



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E
SAÚDE



CLÉCITON BRAGA TAVARES

**EXPRESSÃO DO ANTÍGENO Ki-67 E DOS RECEPTORES DE ESTRÓGENO E
PROGESTERONA EM ASTROCITOMAS DE BAIXO E ALTO GRAU**

TERESINA

2017

CLÉCITON BRAGA TAVARES

**EXPRESSÃO DO ANTÍGENO Ki-67 E DOS RECEPTORES DE ESTRÓGENO E
PROGESTERONA EM ASTROCITOMAS DE BAIXO E ALTO GRAU**

Dissertação apresentada ao Mestrado em Ciências e Saúde da Universidade Federal do Piauí a obtenção do título de Mestre em Ciências e Saúde

Área de Concentração: Métodos Diagnósticos e Análise das Condições de Saúde

Linha de Pesquisa: Investigação para Diagnóstico em Saúde

Orientador: Prof. Dr. Benedito Borges da Silva

TERESINA

2017

CLÉCITON BRAGA TAVARES

**EXPRESSÃO DO ANTÍGENO Ki-67 E DOS RECEPTORES DE ESTRÓGENO E
PROGESTERONA EM ASTROCITOMAS DE BAIXO E ALTO GRAU**

Dissertação apresentada ao Mestrado em Ciências e Saúde da Universidade Federal do Piauí para obtenção do título de Mestre em Ciências e Saúde.

Linha de Pesquisa: Investigação para Diagnóstico em Saúde

Data da defesa: 27 de Janeiro de 2017

Banca examinadora:

Presidente: Prof. Dr. Benedito Borges da Silva

1º Examinador: Prof. Dr. Pedro Vítor Lopes Costa

2º examinador: Dr. Raimundo Nonato Campos Sousa

Suplente: Prof. Dr. José Nazareno Pearce de Oliveira Brito

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do CCS
Serviço de Processamento Técnico

T231e Tavares, Cléciton Braga.
Expressão do antígeno ki-67 e dos receptores de estrógeno e progesterona em astrocitomas de baixo e alto grau / Cléciton Braga Tavares. – 2017.
63 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Ciências e Saúde, 2022.
Orientação: Prof. Dr. Benedito Borges da Silva.
Bibliografia

1. Antígeno ki-67. 2. Receptor estrogênio alfa. 3. Receptor estrogênio beta. 4. Receptor progesterona. 5. Astrocitoma. I. Silva, Benedito Borges da. II. Título.

CDD 616.994

DEDICATÓRIA

Dedico primeiramente a **Deus**, por estar sempre guiando meus caminhos, fortalecendo-me diante de todos os obstáculos e por ter permitido mais essa conquista na minha vida.

A minha querida mãe, **Neuza Braga Rodrigues Tavares**, uma guerreira que mesmo sob todas as dificuldades manteve o pulso firme na minha criação e soube me ensinar o valor do ensino, do caráter, do respeito, da perseverança e da responsabilidade.

Ao meu pai, **Diaslano de Souza Tavares** (in memoriam) por ter deixado uma história de vida marcada pela superação e por muito trabalho, que servem até hoje como exemplo e inspiração na minha vida.

A minha amada esposa, **Francisca das Chagas Sheyla Almeida Gomes Braga**, por sempre demonstrar paciência, companheirismo, amizade, dedicação, compreensão, amor, carinho e incentivo nesta e em todas as outras conquistas que vivenciamos juntos. Te amo!

Ao meu cativante filho, **Heitor Gomes Braga**, por sempre me deixar mais feliz, leve e alegre ao retornar ao final de cada dia para casa, mesmo após a laboriosa vida de pós-graduando e médico. Espero que toda esta dedicação sirva de exemplo para ele ao longo de sua vida.

DEDICATÓRIA ESPECIAL

Ao querido **Prof. Dr. Benedito Borges da Silva**, mestre na verdadeira acepção da palavra, marco em minha formação como pesquisador, me ensinou a importância da pesquisa e seus benefícios para a sociedade, pela sua brilhante orientação deste trabalho, por ter me acolhido em seu grupo de pesquisa, pelo incentivo, amizade e confiança, a minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

A **Universidade Federal do Piauí** pela oportunidade de crescimento intelectual e profissional.

Ao **Hospital São Marcos** por permitir a coleta de dados e desenvolvimento inicial da minha pesquisa.

Aos colegas do grupo de pesquisa do professor Dr. Benedito Borges da Silva, dentre eles **Danylo Rafael, Maria da Conceição, Luana, Carla Escórcio e demais alunos do mestrado e doutorado**, agradeço não apenas pela ajuda e apoio no desenvolvimento deste trabalho, mas também pela amizade, união, força e superação desde o início desta caminhada.

Aos funcionários e médicos do Serviço de Patologia do Hospital São Marcos, em especial **Doutora Lina Gomes dos Santos**, pela importantíssima ajuda na coleta dos dados e na confecção das lâminas que foram utilizadas neste estudo.

Ao **Professor Doutor José Nazareno Pearce de Oliveira Brito**, neurocirurgião e coordenador do Programa de Residência de Neurocirurgia do Hospital São Marcos, pelo incentivo acadêmico e pelas valorosas contribuições durante o processo de qualificação deste trabalho.

Ao Magnífico **Reitor e Vice-Reitorada Universidade Federal do Piauí** pela existência desta pós-graduação stricto sensu trabalhando na qualificação de recursos humanos no Piauí.

A **Diretora do Centro de Ciências e Saúde** pelo empenho no funcionamento das pós-graduações do CCS.

Aos **professores do Mestrado** pelos ricos ensinamentos e preciosas contribuições, em particular aos professores doutores Pedro Vitor, Alesse, Airton, Nadir e a todos os outros pelo apoio.

A secretária do Mestrado **Edilene** pelo cuidado, apoio, carinho e amizade.

Aos **funcionários da Ginecologia do Hospital Getúlio Vargas** em particular as Senhoras Efigênia, Toinha, Socorro, Eugênia, pela acolhida durante a realização deste estudo.

RESUMO

INTRODUÇÃO: Os gliomas de acordo com a célula de origem são denominados de astrocitomas, oligodendrogliomas, oligoastrocitomas e ependimomas. O astrocitoma é o subtipo de glioma mais comum, em que agressividade tumoral está associada à proliferação celular, cujo marcador mais sensível para avaliação de sua expressão é o antígeno Ki-67, permitindo sua classificação em graus I e II (baixo grau ou benignos) e graus III e IV (alto grau ou malignos), segundo OMS. Os estrogênios e progesterona também agem no sistema nervoso central através da interação com seus receptores e tanto a proliferação celular quanto a expressão dos receptores de estrogênio e progesterona estão relacionados à agressividade dos astrocitomas, contudo há algumas controvérsias e escassez de estudos.

OBJETIVO: Avaliar a expressão do antígeno Ki-67 e dos receptores de estrógeno e progesterona em astrocitomas de baixo e alto grau. **METODOLOGIA:** Estudo transversal realizado em blocos de parafina de astrocitomas arquivados no Setor de Anatomia Patológica do Hospital São Marcos há menos de cinco anos. Quarenta casos foram histologicamente divididos em dois grupos, baixo e alto grau, com 20 casos cada. Foi analisada a expressão de Ki-67, receptores de estrógeno alfa e progesterona. Os dados foram analisados estatisticamente usando o teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

RESULTADOS: A porcentagem média de núcleos corados com anti-ki-67 foi $0,19 \pm 0,07$ nos astrocitomas de alto grau em comparação com $0,05 \pm 0,02$ nos astrocitomas de baixo grau ($p < 0,0001$). A porcentagem média de núcleos corados com anti-RE foi nula nos astrocitomas de alto grau em comparação com $0,04 \pm 0,05$ nos astrocitomas de baixo grau ($p < 0,0001$). A porcentagem média de núcleos corados com anti-RP foi $0,09 \pm 0,1$ nos astrocitomas de alto grau em comparação com $0,15 \pm 0,15$ nos astrocitomas de baixo grau ($p = 0,2$).

CONCLUSÃO: A expressão da proteína Ki67 foi estatisticamente maior nos astrocitomas de alto grau em comparação aos de baixo grau. A expressão dos receptores de estrógeno foi encontrada apenas em astrocitomas de baixo grau, enquanto com relação a expressão dos receptores de progesterona não houve diferença estatística entre astrocitomas de baixo e alto grau.

PALAVRAS CHAVES: Antígeno ki-67, receptor estrogênio alfa; receptor estrogênio beta; receptor progesterona; astrocitoma.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Gliomas are tumors originating from glial cells and are the most common primary neoplasms of the central nervous system (CNS). They are classified according to the cell of origin into astrocytoma, oligodendroglioma, oligoastrocytoma, and ependymoma. The growth of gliomas is quantitatively assessed by the cell proliferation index using various methods. Of these, the most widely used is the Ki-67 index test, in which a monoclonal IgG1-like antibody recognizes Ki-67, a protein that is expressed in proliferating cells but not in quiescent cells. Estrogens and progesterone are steroid hormones that have important effects on various biological systems, including the CNS. These hormones mediate their effect by primarily interacting with their receptors. **OBJECTIVE:** To evaluate the expression of Ki-67 proteins and estrogen and progesterone receptors (RE and RP, respectively) in low- and high-grade astrocytomas. **METHODS:** This retrospective study was performed using paraffin blocks of glial tumors obtained from the Pathology Department of Hospital São Marcos. Forty cases were histologically divided into two groups (20 cases each), of low- and high-grade astrocytomas, according to WHO criteria. The samples were subjected to immunohistochemical analyses for Ki67 and estrogen and progesterone receptors. Data were statistically analyzed using the Mann-Whitney test ($p < 0.05$). **RESULTS:** The mean percentage of nuclei stained with anti-ki-67 was higher in high-grade astrocytoma than in low-grade astrocytoma (0.19 vs. 0.016; $p < 0.01$). The mean percentage of nuclei stained with anti-RE was lower in high-grade astrocytoma than in low-grade astrocytoma (0 vs. 0.04; $p < 0.0001$). The mean percentage of nuclei stained with anti-RP was lower in high-grade astrocytomas than in low-grade astrocytoma (0.09 vs. 0.15; $p = 0.2$). **CONCLUSION:** Ki67 expression is higher in high-grade astrocytoma. Only estrogen receptors are expressed in low-grade astrocytoma but not high-grade astrocytoma. Progesterone receptors are similarly expressed in both low and high-grade gliomas.

