

ANA PAULA DE SOUZA E PINTO

A INFLUÊNCIA DOS PARÂMETROS DE
HIPERCELULARIDADE, MITOSE E NECROSE EM
PALIÇADA NA VASCULATURA DOS GLIOBLASTOMAS.

RECIFE, 2011

Ana Paula de Souza e Pinto

A influência dos parâmetros de hiper celularidade, mitose e necrose
em paliçada na vasculatura dos Glioblastomas.

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Patologia do Centro de Ciências da
Saúde da Universidade Federal de
Pernambuco, para obtenção do
título de Mestre em Patologia.

Orientador: Nicodemos Teles de Pontes Filho
Co-orientador: Roberto José Vieira de Mello

Recife
2011

Pinto, Ana Paula de Souza e

A influência dos parâmetros de hiper celularidade, mitose e necrose em paliçada na vasculatura dos glioblastomas / Ana Paula de Souza e Pinto. – Recife: O Autor, 2011.

73 folhas: il., fig. ; 30 cm

Orientador: Nicodemos Teles de Pontes Filho

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Patologia, 2011.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Glioblastoma. 2. Angiogênese. 3. Hiper celularidade. 4. Mitose. 5. Necrose em paliçada. I. Pontes Filho, Nicodemos Teles de. II. Título.

616.994

CDD (20.ed.) CCS2011-117

UFPE



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. Nº. 024/2011 - CEP/CCS

Recife, 02 de março 2011

Registro do SISNEP FR - 280392

CAAE – 0237.0.172.000-09

Registro CEP/CCS/UFPE Nº 240/09

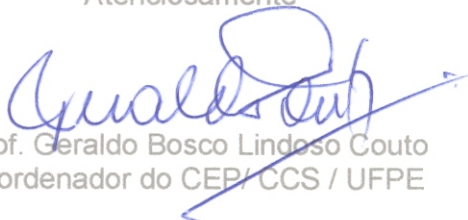
Título: Correlação entre os tipos de astrocitomas e a proliferação celular marcada com o antígeno Ki-67”

Pesquisador Responsável: Ana Paula de Souza e Pinto

Senhor (a) Pesquisador (a):

O Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) recebeu em 01/03/2011 o relatório final do protocolo em epígrafe e considera que o mesmo foi devidamente aprovado por este Comitê nesta data.

Atenciosamente



Prof. Geraldo Bosco Lindoso Couto
Coordenador do CEP/CCS / UFPE

A

Mestre Ana Paula de Souza e Pinto
Programa de Pós-graduação em Patologia – CCS/UFPE.



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Patologia

Av. Prof. Moraes Rego s/n - Cidade Universitária - CEP: 50670-901 - Recife - PE
Prédio da Pós-graduação do Centro de Ciências da Saúde (CCS) - térreo
Fone/Fax: (81) 2126.8529
<http://www.pgmap@ufpe.br> <http://www.pospat.ufpe.br>



***DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE
EM PATOLOGIA.***

AUTORA: ANA PAULA DE SOUZA E PINTO

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PATOLOGIA

**NOME DA DISSERTAÇÃO: “A INFLUÊNCIA DOS PARÂMETROS DE
HIPERCELULARIDADE, MITOSE E NECROSE EM PALIÇADA NA VASCULATURA
DOS GLIOBLASTOMAS”.**

ORIENTADOR: DR. NICODEMOS TELES DE PONTES FILHO

CO – ORIENTADOR: DR. ROBERTO JOSÉ VIEIRA DE MELLO

DATA DA DEFESA: 23 DE FEVEREIRO DE 2011.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Roberto José Vieira de Melo

Prof. Dr. Luciano Tavares Montenegro

Profª. Drª. Sandra Lopes de Souza

Ana Paula de Souza e Pinto

A influência dos parâmetros de hipercelularidade, mitose e necrose
em paliçada na vasculatura dos Glioblastomas.

Dissertação aprovada em: 23 de fevereiro de 2011

Roberto José Vieira de Mello

Prof. Dr. (UFPE)

Luciano Tavares Montenegro

Prof. Dr. (UFPE)

Sandra Lopes de Souza

Prof^a. Dr^a. (UFPE)

Recife
2011

AGRADECIMENTOS

Sou grata a Deus, minha família, meu orientador e co-orientador, a todos os colaboradores, meus amigos e demais pessoas que ajudaram no desenvolvimento desse trabalho.

Penso, logo existo

René Descartes

RESUMO

O Glioblastoma multiforme é uma neoplasia astrocitária maligna e infiltrativa que se torna mais freqüente com a idade e tem uma incidência de 12% a 15% dentre as neoplasias intracranianas com uma sobrevida pós-operatória de 12 meses. Angiogênese é um dos principais pré-requisitos para o crescimento tumoral e para metástase. Em glioblastomas, a presença de vascularização atípica estabelece de forma marcante a malignidade de suas células que secretam fatores pró-angiogênicos alterando totalmente a estrutura do vaso, tornando-o similar a um glomérulo renal. O estudo dos indicadores de anaplasia (mitose, celularidade e necrose em paliçada) em região circunvizinha a angiogênese típica e atípica, em glioblastomas, esclarecerá a importância da estrutura vascular normal ou alterada para o desenvolvimento deste tipo de tumor. O presente estudo teve por objetivo avaliar a influência dos parâmetros histopatológicos de hiper celularidade, mitose e necrose em paliçada na vasculatura dos glioblastomas. Foram utilizados blocos de parafina com fragmentos teciduais cujos diagnósticos histopatológicos foram de glioblastomas. Foram preparadas lâminas e, após análise histológica, selecionados os casos que apresentaram vasculatura atípica. Em cada caso foram analisados os parâmetros de malignidade: hiper celularidade, mitose e presença de necrose em paliçada em áreas vasculares típicas para comparação com áreas vasculares atípicas. Após essa análise, a morfometria gerou as médias da contagem do número de células tumorais e número de mitoses que foram comparadas intra-grupo e esses achados foram correlacionados com a presença ou ausência de necrose em paliçada. O número de mitoses e células em regiões circunvizinhas a vasos atípicos foi estatisticamente superior, estando fortemente relacionados entre si. Constatou-se, que regiões onde há o aumento do número de células e mitoses predispõem a formação de vascularização atípica. A necrose em paliçada não teve correlação com o aumento do número de mitoses em áreas vasculares típicas ou atípicas, mas sua presença foi significativa quanto ao número de células, sendo encontrada uma maior celularidade nos casos em que estava presente esse tipo de necrose. Há interferência dos parâmetros histopatológicos relacionados a hiper celularidade e número de mitoses na áreas vasculares atípicas dos glioblastomas em relação às áreas vasculares típicas.

Palavras-chave: Glioblastoma, angiogênese, hiper celularidade, mitose, necrose em paliçada.

ABSTRACT

Glioblastoma multiforme is a malignant astrocytic tumor infiltrating becoming more frequent with age, has an incidence of 12% to 15% among intracranial tumors with a postoperative survival of 12 months. Angiogenesis is a key prerequisite for tumor growth and metastasis. Glioblastomas in the presence of atypical vascularization provides subsidies to the malignancy of their cells that secrete pro-angiogenic factors altering the structure of the vessel, making it similar to a renal glomerulus. The study of indicators of anaplasia (mitosis, hypercellularity, necrosis in palisading) in region surrounding typical and atypical angiogenesis , in Glioblastomas will clarify the importance of the normal or changed vascular structure to the development of this tumor type. The aim of this study was to evaluate the influence of histomorphometric parameters of hypercellularity, mitoses and necrosis palisading in the vasculature of glioblastomas. This study used paraffin blocks of tissue samples with histopathological diagnoses of glioblastoma. Slides were prepared and after morphological analysis selected cases that presented atypical vasculature. In each case we analyzed the parameters of malignancy increased cellularity, mitosis and necrosis palisading in the typical vascular areas to compare with atypical vascular areas. After that morphometric analysis, the mean counts of the number of tumor cells and number of mitosis were compared and these findings were correlated with the presence or absence of necrosis in palisades. The number of mitoses and cells in areas surrounding the atypical vessels was superior, being strongly interlinked. It was found that regions where there is increase in cells number and mitosis predisposes the formation of atypical vascularization. Palisading necrosis did not correlate with the increased number of mitoses in vascular areas typical or atypical, but their presence was significant as for the number of cells, was found an increased cellularity where was this type of necrosis present. There is interference by the histopathological parameters related to hypercellularity and number of mitosis in vascular atypical areas of glioblastomas as compared to the typical areas.

KEYWORDS: Glioblastoma, angiogenesis, hypercellularity, mitoses, palisading necrosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Critérios histológicos	18
---	----

ILUSTRAÇÕES DO ARTIGO ORIGINAL

Figura 1. Relação morfométrica dos parâmetros histológicos de hiper celularidade e mitose entre regiões de vasos típicos e atípicos em Glioblastomas.	43
Figura 2. Relação entre o número de células e mitoses.	44
Figura 3. Relação do número de mitoses e do número de células com a presença ou ausência de necrose em paliçada.	45
Figura 4. Critérios histológicos	45

LISTA DE TABELAS

ARTIGO DE REVISÃO

Tabela 1. Base de dados e resultados	26
Tabela 2. Análise dos estudos selecionados	26

ARTIGO ORIGINAL

Tabela 1. Correlação entre o número de células e mitoses em regiões de vasos típicos e atípicos.	44
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SNC	Sistema Nervoso Central
OMS-	Organização Mundial de Saúde
GBM	Glioblastoma Multiforme
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1. Artigo de revisão	20
3. OBJETIVO	32
3.1. Objetivo geral	32
3.2. Objetivo específico	32
4. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	33
4.1. Área	33
4.2. Período	33
4.3. Amostragem	33
4.4. Seleção da amostra	33
4.5. Critérios de inclusão	34
4.6. Critérios de exclusão	34
4.7. Análise histológica e morfométrica	34
4.8. Desenho e tipo de estudo	35
4.8.1. Análise estatística	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1. Artigo original	36
6. CONCLUSÃO	51
7. REFERÊNCIAS	52
8. ANEXOS	59

1. APRESENTAÇÃO

Os tumores do Sistema Nervoso Central (SNC) constituem um grupo heterogêneo de doenças, sendo as neoplasias astrocitárias correspondentes a 60% deles (ISOLAN et al., 2005). Os astrocitomas constituem o principal tipo histológico entre os tumores primários do Sistema Nervoso Central (SNC), configurando 1,32% de todas as neoplasias diagnosticadas anualmente. O termo astrocitoma foi cunhado por Virchow para designar os tumores compostos predominantemente por astrócitos atípicos, porém só foi empregado definitivamente na classificação proposta por Bailey e Cushing (FARIA, PATROCÍNIO e RABENHORST, 2006). Representam o tumor sólido mais freqüente na infância e adolescência, com aproximadamente 17% de todos os casos de câncer nesta faixa etária. Os gliomas de alto grau (astrocitoma anaplásico e glioblastoma multiforme) são tumores mais comuns em adultos do que em pacientes pediátricos, representando somente 1% dos tumores do SNC na infância e ocorrem com maior freqüência durante a primeira década de vida (CARVALHO et al., 2006).

Na classificação histopatológica da Organização Mundial da Saúde (OMS) para os tumores próprios do SNC, admite-se que as diversas apresentações histológicas dos astrocitomas possam ser divididas em diferentes graus de malignidade, variando de I a IV. Os astrocitomas de grau I são o astrocitoma de célula gigante subependimário e o astrocitoma pilocítico; os de grau II são astrocitoma pilomixóide, o astrocitoma difuso e o xantoastrocitoma pleomórfico; o de grau III é o astrocitoma anaplásico e os de grau IV são o glioblastoma, o glioblastoma de célula gigante e o gliossarcoma (LOUIS et al., 2007).

Em grande parte, essa graduação resulta do reconhecimento de indicadores de anaplasia (hipercelularidade, pleomorfismo nuclear, atividade mitótica, angiogênese e necrose) típicos de cada variante tumoral através da análise histológica rotineira por microscopia óptica. Como regra geral, o grau tumoral é baseado nas áreas de maior atipia, admitindo-se que essa população de células é a que determina o curso da doença. Além de manifestar o comportamento biológico tumoral, permitindo inferências prognósticas, o acúmulo de achados anaplásicos parece refletir a progressão das alterações moleculares adquiridas durante o processo de transformação neoplásica (FARIA, et al., 2006).

O GBM é uma neoplasia astrocitária maligna, torna-se mais freqüente com a idade, representando dentre as neoplasias astrocitárias do SNC, acima de 50% após os 60 anos

(EDMONSON, 1995; CAMBRUZZI et al., 2010). A incidência dos Glioblastomas multiformes é de 12% a 15% dentre as neoplasias intracranianas e de 2% dentre todos os tumores (MAHALEY, 1989). A sobrevida pós-operatória, apesar do tratamento, é de 12 meses (ROSAI, 2004). Estima-se que menos de 3% dos pacientes com glioblastoma sobrevivem cinco anos após o diagnóstico, sendo a idade avançada o preditor mais significativo de mau prognóstico (SALMAGGI et al., 2008). Estes tumores são mais frequentes em homens do que em mulheres (CBTRUS 2008).

