) (MULERIS et al., 1994; WEBER et al., 1996; MOHAPATRA et al., 1998; NISHIZAKI et al., 1998; RIED et al., 1999; KOSCHNY et al. 2002). Os resultados sugerem que a amplificação do gene *MYC* deve ser considerada um evento crítico da tumorigênese dos astrocitomas.

Desde que o desenvolvimento do câncer resulta de uma série de alterações consecutivas, células com amplificação do gene *MYC* podem ser selecionadas, levando a expansão de um clone particular. A habilidade do gene *MYC* para promover a proliferação celular, faz com que sua amplificação provoque instabilidade genômica (WADE; WAHL 2006). De fato, a estimulação exacerbada da proliferação celular é mutagênica, em tal caso, a expressão de *MYC* colabora com a tumorigênese por promover o acúmulo de mutações secundárias e/ou por desestabilizar os mecanismos de *checkpoint*, que controla o número cromossômico e a ploidia (LUTZ et al., 2002).

O aumento do número de alelos do gene *MYC* nas neoplasias humanas está correlacionado com prognóstico negativo da patologia (ECKHARDT et al., 1994; CALCAGNO et al., 2006). Podemos concluir que o Pisosterol apresenta um importante potencial anti-cancer, visto que diminui significativamente o número de células com cópias extras do gene *MYC*, as células que não apresentaram mais de dois alelos desse gene, não são atingidas pelo tratamento com esse triterpeno e continuam proliferando. Células neoplásicas sem anormalidades numéricas do gene *MYC* apresentam comportamento menos agressivo e invasivo (BURBANO et al., 2008) e seriam, portanto, alvos mais desejáveis para a quimioterapia (FEGAN et al., 1995). Desta forma, o Pisosterol pode ser utilizado no futuro em combinação com o tratamento convencional contra o câncer cerebral.

9 CONCLUSÃO

O tratamento com Pisosterol não alterou a morfologia das células das linhagens U343 e AHOL1, o que sugere que este triterpeno não induz a diferenciação de células de astrocitoma.

As linhagens U343 e AHOL1 são diplóides semelhante a maioria de gliomas humanos descritos na literatura. As principais alterações encontradas nas linhagens U343 e AHOL1 foram as deleção del(7)(q32) e del(1)(p21), respectivamente. Concluimos que tumores primários que apresentem estas aberrações podem ser caracterizados como de alto grau de malignidade.

O Pisosterol apresenta um importante potencial anti-cancer, visto que diminui significativamente o número células com cópias extras do gene MYC, provavelmente porque este triterpeno bloqueie essas células, com excesso de proteína MYC, antes da fase S do ciclo celular.

As células que não apresentaram mais de dois alelos desse gene, antes do tratamento, suportam a citotoxicidade do Pisosterol e seguem continuamente o ciclo celular.

Visto que células neoplásicas sem anormalidades numéricas do gene MYC apresentam comportamento menos agressivo e invasivo e são alvos mais fáceis para a quimioterapia, concluímos que o Pisosterol pode ser utilizado no futuro em combinação com o tratamento convencional contra o câncer cerebral, sugerindo-se estudos adicionais *in vivo* em cobaias para confirmar os achados do presente estudo.

REFERÊNCIAS

- ABE, I. Enzymatic synthesis of cyclic triterpenes. **Nat Prod Rep**, v. 24, n. 6, p. 1311-1331, 2007.
- ADAM, D. Chemical released by trees can help cool planet. **Guardian.co.uk**. Friday 31 Oct. 2008. Disponível em: <<http://www.guardian.co.uk/>>. Acesso em: 23 out. 2009.
- ADHIKARY, M. J. et al. Differential effects of the widely expressed dMax splice variant of Max on E-box vs initiator element-mediated regulation by MYC". **Oncogene (England)**, v. 18, n. 15, p. 2489-2498, 1999.
- AL-HAJJ, M. et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. **Proc Natl Acad Sci USA**, n. 100, p. 3983-3988, 2003.
- ALTANER, C. Glioblastoma and stem cells. **Neoplasia**, v. 55, n. 5, p. 369-374, 2008.
- ALTMAN, J. et al. Postnatal neurogenesis in the caudate nucleus and nucleus accumbens septi in the rat. **Brain Res**, v.21, n.1, p.122-127, 1970
- ALVAREZ-BUYLLA, A. et al. Neuronal stem cells in the brain of adult vertebrates. **Stem Cells**, v. 13, n. 3, p. 263-272, 1995.
- ANAN'EVA II. et al. Glia tumors of the brain: current aspects of the immunopathogenesis and immunogenodiagnosis. **Arkh Patol**, v. 69, n. 2, p. 53-57, 2007.
- ATLAS, S. W. Adult supratentorial tumors. **Semin Roentgenol**, v. 25, n. 2, p. 130-154, 1990.
- AZEVEDO, F. A. et al. Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. **J. Comp. Neurol**, v. 513, n. 5, p. 532-541, 2009.
- BACCIOCCHI, G. et al. Establishment and characterization of two cell lines derived from human glioblastoma multiforme. **Anticancer Res**, v. 12, n. 3, p. 853-861, may/jun. 1992.
- BALBANI, A. P. et al. Patents of drugs extracted from Brazilian medicinal plants. **Expert Opin Ther Pat**, v. 19, n. 4, p. 461-473, 2009.
- BAUCHET, L. Epidemiology and classification of gliomas. **Soins**, n. 733, p. 24-25, 2009.
- BAUMERT, A. et al. Triterpenoids from *Pisolithus tinctorius* isolates and ectomycorrhizas. **Phytochemistry**, v. 45, n. 3, p. 499-504, 1997.
- BERNARD S., EILERS M.: Control of cell proliferation and growth by Myc proteins. **Results Probl Cell Differ.** v.42,p.329-342
- BIGNER, S. H. et al. DNA content and chromosomal composition of malignant human gliomas. **Neurol Clin**, v. 3, n. 4, p. 769-84, nov. 1985.
- BINDER, M. et al. Molecular systematics and biological diversification of Boletales. **Mycologia**, v. 98, n. 6, p. 971-981, 2006.