KEYWORDS: Ki67 Antigen, Estrogen Receptor Alpha; Estrogen Receptor Beta; Progesterone Receptor; Astrocytoma.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Principais células do sistema nervoso central.....	24
Figura 2	Fotomicrografias mostrando alterações histológicas encontradas nos gliomas: a) aumento da proliferação celular; b) atipias nucleares; c) inúmeros vasos no interior do tumor-aumento da angiogênese e d) necrose em pseudo-paliçada.....	25
Figura 3	Achados radiológicos encontradas nos gliomas: a) astrocitoma grau I; b) glioma grau II; c) astrocitoma grau IV, centro necrótico e realce periférico ao meio de contraste e d) astrocitoma grau III, lesão com realce irregular ao meio de contraste.....	27
Figura 4	Regiões funcionais dos receptores de estrogênio alfa e beta.....	30
Figura 5	Sistema computadorizado BenchMark Ultra (Ventana Medical Systems®). 1 computador com software de controle; 2: Instrumento de coloração das lâminas.....	38
Figura 6	Sistema computadorizado utilizado para contagem de células. 1:Microscopia óptica; 2: Vídeo câmera digital; 3: Software de análise de imagem.....	39
Figura 7	Fotomicrografia de corte histológico de astrocitoma de baixo grau mostrando ausência de expressão do antígeno Ki-67 (ampliação original, 400X).....	42
Figura 8	Fotomicrografia de corte histológico de astrocitoma de alto grau mostrando alta concentração de núcleos celulares corados com anti-KI67 (ampliação original, 400X).....	43
Figura 9	Fotomicrografia de corte histológico de astrocitoma de baixo grau mostrando a presença de núcleos corados com anti-RE(ampliação original, 400X).....	44
Figura 10	Fotomicrografia de corte histológico de astrocitoma de alto grau mostrando ausência da expressão de receptores de estrogênio (ampliação original, 400X).....	45
Figura 11	Fotomicrografia de corte histológico de astrocitoma baixo grau mostrando alta concentração de núcleos corados com anticorpo anti-RP (ampliação original, 400X).....	46

Figura 12	Fotomicrografia de corte histológico de astrocitoma alto grau mostrando alta concentração de núcleos corados com anticorpo anti-RP, porém sem diferença estatisticamente significativa em relação aos de baixo grau (ampliação original, 400X).....	47
Figura 13	Mediana de núcleos corados com anti-Ki-67 em astrocitomas de alto e baixo grau.....	51
Figura 14	Mediana de núcleos corados com anti-RE em astrocitomas de alto e baixo grau.....	52
Figura 15	Mediana de núcleos corados com anti-RP em astrocitomas de alto e baixo grau.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Porcentagem média de núcleos corados com anti-Ki67 em astrocitomas de alto e baixo grau.....	45
Tabela 2	Porcentagem média de núcleos corados com anti-RE em astrocitomas de alto e baixo grau.....	46
Tabela 3	Porcentagem média de núcleos corados com anti-iRP em astrocitomas de alto e baixo grau.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

AA: Astrocitoma Anaplásico

anti-KI-67: Anticorpo KI-67

anti-RE: Anticorpo Receptor de Estrógeno

anti-RP: Anticorpo Receptor de Progesterona

GBM: Glioblastoma Multiforme

IDH1/2: Isocitrato Desidrogenase 1 e 2

IP: Índice de Proliferação Celular

LOH 10/10q: Perda da Heterozigose do Cromossomo 10/10q

O6-MGMT: O6-Metilguanina-metiltransferase

OMS: Organização Mundial de Saúde

P: Progesterona

PCK: Proteína C Kinase

RE α : Receptor de Estrógeno Alfa

RE β : Receptor de estrógeno Beta

RP: Receptor de Progesterona

RP-A: Receptor de Progesterona A

RP-B: Receptor de Progesterona B

SNC: Sistema Nervoso Central

MIB-1: anticorpo MIB-1

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	23
2	OBJETIVO.....	33
3	PACIENTES E MÉTODOS.....	35
3.1	Tipo de estudo e local de realização.....	36
3.2	Cálculo Amostral.....	36
3.3	Crterios de inclusão da amostra.....	37
3.4	Método Imunoistoquímico.....	37
3.5	Método Quantitativo.....	38
3.6	Método Estatístico.....	39
3.7	Aspectos Legais e Éticos.....	39
4	RESULTADOS.....	40
5	DISCUSSÃO.....	54
6	CONCLUSÃO.....	59
	REFERÊNCIAS	61
	ANEXOS.....	66
	ANEXO A- Parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Piauí.....	67
	ANEXO B-Comprovante de submissão do Artigo Científico da Dissertação como requisito para defesa, na European Journal Of Cancer.....	68

1. INTRODUÇÃO

O sistema nervoso central (SNC) é composto principalmente por neurônios e células da glia, como astrócitos, oligodendroglíocitos, ependimócitos e micróglia, que possuem a função de proteger, sustentar, nutrir e facilitar a condução dos potenciais de ação dos neurônios. Assim como células do organismo, estas podem sofrer mutações genéticas e desenvolver neoplasias (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999) (Figura 1).

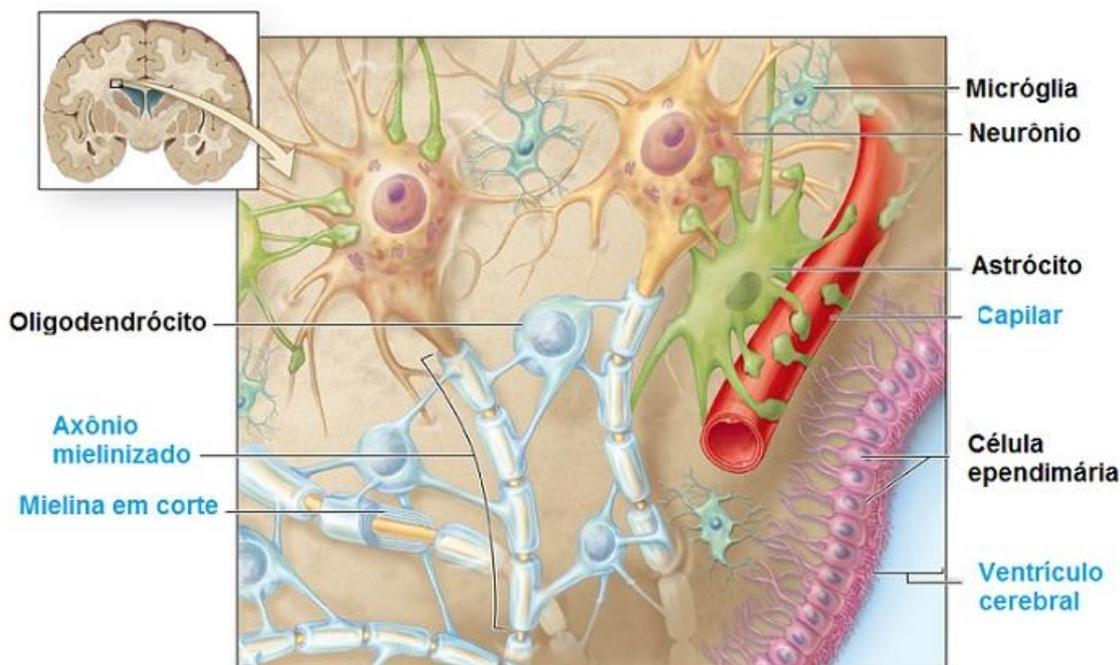


Figura 1- Principais células do sistema nervoso central.

Fonte: JUNQUEIRA; CARNEIRO (1999)

Os gliomas, tumores originados da glia, são as neoplasias primárias mais comuns do SNC, representando cerca de 70-80% de todos os casos. De acordo com a célula de origem, são denominados de oligodendrogliomas, oligoastrocitomas, ependimomas e astrocitomas, sendo estes os tumores mais prevalentes e que representam cerca de 60% dos casos (POLLACK et al., 1990; UEMATSU et al., 2005; TONN et al., 2006; PATEL et al., 2012).

A incidência destas neoplasias vem aumentando nos últimos 21 anos, passando de 4,9 casos/100 mil habitantes/ano para 5,9 casos/100mil habitantes/ano. Este crescimento talvez se justifique pelo maior conhecimento da população e da comunidade médica a respeito da doença e o maior acesso à realização de exames de imagem, permitindo um maior número de diagnósticos, inclusive de tumores ainda assintomáticos (HO et al., 2014).

Segundo a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS), os gliomas podem ser de quatro tipos, Grau I e II (designados baixo grau ou benignos), III e IV (designados alto grau ou malignos), levando-se em consideração os critérios histológicos tais como,proliferação celular, atipias nucleares, angiogênese e presença de necrose (POLLACK et al., 1990; KARAMITOPOULOU et al., 1994; BATISTATOU et al., 2004; EVANS et al., 2004; UEMATSU et al., 2005) (Figura 2).

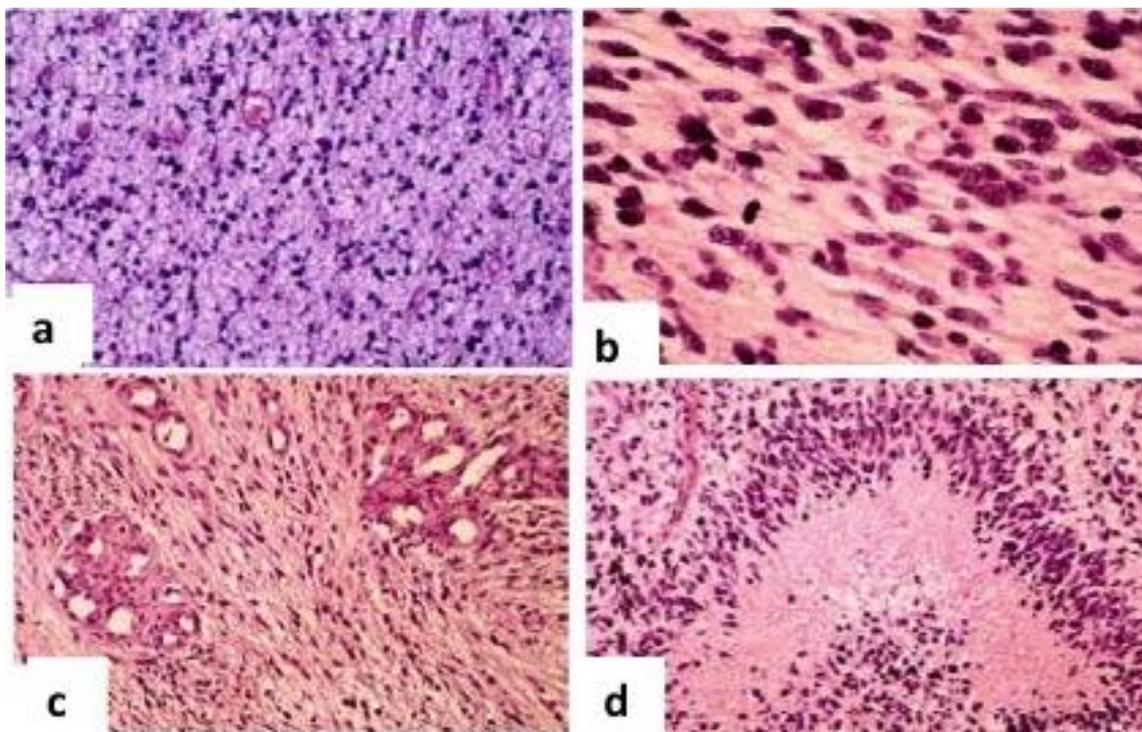


Figura 2-Fotomicrografias mostrando alterações histológicas encontradas nos gliomas: a) aumento da proliferação celular; b) atipias nucleares; c) inúmeros vasos no interior do tumor aumento da angiogênese e d) necrose em pseudo-paliçada.

Fonte: Adaptada de: TONN et al (2006).

Os gliomas de baixo grau envolvem um grupo heterogêneo de tumores, com histórias naturais diferentes, mas que possuem um prognóstico significativamente melhor do que os gliomas de alto grau, representando 15% dos tumores cerebrais em adultos e 25% em crianças. Todavia, a incidência com relação a idade é bimodal, com um pico entre 6 e 12 anos e outro entre 26 e 46 anos. A etiologia é desconhecida, e não se tem encontrado qualquer predisposição genética no desenvolvimento destes tumores, exceto em pacientes com esclerose tuberosa e neurofibromatose do tipo 1 e 2, não havendo predomínio por grupo étnico ou populacional específico (REIFENBERGER et al., 2006; KELLES et al., 2006).

A manifestação clínica mais comum dos astrocitomas benignos são as crises

convulsivas, ocorrendo em metade dos casos. Cerca de 50% destes pacientes queixam-se de cefaléia, além de déficits neurológicos focais, que podem ocorrer na dependência da localização e do grau de infiltração dos tumores no parênquima cerebral (KELLES et al., 2006).

Os gliomas de alto grau são os tumores primários malignos mais comuns do SNC em adultos. Há um leve predomínio do sexo masculino sobre o feminino (1,6:1,0). O pico de incidência do astrocitoma anaplásico (AA), grau III, ocorre entre a quarta e quinta década de vida, enquanto o do glioblastoma multiforme (GBM), grau IV, ocorre entre a sexta e sétima décadas, raramente ocorrem em crianças menores do que 14 anos de idade (REIFENBERGER et al., 2006). Astrocitomas malignos não parecem ser uma doença familiar ou apresentar uma clara predisposição genética, entretanto um aumento na incidência tem se observado em múltiplas síndromes, tais como Síndrome de Turcot e Li-Fraumeni (WEINGART; McGIRT; BREM, 2006).