A permeabilidade vascular e a angiogênese dependem do tipo do tumor e do órgão acometido, visto que cada órgão tem o estroma diferente do outro, com fatores pró e anti angiogênicos diferentes (POON, FAN e WONG, 2003). Em Glioblastomas, a presença de vascularização atípica estabelece de forma marcante a malignidade de suas células tumorais que secretam fatores pró-angiogênicos alterando totalmente a estrutura do vaso, tornando-o, por vezes, semelhante a um glomérulo renal , além de ser um parâmetro histológico, onde sua presença indica o diagnóstico preciso deste tipo tumoral (LOUIS, 2007; KLEIHUES E CAVENEE, 2000; CAVENEE et al., 2000; HADDAD et al., 1992).

Múltiplos focos de pequenas necroses centrais com células na periferia que se assemelham a paliçada, conhecida como necrose em paliçada ou pseudopaliçada, também é um importante preditor de malignidade, pois assim como a vascularização atípica, sua simples presença, isolada ou em conjunto com outros parâmetros, define o diagnóstico histológico de Glioblastoma (BRAT E VAN MEIR, 2004; BRAT et al., 2004; KLEIHUES E CAVENEE, 2000; GRAEBER et al., 1996; . KINZLER e VOGELSTEIN, 1996). O estudo dos indicadores de anaplasia (mitose, celularidade e necrose em paliçada) em região circunvizinha a angiogênese típica e atípica, em Glioblastomas, esclarecerá a importância da estrutura vascular normal ou alterada para o desenvolvimento deste tipo de tumor.

2. REVISÃO DE LITERATURA

As patologias tumorais do sistema do SNC possuem características peculiares diferenciais dos demais tumores do organismo humano por isso a distinção entre lesões benignas e malignas é menos evidenciada no SNC.

Os gliomas são tumores cerebrais que podem infiltrar grandes regiões cerebrais levando a deficiências clínicas sérias e prognóstico reservado. Os sinais e sintomas clínicos mais comuns se expressam por convulsões, cefaléias e deficiências neurológicas focais relacionadas com a região anatômica do comprometimento (KUMAR, ABBAS e FAUSTO, 2005).

Glioma é o termo utilizado para designar os tumores (neoplasias) originários das células da glia encefálica, sendo estes, a forma mais comum de tumor cerebral primário (BAVARESCO, 2008).

A glia é formada por várias células e tem como principal função dar suporte nutricional, sanguíneo, estrutural e de defesa aos neurônios. Essas células se encontram ao redor dos neurônios e entre os axônios neuronais. A maior parte da glia em termos quantitativos pode ser encontrada na substância branca encefálica. A glia é formada por quatro células principais: astrócitos, oligodendrócitos, microglia e epêndima. Serão dessas células que as neoplasias se originarão (NARDIN, 2006; CAPPELLARI, 2008).

Os gliomas, na grande maioria dos casos se originam de mutação espontânea em genes que controlam a divisão celular. Esses genes quando em função normal controlam a sua divisão de forma harmônica. Essa mutação é esporádica e não tem caráter hereditário. Somente em casos raros de tumores familiares os genes passam de uma geração a outra (FURNARI et al., 2007; THE CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK, 2008).

Seguindo a mesma nomenclatura das células que formam a glia, os gliomas podem ser divididos em quatro grandes grupos de acordo com a OMS.

1. Os gliomas de origem astrocítica: Astrocitomas.
2. Os gliomas de origem oligodendrocítica: Oligodendrogliomas.
3. Os gliomas de origem ependimária: os Ependimomas.
4. Os gliomas mistos: Oligoastrocitomas.

Cerca de 240 mil tumores cerebrais primários são diagnosticados a cada ano, somente nos Estados Unidos. A incidência estimada para todas as idades é de 8,2 casos para cada 100 mil habitantes, e os tumores cerebrais têm sido diagnosticados com frequência cada vez maior, especialmente devido ao crescente número de idosos. Além disso, são responsáveis por 20% das condições malignas antes dos 15 anos de idade. Além de ter tido sua incidência aumentada em função do envelhecimento populacional, houve também aumento nos tumores primários do SNC em todas as faixas etárias. Por exemplo, o aumento médio de tumores primários do SNC para idades de 75 a 79, 80 a 84 e acima dos 85 anos foi de respectivamente 7%, 20,4% e 23,4%. Esse aumento da incidência parece ser independente das melhorias nos meios de diagnóstico (ALHO e BROCK, 2009).

Os tumores do SNC constituem um grupo heterogêneo de doenças, sendo as neoplasias astrocíticas correspondentes a 60% deles (ISOLAN et al., 2005). Os astrocitomas constituem o principal tipo histológico entre os tumores primários do SNC, configurando 1,32% de todas as neoplasias diagnosticadas anualmente. O termo astrocitoma foi cunhado por Virchow para designar os tumores compostos predominantemente por astrócitos atípicos, porém só foi empregado definitivamente na classificação proposta por Bailey e Cushing (FARIA, PATROCÍNIO e RABENHORST, 2006). Representam o tumor sólido mais freqüente na infância e adolescência, com aproximadamente 17% de todos os casos de câncer nesta faixa etária. Os gliomas de alto grau (astrocitoma anaplásico e glioblastoma multiforme) são tumores mais comuns em adultos do que em pacientes pediátricos, representando somente 1% dos tumores do SNC na infância e ocorrem com maior freqüência durante a primeira década de vida (CARVALHO et al., 2006).

A despeito da baixa incidência, os astrocitomas, além de representarem os mais freqüentes tumores sólidos da infância, são a segunda causa de mortalidade por câncer nessa faixa etária, ficando atrás somente das leucemias. Nos adultos, a sobrevida média após cinco anos do diagnóstico desses tumores é de 32%, constituindo a terceira e a quarta causa de mortalidade por câncer entre homens e mulheres, respectivamente (PEKMEZOVIC, JAREBINSKI e PAVLOVIC, 2002).

Na classificação histopatológica da OMS para os tumores próprios do SNC, admite-se que as diversas apresentações histológicas dos astrocitomas possam ser divididas em diferentes graus de malignidade, variando de I a IV. Os astrocitomas de grau I são o astrocitoma de célula gigante

subependimário e o astrocitoma pilocítico; os de grau II são astrocitoma pilomixóide, o astrocitoma difuso e o xantoastrocitoma pleomórfico; o de grau III é o astrocitoma anaplásico e os de grau IV são o glioblastoma, o glioblastoma de célula gigante e o gliossarcoma (LOUIS et al., 2007).

Em grande parte, essa graduação resulta do reconhecimento de indicadores de anaplasia (hipercelularidade, pleomorfismo nuclear, atividade mitótica, angiogênese e necrose) típicos de cada variante tumoral através da análise histológica rotineira por microscopia óptica. Como regra geral, o grau tumoral é baseado nas áreas de maior atipia, admitindo-se que essa população de células é a que determina o curso da doença. Além de manifestar o comportamento biológico tumoral, permitindo inferências prognósticas, o acúmulo de achados anaplásicos parece refletir a progressão das alterações moleculares adquiridas durante o processo de transformação neoplásica (FARIA et al., 2006).

O GBM é uma neoplasia astrocitária maligna, torna-se mais freqüente com a idade, representando somente 1% dos gliomas na primeira década de vida, mas acima de 50% após os 60 anos (EDMONSON, 1995; CAMBRUZZI et al., 2010). A incidência dos Glioblastomas multiformes é de 12% a 15% dentre as neoplasias intracranianas. (MAHALEY, 1989). A sobrevida pós-operatória, apesar do tratamento, é de 12 meses (ROSAI, 2004). Estima-se que menos de 3% dos pacientes com glioblastoma sobrevivem cinco anos após o diagnóstico, sendo a idade avançada o preditor mais significativo de mau prognóstico (SALMAGGI et al., 2008). Estes tumores são mais freqüentes em homens do que em mulheres (CBTRUS 2008).

Apesar da curta duração da sintomatologia, os glioblastomas podem ser surpreendentemente grandes quando do início dos sintomas, inclusive ocupando uma extensa área do parênquima cerebral (KLEIHUES e CAVANEE, 1997). É caracterizado histologicamente por seu polimorfismo celular com células gliais imaturas e gigantes, apresentando imagens de mitose (CAMBIER et al., 1988; DAI e HOLLAND, 2001). Estes tumores têm uma aparência histológica semelhante à do astrocitoma anaplásico, com as características adicionais de necrose e proliferação de células vasculares ou endoteliais - tufos de células vasculares empilhadas que se projetam para a luz vascular (GIROLAMI, 2000). A necrose no GBM, ocorre, muitas vezes em um padrão sinuoso, em áreas de hipercelularidade com células tumorais altamente malignas aglomeradas ao longo das bordas das regiões necróticas (GIROLAMI, 2000).

Embora a disseminação infiltrativa seja uma característica comum de todos os tumores astrocíticos, os GBM são particularmente notórios pela rápida invasão de estruturas cerebrais adjacentes (DEL MAESTRO et al., 1990). A invasão tumoral, via vasos sanguíneos e linfáticos, é considerada o principal marco de malignidade e também um dos maiores impedimentos para a cura do câncer (ECCLES, 1999).

De acordo com evidências biológicas e clínicas, os GBM classificam-se em dois subtipos: a) GBM primários ou “de novo”, que acometem pessoas com idade média de 55 anos, que apresentam história clínica de curta duração, usualmente menor que seis meses, sem evidência clínica ou histopatológica de lesão maligna precursora; b) GBM secundários, que se originam de astrocitomas difusos de baixo grau ou astrocitomas anaplásicos, sendo provavelmente os responsáveis pela maioria dos glioblastomas. Este subtipo apresenta longo tempo de evolução clínica, com tempo médio de quatro anos, e acometem preferencialmente adultos jovens, com idade média de 40 anos (WATANABE et al., 1996; FRANCO-HERNÁNDEZ e MARTÍNEZ-GONZÁLEZ e REY, 2007).

Há evidências de que glioblastomas primários e secundários constituem entidades diferentes, envolvendo vias genéticas próprias, pacientes em distintas faixas etárias e com respostas variadas ao tratamento (TOHMA et al. 1998). Esta hipótese baseia-se em observações dos diferentes espectros de alterações genéticas encontradas tanto nos GBM secundários como nos astrocitomas de baixo grau e astrocitomas anaplásicos (FONSECA et al., 2003; OHGAKI e KLEIHUES, 2007).

Dentre os critérios de evolução tumoral, anteriormente citados, podemos destacar a angiogênese. John Hunter em 1787 cunhou este termo para descrever o crescimento de novos vasos (GUPTA e ZHANG, 2005). A angiogênese está envolvida em uma série de condições patológicas nas quais os processos de inflamação e de isquemia estão presentes (ENEPEKIDES et al., 1999). O conceito de que o crescimento tumoral e o processo de formação de metástases sejam dependentes do desenvolvimento de novos vasos sanguíneos foi consolidado por Folkman, no início da década de 70 (FOLKMAN, 1971; 1972; 2002). Vários estudos a partir dessa data têm confirmado as hipóteses de Folkman e demonstrado a importância do processo de angiogênese no desenvolvimento dos tumores.

A constatação de que a angiogênese tem uma correlação consistente e é um pré-requisito para o crescimento tumoral e para metástase tem importantes implicações (RAK e YU, 2004).

Como foi reconhecida inicialmente por Folkman essa necessidade contínua de suprimento vascular é um importante sinal de crescimento e possível metástase (FOLKMAN, 1971). Isto porque o sangue carregado por tais vasos sanguíneos é fonte não só de oxigênio, nutrientes e metabolitos (FOLKMAN, 1995¹), mas também de hormônios, substâncias derivadas do endotélio (parácrinas); como fatores de crescimento e citocinas com ação pró-invasiva e proteolítica fundamentais para o desenvolvimento de rotas de escape para a metástase hematogênica; além de derivados tumorais com ação moduladora dos sistemas de coagulação e fibrinolítico (BROOKS et al., 1995; NASH, WALSH e KAKKAR, 2001; FIDLER, 2001; WOJTUKIEWICZ, et al., 2001; FERNANDEZ e RICKLES, 2002; SKOBE et al, 2004).

A existência destas atividades microvasculares múltiplas, maior parte promovidas pelo tumor, conduziu Folkman a hipótese de que terapias anti-angiogênicas ou anti-vasculares poderiam representar uma alternativa para os tratamentos de câncer tradicionais (FOLKMAN, 1995²; RAK e YU, 2004). Este conceito já foi validado por meio de vários estudos pré-clínicos em animais e atualmente foi relatado seu sucesso na clínica. Um ensaio clínico envolvendo pacientes com câncer colorretal metastático foi recentemente concluído. Neste, a quimioterapia tradicional (irinotecan, 5-fluorouracil and leucovorin—IFL) foi combinada com um anticorpo neutralizador (Avastin/bevacizumab) do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), essa associação levou a um aumento significativo na sobrevida dos pacientes (HURWITZ, et al., 2004). Este resultado confirma a hipótese de Folkman e demonstra a importância do suprimento vascular no desenvolvimento dos tumores.

Na angiogênese ocorre o crescimento de novos capilares a partir de células endoteliais normais. Isto permite o crescimento do tumor além de 2-3 mm (maior tamanho possível sem a neoformação vascular), pela efusão de oxigênio e nutrientes e remoção de metabólitos tóxicos, ao invés de simples difusão no espaço extracelular que manteria o tumor restrito, e com uma pequena população celular. Logo, este processo depende de um balanço entre fatores que promovem o crescimento e fatores inibidores. Nos tecidos normais, os vasos estão quiescentes e as células secretam baixos níveis de indutores e altos níveis de inibidores da angiogênese. As células do tumor secretam fatores angiogênicos para atrair células endoteliais que produzem fatores de crescimento para o tumor, logo a célula maligna modifica o equilíbrio dos fatores angiogênicos (HASINA e LINGEN, 2001; BELTING, et al., 2004; TANDLE, BLAZER e LIBUTTI, 2004).