BLACKBURN, E. H. Telomeres: structure and synthesis. **J Biol Chem**, v. 265, n. 11, p. 5919-5921, 1990.

BLOCK, M. L. et al. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. **Nature**, v. 8, p. 57-59, 2007.

BRANDES, A. A. et al. Glioblastoma in adults. **Hematol Oncol Crit Rev**, v. 67, n. 2, p. 139-52, 2008.

BROCKMANN, M. A. et al. Glioblastoma and cerebral microvascular endothelial cell migration in response to tumor-associated growth factors. **Neurosurgery**, v. 52, n. 6, p. 1391-1399, 2003.

BURBANO, R. R. et al. MYC amplification and expression in astrocytic tumors. **Acta Neuropathol**, v. 116, n. 1, p. 87-95, 2008a.

BURBANO, R. R. et al. Cell cycle arrest induced by Pisosterol in HL60 cells with gene amplification. **Cell Biol Toxicol**, v. 25, n. 3, p. 245-251, 2008b.

CALCAGNO, D. Q. et al. Interrelationship between chromosome 8 aneuploidy, MYC amplification and increased expression in individuals from northern Brazil with gastric adenocarcinoma. **World J Gastroenterol**, n. 12, p. 6207-6211, 2006.

CALCAGNO, D. Q. et al. MYC and gastric adenocarcinoma carcinogenesis. **World J. Gastroenterol**, v. 14, n. 39, p. 5962-5968, 2008b.

Carrasco-González, A. et al. Neuronal tumors: gangliocytoma. **Rev. Neurol**, v. 46, n. 3, p. 155-159, 2008.

CARROLL, S. M. et al. Double minute chromosomes can be produced from precursors derived from a chromosomal deletion. **Molecular and cellular biology**, n. 8, p. 1525-1533, 1988.

CENTRAL BRAIN TUMOR REGISTRY OF THE UNITED STATES. annual report: primary brain tumors in the United States 1998-2002. Disponível em: <<http://www.cbtrus.org/>>. Acesso em: 13 jun. 2009.

CHANDANA, S. R. et al. Primary Brain Tumors in Adults. **Am Fam Physician**, v. 15 77, n. 10, p. 1423-1430, 2008.

CIEMERYCH, M. A. et al. Development of mice expressing a single D-type cyclin. **Genes Dev**, v. 16, n. 24, p. 3277-3289, 2002.

COLLINS, V. P. Gene amplification in human gliomas. **Glia**, v. 15, n. 3, p. 289-296, 1995.

COLLINS, V. P. Mechanisms of disease, genetic predictors of response to treatment in brain tumors. **Nat. Clin. Pract. Oncol**, n. 4, p. 362-374, 2007.

DAVIS, F. G. et al. Prevalence estimates for primary brain tumors in the United States by behavior and major histology groups. **Neuro Oncol**, n. 3, p. 152-158, 2001.

DEMAIN, A. L. The beta-lactam antibiotics: past, present, and future. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 75, n. 1-2, p. 5-19, 1999.

DEMUTH, T. et al. Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion. **J Neurooncol**, v. 70, n. 2, p. 217-228, 2004.

DENNIS, T. et al. Natural products for chemopreventive and adjunctive therapy in oncologic disease. **Nut Cancer**, v. 61, n. 5, p. 587-597, 2009.

DHAWAN, A. et al. Aneugenic and clastogenic effects of doxorubicin in human lymphocytes. **Mutagenesis**, v. 18, n. 6, p. 487-490, 2003.

D'HAENE, N. et al. Leptomeningeal dissemination of low-grade intramedullary gliomas: about one case and review. **Clin Neurol Neurosurg**, v. 111, n. 4, p. 390-394, 2009.

DIRKS, P. B., et al. Retinoic acid and the cyclin dependent kinase inhibitors synergistically alter proliferation and morphology of U343 astrocytoma cells. **Oncogene**, v. 15, p. 2037-2048, 1997.

DOETSCH, F. et al. Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 96, n. 20, p. 11619-11624, 1999.

DONADIO, S. et al. Microbial technologies for the discovery of novel bioactive metabolites. **J Biotechnol**, v. 99, n. 3, p. 187-198, 2002.

DUPONT, S. Epilepsy and brain tumors. **Rev Neurol (Paris)**, v. 164, n. 6-7, p. 517-522, 2008.

DURAN, I. et al. Low-grade gliomas: management issues. **Expert Rev Anticancer Ther**, v. 7, n. 12, p. S15-21, 2007. Suppl.

ECKHARDT, S.G. et al. Induction of differentiation in HL60 cells by the reduction of extrachromosomally amplified MYC. **Proc Natl Acad Sci USA**, n. 91, p. 6674-6678, 1994.

EILERS, M. Control of cell proliferation by Myc family genes. **Mol Cells**, v. 9, n. 1, p. 1-69, 1999.