Os astrocitomas malignos podem apresentar sintomas não específicos, devido ao aumento da pressão intracraniana, como cefaléia, náuseas, vômitos, papiledema, rigidez de nuca, paralisia do sexto par craniano, dormência, alteração do nível de consciência e sintomas locais-específicos, devido a localização da neoplasia, como déficit motor ou sensitivo, alteração visual e auditiva, distúrbios da fala entre outros. Crises epilépticas focais e ou generalizadas são evidenciadas em 29% dos casos (WEINGART; McGIRT; BREM, 2006).

A tomografia e a ressonância são os exames mais utilizados para o diagnóstico, sendo esta a de eleição, devido sua maior sensibilidade e capacidade de definir melhor o volume e o grau de infiltração da neoplasia nos tecidos vizinhos (KELLES et al., 2006). A propósito, os tumores benignos costumam apresentar pouco realce ao meio de contraste, enquanto os malignos costumam apresentar perfil diferente à ressonância magnética (WEINGART; McGIRT; BREM, 2006). (Figura 3)

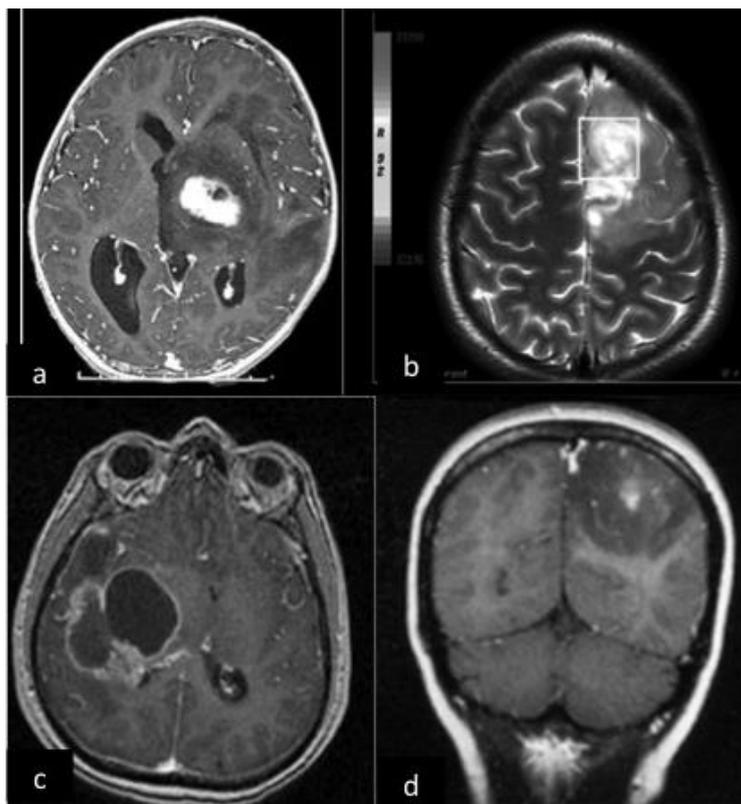


Figura 3- Achados radiológicos encontrados nos gliomas: a) astrocitoma grau I; b) glioma grau II; c) astrocitoma grau IV, centro necrótico e realce periférico ao meio de contraste e d) astrocitoma grau III, lesão com realce irregular ao meio de contraste.

Fonte: Adaptado de: TONN et al (2006); DEBNAM et al. (2007)

O tratamento dos astrocitomas de baixo grau é baseado na observação com exames de imagem seriados, biópsia ou ressecção cirúrgica e radioterapia, esta normalmente reservada para doença residual sintomática ou em progressão após cirurgia. A eficácia da quimioterapia está sendo estudada, principalmente para tumores recorrentes (KELLES et al., 2006).

Os astrocitomas anaplásicos e os glioblastomas multiformes são tratados com cirurgia, radioterapia e quimioterapia adjuvante normalmente. A decisão entre biópsia ou ressecção cirúrgica da lesão depende da localização e das características do tumor e do grau de funcionalidade do paciente, uma vez que indivíduos muito sequelados neurologicamente ou debilitados sistemicamente não apresentam benefícios com procedimentos muito agressivos (WEINGART; MCGIRT; BREM, 2006).

Os pacientes com gliomas de baixo grau possuem uma sobrevida média de 5-10 anos. Os pacientes com gliomas de alto grau, mesmo tratados adequadamente,

com ressecção cirúrgica, quimioterapia e radioterapia, possuem um prognóstico reservado, cerca de 18 meses (TANG et al., 2006; PATEL et al., 2012). Todavia, a melhora da sobrevida e a maior efetividade do tratamento parecem depender do conhecimento e da manipulação das vias moleculares e genéticas que regulam o crescimento aberrante destes tumores: Os biomarcadores têm trazido informações adicionais neste sentido nas últimas décadas (BATISTATOU et al., 2004; BATISTATOU et al., 2006; JOHANNESSEN; TORP, 2006; YAMASHITA et al., 2010; UEHARA et al., 2012; HU et al., 2013; THOTAKURA; TIRUMALASETTI; KRISHNA, 2014; SIEGAL, 2015; THUY et al., 2015).

Com relação a evolução da doença, duas classes de marcadores são reconhecidos em oncologia: prognósticos e preditivos. Aqueles informam qual o comportamento da doença independentemente do tratamento adotado e estes fornecem informações sobre a evolução esperada se determinada intervenção for realizada (UEMATSU et al., 2005; SIEGAL, 2015).

Consoante Thuy et al. (2015), há quatro principais biomarcadores, a metilação da 06-metilguanina metiltransferase (06-MGMT), a mutação da isocitratodesidrogenase 1 e 2 (IDH1/2), o índice de proliferação celular (Ki-67/MIB-1) e a perda da heterozigose do cromossomo 10/10q (LOH 10/10q).

O índice de proliferação celular sugere o grau de crescimento quantitativo e a agressividade das neoplasias. Uma variedade de métodos tem sido empregados para estimar este valor em tumores do sistema nervoso central. Destes, o mais largamente utilizado é baseado na reação imunoistoquímica com o Ki-67, devido sua sensibilidade (GERDES et al., 1983; UEMATSU et al. 2005; JOHANNESSEN; TORP, 2006; HU et al., 2013; THOTAKURA; TORP, 2014)

O anti-Ki-67 é um anticorpo monoclonal do tipo IgG1 que foi descoberto por Gerdes et al. (1983). Reconhece uma proteína, existente no núcleo de células em proliferação e ausentes em células quiescentes, denominada Ki67 e que está presente em todas as fases do ciclo celular, exceto na G0 e no início de G1. A função específica desta proteína ainda permanece desconhecida (HSU et al., 1994; UEMATSU et al., 2005; JOHANNESSEN; TORP, 2006; YAMASHITA et al., 2010).

Este anticorpo só pode ser utilizado em tecidos frescos, uma vez que a fixação em formol reduz de forma significativa a sua imunorreatividade. No entanto, a descoberta do anticorpo MIB-1 permitiu o reconhecimento do antígeno em tecidos previamente fixados em formalina, em particular tamponada, e embebidos com

parafina, o que melhorou a detecção da proteína e permitiu que tanto estudos prospectivos como retrospectivos possam utilizar este marcador (JOHANNESSEN; TORP, 2006).

Vários trabalhos apontam para um substancial aumento no índice de proliferação (IP) celular com Ki-67 com o aumento da malignidade dos gliomas, com diferenças estatisticamente maiores entre astrocitomas de alto grau quando comparados aos de baixo grau (GERDES et al., 1983; HSU et al., 1994; KARAMITOPOULOU et al., 1994; KHALID, et al., 1997; JOHANNESSEN; TORP, 2006; RATHI; RADOTRA; KHOSLA, 2007; THOTAKURA; TORP, 2014; SKJULSVIK et al., 2014;)

A proliferação celular e a presença de receptores hormonais nos gliomas vem despertando o interesse para o estudo dos efeitos dos moduladores seletivos dos receptores de estrogênio, em particular o tamoxifeno, sobre a proliferação celular destas neoplasias, consoante estudo mostrado in vitro por ROBINS et al. (2006).

A propósito, os estrogênios e a progesterona são hormônios esteróides que exercem importantes efeitos sobre o trato reprodutivo, trato gastrointestinal, glândulas mamárias, esqueleto, sistema imunológico e até mesmo o sistema nervoso central. O mecanismo de ação dos esteróides é mediado principalmente pela interação com os receptores destes hormônios (BATISTATOU et al., 2004).

Há evidências de que são neuroprotetores em vários distúrbios neurológicos como doença de Parkinson, Alzheimer, esquizofrenia e no acidente vascular cerebral. Os efeitos neuroprotetores incluem o aumento da mielinização, a diminuição do edema, da apoptose e da inflamação (KABAT; ETGEN; ROHAN, 2010).

Estes hormônios, principalmente os estrógenos, podem influenciar no desenvolvimento e ou no controle do crescimento de tumores cerebrais devido a interação com seus receptores e ou ativando mediadores potencialmente oncogênicos (CARROLL et al., 1995; KABAT; ETGEN; ROHAN, 2010; PATEL et al., 2012; JIMENEZ et al., 2014).

Os receptores de estrogênios são proteínas intranucleares que se apresentam sob a forma de dois subtipos, alfa e beta (Figura 4). O receptor de estrogênio alfa ($RE\alpha$) foi inicialmente caracterizado e clonado em 1986 e sua presença e função em vários tecidos e neoplasias é muito bem conhecida, especialmente no tumor de mama. O receptor de estrogênio beta ($RE\beta$) foi

sequenciado em 1996 e sua fisiopatologia ainda não é muito elucidada, apesar de alguns trabalhos mostrarem que ocorre a redução de sua expressão em cânceres de mama, ovário, próstata, cólon e nos tumores astrocitários (POLLACK et al., 1990; PATEL et al., 2012).

Estes receptores de alfa e beta de estrógeno possuem cinco domínios funcionais, sendo a região A/B, ou amino-terminal, onde localiza-se a Função de Ativação da Transcrição Gênica 1 (TAF-1), enquanto na região E, ou carboxi-terminal, onde localiza-se a Função de Ativação da Transcrição Gênica 2 (TAF-2), sendo que nos tecidos em que predomina a TAF-1, como as células endometriais ocorre uma ação estrogênio agonística parcial com formação de pólipos e até mesmo carcinoma endometrial sob a ação do tamoxifeno. Já no tecido mamário onde nas células predomina TAF-2, ocorre um bloqueio da ação estrogênica resultando uma ação antiproliferativa e antineoplásica (LEWIS; JORDAN, 2005)

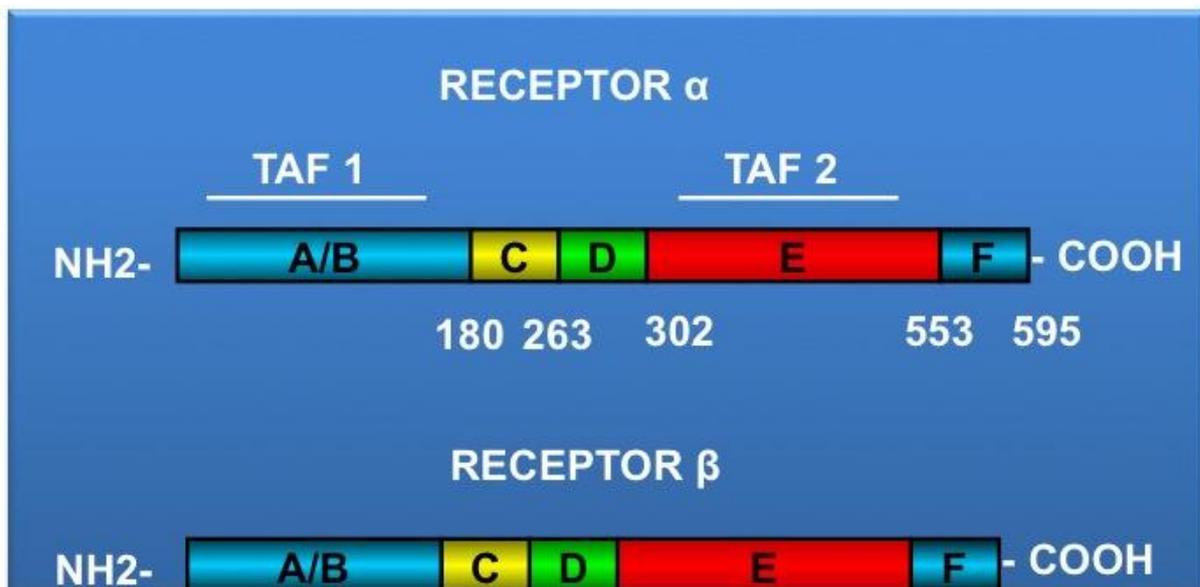


Figura 4. Regiões funcionais dos receptores de estrogênio alfa e beta.