A angiogênese se inicia pela ativação das células endoteliais de vasos normais que secretam enzimas degradando a membrana basal. Proteinases e ativadores do plasminogênio são secretados por células do tumor e dissolvem a matriz extracelular. As células endoteliais ativadas proliferam, migram e desenvolvem novos capilares, sintetizam nova membrana basal e maturam os vasos com a formação de lúmen. Os vasos se formam a partir de um vaso pré-existente e não há uma homogeneidade no endotélio dos vasos. Os vasos do tumor são estruturalmente e funcionalmente diferentes com uma vascularização altamente desorganizada. São vasos tortuosos, dilatados, formando braços (POON, FAN e WONG, 2003).

A permeabilidade vascular e a angiogênese dependem do tipo do tumor e do órgão acometido, visto que cada órgão tem o estroma diferente do outro, com fatores pró e anti angiogênicos diferentes (POON, FAN e WONG, 2003). Em GBM, a presença de vascularização atípica estabelece de forma marcante a malignidade de suas células tumorais que secretam fatores pró-angiogênicos alterando totalmente a estrutura do vaso, tornando-o, por vezes, semelhante a um glomérulo renal, além de ser um parâmetro histológico, onde sua presença indica o diagnóstico preciso deste tipo tumoral (Figura 1) (LOUIS, 2007; KLEIHUES E CAVENEE, 2000; CAVENEE et al., 2000; HADDAD et al., 1992).

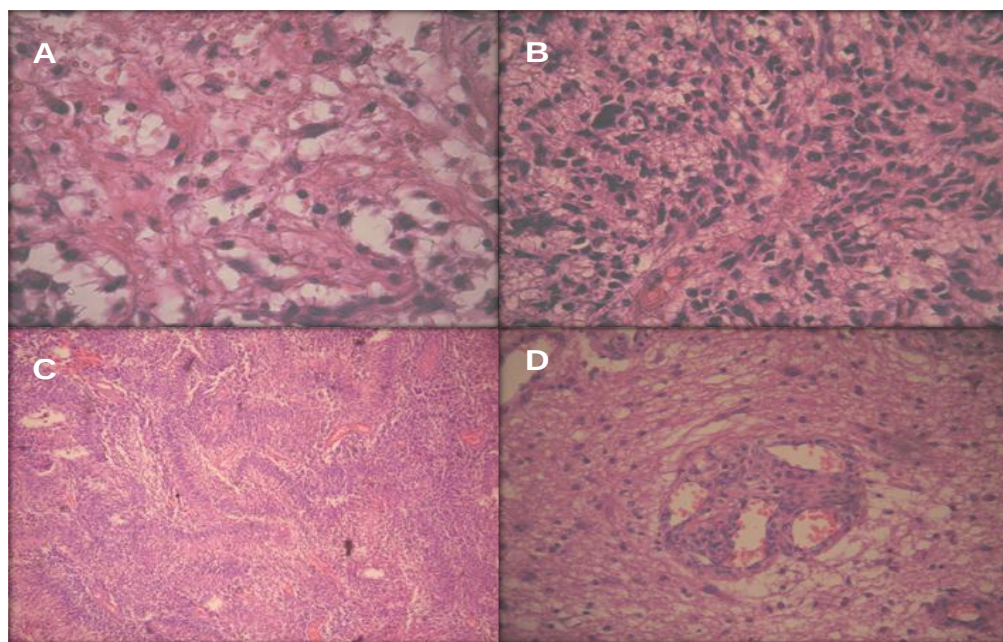


Figura 1. Critérios histológicos. A. Hiper celularidade e mitose em vasos típicos. B. Hiper celularidade e mitose em vasos atípicos. C. Necrose em paliçada. D. Vaso atípico.

Múltiplos focos de pequenas necroses centrais com células na periferia que se assemelham a paliçada, conhecida como necrose em paliçada ou pseudopaliçada, também é um importante preditor de malignidade, pois assim como a vascularização atípica, sua simples presença, isolada ou em conjunto com outros parâmetros, define o diagnóstico histológico de GBM (Figura 1). A necrose em paliçada se dá por aumento no consumo metabólico das células tumorais, onde esse aumento da demanda de energia se dá pelo aumento da densidade celular, expresso quantitativamente pelo aumento do número de células tumorais, tornando esta área de aumento celular, além de mal nutrida, alvo fácil do estímulo hipóxico que induz à apoptose, com pequenas áreas de necrose central. Na periferia se observam células que resistiram a este estímulo mortal e além de sobreviver, tornam-se capazes de infiltrar novas áreas (BRAT E VAN MEIR, 2004; BRAT et al., 2004; KLEIHUES E CAVENEE, 2000; GRAEBER et al., 1996; . KINZLER e VOGELSTEIN, 1996). O estudo dos indicadores de anaplasia (mitose, celularidade e necrose em paliçada) em região circunvizinha a angiogênese típica e atípica, em GBM, esclarecerá a importância da estrutura vascular normal ou alterada para o desenvolvimento deste tipo de tumor.

10.1. Artigo de revisão

**Aceito pela revista Neurobiologia
Qualis – B5 Medicina II**

O Estudo da vasculatura dos astrocitomas do ponto de vista histoquímico auxiliando na escolha terapêutica : uma revisão sistemática.

Ana Paula de Souza e Pinto¹, Anacássia Fonseca de Lima¹, Juliana Pedrosa de Holanda Marques¹, Livia Bandeira Costa¹, Roberto José Vieira de Mello¹, Luciano Tavares Montenegro¹, Nicodemos Teles de Pontes Filho¹

¹Universidade Federal de Pernambuco - Centro de Ciências da Saúde (UFPE-CCS), Pernambuco, Brasil.

ABSTRACT

CONTEXT: Angiogenesis is a prerequisite for tumor growth and expansion. Astrocytoma constitutes the main histological type among primary tumors of the Central Nervous System. Therefore, the study of angiogenesis in astrocytomas account for the vascular supply of this type of tumor.

OBJECTIVE: Undertake a systematic review of articles demonstrating if angiogenesis in astrocytomas using immunohistochemistry can help in determining therapy.

METHODS: We conducted a systematic review with a search in the databases LILACS, SciELO, PubMed / Medline and Old Medline and published between 1966 and 2009. For selection of the study the following criteria were considered: studies with biopsies of human astrocytomas in patients with different degrees of malignancy, in which he was marking the vascular growth of the tumor using immunohistochemistry and antigen Ki-67-labeled antibody MIB- 1.

RESULTS: Of the 22 articles initially identified through the electronic search, two articles have been fully recovered for further evaluation.

CONCLUSIONS: There are few articles reporting the use of immunohistochemical staining of vascular proliferation with antibody MIB-1. Furthermore, the results of the articles found are contradictory, since one stimulates the anti-angiogenesis therapy and the other affirms that such therapy is inefficacious if it is not associated with an anti-proliferative tumor therapy. The contradiction of the studies does not discredit its findings, but highlights the need for further research to clarify the importance of vascular proliferation in several types of gliomas.

KEY WORDS: Astrocytomas, immunohistochemistry, antigen Ki-67, antibody MIB- 1, vascular proliferation

RESUMO

CONTEXTO: Angiogênese é um pré-requisito básico para o crescimento e expansão tumoral. Os astrocitomas constituem o principal tipo histológico entre os tumores primários do Sistema Nervoso Central. Logo, o estudo da angiogênese em astrocitomas esclarece o suprimento vascular deste tipo de tumor.

OBJETIVO: Realizar uma revisão sistemática de artigos que demonstrem se a angiogênese em astrocitomas utilizando o método imunohistoquímico, auxilia na determinação da terapêutica.

MÉTODOS: Realizamos uma revisão sistemática com uma busca abrangente nos bancos de dados LILACS, SciELO, PubMed / Medline e Old Medline, publicados entre 1966 e 2009. Para seleção do estudo os seguintes critérios foram considerados: estudos com biópsias de seres humanos portadores de astrocitomas nos seus diferentes graus de malignidade, nos quais foi feita marcação do crescimento vascular do tumor utilizando imunohistoquímica, sendo o antígeno ki-67 marcado com o anticorpo MIB-1.

RESULTADOS: Dentre os 22 artigos inicialmente identificados através da busca eletrônica, 2 artigos foram totalmente recuperados para a avaliação mais detalhada.

CONCLUSÕES: Poucos são os artigos que relatam o uso da marcação imunohistoquímica da proliferação vascular com anticorpo MIB-1. Além disso, os resultados dos artigos encontrados são contraditórios, uma vez que, um incentiva a terapia antiangiogênica e o outro afirma que tal terapia é ineficaz se não associada a uma terapia anti-proliferativa tumoral. A contradição dos estudos não desacredita seus resultados, mas evidencia a necessidade de novas pesquisas que esclareçam a importância da proliferação vascular na determinação da terapia.

PALAVRAS-CHAVE: Astrocitomas, imunohistoquímica, antígeno Ki-67, anticorpo MIB- 1, proliferação vascular

INTRODUÇÃO

Um tumor no seu período avascular é pequeno o bastante para receber nutrientes e eliminar resíduos por difusão. Porém, sabe-se que um processo de difusão não tem condições de manter indefinidamente o crescimento de um tumor, pois o tumor consome nutrientes numa taxa equivalente ao seu volume, onde a quantidade de nutrientes é proporcional à área de superfície do tumor. Então, um tumor avascular pode se tornar dormente, parando seu crescimento. Porém, o tumor pode suprir essa deficiência adquirindo suprimento de sangue e faz isso por induzir a formação de vasos sanguíneos¹. Este processo é dito angiogênese. Logo, a angiogênese é um pré-requisito básico para o crescimento e expansão tumoral².

Os tumores do Sistema Nervoso Central (SNC) constituem um grupo heterogêneo de doenças, sendo as neoplasias astrocitárias correspondentes a 60% deles³. Os astrocitomas constituem o principal tipo histológico entre os tumores primários do sistema nervoso central (SNC), configurando 1,32% de todas as neoplasias diagnosticadas anualmente⁴. Representam o tumor sólido mais freqüente na infância e adolescência, com aproximadamente 17% de todos os casos de câncer nesta faixa etária. Os gliomas de alto grau (astrocitoma anaplásico e glioblastoma multiforme) são tumores mais comuns em adultos do que em pacientes pediátricos, representando somente 10% dos tumores do SNC na infância e ocorrem com maior freqüência durante a primeira década de vida⁵.

A angiogênese depende do tipo do tumor e do órgão acometido, visto que cada órgão tem o estroma diferente do outro, com fatores pró e anti angiogênicos diferentes⁶. Logo, o estudo da angiogênese em astrocitomas esclarece o suprimento vascular deste tipo de tumor.

Existem atualmente várias técnicas para avaliação da proliferação celular (astrocitária e vascular) em tumores cerebrais, entre elas a avaliação da expressão do antígeno Ki-67 utilizando a técnica de imuno-histoquímica^{7,8,9}. A proteína Ki-67 é um importante marcador tumoral que indica a proliferação celular e por isso torna-se um coadjuvante na pesquisa do câncer³. A utilização do anticorpo MIB-1, para detecção do antígeno Ki-67, e a caracterização histológica são prognósticos relevantes para gliomas de alto grau na infância¹⁰. O índice de marcação de MIB-1 ajuda a refinar a acurácia do prognóstico baseado na histologia, logo a utilização de tal marcação para determinar a proliferação vascular possibilitaria um diagnóstico prévio eficaz e uma terapia direcionada.

OBJETIVO: Realizar uma revisão sistemática de artigos que demonstrem se a angiogênese em astrocitomas utilizando o método imuno-histoquímico auxilia na determinação da terapêutica.

MÉTODOS

Para realização desta revisão foram selecionados, no período de agosto de 2009 a março de 2010, artigos publicados a partir de periódicos indexados nas bases de dados LILACS, SciELO e PubMed/MEDLINE durante o período de 1966 a 2010.

As palavras-chaves utilizadas foram baseadas na lista do MeSH, e os seguintes termos foram escolhidos: Pathologic Neovascularization, Astrocytoma. Pela lista do DeCS os termos selecionados foram: Astrocitoma, Neovascularização Patológica, Angiogênese Patológica. Foram também escolhidas palavras-chave sobre o tema: Ki-67 e MIB-1, newly formed vessels. Todos os termos e palavras foram combinados e pesquisados em todos os bancos de dados. As referências

de artigos selecionados também foram verificadas para identificar outros estudos que pudessem ter sido omitidos na busca eletrônica.

Títulos e resumos identificados através de pesquisas foram examinados independentemente por dois investigadores na tela do computador para selecionar os estudos relevantes.

Para seleção do estudo os seguintes critérios foram considerados: artigos que descreviam avaliação de portadores de astrocitomas com diferentes graus de malignidade, nos quais foi feita marcação do crescimento vascular do tumor utilizando imuno-histoquímica, sendo o antígeno Ki-67 marcado com o anticorpo MIB-1. Foram excluídos estudos com animais, em biópsia humana que relatassem outra patologia associada ao astrocitoma e que não tivessem como objetivo avaliar a proliferação vascular ou que evidenciassem outro antígeno que não o Ki-67, bem como artigos de revisão.