FARIA, M. H. et al. c -MYC amplification and expression in astrocytic tumors. **Acta Neuropathol**, v. 116, n. 1, p. 87-95, 2008.

FARIA, M. H. et al. Expression of Ki-67, topoisomerase IIalpha and MYC in astrocytic tumors: correlation with the histopathological grade and proliferative status. **Neuropathology**, n. 26, p. 519-527, 2006.

FLÜGEL, A. et al. Microglia only weakly present glioma antigen to cytotoxic T cells. **Int J Dev Neurosci**, v. 17, n. 5-6, p. 547-556, 1999.

FLYNN, J. R. et al. Hypoxia-regulated protein expression, patient characteristics, and preoperative imaging predictors of survival in adults with glioblastoma multiforme. **Cancer**, v. 113, n. 5, p. 1032-1042, 2008.

FRANKS, L. M. et al. Neuroblastoma in adults and adolescents: an indolent course with poor survival. **Cancer**, v. 79, n. 10, p. 2028-2035, 1997.

FRENEL, J. S. et al. Prognostic and predictive factors for gliomas in adults. **Bull Cancer (Tokyo)**, v. 96, n. 4, p. 357-367, 2009.

FRIEDMAN, H.S. DNA mismatch repair and O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase analysis and response to Temodal in newly diagnosed malignant glioma. **J Clin Oncol**, v. 16, n. 12, p. 3851-3857, 1998.

FULLER, G. N. et al. Amplified cellular oncogenes in neoplasm of the human central nervous system. **Mutat Res**, v. 276, n. 3, p. 299-306, 1992.

FULTON, D. S. et al. Increased radiation dose intensity using hyperfractionation in patients with malignant glioma. Final report of a prospective phase I-II dose response study. **J Neurooncol**, v. 14, n. 1, p. 63-72, 1992.

GALLI, R. et al. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. **Cancer Res**, n. 64, p. 7011-7021, 2004.

GAUTSCHI, O. P. et al. Fluorescence guided resection of malignant brain tumors – breakthrough in the surgery of brain tumors. **Praxis (Bern 1994)**, v. 98, n. 12, p. 643-647, 2009.

GEARHART, J. Pluripotency Redux – advances in stem-cell research. **N Engl J Med**, v. 357, n. 315, p. 1469, 2007.

GERANMAYEH, F. et al. Microglia in gemistocytic astrocytomas. **Neurosurgery**, v. 60, n. 1, p. 159-166, 2007.

GHASHGHAEI, H. T. et al. Neuronal migration in the adult brain: are we there yet?. **Nature Reviews:Neuroscience**, n. 8, p. 141-151, 2007.

GILBERT, M. R. et al. Management of patients with low-grade gliomas. **Neurol Clin**, v. 25, n. 4, p. 1073-1078, 2007.

GILL, M. et al. The structure and absolute stereochemistry of Pisosterol, the principal triterpenoid from fruitbodies of the fungus *Pisolithus tinctorius*. **Aust J Chem**, n. 42, p. 995-1001, 1989.

GOMES-LEAL, W. Neurogênese no cérebro adulto: a morte de um dogma e o sonho de Cajal. **Neurociências**, n. 5, v. 1, p. 1-56, 2009.

GRAEBER, M. B. et al. Microglia in brain tumors. **Glia**, v. 40, n. 2, p. 252-259, 2002.

GRANDORI, C. et al. The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol**, n. 16, p. 653-699, 2001.

HARALAMPIDIS, K. Biosynthesis of triterpenoid saponins in plants. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol**, n. 75, p. 31-49, 2002.

- HARRY, G. J. et al. Neuroinflammation and microglia: considerations and approaches for neurotoxicity assessment. **Expert Opin Drug Metab Toxicol**, v. 4, n. 10, p. 1265-1277, oct. 2008.
- HART, M. G. et al. Temozolomide for high grade glioma. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 8, n. 4, p. CCD007415, oct. 2008.
- HAWKINS, B.T., DAVIS, T.P.: The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. **Pharmacol Rev**. v. 57, n.2, p.173-185. 2005.
- HAWKSWORTH, D. L. Fungi and biodiversity: international incentives. **Microbiologia**, v. 13, n. 2, p. 221-226, 1997.
- HEGI, M. E. et al. Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. **J Clin Oncol**, v. 26, n. 25, p. 4189-4199, 2008.
- HERMS, J. W. et al. MYC oncogene family expression in glioblastoma and survival. **Surg Neurol**, v. 51, n. 5, p. 536-542, 1999.
- HO, C. Y. et al. Differential anti-tumor activity of coriolus versicolor (Yunzhi) extract through p53-and/or Bcl-2-dependent apoptotic pathway in human breast cancer cells. **Cancer Biol Ther**, v. 4, n. 6, p. 638-644, 2005.
- HOCHBERG, F. H. et al. Assumptions in the radiotherapy of glioblastoma. **Neurology**, v. 30, n. 9, p. 907-911, 1980.
- HOELZINGER, D.B. et al. Autocrine factors that sustain glioma invasion and paracrine biology in the brain microenvironment. **J Nat Cancer Inst**, n. 99, p. 1583-1593, 2007.
- HOLLAND, E. C. et al. Astrocytes give rise to oligodendrogliomas and astrocytomas after gene transfer of polyoma virus middle T antigen in vivo. **Am J Pathol**, v. 157, n. 3, p. 1031-1037, 2000.
- HOPMAN, A. H. et al. In situ hybridization as a tool to study numerical chromosome aberrations in solid bladder tumors. **Histochemistry**, v. 89, n. 4, p. 307-316, 1988.
- HOU, L. C. et al. Congenital glioblastoma multiforme: case report and review of the literature. **Pediatr Neurosurg**, v. 44, n. 4, p. 304-312, 2008.
- HU, Y. et al. Establishment and characterization of HKESC-1, a new cancer cell line from human esophageal squamous cell carcinoma. **Cancer Genet Cytogenet**, n. 118, p. 112-120, 2000.
- HIYAMA, H. et al. Role for cyclin D1 in UVC-induced and p53-mediated apoptosis. **Cell Death Differ**, v. 6, n. 6, p. 565-569, 1999.
- IARC-WHO, órgão da Organização Mundial de Saúde (OMS). Disponível em: <<http://www-dep.iarc.fr/>>. Acesso em: 30 ago. 2009.
- IDOWU, O. E. Glial Brain Tumors. **Neuroepidemiology**, n. 31, p. 270, 2008.