Fonte: Lewis;Jordan (2005)

A progesterona (P) participa da regulação de vários processos reprodutivos, como ovulação e comportamento sexual, e até mesmo do funcionamento do sistema nervoso central, influenciando a excitabilidade neuronal, o aprendizado e proliferação neoplásica das células da glia. Como atravessa rapidamente a barreira hematoencefálica, é capaz de diminuir o processo inflamatório e o edema que acompanha o traumatismo cranioencefálico grave (CABRERA-MUNOZ et al., 2009).

O real mecanismo de ação ainda não está totalmente esclarecido, mas a síntese e o estímulo da secreção de substâncias neuroprotetoras, como o fator de crescimento neuronal, fator de crescimento neurotrófico derivado do cérebro e o fator neurotrófico derivado de células gliais, estão entre os seus principais efeitos (LIU et al., 2014).

Trabalhos experimentais evidenciam a capacidade deste esteróide em estimular a infiltração e a migração de células astrocitárias no córtex de ratos. Isto pode ser devido a vários mecanismos como o aumento da expressão de proteínas de adesão celular, modificação do citoesqueleto e da membrana plasmática e até mesmo a modificação de canais iônicos voltagem dependentes (GERMÁN-CASTELÁN; MANJARREZ-MARMOLEJO; GONZÁLEZ-ARENAS, 2014).

Estudos *in vitro* apontam que a progesterona promove a proliferação de células de astrocitomas, assim como a expressão de genes importantes para o crescimento e disseminação destas neoplasias, tais como ciclina D1, receptor do fator de crescimento epidérmico e fator de crescimento do endotélio vascular (HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ; GONZÁLEZ-GARCÍA; CAMACHO-ARROYO, 2012; GERMÁN-CASTELÁN; MANJARREZ-MARMOLEJO; GONZÁLEZ-ARENAS, 2014;).

Entretanto, segundo Atif (2015), a progesterona em altas doses inibe o crescimento do glioblastoma multiforme, *in vitro* e em animais experimentais. Isto ocorre principalmente pela inibição da proliferação celular, da angiogênese e pela indução da apoptose.

Este hormônio, derivado do colesterol, exerce seus efeitos por dois principais mecanismos, denominados de clássicos e não clássicos. O primeiro, mais lento, envolve a interação com receptores de progesterona (RP) nucleares, enquanto o segundo requer a participação com receptores de membrana e canais iônicos, tendo efeitos mais rápidos. Algumas ações da progesterona podem ser mediados via receptores nucleares, mas outros não, sugerindo um potencial efeito dos receptores de membrana. (CABRERA-MUÑOZ; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ; CAMACHO-ARROYO, 2011; GONZÁLEZ-ARENAS et al., 2012; HLAVATY et al., 2016; VALADEZ-COSMES et al., 2016).

Os receptores são ligantes de fatores de transcrição de vários genes envolvidos no metabolismo, desenvolvimento, reprodução e progressão do ciclo celular. Duas isoformas tem sido descritas em seres humanos, RP-A e RP-B, e

possuem a mesma origem genética, que são diferentemente expressas em várias regiões cerebrais e na mesma célula podem executar funções distintas, pois são reguladas por diferentes promotores. De uma forma geral, o RP-B é mais forte ativador de transcrição do que a o RP-A (EVANS et al., 2004; CABRERA-MUÑOZ; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ; CAMACHO-ARROYO, 2011; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ; GONZÁLEZ-GARCÍA; CAMACHO-ARROYO, 2012; HASSANZADEH; ARBABI, 2012; GERMÁN-CASTELÁN; MANJARREZ-MARMOLEJO; GONZÁLEZ-ARENAS, 2014;).

Os receptores de progesterona tem sido encontrados em vários tipos de tumores cerebrais, tais como meningiomas, cordomas, craniofaringiomas e em gliomas (GONZALEZ-AGUERO et al., 2001; EVANS et al., 2004; UEHARA et al., 2012).

A observação de algumas drogas anti-estrogênicas e anti-progesterônicas em tumores gliais *in vitro*, que atuam principalmente por meio da interação com receptores hormonais, assim como a escassez de estudos abordando a cinética celular e a expressão dos receptores de estrógeno e progesterona em gliomas é o que nos levou ao desenho do presente estudo.

2. OBJETIVO

Avaliar a expressão do antígeno Ki-67 e dos receptores de estrogênio e progesterona em astrocitomas de baixo e alto grau.

3. METODOLOGIA

3.1- Tipo do Estudo e Local da Realização:

Estudo transversal realizado em blocos de parafina de astrocitomas arquivados nos últimos cinco anos no Setor de Anatomia Patológica do Hospital São Marcos.

3.2- Cálculo Amostral:

Baseado nos objetivos do estudo, o cálculo do dimensionamento amostral foi realizado para testar duas médias amostrais independentes do mesmo tamanho (grupo de casos x grupo de controle). Assim, para comparar duas proporções supondo, com base na literatura, seus valores iguais a 25% e 60%, com poder de 80% e nível de significância de 5%, podemos utilizar a fórmula apresentada em Glantz (2002):

$$n = \frac{A \left[1 + \sqrt{1 + \frac{4\delta}{A}} \right]^2}{4\delta^2}$$

$$A = \left[z_{\alpha(2)} \sqrt{2p(1-p)} + z_{1-\beta} \sqrt{p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2)} \right]^2$$

$$p = \frac{p_1 + p_2}{2}$$

$$\delta = |p_1 - p_2|$$

com $p_1=0,25$, $p_2=0,6$; $z_{\alpha(2)}=1.96$ e $z_{1-\beta}=0,84$. Nesse caso, obtemos $n= 35,59$, ou seja, $n=36$ unidades amostrais por grupo.

Setenta e dois casos de astrocitomas, previamente fixados em formol a 10% e armazenados em blocos de parafina, foram histologicamente divididos em dois grupos de 36 casos, de baixo e alto grau, todavia por motivos técnicos, foram utilizados apenas 40 blocos, sendo 20 em cada grupo.

Foram escolhidos de forma aleatória simples, entre todos os tumores que preencherem os critérios de inclusão, por intermédio de sorteio realizado pelo programa SPSS 20.0.

3.3- Critérios de Inclusão da Amostra:

Apenas amostras do tipo do tipo histológico astrocitoma.

Os casos sem tratamento prévio a cirurgia primária.

Tumores armazenados em blocos de parafina há no máximo cinco anos.

3.4- Método Imunoistoquímico:

Cada bloco de parafina deu origem a três lâminas (uma para estudar o antígeno Ki-67, uma para o receptor de estrógeno e outra para o receptor de progesterona) que foram desparafinizadas com com xilol a temperatura de 60°C por 15 minutos, desidratados com concentrações decrescentes de álcool (100, 95, 80 e 70%) por 30 segundos cada e lavadas com água destilada.

Para recuperar os antígenos, as lâminas foram imersas em ácido cítrico tamponado e aquecidas em microondas por 15 minutos com potência máxima. Em seguida tratadas com peróxido de hidrogênio à 3% em solução tamponada em duas imersões de 10 minutos cada. Novamente lavadas com água destilada e fosfato de salina tamponada.

Em seguida as lâminas foram colocados num sistema informatizado de coloração denominado de BenchMark Ultra (Ventana Medical Systems®) (Figura 6), que utilizou como marcadores imunoistoquímicos o anticorpo monoclonal NCL-ER-6F11 (Novocastra Laboratories Ltd.) para os receptores de estrógeno, o anticorpo monoclonal anti-humano PgR 636 (Dako Corporation) para os receptores de progesterona e o anticorpo monoclonal anti-Ki-67 de rato (clone MIB1 Ref. M7240; Dako, Carpinteria, CA, USA/1:4800) para o antígeno Ki67.

Foram consideradas positivas as células que mostraram núcleo corado em marrom.



Figura 5-Sistema computadorizado BenchMark Ultra (Ventana Medical Systems®). 1 computador com software de controle; 2: Instrumento de coloração das lâminas.

Fonte: Arquivo pessoal

3.5- Método Quantitativo:

Foi realizada utilizando um microscópio (Nikon Eclipse E-400, microscópio óptico, Tokyo, Japão) conectado a uma câmera de vídeo colorida (Samsung digital câmera CHC-370N, Seul, Coréia) que capturou a imagem e transmitiu a um computador equipado com o programa Imagelab, versão 2.3, desenvolvido pela Softium Informática Ltda. (São Paulo, Brasil) para a avaliação das imagens (Figura 7).

Para a expressão dos receptores de estrógeno, progesterona e do antígeno Ki-67, foram contadas 600 células coradas ou não, usando um aumento de 400x, iniciando pelas áreas com maior expressão das células marcadas. Em cada lâmina, a porcentagem de células foi obtida da razão entre o número de células com núcleo corado e o total de células, multiplicada por 100.



Figura 6- Sistema computadorizado utilizado para contagem de células. 1:Microscopia óptica; 2: Vídeo câmera digital; 3: Software de análise de imagem.

Fonte: Arquivo pessoal

3.6- Método Estatístico:

Os resultados foram armazenados em planilhas do Excel Windows e a análise estatística foi realizada pelo programa SPSS 20.0.

Os dados obtidos foram previamente submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov.

A porcentagem média de núcleos corados para receptores de estrógeno, progesterona e para o Ki-67, entre os gliomas de baixo e alto grau foi comparada utilizando o teste de Mann-Whitney, uma vez que a distribuição não foi normal e as amostras são independentes. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$.

3.7- Aspectos Legais e Éticos:

O trabalho foi aprovado pela Plataforma Brasil e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Piauí com um aditivo feito a um projeto mais amplo da linha de pesquisa do orientador intitulado “Biomarcadores Moleculares em Mulheres com Neoplasia Mamária” sob o número de registro CAAE 43447015.8.0000.5214.

4. RESULTADOS

O estudo microscópico mostrou uma maior concentração de células com núcleos corados com anti-Ki-67 no grupo de células de astrocitomas de alto grau em comparação com o de baixo grau. Os núcleos corados para RE foram encontrados apenas nos astrocitomas de baixo grau, enquanto os núcleos corados para RP foram tanto nos astrocitomas de baixo como de alto grau (Figuras 7 a 12).

A porcentagem média de núcleos corados com anti-ki-67 foi $0,19 \pm 0,07$ nos astrocitomas de alto grau em comparação com $0,05 \pm 0,02$ nos astrocitomas de baixo grau ($p < 0,0001$) (Tabela 1). A porcentagem média de núcleos corados com anti-RE foi nula nos astrocitomas de alto grau em comparação com $0,04 \pm 0,05$ nos astrocitomas de baixo grau ($p < 0,0001$) (Tabela 2). A porcentagem média de núcleos corados com anti-RP foi $0,09 \pm 0,1$ nos astrocitomas de alto grau em comparação com $0,15 \pm 0,15$ nos astrocitomas de baixo grau ($p = 0,2$) (Tabela 3). Os resultados encontram-se melhor ilustrados no *boxplot* da mediana de núcleos com expressão positiva para o antígeno Ki-67, RE e RP entre os astrocitomas de alto e baixo grau (Figura 13, Figura 14 e Figura 15).