RESULTADOS

Dentre os 22 artigos inicialmente identificados através da busca eletrônica, 2 artigos relacionados com a análise da angiogênese em astrocitomas através do método imuno-histoquímico, e publicados durante o período de 1997 a 2003, foram utilizados para a avaliação mais detalhada. Estudos repetidos foram considerados apenas em uma fonte de busca. Um resumo dos resultados dos estudos obtidos em cada base de dados é mostrado na tabela 1, já a tabela 2 analisa os artigos quanto ao ano da publicação, a amostra, a metodologia e as conclusões obtidas.

Tabela 1 – Base de Dados e Resultados.

Base de Dados	Estudos Identificados*	Estudos Incluídos*
LILACS	0	0
Medline	19	2
Old Medline	3	0
Scielo	0	0
Total	22	2

***Números de estudos**

Tabela 2 – Análise dos estudos selecionados.

Autor (ano)	Amostra	Metodologia	Conclusão
Di et al. (1997)¹¹	78 espécimes de gliomas.	Determinação do índice de proliferação de células tumorais (PTC-PI) e células endoteliais (PEC-PI), utilizando o MIB-1 anticorpo monoclonal.	Enquanto o valor médio da PEC-PI foi menor do que a PTC-PI, houve uma relação muito estreita entre eles, incentivando o desenvolvimento de novas terapias dirigidas para a supressão da angiogênese.
Kern et al. (2003)¹²	20 espécimes de glioblastoma.	Imunohistoquímica com MIB-1 para determinação do índice de desenvolvimento de células microvasculares (MVC) em tumores primários e em recorrentes.	A fração de crescimento das MVC foi significativamente menor do que a de células tumorais. As células microvasculares em glioblastomas parecem ter propriedades de proliferação caóticas sem qualquer ligação com o potencial de crescimento do tumor. Essa observação pode ter implicações para a terapia anti-angiogênica.

DISCUSSÃO

A análise da proliferação celular através do método imuno-histoquímico tem sido muito utilizada para determinação do crescimento tumoral¹³. No entanto, conforme os resultados obtidos em nossa revisão da literatura, poucos autores utilizaram a imunohistoquímica com marcação do antígeno Ki-67 para determinação do crescimento vascular de tumores astrocitários. Apenas dois estudos foram encontrados e o intervalo de tempo de publicação entre eles foi de seis anos.

Os artigos não eram homogêneos quanto à amostra, Di et al. (1997)¹¹ usaram 78 espécimes de gliomas (24 glioblastomas, 25 astrocitomas anaplásicos e 29 astrocitomas; classificação da WHO 1993¹⁴) enquanto que Kern et al. (2003)¹² analisaram amostras de 20 espécimes com glioblastoma. A disparidade em relação ao número de amostra pode ter sido devido ao fato do primeiro estudo analisar vários tipos de gliomas enquanto o segundo pesquisou apenas um tipo específico, o glioblastoma. Ambos os estudos também foram limitados à ocorrência dos tumores cerebrais sem nenhuma patologia associada.

Embora os estudos tenham marcado a proliferação vascular através de imuno-histoquímica com anticorpo MIB-1, o primeiro determinou o índice de proliferação de células tumorais (PTC-PI) e o índice de proliferação de células endoteliais (PEC-PI) usando imuno-histoquímica e relacionou os dois entre si. Já o segundo usou a imunomarcação com MIB-1 para determinação do índice de desenvolvimento de células microvasculares (MVC) e comparou esse crescimento em tumores primários e tumores recorrentes, além de comparar com o índice de crescimento tumoral.

Quanto aos resultados encontrados, Di et al. (1997)¹¹ observou que o PTC-PI, do glioblastoma foi significativamente maior do que do astrocitoma anaplásico ($p < 0.05$) e do astrocitoma ($p < 0.01$). Uma diferença estatisticamente significativa também foi encontrada entre o PTC-PI do astrocitoma anaplásico e do astrocitoma ($p < 0.01$), o que só reforça a diferença entre os vários tipos de gliomas e corrobora a graduação histológica. A relação estatística dos valores de PEC-PI dos diferentes tipos de gliomas seguiu o mesmo padrão do PTC-PI, sendo o glioblastoma seguido do astrocitoma anaplásico ($p < 0.05$) e do astrocitoma ($p < 0.01$). Os valores de PEC-PI foram menores que os do PTC-PI justificado pelo fato do número de células tumorais ser maior que os de células vasculares durante o crescimento tumoral, embora tenha sido observado uma significativa correlação entre eles ($p < 0.01$). Em dois tumores recorrentes foi observado valores de PTC-PI e PEC-PI maior no tumor recorrente em relação ao primário. Pacientes com PTC-PI menor que 8,0% e PEC-PI menor que 3,0% tiveram maior sobrevida, de 5 a 10 anos. Estes resultados sugerem que PTC-PI oferece informações úteis que podem permitir uma melhor avaliação do comportamento biológico e prognóstico clínico de gliomas, além da graduação histológica.

Kern et al. (2003)¹² não observaram relação entre a marcação da angiogênese com MIB-1 e o crescimento celular de glioblastomas. Tanto em tumores primários quanto em recorrentes, o crescimento era desorganizado e não havia relação entre tumores primários e recorrentes. Ainda que a indução da proliferação vascular pelas células tumorais tenha sido quantitativamente independente do potencial de crescimento das células tumorais em glioblastomas. Isso porque independente da vascularização do tumor, o mesmo pode infiltrar regiões adjacentes vascularizadas do cérebro utilizando o fluxo sanguíneo local para sua nutrição. Logo, segundo os

autores, em glioblastomas uma terapia antiangiogênica seria ineficaz e o tratamento mais indicado seria uma terapia contra a proliferação das células tumorais.

CONCLUSÕES

Poucos são os artigos que relatam o uso da marcação imunohistoquímica da proliferação vascular com anticorpo MIB-1. Além disso, os resultados dos artigos encontrados são contraditórios, uma vez que, um incentiva a terapia antiangiogênica e o outro afirma que tal terapia é ineficaz se não associada a uma terapia anti-proliferativa tumoral.

Essa contradição pode ser devido ao fato de que os estudos possuem amostras diferentes, uma vez que, Di et al. (1997)¹¹ analisaram diferentes tipos de gliomas e Kern et al. (2003)¹² analisaram apenas glioblastomas. No entanto, tratando-se apenas de glioblastomas, tumor analisado em ambos os estudos, a amostra do primeiro estudo foi maior que a do segundo e os resultados foram diferentes tanto quanto a relação entre crescimento tumoral e crescimento vascular, como quanto à relação tumor primário e tumor recorrente. Enquanto Di et al. (1997)¹¹ relacionaram o crescimento tumoral e vascular com a sobrevida, Kern et al. (2003)¹² não fizeram tal relação.

Apesar do trabalho de Kern et al. (2003)¹² ser mais recente e ter sofrido a influência dos avanços das pesquisas nesta área, a metodologia de ambos os estudos é semelhante e o primeiro estudo não apenas tem uma amostra mais consistente como suas análises são mais diversificadas. A contradição dos estudos não desacredita seus resultados, mas evidencia a necessidade de novas

pesquisas que esclareçam a importância da proliferação vascular na escolha terapêutica dos vários tipos de gliomas.

BIBLIOGRAFIA

1. HAHNFELDT P, PANIGRAHY PD, HLATKY L. Tumor development under angiogenic signaling: A dynamical theory of tumor growth, treatment response, and postvascular dormancy. *Cancer Research* 1999; 59: 4770-5.
2. FOLKMAN J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *The New England Journal of Medicine* 1971; 285: 1182-6.
3. ISOLAN GR, FILHO JM R, ISOLAN PMBS, GIOVANINI A, MALAFAIA O, DINI LI, R KUMMER AJR, NEGRÃO AW. Neoplasias astrocitárias e correlação com as proteínas p53 mutada e Ki-67. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria* 2005; 63 (4): 997-1004.
4. FARIA MHG, PATROCÍNIO RMSV, RABENHORS SHB. Estratégias auxiliares para graduação dos tumores astrocíticos segundo os critérios histopatológicos estabelecidos pela OMS. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 2006; 42 (5): 401-10.
5. CARVALHO GP, ALMEIDA SEM, ROCHA AB, BIZZI JWJ, BRUNETTO AL. Análise da expressão do EGFR em glioblastoma multiforme Expression of the EGFR in patients with glioblastoma multiform. *Revista da Associação Médica do Rio Grande do Sul* 2006; 50 (2): 120-3.
6. POON RFANS, WONG J. A target for Novel Prognostic and Therapeutic Approaches. *Annals of Surgery* 2003; 238: 9-28.
7. LEONG ASY, LEE AKC, Biological indices in the assessment of breast cancer. *Journal of Clinical Pathology and Clinical Molecular Pathology* 1995; 48: 221-38.
8. JEZIORSKI A, BLONSKI JZ, NIEWIADOMSKA H. The expression of products of oncogens c-erbB2 and EGFR and proliferating antigens Ki-67 and PCNA in primary invasive ductal cancer of female breast. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 2000; 19: 61-7.

9. HINOJOSA AQ, SANAI N, SMITH JS, MCDERMOTT MW. Techniques to assess the proliferative potential of brain tumors. *Journal of Neuro-Oncology* 2005; 74: 19–30.
10. POLLACK IF, HAMILTON RL, BURNHAM J, HOLMES EJ, FINKELSTEIN SD, SPOSTO R, YATES AJ, BOYETT JM, FINLAY JL. Impact of Proliferation Index on Outcome in Childhood Malignant Gliomas: Results in a Multi-institutional Cohort. *Neurosurgery* 2002; 50 (6): 1238-45.
11. DI X, NISHIZAKI T, HARADA K, KAJIWARA K, NAKAYAMA H, ITO H. Proliferative potentials of glioma cells and vascular components determined with monoclonal antibody MIB-1. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 1997; 16 (2): 153-7.
12. KERN MA, FEISEL KD, FRIESE M, ERNESTUS RI, SCHRÖDER R. Proliferative activity of microvascular cells in glioblastomas does not correlate with time to recurrence. *Journal of Neuro-Oncology* 2003; 63 (1): 9-13.
13. SHARMA S, SHARMA MC, GUPTA DK, SARKAR C. Angiogenic patterns and their quantitation in high grade astrocytic tumors. *Journal of Neuro-Oncology* 2006; 79 (1): 19-30.
14. KLEIHUES P, SURGER PC, SCHEITHAUER BW. The new WHO classification of brain tumors. *Brain Pathology* 1993; 3: 255-268.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo Geral

- ✓ O presente estudo teve por objetivo avaliar a influência dos parâmetros histopatológicos de hiper celularidade, mitose e necrose em paliçada na vasculatura dos glioblastomas.

3.2. Objetivos Específicos

- ✓ Análise da influência do parâmetro necrose em paliçada na vasculatura dos glioblastomas.
- ✓ Análise morfométrica da influência dos parâmetros mitose e hiper celularidade nas áreas vasculares típicas e atípicas de glioblastomas.

4. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

4.1. Área

O presente estudo foi realizado no Departamento de Patologia do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

4.2. Período de referência

O estudo foi desenvolvido entre outubro de 2009 e janeiro de 2011.

4.3. Amostragem

Foram selecionados e utilizados 53 blocos de parafina com fragmentos teciduais de SNC, cujos diagnósticos histopatológicos foram de Glioblastomas, provenientes do arquivo do Laboratório de Neuropatologia do Prof. Dr. Roberto José Vieira de Mello. O presente estudo teve aprovação do comitê de ética em pesquisa com seres humanos da Universidade Federal de Pernambuco, com número de protocolo 240/09.

4.4. Seleção da amostra

Foram utilizados fragmentos de tecido do SNC, provenientes de biópsia intra-operatória para exérese e diagnóstico histopatológico das neoplasias cerebrais. Este material foi fixado em formol a 10% e posteriormente processado histologicamente e emblocado em parafina, de onde se obteve por microtomia, recortes teciduais com 6 micras de espessura, que foram coradas pela técnica de hematoxilina-eosina e montadas em lâminas histológicas. As lâminas histológicas foram diagnosticadas como Glioblastomas.

Dos blocos arquivados no laboratório, foram feitos novos recortes histológicos com 6 micras de espessura para a preparação de lâminas que foram coradas por hematoxilina eosina para estudo das regiões com vasos atípicos e típicos, bem como número de mitoses, número de

células tumorais e presença ou ausência de necrose em paliçada, visualizados através da microscopia óptica e posterior análise morfométrica.

4.5. Critérios de inclusão

Foram selecionados 53 blocos de parafina arquivados no período entre 2006 e 2009, sendo posteriormente utilizados 49 deles, cujo diagnóstico histopatológico foi de Glioblastoma e que apresentavam vasos atípicos.

4.6. Critérios de exclusão

Foram excluídos a princípio todos os blocos de parafina que não estivessem situados neste período pré-determinado, que não possuíam diagnóstico histopatológico prévio de Glioblastoma e blocos diagnosticados como astrocitoma de graus I, II e III.

Após esta etapa e a partir dos 53 blocos capturados, foi seguida a rotina metodológica para a confecção das lâminas histológicas coradas pela hematoxilina eosina.