- IGNATOVA, T. N. et al. Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. **Glia**, n. 39, p. 193-206, 2002.
- IKEDA, T. et al. Anti-herpes virus type 1 activity of oleanane-type triterpenoids. **Biol Pharm Bull**, v. 28, n. 9, p. 1779-1781, 2005.
- JACKSON, E. L. et al. Characterization of adult neural stem cells and their relation to brain tumors. **Cells Tissues Organs**, v. 188, n. 1-2, p. 212-224, 2008.
- JAIN, R. K. et al. Angiogenesis in brain tumors. **Nat Rev Neurosci**, v. 8, n. 8, p. 610-622, 2007.
- JOHANNENSSSEN, A. L. et al. The Clinical Value of Ki-67/MIB-1 Labeling Index in Human Astrocytomas. **Pathol Oncol Res**, v. 12, n. 3, p. 143-147, 2006.
- KAPLAN, M. S. Neurogenesis in the 3-month-old rat visual cortex. **J Comp Neurol**, v. 195, n. 2, p. 323-338, 1981.
- KAUR, C. et al. From blood to brain: amoeboid microglial cell, a nascent macrophage and its functions in the developing brain. **Acta Pharmacol Sin**, v. 28, n. 8, p. 1087-1096, 2007.
- KERPPOLA, T. K. et al. Intrinsic sites of transcription termination and pausing in the MYC gene. **Mol Cell Biol**, v. 8, n. 10, p. 4389-4394, 1988.
- KHACHIGIAN, L. M. et al. A crossreactive antipeptide monoclonal antibody with specificity for lysyl-lysine. **J Immunol Methods**, v. 140, n. 2, p. 249-258, jul. 1991.
- KIDD, P. M. The use of mushroom glucans and proteoglycans in cancer treatment. **Altern Med Rev**, v. 5, n. 1, p. 4-27, 2000.
- KINGSTON, D. G. et al. Natural products as drug leads: an old process or the new hope for drug discovery?. **IDrugs**, v. 8, n. 12, p. 990-992, 2005.
- KLEIHUES, P. et al. World Health Organization classification of tumors. **Cancer**, v. 88, n. 12, p. 2887, 2000.
- KNOEPFLER, P. S. Myc goes global, new tricks for an old oncogene. **Cancer Res**, n. 67, p. 5061-5063, 2007.
- KOMOHARA, Y. Possible involvement of the M2 anti-inflammatory macrophage phenotype in growth of human gliomas. **J Pathol**, v. 216, n. 1, p. 15-24, 2008.
- KOOT, R. W. et al. Brachytherapy: Results of two different therapy strategies for patients with primary glioblastoma multiforme. **Cancer**, v. 88, n. 12, p. 2796-2802, 2000.
- KOPE, H. H., et al. p-Hydroxybenzoylformic acid and (R)-(-)-p-hydroxymandelic acid, two antifungal compounds isolated from the liquid culture of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus arhizus*. **Can J Microbiol**, v. 37, n. 4, p. 258-264, 1991.
- KOSCHNY, R. et al. Comparative genomic hybridization in glioma: a meta-analysis of 509 cases. **Cancer Genet. Cytogenet**, n. 135, p. 147-159, 2002.