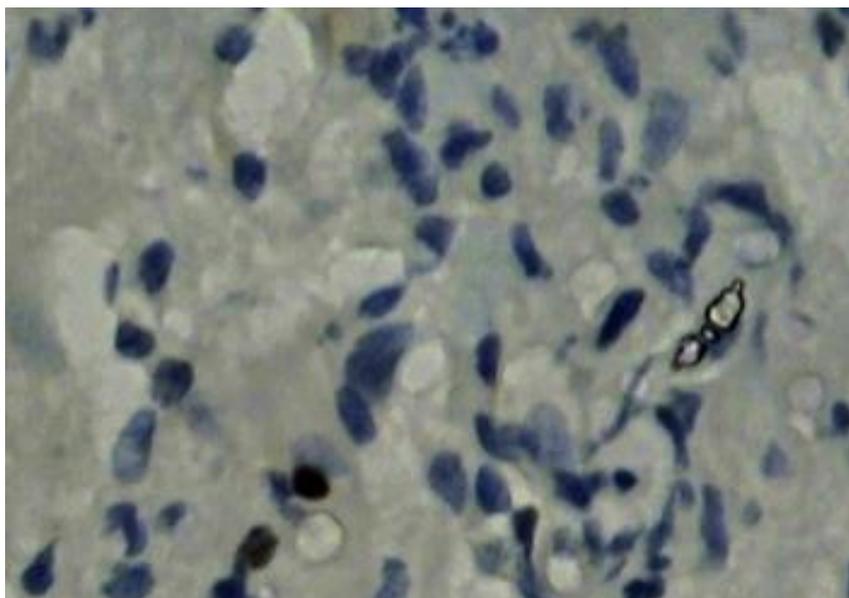


Figura 7-Fotomicrografia de corte histológico de astrocitoma de baixo grau mostrando ausência de expressão do antígeno Ki-67 (ampliação original, 400X).

Fonte: Arquivo Pessoal.

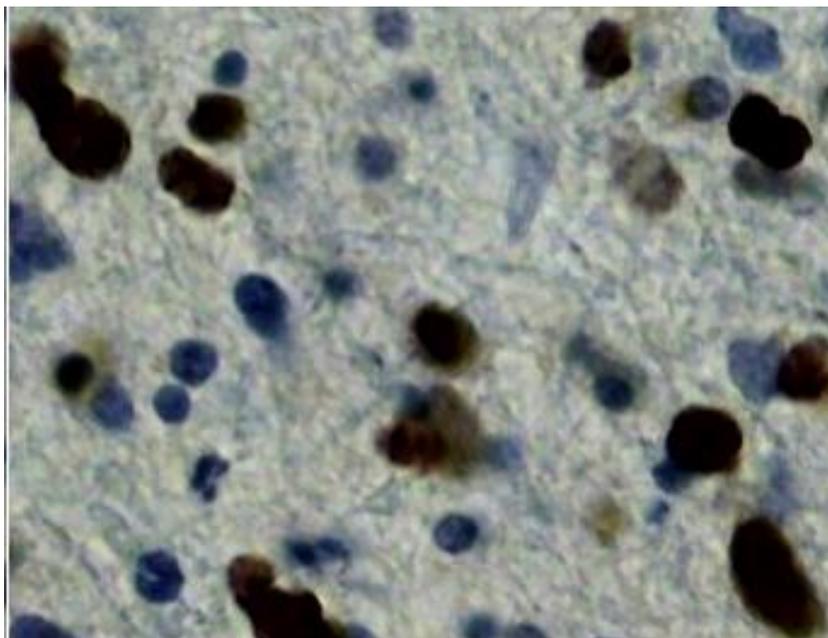


Figura 8-Fotomicrografia de corte histológico de astrocitoma de alto grau mostrando alta concentração de núcleos celulares corados com anti-KI-67 (ampliação original, 400X).

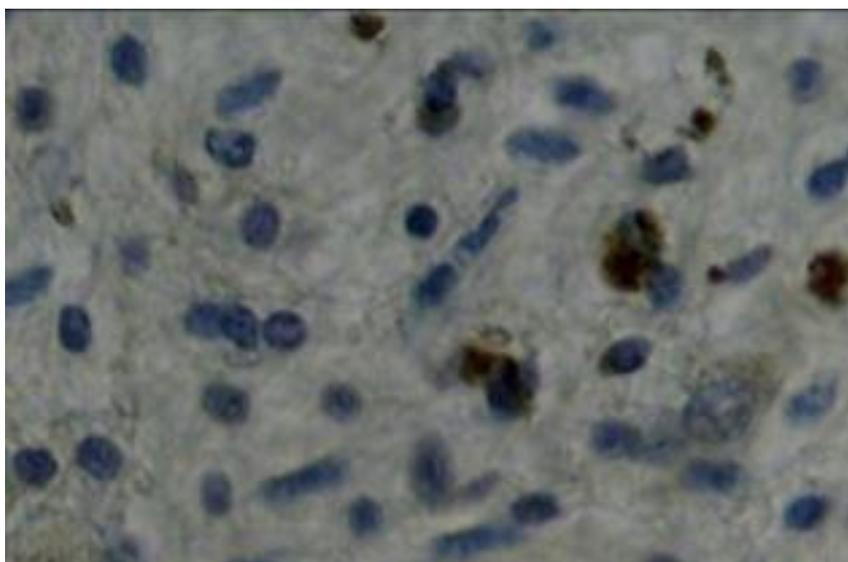


Figura 9-Fotomicrografia de corte histológico de astrocitoma de baixo grau mostrando a presença de núcleos corados com anti-RE(ampliação original, 400X).

Fonte: Arquivo Pessoal.

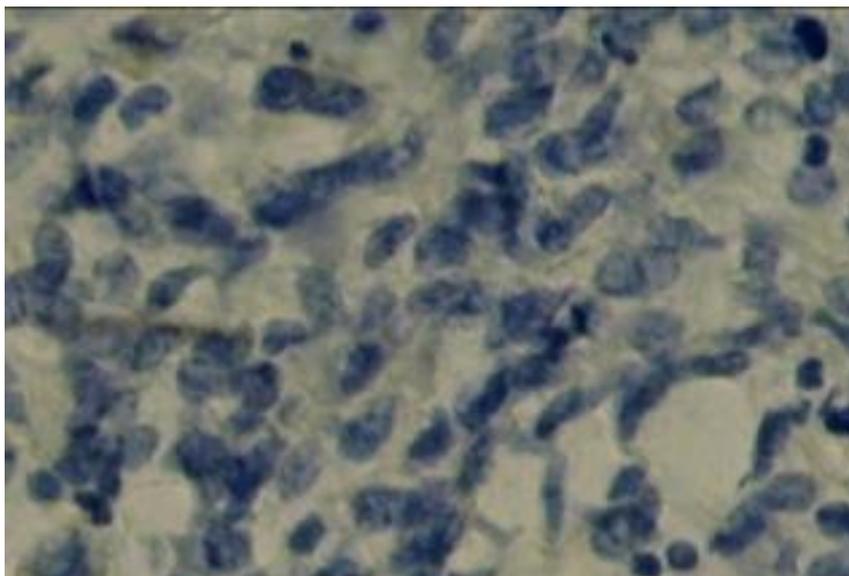


Figura 10-Fotomicrografia de corte histológico de astrocitoma de alto grau mostrando ausência da expressão de receptores de estrogênio (ampliação original, 400X).

Fonte: Arquivo Pessoal.

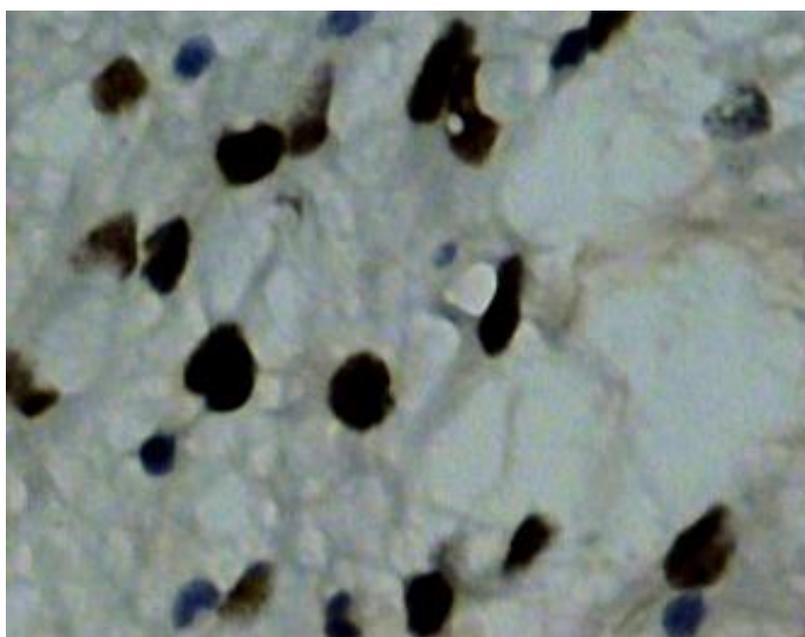


Figura 11-Fotomicrografia de corte histológico de astrocitoma de baixo grau mostrando alta concentração de núcleos corados com anticorpo anti-RP (ampliação original, 400X).

Fonte: Arquivo Pessoal.

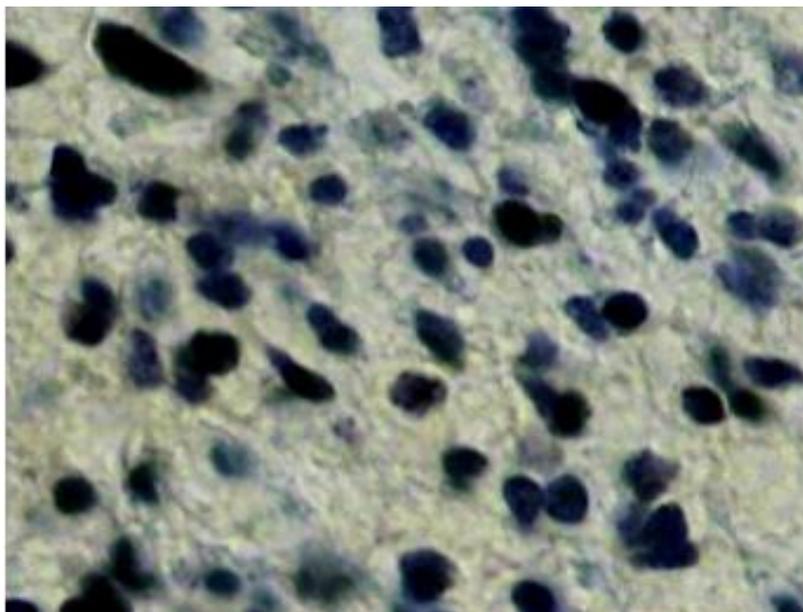


Figura 12-Fotomicrografia de corte histológico de astrocitoma alto grau mostrando alta concentração de núcleos corados com anticorpo anti-RP, porém sem diferença estatisticamente significativa em relação aos de baixo grau (ampliação original, 400X).

Tabela 01: Porcentagem média de núcleos corados com anti-Ki-67 em astrocitomas de alto e baixo grau.

Grupos	N	Média	EP	DP	Mínimo	Máximo	Mediana
Alto Grau	20	0,19*	0,0175	0,0783	0,0682	0,3371	0,1975
Baixo Grau	20	0,05	0,0046	0,0204	0,0223	0,1135	0,0468

Legenda: EP: erro padrão; DP: desvio padrão

* $p < 0,0001$

Tabela 02: Porcentagem média de núcleos corados com anti-RE em astrocitomas de alto e baixo grau.

Grupos	N	Média	EP	DP	Mínimo	Máximo	Mediana
Alto Grau	20	0,0	0	0	0	0	0
Baixo Grau	20	0,04*	0,012	0,0536	0	0,1894	0,0164

EP: erro padrão; DP: desvio padrão

* $p < 0,0001$

Tabela 03: Porcentagem média de núcleos corados com anti-RP em astrocitomas de alto e baixo grau.