Foi realizada a partir das lâminas confeccionadas, a leitura histológica, onde houve nova exclusão de casos que possuíam pouco material para ser estudado e para se proceder às comparações entre áreas vasculares típicas e atípicas, assim como também foram excluídos casos que não possuíam vasos atípicos. Também não foi incluído neste estudo a análise do parâmetro pleomorfismo nuclear

Foram por fim, avaliados 49 espécimes, diagnosticados como Glioblastomas que possuíam os parâmetros histológicos a serem estudados para comparação.

4.7. Análise histológica e morfométrica

Em cada caso foram analisadas áreas vasculares típicas para comparação com áreas vasculares atípicas, logo cada caso, em sua área vascular típica, foi controle de si mesmo. A análise histológica se procedeu através da leitura das lâminas sob a microscopia óptica para seleção dos casos com critérios histológicos a serem estudados e para avaliação qualitativa quanto a presença ou ausência de necrose em paliçada. Após esta avaliação, com a câmera digital

acoplada ao microscópio óptico foram realizadas 12 fotos com a objetiva no aumento de 400x, sendo 6 fotos de áreas adjacentes a vasos atípicos e 6 fotos de áreas de vasos típicos, dessas fotos foram selecionadas 3 fotos de áreas vasculares típicas e atípicas que possuíam os parâmetros histológicos mais significativos para serem analisadas no estudo morfométrico. Foram também realizadas para fins ilustrativos do estudo, com a objetiva no aumento de 200x, fotos dos critérios necrose em paliçada e vasos atípicos.

A análise morfométrica, baseou-se na contagem do número de células tumorais e número de mitoses nas regiões circunvizinhas a vasos atípicos e típicos, que foi feita através da captura de imagens anteriormente selecionadas, acopladas a um sistema de computação com o programa Mesurin-pro. As médias dos resultados obtidos foram comparadas intra-grupo, assim como também foram comparadas áreas adjacentes a vasos típicos e atípicos, correlacionando esses achados com a presença ou ausência de necrose em paliçada.

4.8. Desenho e tipo de estudo

Uma vez que este trabalho testou a hipótese da influência dos parâmetros de celularidade, número de mitose e necrose em paliçada na proliferação vascular de Glioblastomas, trata-se de um estudo analítico, observacional, e retrospectivo por ter utilizado material biológico arquivado.

4.8.1. *Análise estatística*

As variáveis numéricas foram representadas pelas medidas de tendência central e medidas de dispersão e foram comparadas estatisticamente pelos testes: Teste de Normalidade de Kolmogorov-Smirnov para variáveis quantitativas, Teste t Student (Distribuição Normal) e Mann-Whitney (Não Normal). Todos os testes foram aplicados com 95% de confiança. Foram utilizados os Softwares SPSS 13.0 para Windows e o Excel 2003. O valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Artigo original

**A ser submetido à revista Arquivos de Neuro-Psiquiatria
Qualis – B2 Medicina II**

**A influência do parâmetros de hipercelularidade, mitose e necrose em paliçada na
vasculatura dos Glioblastomas.**

Ana Paula de Souza e Pinto¹, Anacássia Fonseca de Lima¹, Roberto José Vieira de Mello¹,
Luciano Tavares Montenegro¹, Nicodemos Teles de Pontes Filho¹

¹Universidade Federal de Pernambuco - Centro de Ciências da Saúde (UFPE-CCS), Pernambuco,
Brasil.

ABSTRACT

CONTEXT: Glioblastoma multiforme is a malignant astrocytic tumor has an incidence of 12% to 15% among intracranial tumors, with a postoperative survival of 12 months. Angiogenesis is a key prerequisite for tumor growth and metastasis. Glioblastomas in the presence of atypical vascularization provides subsidies to the malignancy of their cells that secrete pro-angiogenic factors altering the structure of the vessel, making it similar to a renal glomerulus. The study of indicators of anaplasia (mitosis, hypercellularity, necrosis in palisading) in region surrounding typical and atypical angiogenesis , in Glioblastomas will clarify the importance of the normal or changed vascular structure to the development of this tumor type.

OBJECTIVE: The aim of this study was to evaluate the influence of histomorphometric parameters of hypercellularity, mitoses and necrosis palisading in the vasculature of glioblastomas.

METHODS: Used paraffin blocks of tissue samples with histopathological diagnoses of glioblastoma. Slides were prepared and after morphological analysis selected cases that presented atypical vasculature. In each case we analyzed the parameters of malignancy increased cellularity, mitosis and necrosis palisading in the typical vascular areas to compare with atypical vascular areas. After that morphometric analysis, the mean counts of the number of tumor cells and number of mitosis were compared and these findings were correlated with the presence or absence of necrosis in palisades.

RESULTS: The number of mitoses and cells in areas surrounding the atypical vessels was superior, being strongly interlinked. It was found that regions where there is increase in cells number and mitosis predisposes the formation of atypical vascularization. Palisading necrosis did not correlate with the increased number of mitoses in vascular areas typical or atypical, but their presence was significant as for the number of cells, was found an increased cellularity where was this type of necrosis present.

CONCLUSIONS: There is interference by the histopathological parameters related to hypercellularity and number of mitosis in vascular atypical areas of glioblastomas as compared to the typical areas.

KEYWORDS: glioblastoma, angiogenesis, hypercellularity, mitoses, palisading necrosis.

RESUMO

CONTEXTO: O Glioblastoma multiforme é uma neoplasia astrocitária maligna que tem uma incidência de 12% a 15% dentre as neoplasias intracranianas, com uma sobrevida pós-operatória de 12 meses. Angiogênese é um dos pré-requisitos para o crescimento tumoral e para metástase. Em Glioblastomas, a presença de vascularização atípica estabelece de forma marcante a malignidade de suas células que secretam fatores pró-angiogênicos alterando totalmente a estrutura do vaso, tornando-o similar a um glomérulo renal. O estudo dos indicadores de anaplasia (mitose, celularidade e necrose em paliçada) em região circunvizinha a angiogênese típica e atípica, em glioblastomas esclarecerá a importância da estrutura vascular normal ou alterada para o desenvolvimento deste tipo de tumor.

OBJETIVO: Este estudo teve por objetivo avaliar a influência dos parâmetros histopatológicos de hiper celularidade, mitose e necrose em paliçada na vasculatura dos glioblastomas.

MÉTODOS: Foram utilizados blocos de parafina com fragmentos teciduais cujos diagnósticos histopatológicos foram de glioblastomas. Foram preparadas lâminas e coradas em hematoxilina eosina e posteriormente análise histomorfométrica, sendo selecionados os casos que apresentaram vasculatura atípica. Foram analisados os parâmetros de malignidade hiper celularidade, mitose e presença de necrose em paliçada em áreas vasculares típicas para comparação com áreas vasculares atípicas. Depois, procedeu-se as médias das contagens do número de células tumorais e de mitoses comparadas intra grupo, que foram correlacionadas à presença ou ausência de necrose em paliçada.

RESULTADOS: O número de mitoses e células em regiões circunvizinhas a vasos atípicos foi estatisticamente superior, estando relacionados entre si. Constatou-se, que regiões onde há o aumento do número de células e mitoses predispõem à formação de vascularização atípica. A necrose em paliçada não teve correlação com o aumento do número de mitoses em áreas vasculares típicas ou atípicas, mas sua presença foi significativa quanto ao número de células, sendo encontrada uma maior celularidade nos casos em que estava presente esse tipo de necrose.

CONCLUSÕES: Há interferência dos parâmetros histopatológicos relacionados a hiper celularidade e número de mitoses na áreas vasculares atípicas dos glioblastomas em relação às áreas vasculares típicas. A presença da necrose em paliçada influencia indiretamente a formação de vasos atípicos, pois propicia o aumento da celularidade.

PALAVRAS-CHAVE: Glioblastoma, angiogênese, hiper celularidade, mitose, necrose em paliçada.

INTRODUÇÃO

Glioma é o termo utilizado para designar os tumores (neoplasias) originários das células da glia encefálica, sendo os gliomas a forma mais comum de tumor cerebral primário¹.

Os tumores do Sistema Nervoso Central (SNC) constituem um grupo heterogêneo de doenças, sendo as neoplasias astrocitárias correspondentes a 60% deles². Os astrocitomas constituem o principal tipo histológico entre os tumores primários do sistema nervoso central (SNC), configurando 1,32% de todas as neoplasias diagnosticadas anualmente. O termo astrocitoma foi cunhado por Virchow para designar os tumores compostos predominantemente por astrócitos atípicos, porém só foi empregado definitivamente na classificação proposta por Bailey e Cushing³.

Na classificação histopatológica da Organização Mundial da Saúde (OMS) para os tumores próprios do SNC, admite-se que as diversas apresentações histológicas dos astrocitomas possam ser divididas em diferentes graus de malignidade, variando de I a IV. Os astrocitomas de grau I são o astrocitoma de célula gigante subependimário e o astrocitoma pilocítico; os de grau II são astrocitoma pilomixóide, o astrocitoma difuso e o xantoastrocitoma pleomórfico; o de grau III é o astrocitoma anaplásico e os de grau IV são o glioblastoma, o glioblastoma de célula gigante e o gliossarcoma⁴.

Em grande parte, essa graduação resulta do reconhecimento de indicadores de anaplasia (hipercelularidade, pleomorfismo nuclear, atividade mitótica, angiogênese e necrose) típicos de cada variante tumoral, através da análise histológica rotineira por microscopia óptica. Como regra geral, o grau tumoral é baseado nas áreas de maior atipia, admitindo-se que essa população de células é a que determina o curso da doença. Além de manifestar o comportamento biológico tumoral, permitindo inferências prognósticas, o acúmulo de achados anaplásicos parece refletir a progressão das alterações moleculares adquiridas durante o processo de transformação neoplásica³.

O Glioblastoma torna-se mais freqüente com a idade, representando somente 1% dos gliomas na primeira década de vida, mas acima de 50% após os 60 anos^{5,6}. A incidência dos Glioblastomas multiformes é de 12% a 15% dentre as neoplasias intracranianas e de 2% dentre todos os tumores⁷. A sobrevida pós-operatória, apesar do tratamento, é de 12 meses⁸. Estima-se

que menos de 3% dos pacientes com Glioblastoma sobrevivem cinco anos após o diagnóstico, sendo a idade avançada o preditor mais significativo de mau prognóstico⁹. Estes tumores são mais freqüentes em homens do que em mulheres¹⁰.

Dentre os critérios de evolução tumoral, anteriormente citados, podemos destacar a angiogênese. John Hunter, em 1787, cunhou este termo para descrever o crescimento de novos vasos¹¹. O conceito de que o crescimento tumoral e o processo de formação de metástases sejam dependentes do desenvolvimento de novos vasos sanguíneos foi consolidado por Folkman, no início da década de 70^{12,13,14}. A constatação de que a angiogênese tem uma correlação consistente e é um pré-requisito para o crescimento tumoral e para metástase tem importantes implicações¹⁵.

A permeabilidade vascular e a angiogênese, típica ou atípica, dependem do tipo do tumor e do órgão acometido, visto que cada órgão tem o estroma diferente do outro, com fatores pró e anti- angiogênicos diferentes¹⁶. Em Glioblastomas, a presença de vascularização atípica, estabelece de forma marcante a malignidade de suas células que secretam fatores pró-angiogênicos e alteram totalmente a estrutura do vaso, tornando-o, por vezes, similar a um glomérulo renal, além de ser um parâmetro histológico, onde sua presença, indica o diagnóstico preciso deste tipo tumoral^{4,17,18,19}.

Múltiplos focos de pequenas necroses centrais com células na periferia que se assemelham a paliçada, conhecida como necrose em paliçada ou pseudopaliçada, também é um importante preditor de malignidade, pois assim como a vascularização atípica, sua simples presença isolada ou em conjunto com outros parâmetros define o diagnóstico histológico de Glioblastoma^{17,20,21}.

O estudo dos indicadores de anaplasia (mitose, celularidade e necrose em paliçada) em região circunvizinha a angiogênese típica e atípica, em Glioblastomas, esclarecerá a importância da estrutura vascular normal ou alterada para o desenvolvimento deste tipo de tumor.

OBJETIVO

O presente estudo teve por objetivo avaliar a influência dos parâmetros histopatológicos de hiper celularidade, mitose e necrose em paliçada na vasculatura dos Glioblastomas.

MÉTODOS

Seleção da amostra

O presente estudo foi realizado no Departamento de Patologia do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) no período de outubro de 2009 e janeiro de 2011.

Foram selecionados e utilizados 53 blocos de parafina com fragmentos teciduais cujos diagnósticos histopatológicos foram de Glioblastomas, no período entre 2006 e 2009, provenientes do arquivo do Laboratório de Neuropatologia do Prof. Dr. Roberto José Vieira de Mello.

Dos blocos já existentes e arquivados no laboratório, foram feitos novos recortes histológicos com 6 micras de espessura para a preparação de lâminas que foram coradas por hematoxilina eosina para estudo das regiões com vasos atípicos e típicos, bem como número de mitoses, número de células tumorais e presença ou ausência de necrose em paliçada, visualizados através da microscopia óptica.

Foram excluídos todos os blocos dos casos clínicos que não possuíam diagnóstico histopatológico prévio de glioblastoma; que não estivessem situados neste período pré-determinado, blocos diagnosticados como Astrocitoma de graus I, II e III.