- KÖSEL, S. et al. Genotype-phenotype correlation in gemistocytic astrocytomas. **Neurosurgery**, v. 48, n. 1, p. 187-193, 2001.
- KREUTZBERG, G. W. Microglia, the first line of defence in brain pathologies. **Arzneimittelforschung**, v. 45, n. 3A, p. 357-360, 1995.
- KREX, D. et al. Long-term survival with glioblastoma multiforme. **Brain**, v. 130, n. 10, p. 2596-25606, 2007.
- KUZUYAMA, T. Mevalonate and nonmevalonate pathways for the biosynthesis units. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 66, n. 8, p. 1619-1627, 2002.
- LAIGLE-DONADEY, F. et al. Association of radiotherapy and chemotherapy-targeted therapies in glioblastomas. **Bull Cancer**, v. 96, n. 3, p. 291-297, 2009.
- LARJAVAARA, S. et al. Incidence of gliomas by anatomic location. **Neuro Oncol**, v. 9, n. 3, p. 319-325, 2007.
- LARSEN, C. C. et al. Total number of cells in the human newborn telencephalic wall. **Neuroscience**, v. 139, n. 3, p. 999-1003, 2006.
- LATCHMAN, D. S. Transcription factors: an overview. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 29, n. 12, p. 1305-1312, 1997.
- LEE, E. L. et al. Increased intracranial pressure. **Clin J Oncol Nurs**, v.12, n. 1, p. 37-41, 2008.
- LEBEDEV, S.V., et al. The translocation of macromolecules via the hematoencephalic barrier. **Vestn Ross Akad Med Nauk**, v.6, p.37-49, 2007.
- LESZCZYŃIECKA, M. et al. Differentiation therapy of human cancer: basic science and clinical applications. **Pharmacol Ther**, v. 90, n. 2-3, p. 105-156, 2001.
- LI, C. H. et al. Ganoderic acid X, a lanostanoid triterpene, inhibits topoisomerases and induces apoptosis of cancer cells. **Life Sci**, v. 77, n. 3, p. 252-265, 2005.
- LI, F. P.; FRAUMENI, J. R. J. F. Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? **Ann Intern Med**, v. 71, n. 747-752, 1969.
- LI, M. Y. et al. Natural products from semi-mangrove flora: source, chemistry and bioactivities. **Nat Prod Rep**, v. 26, n. 2, p. 281-298, 2009.
- LI, Y. J. et al. Incidence of germ-line p53 mutations in patients with gliomas. **Int J Cancer**, n. 64, p. 383-387, 1995.
- LINS, K. O. et al. Antitumor properties of a sulfated polysaccharide from the red seaweed *Champia feldmannii* (Diaz-Pifferer). **J Appl Toxicol**, v. 29, n. 1, p. 20-26, 2009.
- LOUIS, D. N. et al. The 2007 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System. **Acta Neuropathol**, n. 114, p. 97-109, 2007.

- LUTZ, W. et al. Contributions of Myc to tumorigenesis. **Biochim Biophys Acta**, n. 1602, p. 61-71, 2002.
- LUYENGI, L. et al. A lignin and four terpenoids from *Brucea javanica* that induce differentiation with cultured HL-60 promyelocytic leukemia cells. **Phytochemistry**, v. 43, n. 2, p. 409-412, 1996.
- MCCARTHY, B. J. et al. A Case for the Worldwide Collection of Primary Benign Brain Tumors. **Neuroepidemiology**, v. 33, n. 3, p. 268-275, 2009.
- MCCORMACK, B. M. et al. Treatment and survival of low-grade astrocytoma in adults – 1977-1988. **Neurosurgery**, v. 31, n. 4, p. 636-642, 1992.
- MCDERMOTT, M. W. et al. Stereotatic radiosurgery and interstitial brachytherapy for glial neoplasms. **J Neurooncol**, v. 69, n. 1-3, p. 83-100, 2004.
- MAGISTRETTI, P. J. Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. **J Exp Biol**, v. 209, n. Pt12, p. 2304-2311, 2006.
- MARKOVIC, S. M. et al. The invasion promoting effect of microglia on glioblastoma cells is inhibited by cyclosporin A. **Brain**, v. 130, n. Pt 2, p. 476-489, 2007.
- MARTIN, F. et al. Cell wall proteins of the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius*: identification, function, and expression in symbiosis. **Fungal Genet Biol**, v. 27, n. 2-3, p. 161-174, 1999.
- MATSUMOTO, T. et al. Cervical intramedullary glioblastoma: report of a long-term survival case and review of the literature. **J Uoeh**, v. 30, n. 4, p. 413-420, 2008.
- MAYAUX, J. F. Triterpene derivatives that block entry of human immunodeficiency virus type 1 into cells. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 91, n. 9, p. 3564-3568, 2008.
- MEDHKOUR, A. et al. Extremely rare glioblastoma multiforme of the conus medullaris with holocord and brain stem metastases, leading to cranial nerve deficit and respiratory failure: a case report and review of the literature. **Surg Neurol**, v. 63, n. 6, p. 576-582, 2005.
- MELLAI, M. et al. MGMT promoter hypermethylation in a series of 104 glioblastomas. **Cancer Genomics Proteomics**, v. 6, n. 4, p. 219-227, 2009.
- MENEZES, J.R.L. et al. Cell migration in the postnatal subventricular zone. **Braz J Med Biol Res**, v. 35, n. 12, p. 1411-1421, 2002.
- MERKLE, F. T. et al. Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 101, n. 50, p. 17528-17532, 2004.
- MILLER, J.P., JACOBS, G.A.: Relationships between neuronal structure and function. **J Exp Biol**, v. 112, p. 129-145
- MILETIC, H. et al. Anti-VEGF therapies for malignant glioma: treatment effects and escape mechanisms. **Expert Opin Ther Targets**, v. 13, n. 4, p. 455-468, 2009.

MINEO, J. F. et al. Prognostic factors of survival time in patients with glioblastoma multiforme: a multivariate analysis of 340 patients. **Acta Neurochir (Wien)**, v. 149, n. 3, p. 245-252, 2007.

MISAWA, S. et al. Amplification of the *MYC* oncogene is associated with an abnormally banded region on chromosome 8 or double minute chromosomes in two HL-60 human leukemia sublines. **Cancer Genet Cytogenet**, n. 28, p. 127-135, 1987.

MO, H. et al. Identification of small molecules that induce apoptosis in a Myc-dependent manner and inhibit Myc-driven transformation. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 103, n. 16, p. 6344-6349, 2006.

MOHAPATRA, G. et al. Genetic analysis of glioblastoma multiforme provides evidence for subgroups within the grade. **Genes Chromosomes Cancer**, n. 21, p. 195-206, 1998.

MONTENEGRO, R. C. et al. Pisosterol induces monocytic differentiation in HL-60 cells. **Toxicol In Vitro**, v. 21, n. 5, p. 795-800, aug. 2007.