Grupos	N	Média	EP	DP	Mínimo	Máximo	Mediana
RP Alto Grau	20	0,09	0,0237	0,1062	0	0,37	0,0459
RP Baixo Grau	20	0,15	0,0330	0,1479	0	0,55	0,0965

EP: erro padrão; DP: desvio padrão

p=0,2

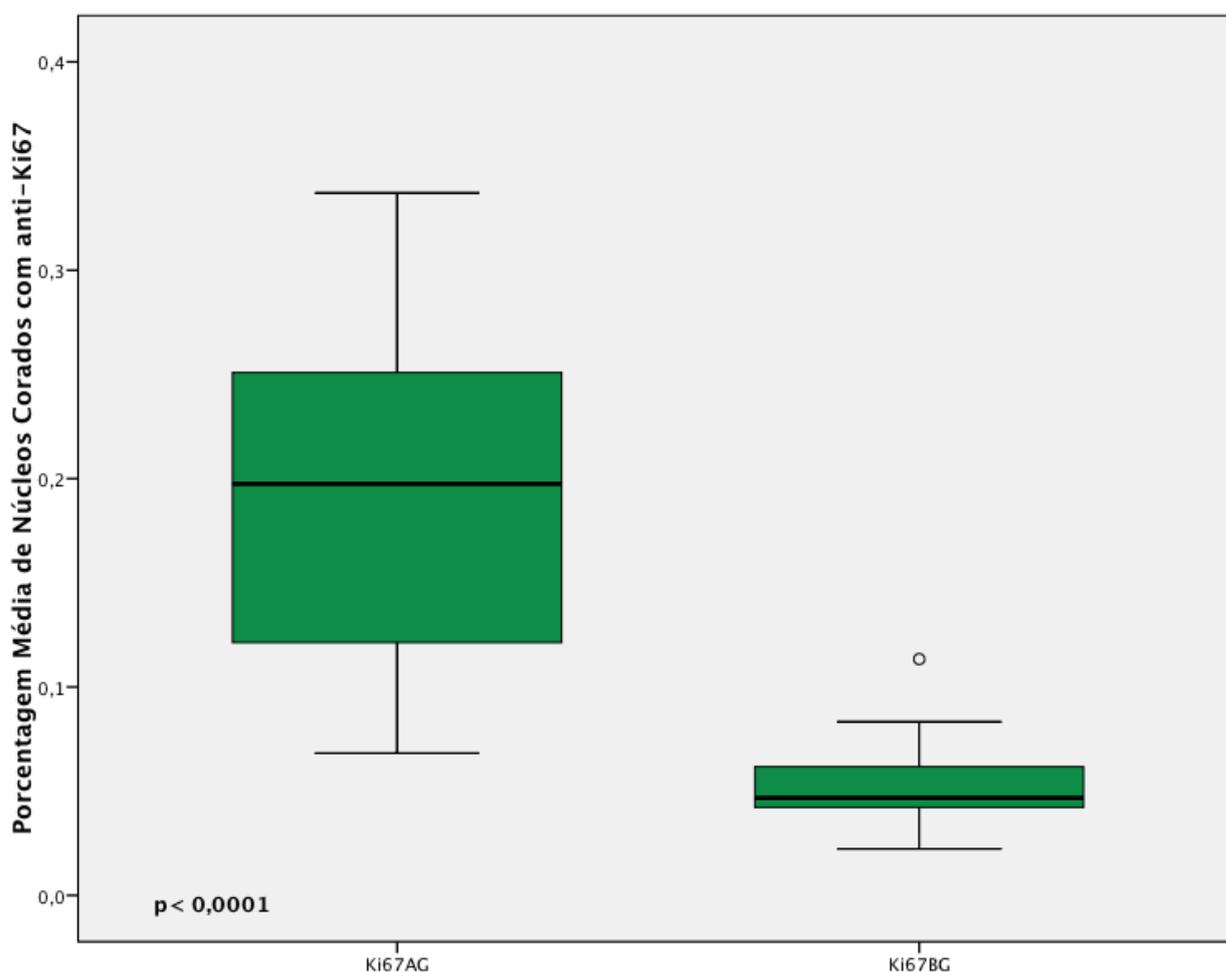


Figura 13: Mediana de núcleos corados com anti-Ki-67 em astrocitomas de alto e baixo grau.

Legenda: Ki-67AG: Ki-67 em Astrocitomas de Alto Grau

Ki-67BG: Ki-67 em Astrocitomas de Baixo Grau

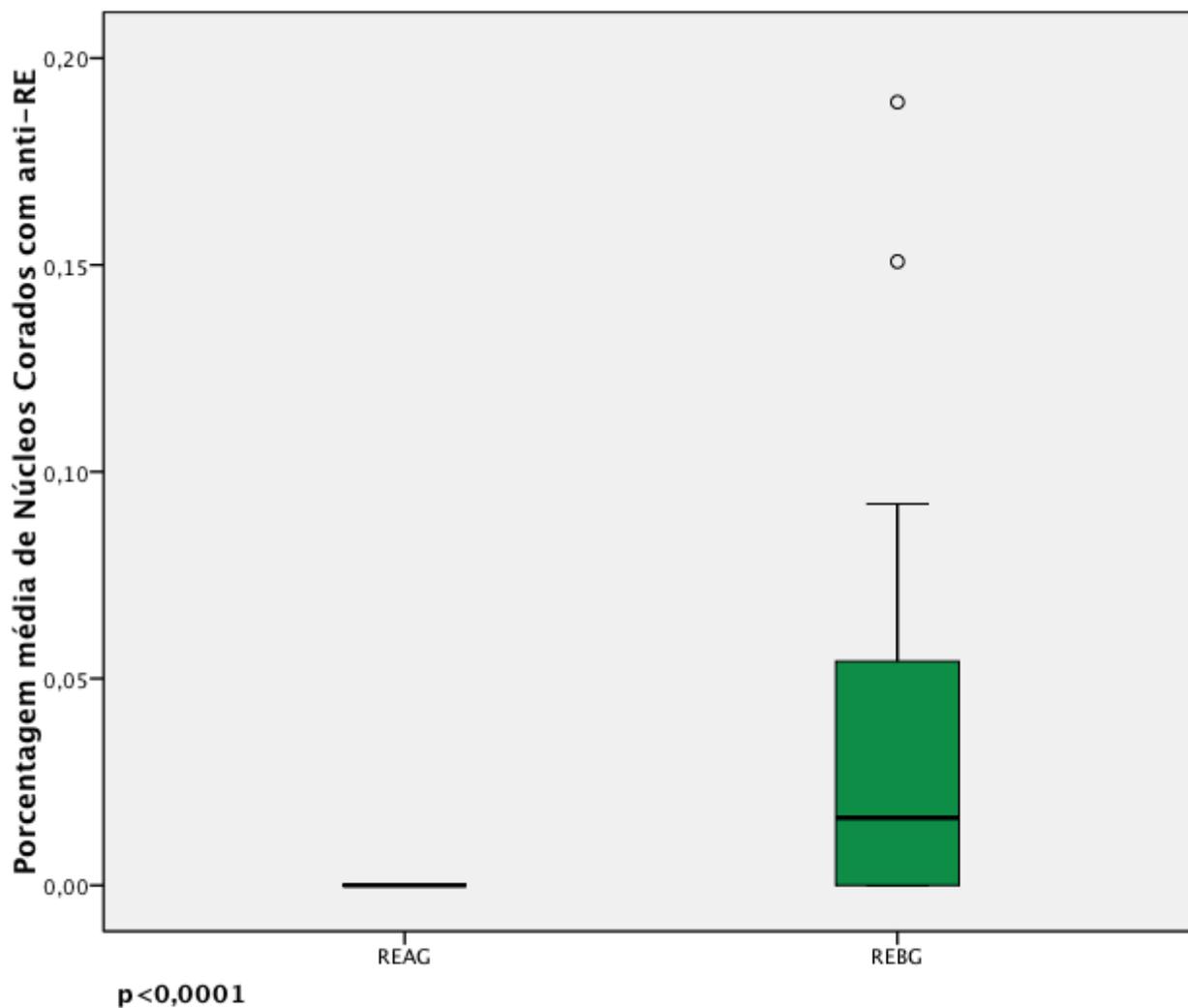


Figura 14: Mediana de núcleos corados com anti-RE em astrocitomas de alto e baixo grau.

Legenda: REAG: Receptor de Estrógeno em Astrocitomas de Alto Grau

REBG: Receptor de Estrógeno em Astrocitomas de Baixo Grau

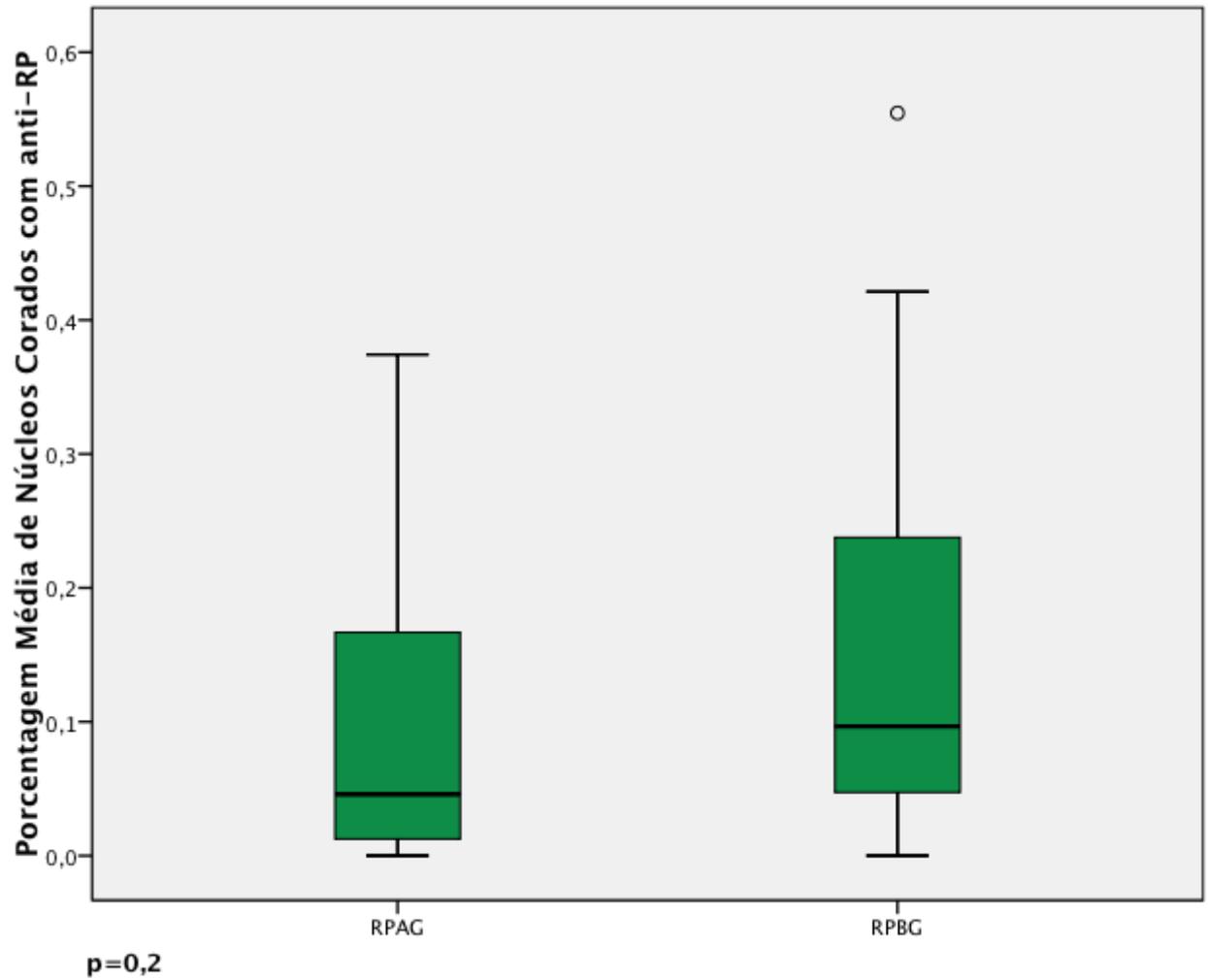


Figura 15: Mediana de núcleos corados com anti-RP em astrocitomas de alto e baixo grau.