Após análise histopatológica, foram excluídos os casos que não tinham quantidade de tecido suficiente para se avaliar os parâmetros de aumento no número de células e número de mitoses, em áreas vasculares típicas e atípicas, assim como também foram excluídos os espécimes que não possuíam vasos atípicos. Também não foi incluído neste estudo, o parâmetro referente ao pleomorfismo nuclear.

Foram selecionados 49 amostras diagnosticados como Glioblastomas que possuíam os parâmetros histológicos a serem estudados para comparação.

Análise morfométrica

Em cada caso foram analisadas áreas vasculares típicas para comparação com áreas vasculares atípicas, logo cada caso foi controle de si mesmo. Após análise histológica para seleção dos casos com critérios histológicos a serem estudados, foram realizadas 12 fotos no aumento de 400x, sendo 6 fotos de áreas adjacentes a vasos atípicos e 6 fotos de áreas de vasos típicos, dessas fotos foram selecionadas 3 fotos de áreas vasculares típicas e atípicas que possuíam os parâmetros histológicos mais significativos para serem analisadas no estudo morfométrico.

A análise morfométrica, baseou-se na contagem do número de células tumorais e número de mitoses nas regiões circunvizinhas a vasos atípicos e típicos. Foi feita utilizando-se um microscópio óptico com câmera digital, para captura de imagem, acoplado a um sistema de computação com o programa Mesurin-pro. As áreas de necrose em paliçada presentes ou ausentes foram detectadas na microscopia óptica. As médias dos resultados obtidos foram comparadas intra grupo, assim como também foram comparadas áreas adjacentes a vasos típicos e atípicos, correlacionando esses achados com a presença ou ausência de necrose em paliçada.

Análise estatística

As variáveis numéricas foram representadas pelas medidas de tendência central e medidas de dispersão e foram comparadas estatisticamente pelos testes: Teste de Normalidade de Kolmogorov-Smirnov para variáveis quantitativas, Teste t Student (Distribuição Normal) e Mann-Whitney (Não Normal). Todos os testes foram aplicados com 95% de confiança. Foram utilizados os Softwares SPSS 13.0 para Windows e o Excel 2003. O valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

O número de mitoses e células em regiões circunvizinhas a vasos típicos e atípicos foi comparado estatisticamente. Foram observados que os parâmetros aferidos estão em maior número na área de vasos atípicos (Figura 1) e constatado que há uma correlação forte positiva entre esses parâmetros, ou seja, quanto maior o número de mitoses, maior a celularidade (Figura 2). Daí constatou-se, que as regiões onde há o aumento do número de células e do número de mitoses predispõem a formação de vascularização atípica (Tabela1).

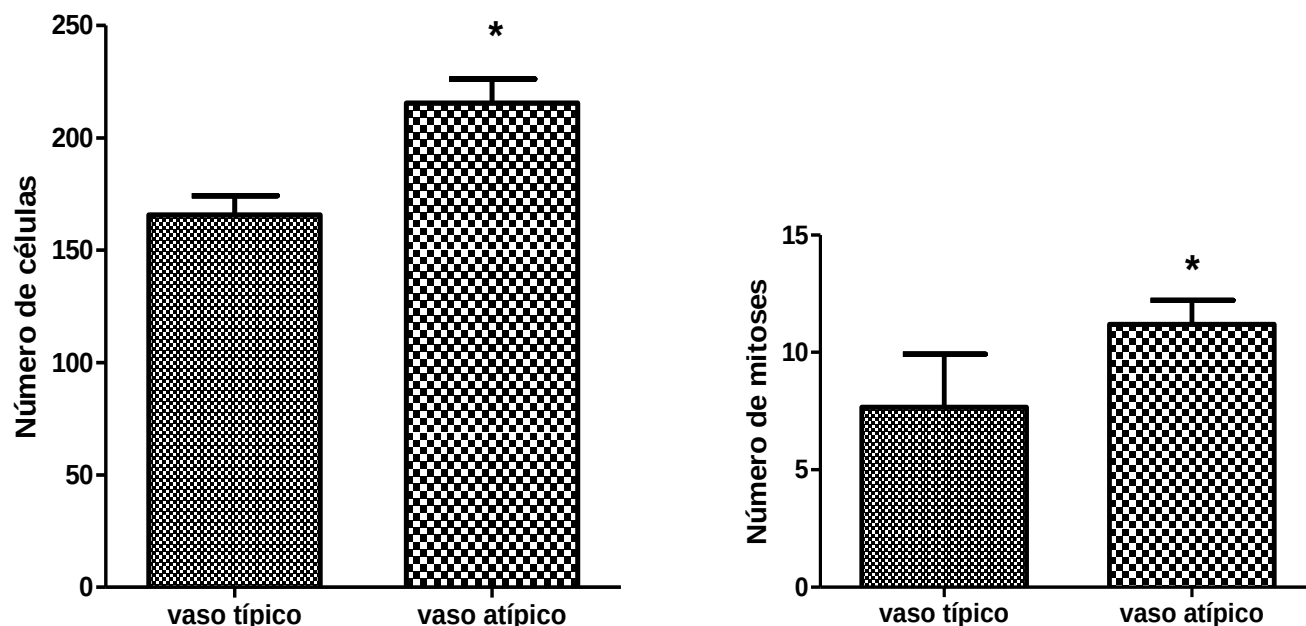


Figura 1. Relação morfométrica dos parâmetros histológicos de hiper celularidade e mitose entre regiões de vasos típicos e atípicos em glioblastomas. * Houve diferença estatisticamente significativa entre o número de células e de mitoses em regiões de vasos típicos e atípicos.

Tabela 1. Correlação entre o número de células e mitoses em regiões de vasos típicos e atípicos.

Variáveis	Grupos		p-valor
	Típico	Atípico	
	Média ± DP	Média ± DP	
Mitoses	6,08 ± 4,84	11,64 ± 6,97	< 0,001 *
Células	167,73 ± 57,11	217,47 ± 72,76	< 0,001 **

(**) Teste t Student (*) Teste de Mann-Whitney

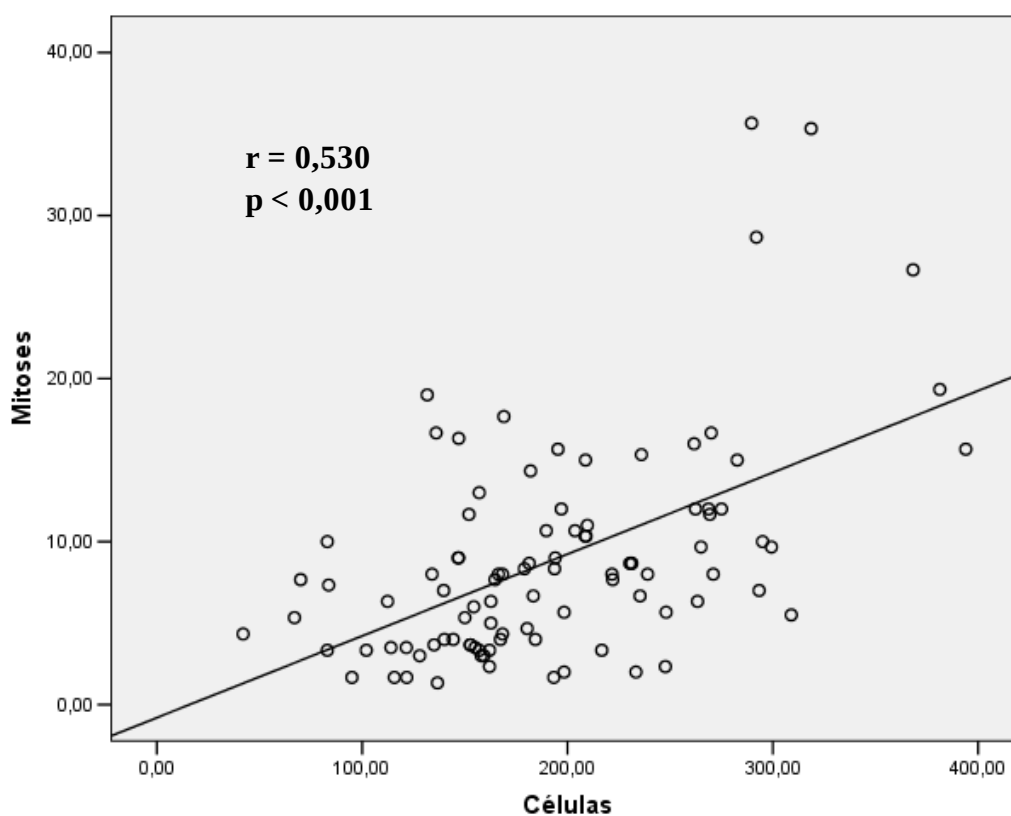


Figura 2. Relação entre o número de células e mitoses.

Em todos os casos estudados, foram analisadas a presença ou ausência de necrose em paliçada independente da proximidade a vasos atípicos ou típicos. A necrose em paliçada não teve correlação com o aumento do número de mitoses em áreas vasculares típicas ou atípicas, mas sua presença foi significativa quanto ao número de células, sendo encontrada uma maior celularidade nos casos em que estavam presentes esse tipo de necrose (Figura 3 e 4).

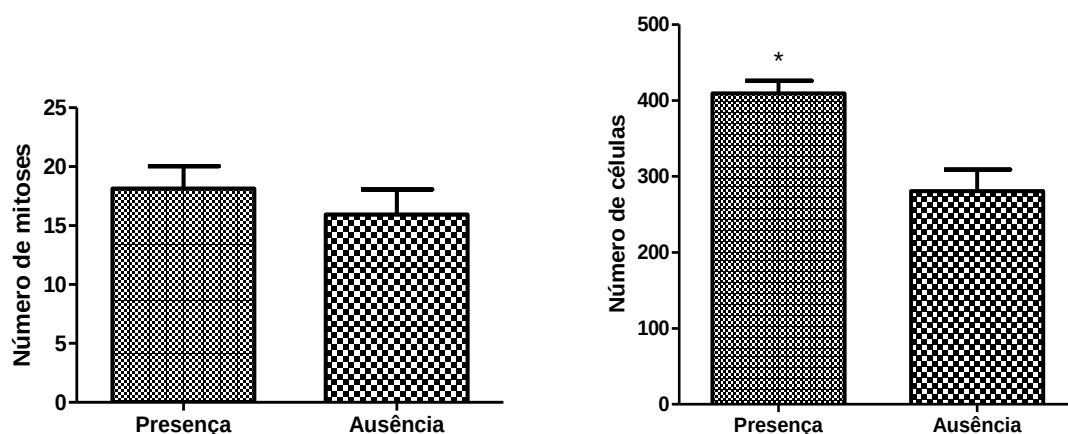


Figura 3. Relação do número de mitoses e do número de células com a presença ou ausência de necrose em paliçada. Não foi observada diferença estatisticamente significativa quanto ao número de mitoses quer na presença ou ausência de necrose em paliçada. * Houve diferença estatisticamente significativa quanto ao número de células nos Glioblastomas que apresentaram necrose em paliçada.

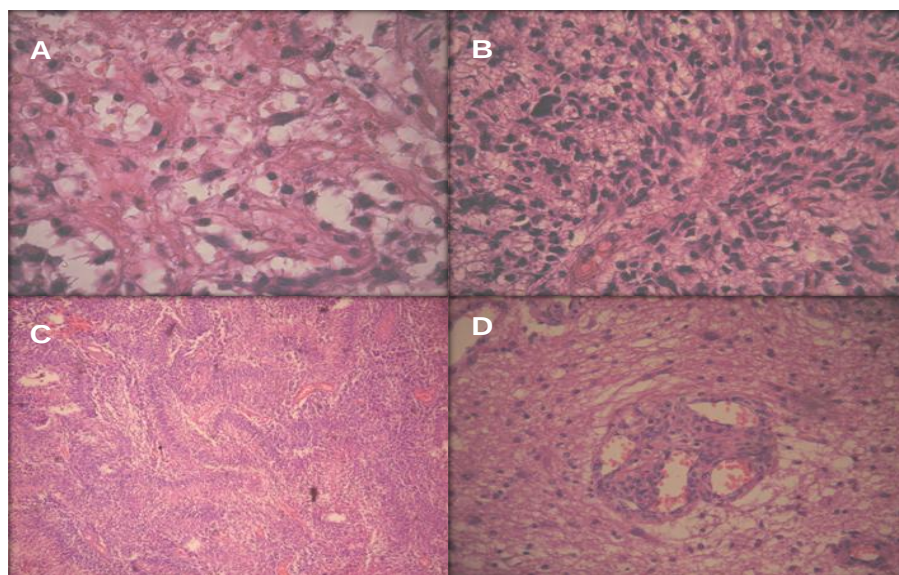


Figura 4. Critérios histológicos. A. Hiper celularidade e mitose em vasos típicos. B. Hiper celularidade e mitose em vasos atípicos. C. Necrose em paliçada. D. Vaso atípico.

DISCUSSÃO

A amostra estudada foi válida estatisticamente, sendo utilizados 49 dos 53 espécimes. Os dados obtidos nesta pesquisa refletem com fidedignidade a demonstração da revisão de literatura. O estudo morfológico é reconhecido no diagnóstico e terapêutica de diversas doenças e esta pesquisa amplia o conhecimento acerca dos critérios histológicos que são necessários para o diagnóstico histopatológico de Glioblastomas. Esses critérios são a necrose em paliçada e/ou vascularização atípica (vasos com aspecto glomerulóide), além da presença obrigatória do aumento no número de células, aumento no número de mitoses e pleomorfismo nuclear. As variantes necrose em paliçada e vascularização atípica ao mesmo tempo em que marcam uma maior malignidade deste tipo tumoral, têm que estar presentes, uma ou ambas, para caracterizar os astrocitomas grau IV^{17,19}.