MONTENEGRO, R. C. et al. Cytotoxic activity of Pisosterol, a triterpene isolated from *Pisolithus tinctorius* (Mich.:Pers.) Coker & Couch, 1928. **Z Naturforsch C**, v. 59, n. 7-8, p. 519-522, 2004.

MOUSSEAU, M. Chemotherapy of brain tumors: biological basis of its limited efficacy. **Bull Cancer**, v. 81, n. 5, p. 414-424, 1994.

MULERIS, M. et al. Oncogene amplification in human gliomas: a molecular cytogenetic analysis. **Oncogene**, n. 9, p. 2717-2722, 1994.

MURAT, A. et al. Modulation of angiogenic and inflammatory response in glioblastomas by hypoxia. **PLoS One**, v. 4, n. 6, p. e5947, 2009.

NAIR, V. et al. Gangliogliomas: a report of five cases. **Indian J Cancer**, v. 41, n. 1, p. 41-46, 2004.

NAKAMURA, M. et al. Genetic analysis to complement histopathological diagnosis of brain tumors. **Histol. Histopathol**, n. 22, p. 327-335, 2007.

NAKAMURA, M. et al. Promoter hypermethylation of the *RB1* gene in glioblastomas. **Lab Invest**, v. 81, n. 77-82, 2001.

NAKAZATO, Y. Revised WHO classification of brain tumors. **Brain Nerve**, v. 60, n. 1, p. 59-77, 2008.

NELSON, D. F. et al. Combined modality approach to treatment of malignant gliomas-re-evaluation of RTOG 7401/ECOG 1374 with long-term follow-up: a joint study of the Radiation Therapy Oncology Group and the Eastern Cooperative Oncology Group. **NCI Monogr**, n. 6, p. 279-284, 1988.

NISHI, N. et al. Early appearance of high grade glioma on magnetic resonance imaging. **Neurol Med Chir (Tokyo)**, v. 49, n. 1, p. 8-12, 2009.

- NISHIZAKI, T. et al. Investigation of genetic alterations associated with the grade of astrocytic tumor by comparative genomic hybridization. **Genes Chromosomes Cancer**, n. 21, p. 340-346, 1998.
- NORDEN, A. D. et al. Glioma therapy in adults. **Neurologist**, v. 12, n. 6, p. 279-292, 2006.
- OBERHEIM, N. A. et al. Uniquely hominid features of adult human astrocytes. **J Neurosci**, v. 29, n. 10, p. 3276-3287, 2009.
- OHGAKI, H. Epidemiology of brain tumors. **Methods Mol Biol**, n. 472, p. 323-342, 2009.
- OHGAKI, H. et al. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. **The American Journal of Pathology**, v. 170, n. 5, p. 1445-1453, 2008.
- OHGAKI, H. et al. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. **Am J Pathol**, v. 170, n. 5, p. 1445-1453, 2007.
- O'KUSKY, J. et al. A laminar analysis of the number of neurons, glia and synapses in the visual cortex (area 17) of the adult macaque monkey. **J Comp Neurol**, n. 210, p. 278-2902, 1982.
- OLOVNIKOV, A. M. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. **AM. J. Theor. Biol**, v. 41, n. 1, p. 181-190, 1973.
- OLSON, J. J. et al. Management of newly diagnosed glioblastoma: guidelines development, value and application. **J Neurooncol**, v. 93, n. 1, p. 1-23, 2009.
- PAPADOPOULOS, M. C. et al. Emerging molecular mechanisms of brain tumour oedema. **Br J Neurosurg**, v. 15, n. 2, p. 101-108, 2001.
- PARSONS, D. W. et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. **Science**, v. 321, n. 5897, p. 1807-1812, 2008.
- PATCHELL, R. A. et al. A phase I trial of neutron brachytherapy for the treatment of malignant gliomas. **Br J Radiol**, v. 70, n. 839, p. 1162-1168, 1997.
- PELVIG, D. P. et al. Neocortical glial cell numbers in human brains. **Neurobiol Aging**, v. 29, n. 11, p. 1754-1762, 2008.
- PERSHOUSE, M. A. et al. Analysis of the functional role of chromosome 10 loss in human glioblastoma. **Cancer Res**, v. 53, n. 20, p. 5043-5050, 1993.
- PERRY, V. H. et al. The inflammatory response in the CNS. **Neuropathol Appl Neurobiol**, v. 18, n. 5, p. 454-459
- PFISTER, S. et al. Pediatric gliomas. **Recent Results Cancer Res**, n. 171, p. 67-81, 2009.
- PHILLIPS, H. S. et al. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression and resemble stages in neurogenesis. **Cancer Cell**, v. 9, n. 3, p. 157-173, 2006.