Legenda: RPAG: Receptor de Progesterona em Astrocitomas de Alto Grau

RPBG: Receptor de Progesterona em Astrocitomas de baixo Grau

5. DISCUSSÃO

No presente estudo observamos uma maior proporção de núcleos corados com anti-Ki-67 nos gliomas de alto grau em comparação com os gliomas de baixo grau, mostrando uma maior proliferação celular dos malignos em comparação com os benignos. Este achado está de acordo com inúmeros trabalhos que apontam para um substancial aumento no IP com o aumento da malignidade dos gliomas (GERDES et al., 1983; KARAMITOPOULOU et al., 1994; HSU et al., 1994; KHALID et al., 1997; JOHANNESSEN; TORP, 2006; RATHI; RADOTRA; KHOSLA, 2008; SKJULSVIK et al., 2014; THOTAKURA; TIRUMALASETTI; KRISHNA, 2014;).

No trabalho de Skjulsvik et al. (2014), os valores de Ki-67 mostraram-se significantemente maiores nos astrocitomas de alto grau em comparação com os de baixo grau, todavia não foi mostrada diferença estatisticamente significativa na proliferação celular entre os astrocitomas de baixo grau I e II, assim como entre os gliomas de alto grau III e IV.

Alguns artigos citam a importância do Ki-67 como método de classificação dos gliomas, sendo valores superiores a 10% um ponto de corte razoável, na maioria dos trabalhos, para diferenciar os astrocitomas em baixo grau e alto grau (JOHANNESSEN; TORP, 2006; HABBERSTAD; GULATI; TORP, 2011; THOTAKURA; TIRUMALASETTI; KRISHNA, 2014;)

No entanto, o índice de proliferação celular é utilizado principalmente como um marcador prognóstico. Saha et al. (2014) evidenciou, com auxílio da curva de Kaplan-Meier, que astrocitomas com Ki-67 maior do que 14,3% tinham menor tempo médio de sobrevida e sobrevida acumulativa. Consoante, Uehara et al.(2012), o Ki-67 também é preditivo, pois quanto maior for o índice de proliferação, maior a taxa de recorrência em glioblastomas multiformes, mesmo tratados adequadamente.

Uma revisão sistemática com metanálise, publicada por Wen-Ji et al. (2015), mostrou associação estatisticamente significativa entre o aumento da expressão do Ki-67 e a piora do prognóstico de pacientes com glioma. Já nos pacientes com valores menores do que 10% ocorreu um efeito inverso, uma melhora na sobrevida.

Todavia, os valores do Ki-67 são muito variáveis, uma vez que os métodos de contagem sofrem muita variação interobservadores e intraobservadores e não há uma padronização dos procedimentos imunoistoquímicos entre os diferentes laboratórios. Portanto, o Ki-67 apesar de ser um importante marcador clínico, deve ser utilizado em combinação com outras variáveis, como exames de imagem,

condição neurológica, duração dos sintomas e critérios histopatológicos para definir o diagnóstico, a classificação e prognóstico da doença (GERDES et al., 1983; JOHANNESSEN; TORP, 2006; HABBERSTAD; GULATI; TORP, 2011; THOTAKURA; TIRUMALASETTI; KRISHNA, 2014;).

Os achados imunoistoquímicos em relação ao receptor de estrógeno do presente estudo mostraram que sua presença ocorreu apenas em astrocitomas de baixo grau, o que está de acordo com a literatura que mostra os RE serem principalmente expressos em células astrocitárias normais e em gliomas de baixo grau, assim diminuindo a sua concentração com o aumento da malignidade destes tumores, suscitando um papel neuroprotetor (BATISTATOU et al., 2004; BATISTATOU et al., 2006; SAREDDY et al., 2012; JIMENEZ et al., 2014; LIU et al., 2014, TAVARES et al., 2016).

Por outro lado, Wenjun Lia et al. (2013) mostraram que o RE β 5 foi a principal isoforma dos RE β encontrada em gliomas e a sua expressão foi maior na neoplasia do que em tecido cerebral normal e com aumento da sua expressão com o processo de desdiferenciação celular, o que segundo este autor poderia ter ocorrido devido a hipóxia, comum em gliomas, que pode aumentar a expressão destes receptores.

Outrossim, Sareddy et al. (2012), mencionam que em gliomas de alto grau estes receptores são encontrados principalmente no citoplasma celular dos gliomas, o que poderia justificar a sua ausência, tendo em vista que neste estudo foi utilizado anticorpo para marcação desta proteína localizada no núcleo celular.

Os receptores de estrogênio também podem ser usados como biomarcadores prognósticos, uma vez que correlação positiva entre a expressão RE α e o tempo de sobrevida de pacientes com gliomas tem sido encontrada. Modelos de regressão, utilizando a curva de Kaplan-Meier, também tem evidenciado um melhor prognóstico e maior tempo de sobrevida para pacientes com tumores RE β positivos (BATISTATOU et al., 2006; JIMENEZ et al., 2014; TAVARES et al., 2016).

Por sua vez, os achados do presente estudo, com relação à expressão dos receptores de progesterona não mostraram diferença estatisticamente significativa entre os astrocitomas de alto e baixo grau. Estes resultados não estão em consonância com achados consistentes da literatura em relação à expressão dos receptores de progesterona e o grau histológico dos astrocitomas (ASSIMAKOPOULOU et al., 1998; GONZALEZ-AGUERO et al., 2001; EVANS et al., 2004; HERNANDEZ-HERNANDEZ et al., 2010; HASSANZADEH; ARBABI, 2012;

THOTAKURA; TIRUMALASETTI; KRISHNA, 2014; GERMÁN-CASTELÁN; MANJARREZ-MARMOLEJO; GONZÁLEZ-ARENAS, 2014).

A propósito, a progesterona, como já supracitada, é derivada do colesterol e exerce seus efeitos por meio de dois principais mecanismos, denominadas vias clássica e não-clássica. A clássica envolve a interação com os receptores nucleares intracelulares de progesterona, enquanto a não-clássica requer a participação de receptores de membrana e canais de íons. Estes receptores são ligantes de fatores da transcrição para diversos genes que estão envolvidos no metabolismo, desenvolvimento, reprodução e progressão do ciclo celular (CABRERA-MUÑOZ; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ; CAMACHO-ARROYO, 2011; GONZÁLEZ-ARENAS et al., 2015). Outrossim, na forma clássica a isoforma do receptor de progesterona B é um ativador transcripcional mais forte do que o receptor de progesterona A (EVANS et al., 2004; CABRERA-MUÑOZ; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ; CAMACHO-ARROYO, 2011; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ; GONZÁLEZ-GARCÍA; CAMACHO-ARROYO, 2012; GERMÁN-CASTELÁN; MANJARREZ-MARMOLEJO; GONZÁLEZ-ARENAS, 2014).

Os receptores de progesterona são regulados diferentemente pelo estradiol e progesterona em células e tecidos. Comumente, o receptor de progesterona é aumentado (hiperexpresso) pelo estradiol e reduzido (subexpresso) pela progesterona (CABRERA-MUÑOZ; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ; CAMACHO-ARROYO, 2011; DUEÑAS JIMÉNEZ et al.2014).

Todavia, consoante alguns estudos, a expressão do receptor de progesterona, em particular a sua isoforma B, aumenta com a malignidade histológica dos astrocitomas, diferindo do que é observado com os receptores de estrogênios (GONZALES-AGUERO et al., 2001; EVANS et al., 2004; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ et al., 2010; CABRERA-MUÑOZ; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ; CAMACHO-ARROYO, 2011; HASSANZADEH; ARBABI, 2012; THOTAKURA; TIRUMALASETTI; KRISHNA, 2014; GERMÁN-CASTELÁN; MANJARREZ-MARMOLEJO; GONZÁLEZ-ARENAS, 2014). Assim, os nossos achados, como já supracitados, não apresentaram concordância com a literatura em relação à expressão do receptor de progesterona com o grau de malignidade dos astrocitomas.

Alguns autores têm sugerido um mecanismo de ação em que o receptor de progesterona participa na proliferação celular induzido pela ativação da Proteína C

Kinase (PCK) por meio de uma complexa via de sinalização, onde a PCK ativa o receptor de progesterona pela fosforilação e isto aumenta a atividade transcricional, que possivelmente induz a expressão gênica (GONZÁLEZ-ARENAS et al., 2015).

Por sua vez, Assimakopoulou et al. (1998) mencionaram que uma possível explicação para o desencontro desses achados poderia ser a heterogeneidade tumoral regional que poderia assim ser um fator limitante para o uso de imunohistoquímica do receptor de estrógeno e receptor de progesterona na avaliação do exame de patologia de rotina.

Assim, os achados do presente estudo mostraram uma expressão dos receptores de estrógenos estatisticamente significante maior nos astrocitomas de alto grau em comparação com os de baixo grau e uma expressão similar da expressão dos receptores de progesterona entre astrocitomas de alto e baixo grau, todavia há necessidade de futuros estudos prospectivos com um tamanho amostral maior para se melhor correlacionar os receptores hormonais com agressividade dos astrocitomas.

6. CONCLUSÕES

Neste estudo:

1. A expressão da proteína Ki-67 foi significativamente maior nos astrocitomas de alto grau em comparação com os de baixo grau.
2. Somente os astrocitomas de baixo grau mostraram expressão do RE, com uma diferença estatisticamente significante em comparação com os de alto grau.
3. A expressão do receptor de progesterona foi similar entre os astrocitomas de baixo e alto grau.

REFERÊNCIAS

ASSIMAKOPOULOU M. *et al.* Does Sex Stereoid Receptor Status Have any Prognostic or Predictive Significance in brain Astrocytic Tumors? **ClinNeuropathol**, v.17, p.27-34, 1998.

ATIF F.; YOUSUF S.; STEIN D.G. Anti-tumor effects of progesterone in human glioblastomamultiforme: Role of PI3K/Akt/mTOR signaling. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v.146, p.62–73, 2015.

BATISTATOU A. *et al.* Estrogen receptor beta (ERb) protein expression correlates with BAG-1 and prognosis in brain glial tumours. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 77, p.17–23, 2006.

BATISTATOU, A. *et al.* Estrogen Receptor Beta (Erb) is Expressed in Brain Astrocytic Tumors and Declines with Dedifferentiation of The Neoplasm. **J Cancer Res ClinOncol**, v.130, p. 405–410, 2004.

BERNY W. Analysis of expression of estrogen (ER) and progesterone receptors (PR) in brain glial tumors and its correlation with expression of p53 protein and proliferating cell nuclear antigen (PCNA). **NeuroNeurochir Pol**, v.38 p.367-371, 2004.

CABRERA-MUNOZ E. *et al.* Regulation of progesterone receptor isoforms content in human astrocytoma cell lines. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v.113, p. 80–84, 2009.

CABRERA-MUÑOZ E.;HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ O.T.; CAMACHO-ARROYO I. Role of progesterone in human astrocytomas growth. **Curr Top Med Chem**, v.11, p.1663-1667, 2011.

CARROLL R.S. *et al.* Steroid Hormone Receptors in Astrocytic Neoplasm. **Neurosurgery**, v.37, p. 496-504, 1995.

CHECK J.H. *et al.* Evidence that Mifepristone, a progesterone receptor antagonist, can cross the blood brain barrier and provide palliative benefits for glioblastomamultiforme grade IV. **Anticancer Res**, v. 34, p.2385-2388, 2014.

CORK D.M.; Lennard T.W.; Tyson-Capper A.J. Alternative splicing and the progesterone receptor in breast cancer. **Breast Cancer R**, v.10,p. 207, 2008.

DEBNAM, J.M. *et al.* Radiology of Brain Tumors: Structure and Physiology. In: DeMONTE, F. *et al.* **Tumors of the Brain and Spine**. United States of America: Spinger, 2007. p. 37-52.