Em todo o estudo, só foram analisadas as amostras que tinham vascularização atípica, para uma posterior comparação morfométrica nos aumentos do número de células e número de mitoses dentro do mesmo tumor em áreas vasculares típicas e atípicas, sendo desprezadas as amostras que não possuíam vasos atípicos e não incluído neste estudo, o parâmetro referente ao pleomorfismo nuclear.

A necrose em paliçada esteve presente na maioria das amostras analisadas na microscopia óptica, sendo estatisticamente significativa com p valores maiores que 0,05 em relação ao número de células aumentadas, e não tendo significância estatística quando comparadas sua presença em relação ao número de mitoses. Esses dados corroboram a demonstração de estudos que relatam que o aumento do número de células tumorais, que têm alta atividade metabólica, requer uma maior oxigenação e com essa maior exigência, induz através do estímulo hipóxico à apoptose, culminando com a formação de pequenos centros necróticos, promovendo então, uma fuga de células deste centro para a periferia(paliçada), células estas, que após sobreviverem ao estímulo mortal, tornam-se mutadas, com maior capacidade infiltrativa e promovendo a formação de novos clones celulares tumorais, traduzidos por aumento de celularidade, sendo estes clones celulares ainda mais resistentes a estímulos apoptóticos, e os promotores que reiniciam o ciclo vicioso de indução à necrose em paliçada e aumento no número de células tumorais^{20,21,22,23}.

A relação entre o número de mitoses e a necrose em paliçada não teve significado estatístico neste estudo e também não foi abordada na literatura.

Esse aumento na proliferação celular tumoral tem significância estatística em relação ao aumento no número de mitose. Há uma forte relação do aumento no número de mitoses típicas ou atípicas com uma quantidade aumentada de células tumorais, pois sendo o parâmetro mitose, um importante marcador de divisão celular, quando esta é finalizada, há o aumento quantitativo e significativo no número de células tumorais. Essa relação estatística significativa entre o aumento no número de mitoses e a hiper celularidade tumoral encontra sua sustentação em uma vasta literatura, estando presente não só nos Glioblastomas, mas na maioria das neoplasias malignas^{17,24,25}.

Através do teste t de student, foi feita a correlação estatística entre as variáveis hiper celularidade e aumento do número de mitoses quantificadas em áreas vasculares típicas e atípicas, demonstrando os resultados estatísticos, que nas áreas vasculares atípicas, esses parâmetros aferidos são significativos, em detrimento às áreas vasculares típicas. Esses resultados encontraram base em pesquisas que relatam a interferência do aumento da celularidade e sua relação íntima com o aumento do número de mitose já explicada acima, descrevendo no entanto, a importância das células tumorais de Glioblastomas na secreção de fatores angiogênicos, que atuam induzindo uma proliferação endotelial atípica e também proliferação de células musculares lisas que produzem nos vasos, o aspecto morfológico que se assemelha a um glomérulo renal, sendo por isso, os vasos atípicos também conhecidos por vasos glomerulóides^{4,18,19}.

Conclui-se, após o fim deste estudo e com base na literatura, que nas áreas de hiper celularidade por causa desse aumento no número de células, há o estímulo da angiogênese com esse padrão atípico, característico deste tipo tumoral específico.

CONCLUSÕES

Constatou-se que há uma forte influência dos parâmetros histopatológicos relacionados à hipercelularidade, número de mitose e necrose em paliçada na vascularização dos Glioblastomas. A presença da necrose em paliçada propicia a hipercelularidade tumoral, induzindo de forma indireta ao aumento da vascularização, concluindo-se que há interferência dos parâmetros histopatológicos relacionados a hipercelularidade e número de mitose na áreas vasculares mais atípicas dos Glioblastomas em relação às áreas vasculares típicas.

BIBLIOGRAFIA

1. BAVARESCO, L. Estudo do papel da ecto-5'-nucleotidase/cd73 na proliferação de gliomas. Porto Alegre (Tese, Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul), 2008.
2. ISOLAN GR, FILHO JM R, ISOLAN PMBS, GIOVANINI A, MALAFAIA O, DINI LI, R KUMMER AJR, NEGRÃO AW. Neoplasias astrocitárias e correlação com as proteínas p53 mutada e Ki-67. Arquivos de Neuro-Psiquiatria 2005; 63 (4): 997-1004.
3. FARIA MHG, PATROCÍNIO RMSV, RABENHORS SHB. Estratégias auxiliares para graduação dos tumores astrocíticos segundo os critérios histopatológicos estabelecidos pela OMS. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial 2006; 42 (5): 401-10.
4. LOUIS D N, OHGAKI H, WIESTLER O D, CAVENEE W K, BURGER P C, JOUVET A, SCHEITHAUER B W, KLEIHUES P. The 2007 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System, Acta Neuropathol, 2007;114:97–109.
5. EDMONSON E A. Neuroncologia in: ROLAK, L. A. Segredos em Neurologia. Porto Alegre. Artes Médicas Sul, 1995;276-291.
6. CAMBRUZZI E, ZETTLER CG, PÊGAS KL, WANDERLEI ABS, KAERCHER JUNIOR D, DUARTE MR, PENNO AK, GIANISSELLA G, BASSO MG. Perfil e prevalência dos tumores primários do sistema nervoso central no Grupo Hospitalar Conceição, de Porto Alegre, RS. Revista da AMRIGS, 2010, 54(1):7-12.

7. MAHALEY M, METTLIN C, NATARAJAN N, PEACE BB. National survey of patterns of care for brain tumor patients. *J Neurosurg*, 1989;71:826-36.
8. ROSAI. Special techniques in surgical pathology. In ROSAI and ACKERMAN'S Surgical pathology, 9.Ed. St. Louis, Missouri: Mosby, 2004, 37-91.
9. SALMAGGI A, SILVANI A, MERLI R, CAROLI M, TOMEI G, RUSSO A. Multicentre prospective collection of newly diagnosed glioblastoma patients: update on the Lombardia experience. *Neurol Sci*, 2008;29(2):77-83.
10. CBTRUS. Statistical Report: Primary Brain Tumors in the United States, 2000–2004. Central Brain Tumor Registry of the United States, 2008.
11. GUPTA K, ZHANG J. Angiogenesis: a curse or cure? *Postgraduate Medical Journal*, 2005;81:236-242.
12. FOLKMAN J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *The New England Journal of Medicine*, 1971;285(21):1182-1186.
13. FOLKMAN J. Anti-angiogenesis: New Concept for Therapy of Solid Tumors. *Annals of Surgery*, 1972;175:409-416.
14. FOLKMAN J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Seminars in Oncology*, 2002;29:15-18.
15. RAK J, YU JL. Oncogenes and tumor angiogenesis the question of vascular 'supply' and vascular 'demand'. *Seminars in Cancer Biology*, 2004;14:93-104.
16. POON R, FAN S, WONG J. A target for Novel Prognostic and Therapeutic Approaches. *Annals of Surgery*, 2003;238: 9-28.
17. KLEIHUES P, CAVENEE WK. 2000. World Health Organization Classification of Tumours of the Nervous System. Lyon: WHO/IARC.
18. CAVENEE WK, FURNARI FB, NAGANE M, HUANG H-JS, NEWCOMBE EW, et al. 2000. Diffuse astrocytomas. In *Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System*, ed. P Kleihues, WK Cavenee, pp. 10–21. Lyon: IARC.
19. HADDAD SF, MOORE SA, SCHELPER RL, GOEKEN JA. Vascular smooth muscle hyperplasia underlies the formation of glomeruloid vascular structures of glioblastoma multiforme. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1992;51:488–92

20. BRAT DJ, VAN MEIR EG. Vaso-occlusive and prothrombotic mechanisms associated with tumor hypoxia, necrosis, and accelerated growth in glioblastoma. *Lab. Invest.*, 2004;84:397–405.
21. BRAT DJ, CASTELLANO-SANCHEZ AA, HUNTER SB, PECOT M, COHEN C, et al. Pseudopalisades in glioblastoma are hypoxic, express extracellular matrix proteases, and are formed by an actively migrating cell population. *Cancer Res.*, 2004;64:920–27.
22. GRAEBER TG, OSMANIAN C, JACKS T, HOUSMAN DE, KOCH CJ, et al. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumors. *Nature*, 1996;379:88–91
23. KINZLER KW, VOGELSTEIN B. Life (and death) in a malignant tumor. *Nature*, 1996;379:19–20
24. BRASILEIRO FILHO G. *Blogliolo Patologia*, 7 Ed, Editora Guanabara Koogan, 2006.
25. KUMAR V, ABBAS AK, FAUSTO N. *Patologia, Bases patológicas das doenças*. 7 Ed, Editora Elsevier, 2005.

6. CONCLUSÕES

Constatou-se que há uma forte influência dos parâmetros histopatológicos relacionados à hipercelularidade, número de mitose e necrose em paliçada na vascularização dos Glioblastomas.

A presença da necrose em paliçada propicia a hipercelularidade tumoral, e esta, aumenta a secreção de estímulos angiogênicos, induzindo de forma indireta ao aumento da vascularização.

Conclui-se que há interferência dos parâmetros histopatológicos relacionados a hipercelularidade e número de mitose na áreas vasculares atípicas dos Glioblastomas em relação às áreas vasculares típicas.

7. REFERÊNCIAS

ALHO, E. J. L.; BROCK, R. S. Tumores Primários do Sistema Nervoso Central. **Portal MedicinaNet**, http://www.medicinanet.com.br/conteudos/revisoes/1569/tumores_primarios_do_sistema_nervoso_central.htm. Visualizado em 12 de junho de 2009.

BAVARESCO, L. **Estudo do papel da ecto-5'-nucleotidase/cd73 na proliferação de gliomas**. Porto Alegre (Tese, Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul); 2008.

BRASILEIRO FILHO G. *Blogliolo Patologia*, 7 ed., Editora Guanabara Koogan, 2006.

BELTING; M.; DORREL; M.; SANDGREN; S.; AGUILAR; E.; AHAMED, J.; DORFLEUTNER, A. Regulation of angiogenesis by tissue factor cytoplasmic domain signaling. **Nature Medicine**, v. 10, p. 502-509, 2004.

BRAT, D. J.; CASTELLANO-SANCHEZ, A. A.; HUNTER, S. B.; PECOT, M.; COHEN, C. et al. Pseudopalisades in glioblastoma are hypoxic, express extracellular matrix proteases, and are formed by an actively migrating cell population. **Cancer Res.** v. 64, p. 920–27, 2004.

BRAT, D. J.; VAN MEIR, E. G. Vaso-occlusive and prothrombotic mechanisms associated with tumor hypoxia, necrosis, and accelerated growth in glioblastoma. **Lab. Invest.** v. 84, p. 397–405, 2004.

BROOKS, P. C.; STROMBLAD, S.; KLEMKE, R.; VISSCHER, D.; SARKAR, F. H.; CHERESH, D. A. Antiintegrin α_3 blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 96, p. 1815-1822, 1995.

CAMBIER, J.; MASSON, M.; DEHEN, H. **Manual de Neurologia** 4ª ed. Paris: Masson Edituer, 1988, 395-417 p.

CAMBRUZZI, E.; 1, ZETTLER, C. G.; PÊGAS, K. L.; WANDERLEI, A. B. S.; KAERCHER JUNIOR, D.; DUARTE, M. R.; PENNO, A. K.; GIANISSELLA, G.; BASSO, M. G. Perfil e

prevalência dos tumores primários do sistema nervoso central no Grupo Hospitalar Conceição, de Porto Alegre, RS. **Revista da AMRIGS**, v. 54, n. 1, p. 7-12, 2010.

CAPPELLARI, A. R. **Efeito de diferentes componentes da matriz extracelular sobre a ecto-5'-nucleotidase, proliferação, adesão e migração celular na linhagem de células de gliomas humanos U138-MG**. Porto Alegre (Tese, Universidade Federal do Rio Grande do Sul), 2008.

CARVALHO, G. P.; ALMEIDA, S. E. M.; ROCHA, A. B.; BIZZI, J. W. J.; BRUNETTO, A. L. Análise da expressão do EGFR em glioblastoma multiforme Expression of the EGFR in patients with glioblastoma multiform. **Revista da Associação Médica do Rio Grande do Sul**, v. 50, n. 2, p. 120-123, 2006.

CAVENEY, W. K.; FURNARI, F. B.; NAGANE, M.; HUANG, H. J. S.; NEWCOMBE, E. W.; et al. **Diffuse astrocytomas**. In Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System, ed. P Kleihues, WK Cavenee, 2000, 10–21 p.

CBTRUS. Statistical Report: Primary Brain Tumors in the United States, 2000–2004. **Central Brain Tumor Registry of the United States**, 2008.

DAI, C.; HOLLAND, E. C. Glioma Models. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1551, p. 19-27, 2001.

DEL MAESTRO, R. F.; MEGYESI, J. F.; FERRE, C. L. Mechanisms of tumor-associated edema: a review. **J Neurol Sci**, v. 17, p. 177-83, 1990.

ECCLES, A. S. Heparanase: breaking down barriers in tumors. **Nat Med**, v. 5, p. 735-6, 1999.