- PIEPMEIER, J. M. Current concepts in the evaluation and management of WHO grade II gliomas. **J Neurooncol**, v. 92, n. 3, p. 253-259, 2009.
- PINKEL, D. et al. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity fluorescence hybridization. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 83, n. 9, p. 2934-2938, 1986.
- PONTY, G. et al. Genesis of neuronal and glial progenitors in the cerebellar cortex of peripuberal and adult rabbits. **PLoS One**, v. 3, n. 6, p. e2366, 2008.
- POULSEN, H. S. Gliomas in adults: primary non-surgical treatment. **Ugeskr Laeger**, v. 168, n. 47, p. 4082-4085, 2006.
- RANSOHOFF, R. M. et al. Microglia physiology: unique stimuli, specialized responses. **Annu Rev Immunol**, n. 27, p. 119-145, 2009.
- RICCI-VITIANI, L. et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. **Nature**, n. 445, p. 111-115, 2007.
- RIED, T. et al. Genomic changes defining the genesis, progression, and malignancy potential in solid human tumors: a phenotype/genotype correlation. **Genes Chromosomes Cancer**, n. 25, p. 195-204, 1999.
- ROGGENDORF, W. et al. Distribution and characterization of microglia/macrophages in human brain tumors. **Acta Neuropathol**, v. 92, n. 3, p. 288-293, 1996.
- RONG, Y. et al. Pseudopalisading necrosis in glioblastoma: a familiar morphologic feature that links vascular pathology, hypoxia, and angiogenesis. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 65, n. 6, p. 529-539, 2006.
- ROONPRAPUNT, C. et al. Spinal cord astrocytomas: presentation, management, and outcome. **Neurosurg Clin Am**, v. 17, n. 1, p. 29-36, 2006.
- ROYDS, J. A. et al. p53 and disease: when the guardian angel fails. **Cells Death and Differentiation**, n. 13, p. 1017-1026, 2006.
- RUBAN, D. et al. Chronic epilepsy associated with temporal tumors: long-term surgical outcome **Journal of Neurosurgery**, v. 27, n. 2, 2009.
- RYAN, K. M., BIRNIE, G.D. Cell-cycle progression is not essential for MYC to block differentiation. **Oncogene**, v. 14, n. 23, p. 2835-2843, 1997.
- SAAD, A. G. et al. Extracranial metastases of glioblastoma in a child: case report and review of the literature. **J Pediatr Hematol Oncol**, v. 29, n. 3, p. 190-194, 2007.
- SANAI, Z. et al. Neural stem cells and the origin of gliomas. **N Engl J Med**, n. 353, p. 811-822, 2005.
- SANSON, M., DELATTRE, JY. Cerebral tumours in the adult. A real increase. **Rev Prat**, v.56, n. 16, p. 1755-6, 2006.
- SCHANKIN, C. J. et al. Characteristics of brain tumor-associated headache. **Cephalalgia**, v. 27, n. 8, p. 904-911, 2007.

- SCHERES, J. M. Human chromosome banding. **Lancet**, v. 1, n. 7755, p. 849, 1972.
- SCHRECK, R. R. et al. ISCN standard idiograms. **Curr Protoc Hum Genet**, App 4, p. 4B, 2001.
- SCHWARTZBAUM, J. A. et al. Epidemiology and molecular pathology of glioma. **Nat Clin Pract Neurol**, v. 2, n. 9, p. 494-503, sept. 2006.
- SEARS, R. C.; NEVINS, J.R.. Signaling networks that link cell proliferation and cell fate. **J. Biol. Chem**, n. 277, p. 11617-11620, 2002.
- SEE, S. J. et al. Chemotherapy in adults gliomas. **Ann Acad Med Singapore**, v. 36, n. 5, p. 364-366, 2007.
- SEKER, A; Ozek, M. M. Congenital glioblastoma multiforme. Case report and review of the literature. **J Neurosurg**, v. 105, n. 6, p. 473-479, dec. 2006. Suppl.
- SETZER, W. N. et al. Plant-derived triterpenoids as potential antineoplastic agents. **Mini Rev Med Chem**, v. 3, n. 6, p. 540-556, 2003.
- SHAPIRO, J. R.; SHAPIRO. The subpopulations and isolated cell types of freshly resected high grade human gliomas: their influence on the tumor's evolution in vivo and behavior and therapy in vitro. **Cancer Metastasis Rev**, v. 4, n. 2, p. 107-124, 1985.
- SHITARA, N. et al. Flowcytometric and cytogenetic analysis of human cultured cell lines derived from high- and low-grade astrocytomas. **Acta Neuropathol**, n. 60, n. 1-2, p. 40-48, 1983.
- SIMARD, M. et al. Signaling at the gliovascular interface. **J Neurosci**, v. 23, n. 27, p. 9254-9262, 2003.
- SIMON, M. et al. Surgical management intracranial gliomas. **Recent Results Cancer Res**, n. 171, p. 105-124, 2009.
- SINGHI, S. C. et al. Management of intracranial hypertension. **Indian J Pediatr**, v. 76, n. 5, p. 519-529, 2009.
- SONODA, Y. et al. Long-term survivors of glioblastoma: clinical features and molecular analysis. **Acta Neurochir (Wien)**, 12, may 2009.
- SPENCER, C. A. et al. Control of MYC regulation in normal and neoplastic cells. **Adv Cancer Res**, n. 56, p. 561-548, 1991.
- SPIEGEL, B. M. Clinical impact of adjuvant chemotherapy in glioblastoma multiforme: a meta-analysis. **CNS Drugs**, v. 21, n. 9, p. 775-787, 2007.
- SPOTTS, G. D. et al. Identification of downstream-initiated MYC proteins which are dominant-negative inhibitors of transactivation by full-length MYC proteins. **Mol Cell Biol**, v. 17, n. 3, p. 1459-1468, 1997.

STECK, P. A. et al. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. **Nat. Genet**, v. 15, n. 4, p. 356-362, 1997.

STEWART, L. A. Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials. **Lancet**, v. 359, n. 9311, p. 1011-1018, 2002.

STREIT, W. J. et al. Role of microglia in the central nervous system's immune response. **Neurol Res**, v. 27, n. 7, p. 685-691, 2005.