DUEÑAS JIMÉNEZ J.M, *et al.* Aromatase and estrogen receptor alpha mRNA expression as prognostic biomarkers in patients with astrocytomas. **J Neurooncol**, v.119, p. 275-284, 2014.

EVANS S.M. *et al.* Comparative measurements of hypoxia in human brain tumors using needle electrodes and EF5 binding. **Cancer Res**, v.64, p.1886–1892, 2004.

GERDES J. *et al.* Production of a Mouse Monoclonal Antibody Reactive with a Human Nuclear Antigen Associated with Cell Proliferation. **Int J Cancer**, v.31, p.13-20, 1983.

GERMÁN-CASTELÁN L.; MANJARREZ-MARMOLEJO J.; GONZÁLEZ-ARENAS A. Progesterone Induces the Growth and Infiltration of Human Astrocytoma Cells Implanted in the Cerebral Cortex of the Rat. **BioMed Research International**, p.1-8, 2014.

GLANTZ SA. **Primer in Biostatistics**. 5.ed. New York: McGraw-Hill, 2002.

GONZALEZ-AGUERO G, *et al.* Progesterone Receptor Isoforms Expression Pattern in Human Astrocytomas. **Brain Research Bulletin**, v.56, p.43-48, 2001.

GONZÁLEZ-ARENAS A, *et al.* PKC α and PKC δ Activation Regulates Transcriptional Activity and Degradation of Progesterone Receptor in Human Astrocytoma Cells. **Endocrinology**, v.156, p.1010–1022, 2015.

GONZÁLEZ-ARENAS A. *et al.* Estradiol increases cell growth in human astrocytoma cell lines through ER activation and its interaction with SRC-1 and SRC-3 coactivators. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1823, p. 379–386, 2012.

HABBERSTAD A.H.; GULATI S; TORP S.H. Evaluation of the proliferation markers Ki-67/MIB-1, mitotin, survivin, pHH3, and DNA topoisomerase IIa in human anaplastic astrocytomas an immunohistochemical study. **Diagnostic Pathology**.v.6, p.43, 2011.

HASSANZADEH P.; ARBABI E. The Effects of Progesterone on Glial Cell Line-derived Neurotrophic Factor Secretion from C6 Glioma Cells. **Iran J Basic Med Sci**, v.15, p.1046-1052, 2012.

HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ O. T, GONZÁLEZ-GARCÍA T. K, CAMACHO-ARROYO I. Progesterone receptor and SRC-1 participate in the regulation of VEGF, EGFR and Cyclin D1 expression in human astrocytoma cell lines. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v.132, p.127–134, 2012.

HERNANDEZ-HERNANDEZ O.T. *et al.* Progesterone and Estradiol Effects on SRC-1 and SRC-3 Expression in Human Astrocytoma Cell Lines. **Endocrinology**, v.37, p.194-200, 2010.

HLAVATY J. *et al.* Expression of Progesterone Receptor Membrane Component 1 (PGRMC1), Progesterone and AdipoQ Receptor 7 (PAQPR7), and Plasminogen Activator Inhibitor 1 RNA-Binding Protein (PAIRBP1) in Glioma Spheroids In Vitro. **BioMed Research International**, v.2016, p. 1-12, 2016.

HO V.K.Y. *et al.* Changing incidence and improved survival of gliomas. **European Journal of Cancer**, v.50, p.2309–2318, 2014.

HSU D.W. *et al.* Use of MIB-1 (Ki-67) Immunoreactivity in Differentiating Grade II and Grade III gliomas. **J NeuropatholExpNeurol**, v.56, p.857-865, 1994.

HU X. *et al.* Expression of p53, epidermal growth factor receptor, Ki-67 and O6-methylguanine-DNA methyltransferase in human gliomas. **Oncology Letters**, v.6, p 130-134, 2013.

JIMENEZ J.M.D. *et al.* Aromatase and estrogen receptor alpha mRNA expression as prognostic biomarkers in patients with astrocytomas. **J Neurooncol**, V.119, p.275–284, 2014.

JOHANNESSEN A.L.; TORP S.H. The Clinical Value of Ki-67/MIB-1 Labeling Index in Human Astrocytomas. **PathologyOncologyResearch**, v.12, p.143-147, 2006.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

KABAT, G.C.; ETGEN, A.M.; ROHAN T.E. Do Steroid Hormones Play a Role in the Etiology of Glioma? **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v.19, p. 2421-2427, 2010.

KARAMITOPOULOU, E. *et al.* Ki-67 Immunoreactivity in Human Central Nervous System Tumors: a Study with MIB-1 Monoclonal Antibody on Archival Material. **ActaNeuropathol**, v. 87.p.47-54, 1994.

KELES, G.E. *et al.* Low-Grade Astrocytomas. In: TONN, J.C. *et al.* **Neuro-Oncology of CNS Tumors**. 1. ed. Germany: Springer, 2006. p. 104-117.

KHALID H. *et al.* Immunohistochemical analysis of progesterone receptor and Ki-67 labeling index in astrocytic tumors. **Cancer**, v.11, p.2133-2140, 1997.

KOSTANTINOPOULOS P.A. *et al.* Oestrogen Receptor beta (ERb) is Abundantly Expressed in Normal Colonic Mucosa, but Declines in Colon Adenocarcinoma Paralleling the Tumors Dedifferentiation. **Eur J Cancer**, v.39, p.1251–12458, 2003.

LIU C. *et al.* Expression of estrogen receptors, androgen receptor and steroid receptor coactivator-3 is negatively correlated to the differentiation of astrocytic tumors. **Cancer Epidemiology**, v.38, p. 291–297, 2014.

PATEL, S. *et al.* Phase I Clinical Trial Assessing Temozolomide and Tamoxifen with Concomitant Radiotherapy for Treatment of High-Grade Glioma. **I. J. Radiation Oncology Biology Physics**, v.82, p.739-742, 2012.

POLLACK, F. *et al.* Effect of Tamoxifen on DNA Synthesis and Proliferation of Human Malignant Glioma Lines in Vitro. **Cancer Research**, v.50, p.7134-7138, 1990.

RATHI K.R.; RADOTRA B.D.; KHOSLA V.K. Proliferative Index in Astrocytic Tumours. **Indian J PatholMicrobiol**, v.50, p.754-758, 2007.

REIFENBERGER, G. *et al.* Pathology and Classification of Tumors of the Nervous System. In: TONN, J.C. *et al.* **Neuro-Oncology of CNS Tumors**. 1. ed. Germany: Springer, 2006. p. 104-117.

ROBINS, H.I. *et al.* Phase 2 Trial of Radiation plus High-dose Tamoxifen for Glioblastoma Multiforme: RTOG protocol BR-0021. **Neuro-Oncology**, p.47-51, 2006.

ROSAL A.M.; DA SILVA B.B. Evaluation of estrogen and progesterone receptors in non-neoplastic breast tissue of women of reproductive age exposed to tamoxifen and raloxifene: a randomized, double-blind study. **Breast Cancer Res Treat**, v.125, p.797-801, 2011.

SAHA R. *et al.* Expression of phosphatase and tensin homolog, epidermal growth factor receptor, and Ki-67 in astrocytoma: A prospective study in a tertiary care hospital. **Indian J. MedPaediatr**, v.35, p.149-55, 2014.

SAREDDY G.R. *et al.* Therapeutic significance of estrogen receptor beta agonists in gliomas. **Mol. Cancer Ther**, v.11, p.1174–1182, 2012.

SIEGAL T. Clinical Impact of Molecular Biomarkers in Gliomas. **Journal of Clinical Neuroscience**, v.22, p.437-444, 2015

SKJULSVIK A.J. *et al.* Ki-67/MIB-1 Immunostaining in a Cohort of Human Gliomas. **Int J ClinExpPathol**, v.12, p.8905-8910, 2014.

TANG, P.A. *et al.* A Phase II Study of Carboplatin and Chronic High-Dose Tamoxifen in Patients with Recurrent Malignant Glioma. **Journal of Neuro-Oncology**, v.78, p. 311–316, 2006.

TAVARES C.B. *et al.* Expression of estrogen and progesterone receptors in astrocytomas: a literature review. **Clinics**.v.71 p.481-486, 2016.

THOTAKURA, M.; TIRUMALASETTI, N.; KRISHNA, R. Role of Ki-67 labeling index as an adjunct to the histopathological diagnosis and grading of astrocytomas. **J Can Res Ther**, v.10, p.641-645, 2014.

THUY M.N.T. *et al.* A novel literature-based approach to identify genetic and molecular predictors of survival in glioblastomamultiforme: Analysis of 14,678 patients using systematic review and meta-analytical tools. **Journal of Clinical Neuroscience**, v.22, p.785–799, 2015.

TONN, J.C. *et al.* **Neuro-Oncology of CNS Tumors**.1. ed. Germany: Springer, 2006

UEHARA K. *et al.* Patterns of failure after multimodal treatments for high-grade glioma: effectiveness of MIB-1 labeling index. **Radiation Oncology**, v.7, p.104, 2012.

UEMATSU M. *et al.* Prognostic significance of the immunohistochemical index of survivin in glioma: a comparative study with the MIB-1 index. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 72, p. 231–238, 2005.

VALADEZ-COSMES P. *et al.* Expression and hormonal regulation of membrane progesterone receptors in human astrocytoma cells. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 154, p.176–185, 2015.

WEN-JIE C. *et al.* Ki-67 is a Valuable Prognostic Factor in Gliomas: Evidence from a Systematic Review and Meta-analysis. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v.16, p.411-420, 2015.

WEINGART, J.D.; MCGIRT, M.J.; BREM, H. High-Grade Astrocytoma/Glioblastoma. In: TONN, J.C. et al. **Neuro-Oncology of CNS Tumors**. 1. ed. Germany: Springer, 2006. p. 104-117.

WENJUN LIA. *et al.* Involvement of estrogen receptor b5 in the progression of glioma. **Brain Research**, v.1503, p. 97–107, 2013.

YAMASHITA Y. *et al.* CDC25A mRNA levels significantly correlate with Ki-67 expression in human glioma samples. **J Neuroncol**, v.100, p.43–49, 2010.

ANEXO A- Parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Piauí.**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Biomarcadores Moleculares em Mulheres com Neoplasia Mamária.

Pesquisador: Benedito Borges da Silva

Área Temática:

CAAE: 43447015.8.0000.5214

Instituição Proponente: FUNDACAO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUI

Versão: 2

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.380.140

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A proposta apresenta os componentes básicos exigidos por uma pesquisa acadêmica, referencial teórico que dará sustentação ao estudo, bem como os aspectos éticos do estudo, cronograma e orçamento afirmando ser financiada com recursos próprios.

Os objetivos estão coerentes com a proposta de estudo. O coordenador é docente da UFPI com experiência na temática evidenciada e se compromete cumprir os termos da Resolução CNS nº 466/12 - e zelar pela privacidade e confidencialidade dos dados.

Recomendações:

Sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não.

ANEXO B- Comprovante de submissão do Artigo Científico da Dissertação como requisito para defesa, na European Journal of Cancer.

----- Mensagem original -----

Assunto:European Journal of Cancer: Submission Confirmation for Evaluation of estrogen receptor expression in low-grade and high-grade astrocytomas

Data:27/12/2016 18:27

De:"European Journal of Cancer" <eesserver@eesmail.elsevier.com>

Para:beneditoborges@globo.com

Responder para:"European Journal of Cancer" <ejcancer@elsevier.com>

Title: Evaluation of estrogen receptor expression in low-grade and high-grade astrocytomas
European Journal Of Cancer
Original Research Article

Dear Professor da Silva

Thank you for your submission entitled "Evaluation of estrogen receptor expression in low-grade and high-grade astrocytomas" has been received by the European Journal Of Cancer

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/ejc/>.

Your username is: beneditoborges@globo.com

If you need to retrieve password detail please go to:
http://ees.elsevier.com/ejc/automail_query.asp

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Regards

Yours sincerely

EJC Editorial Office
European Journal Of Cancer