TARDY, M. et al. Regulation of the glial fibrillary acidic protein (GFAP) and of its encoding mRNA in the developing brain and in cultured astrocytes. **Adv. Exp. Med. Biol**, n. 265, p. 41-52, 1990.

TING, P. C. et al. New agents to treat life-threatening fungal infections. **Curr Top Med Chem**, v. 8, n. 7, p. 592-602, 2008.

TRENT, J. et al. Evidence for rearrangement, amplification, and expression of MYC in a human glioblastoma. **Proc Natl Acad Sci USA**, n. 83, p. 470-473, 1986.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS. Faculdade de Ciências Médicas. Departamento de Anatomia Patológica. **Site didático de Anatomia Patológica, Neuropatologia e Neuroimagem**. Disponível em: <<http://anatpat.unicamp.br/>>. Acesso em: 16 out. 2010.

VITA, M. et al. The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer. **Semi Cancer Biol**, v. 16, n. 4, p. 318-330, 2006.

VON HOFF, D. D. et al. Double minutes arise from circular extrachromosomal DNA intermediates which integrate into chromosomal sites in human HL-60 leukemia cells. **J Clin Invest**, n. 85, p. 1887-1895, 1990.

WADE, M.; WAHL. M. Y. C. genome instability, and tumorigenesis: the devil is in the details. **Curr. Top. Microbiol. Immunol**, n. 302, p. 169-203, 2006.

WAGNER, A. J. et al. Expression, regulation, and chromosomal localization of the Max gene. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 89, n. 7, p. 3111-3115, 1992.

WALKER, M. D. et al. Randomized comparisons of radiotherapy and nitrosureas for the treatment of malignant glioma after surgery. **N Engl J Med**, v. 303, n. 23, p. 1323-1329, 1980.

WALL, M. E. et al. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. **J Ethnopharmacol**, v. 51, n. 1-3, p. 239-253, 1996.

WANG, J. et al. MYC is required for maintenance of glioma cancer stem cells. **PLoS ONE**, v. 3, n. 11, p. e3769, 2008.

WARE, M. L. et al. Molecular biology of glioma tumorigenesis. **Histol Histopathol**, n. 18, p. 207-216, 2003.

WATANABE, K. et al. Incidence and timing of p53 mutations during astrocytoma progression in patients with multiple biopsies. **Clin Cancer Res**, v. 3, n. 4, p. 523-530, 1997.

WATANABE, T. et al. IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas. **Am J Pathol**, v. 174, n. 4, p. 1149-1153, 2009.

WEBER, R. G. et al. Characterization of genomic alterations associated with glioma progression by comparative genomic hybridization. **Oncogene**, n. 13, p. 983-994, 1996.

WESSELS, P. H. et al. Supratentorial grade II astrocytomas: biological features and clinical course. **Lancet**, v. 2, n. 7, p. 395-403, 2003.

WILLIAMS, R.W. et al. The control of neuron number. **Annu Rev Neurosci**, n. 11, p. 423-453, 1988.

XIE, Z. et al. Molecular and cell biology of brain tumor stem cells: lessons from neural progenitor stem cells. **Neurosurg Focus**, v. 24, n. 3-4, p. E25, 2008.

YOUNES, R. N. et al. Discovery of new antitumoral and antibacterial drugs from Brazilian plant extracts using high throughput screening. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 62, n. 6, p. 763-768, 2007.

YUNIS, J. J. New chromosome techniques in the study of human neoplasia. **Hum Pathol.**, v. 12, n. 6, p. 540-549, 1981.

ZAIDI, H. A. et al. Origins and clinical implications of the brain tumor stem cell hypothesis. **J Neurooncol**, v. 93, n. 1, p. 49-60, 2009.

ZAMUNER, M. L. M. et al. Lanostane Triterpenes from the fungus *Pisolithus tinctorius*. **J Braz Chem Soc**, v. 16, n. 4, p. 863-867, 2005.

ANEXO

ANEXO A**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Instituições: Serviço de Neurocirurgia Hospital Ophir Loyola / Laboratório de Citogenética Humana UFPA.

Projeto de Pesquisa: **EFEITO DA SUBSTÂNCIA *PISOSTEROL* SOBRE CULTURA DE CÉLULAS DE GLIOMAS MALIGNOS.**

Eu, _____ fui convidado a participar desse trabalho que tem como objetivo, caracterizar e identificar alterações celulares, sendo necessário meu consentimento para utilização de fragmentos de tecido retirados de minha pessoa após remoção cirúrgica, por indicação médica, para melhoria do meu estado de saúde. Os benefícios esperados dessa pesquisa são os de fornecer dados sobre alterações celulares, e testes de novas drogas, que poderão auxiliar no tratamento de outros pacientes. Fui também informado que minha participação nesse trabalho é voluntária, que meu consentimento poderá ser retirado a qualquer momento, que as informações a respeito de minha identificação serão mantidas em segredo e que os resultados dessa pesquisa poderão ser utilizados em futuras publicações. Em caso de dúvida devo entrar em contato com os pesquisadores responsáveis do Serviço de Neurocirurgia do Hospital Ofir Loyola (3289-1000, 8111-2345) e/ou do Laboratório de Citogenética da UFPA (F:8836-4667).

Eu, _____, RG nº _____
(assinatura do paciente ou responsável)

Declaro ter sido informado sobre tudo que está descrito neste documento e concordo em participar desse projeto de pesquisa.

Endereço _____

Telefone _____

Assinatura do Pesquisador Responsável

Data _____

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](#)