EDMONSON, E. A. Neuroncologia in: ROLAK, L. A. **Segredos em Neurologia**. Porto Alegre. Artes Médicas Sul, 1995. 276-291 p.

ELLISON, D. W.; STEART, P. V.; GATTER, K. C.; WELLER, R. O. Apoptosis in cerebral astrocytic tumours and its relationship to expression of the Bcl-2 and p53 proteins. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 21, n. 4, p. 352-61, 1995.

ENEPEKIDES, D.; SULTANEM, K.; NGUYEN, C.; SHENOUDA, G.; BLACK, M.; ROCHON, L. Occult Cervical Metastases: Immunoperoxidase analysis of the pathologically negative neck. **Otolaryngology-Head and Neck Surgery**, v. 120, p. 713-717, 1999.

FARIA, M. H. G.; PATROCÍNIO, R. M. S. V.; FILHO, M. O. M.; RABENHORST, S. H. B. Expressão das proteínas BCL-2 e BAX em tumores astrocíticos humanos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 4, p. 271-278, 2006.

FARIA, M. H. G.; PATROCÍNIO, R. M. S. V.; RABENHORS, S. H. B., Estratégias auxiliares para graduação dos tumores astrocíticos segundo os critérios histopatológicos estabelecidos pela OMS. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 5, p. 401-410, 2006.

FERNANDEZ, P. M.; RICKLES, F. R. Tissue factor and angiogenesis in cancer. **Current Opinion in Hematology**, v. 9, p. 401-406, 2002.

FIDLER, I. J. Angiogenic heterogeneity: regulation of neoplastic an-giogenesis by the organ microenvironment. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 93, p. 1040-1041, 2001.

FOLKMAN, J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. **Seminars in Oncology**, v. 29, p. 15-18, 2002.

FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. **The New England Journal of Medicine**, Nov 18, v. 285, n. 21, p. 1182-1186, 1971.

FOLKMAN, J. Anti-angiogenesis: New Concept for Therapy of Solid Tumors. **Annals of Surgery**, v. 175, p. 409-416, 1972.

FOLKMAN, J.² Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. **Nature Medicine**, v. 1, p. 27-31, 1995.

FOLKMAN, J.¹ Clinical applications of research on angiogenesis. **The New England Journal of Medicine**, v. 333, p. 1757-1763, 1995.

FONSECA, C. O.; QUÍRICO-SANTOS, T.; FERNANDES, J.; CARVALHO, M. G. C.; GATASS, C. R. Biologia molecular dos glioblastomas: perspectivas terapêuticas do monoterpeneo álcool perílico. **J Bras Neurocirurg**, v. 14, n. 2, p. 46-54, 2003.

FRANCO-HERNÁNDEZ, C.; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, V.; REY, J. A. Biología molecular de los glioblastomas. **Neurocirugia**, v. 18, p. 373-382, 2007.

FURNARI, F. B.; FENTON, T.; BACHOO, R. M.; MUKASA, A.; STOMMEL, J. M.; STEGH, A.; HAHN, W. C.; LIGON, K. L.; LOUIS, D. N.; BRENNAN, C.; CHIN, L.; DEPINHO, R. A.; CAVENEE, W. K. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. **Genes Development**, v. 21, p. 2683-2710, 2007.

GIROLAMI, V. O Sist. Nervoso Central. in: COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. ROBBINS. **Patologia estrutural e funcional**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 2000. 1198-1202 p.

GRAEBER, T. G.; OSMANIAN, C.; JACKS, T.; HOUSMAN, D. E.; KOCH, C. J. et al. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumors. **Nature**, v. 379, 88–91, 1996.

GUPTA, K.; ZHANG, J. Angiogenesis: a curse or cure? **Postgraduate Medical Journal**, v. 81, p. 236-242, 2005.

HADDAD, S. F.; MOORE, S. A.; SCHELPER, R. L.; GOEKEN, J. A. Vascular smooth muscle hyperplasia underlies the formation of glomeruloid vascular structures of glioblastoma multiforme. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, v. 51, p. 488–92, 1992.

HASINA, R.; LINGEN, M. Angiogenesis in Oral Câncer. **Journal of Dental Education**, v. 65, p. 1282-1290, 2001.

HURWITZ, H.; FEHRENBACHER, L.; NOVOTNY, W.; CARTWRIGHT, T.; HAINSWORTH, J.; HEIM, W., BERLIN, J.; BARON, A.; GRIFFING, S.; HOLMGREN, E.; FERRARA, N.; FYFE, G.; ROGERS, B.; ROSS, R.; KABBINAVAR, F. Bevacizumab plus

Irinotecan, Fluorouracil, and Leucovorin for Metastatic Colorectal Cancer, **The New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 3, p. 2335-2342, 2004

ISOLAN, G. R.; FILHO, J. M. R.; ISOLAN, P. M. B.S.; GIOVANINI, A.; MALAFAIA, O.; DINI, L.I.; R KUMMER,A. JR.; NEGRÃO, A. W. Neoplasias astrocitárias e correlação com as proteínas p53 mutada e Ki-67. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 63, n. 4, p. 997-1004, 2005.

KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. Life (and death) in a malignant tumor. **Nature**, v. 379, p. 19–20, 1996.

KLEIHUES, P.; CAVANEE, W. K. Pathology and Genetics. Tumors of the Nervous System. **International Agency for Research on Cancer**. 150 cours Albert Thomas, F-69372 Lyon cedex 08, France 1997.

KLEIHUES, P.; CAVENEE WK. **World Health Organization Classification of Tumours of the Nervous System**. Lyon: WHO/IARC, 2000.

KLEIHUES, P.; CAVENEE. W. K. pp. 10–21. Lyon: IARC Haddad SF, Moore SA, Schelper RL, Goeken JA. Vascular smooth muscle hyperplasia underlies the formation of glomeruloid vascular structures of glioblastoma multiforme. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.** v. 51, p. 488–92, 1992.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. Patologia, Bases patológicas das doenças. **Editora Elsevier**, ed. 7, 2005.

LOUIS, D. N.; OHGAKI, H.; WIESTLER, O. D.; CAVENEE, W. K.; BURGER, P. C.; JOUVET, A.; SCHEITHAUER, B. W.; KLEIHUES P. The 2007 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System, **Acta Neuropathol**, v. 114, p. 97–109, 2007.

MAHALEY, M.; METTLIN, C.; NATARAJAN, N.; PEACE, B. B. National survey of patterns of care for brain tumor patients. **J Neurosurg**, v. 71, p. 826-36, 1989.

NARDIN, P. **Avaliação de parâmetros bioquímicos e morfológicos de células gliais expostas a um meio com alto conteúdo de glicose.** Porto Alegre (Tese, Universidade Federal do Rio Grande do Sul), 2006.

NASH, G. F.; WALSH, D. C.; KAKKAR A. K. The role of the coagulation system in tumour angiogenesis. **The Lancet Oncology**, v. 2, p. 608-613, 2001.

OHGAKI, H.; KLEIHUES, P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. **Am J Pathol**, v. 170, n. 5, p. 1445-53, 2007.

PEKMEZOVIC, T.; JAREBINSKI, M.; PAVLOVIC, M. Epidemiology of central nervous system tumours. **Archive of Oncology**, v. 10, n. 3, p. 177-8, 2002.

POLLACK, I. F.; HAMILTON, R. L.; BURNHAM, J.; HOLMES, E. J.; FINKELSTEIN, S. D.; SPOSTO, R.; YATES, A. J.; BOYETT, J. M.; FINLAY, J. L. Impact of Proliferation Index on Outcome in Childhood Malignant Gliomas: Results in a Multi-institutional Cohort. **Neurosurgery**, v. 50, n. 6, p. 1238-1245, 2002.

POON, R.; FAN, S.; WONG, J. A target for Novel Prognostic and Therapeutic Approaches. **Annals of Surgery**, v. 238, p. 9-28, 2003.

RAK, J.; YU, J. L. Oncogenes and tumor angiogenesis the question of vascular 'supply' and vascular 'demand'. **Seminars in Cancer Biology**, v. 14, p. 93-104, 2004.

ROSAI. Special techniques in surgical pathology. In ROSAI and ACKERMAN'S **Surgical pathology**, 9.Ed. St. Louis, Missouri: Mosby, 2004, 37-91 p.

SALMAGGI, A.; SILVANI, A.; MERLI, R.; CAROLI, M.; TOMEI, G.; RUSSO, A. Multicentre prospective collection of newly diagnosed glioblastoma patients: update on the Lombardia experience. **Neurol Sci**, v. 29, n. 2, p. 77-83, 2008.

SKOBE, M.; ROCKWELL, P.; GOLDSTEIN, N.; VOSSELER, S.; FUSENIG, N. E. Halting angiogenesis suppresses carcinoma cell invasion. **Nature Medicine**, v. 3, p. 1222-1227, 1997.

TANDLE, A.; BLAZER D.; LIBUTTI, S. Antiangiogenic gene therapy of cancer: recent developments. **Journal of translational medicine.com**, p. 2-22, 2004.

THE CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK, Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. **Nature**, v. 455, p. 1061-1068, 2008.

TOHMA, Y.; GRATAS, C.; BIERNAT, W. et al. PTEN mutation are frequent in primary glioblastomas but not in secondary glioblastomas. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 57, p. 684-689, 1998.

WATANABE, K. W.; BIERNAT, A. A.; PERAUD, O.; TACHIBANA, K.; SATO, P.; KLEIHUES, P.; OHGAKI, H. Immunohistochemical assessments of P53 protein accumulation and tumor growth fraction during the progression of astrocytomas. **Brain Tumor Res Ther**, p. 255-62, 1996.

WOJTUKIEWICZ, M. Z.; SIERKO, E.; KLEMENT, P.; RAK, J. The hemostatic system and angiogenesis in malignancy. **Neoplasia**, v. 3, p. 371-384, 2001.

ANEXOS

ANEXO A - NORMAS DA REVISTA ARQUIVOS DE NEUROBIOLOGIA

Instruções aos Autores – Disposições Gerais

O periódico **Neurobiologia** publica artigos inéditos, revisões, notas didáticas, Casos Clínicos, Análise de Artigos e Revisão de Livros, Cartas ao Editor e Noticiário, em português e inglês, de autores de quaisquer centros de pesquisa do Brasil e do exterior. Os requisitos para apresentação de originais foram estabelecidos em conformidade com “Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals” do International Committee of Medical Journals Editors – Grupo Vancouver – publicado no Ann Intern Med 1997;126:36-47, disponível em versão digital em <http://www.acponline.org>.

Artigos e correspondências devem ser encaminhados para:

REVISTA NEUROBIOLOGIA

Mestrado e Doutorado em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento da UFPE

Centro de Ciências da Saúde – CCS – UFPE

Av. Prof. Moraes Rego, s/n – Cidade Universitária

50.670-420 Recife/PE Brasil

Tele-fax: 0055-81-2126-8539

E-mail: editor@neurobiologia.org

Home-page: <http://www.neurobiologia.org>

Aceito para publicação, torna-se o trabalho propriedade permanente da Revista Neurobiologia, que reserva todos os direitos autorais do artigo publicado, no Brasil e no exterior, permitindo, entretanto, sua posterior reprodução como transcrição, com a devida citação da fonte, mediante autorização prévia por escrito.

- Visando substancialmente proteger direitos dos autores, é obrigatório o envio da carta de autorização para publicação assinada por todos os autores. No caso de estudos envolvendo seres humanos, os autores devem mencionar que o estudo foi conduzido conforme os princípios da declaração de Helsinki e com o consentimento informado da cada participante ou de seus responsáveis legais. Não é permitida a apresentação do trabalho em outro periódico.

- Modelo para carta de autorização:

“Os autores abaixo assinados transferem com exclusividade todos os direitos para publicação, em qualquer forma ou meio, do artigo....., garantem que o mesmo é inédito e não está sendo avaliado por outro periódico e que o estudo foi conduzido conforme os princípios da declaração de Helsinki (incluir nome completo, endereço postal, telefone, fax, e-mail e assinatura de todos os autores).

Objetivando manter o padrão da Neurobiologia, o respeito às normas para publicação é condição obrigatória para o recebimento do trabalho. Após a análise técnica pelo Editor, quanto ao cumprimento das normas, o trabalho será encaminhado aos Editores de Área que dispõem de plena autoridade para decidir sobre sua aceitação, podendo reapresentá-lo aos autores, no prazo máximo de 30 dias, para que sejam feitas as alterações sugeridas.

De cada artigo será enviado um exemplar da revista. Os trabalhos devem ser enviados em formato eletrônico, acompanhados de duas cópias impressas na última versão, e não serão devolvidos em nenhuma hipótese.

■ Estrutura do artigo

- Todas as páginas devem estar numeradas indicando na primeira o total de páginas.

- A primeira página deve conter: título do trabalho, nome completo dos autores, com entrada direta e sobrenome completo, e filiação científica.
- Os resumos devem ser apresentados em português e inglês, inclusive títulos, com no máximo 200 palavras. Recomenda-se que os resumos sejam previamente encaminhados pelo autor a um revisor especialista no idioma.
- Os unitermos, entre 3 a 10, devem ser apresentados nos dois idiomas. Devem ser utilizados termos da lista denominada Medical Subject Headings do Index Medicus ou da lista de Descritores em Ciências da Saúde, publicada pela BIREME, para trabalhos em língua portuguesa.
- A citação de autores no corpo do texto deve ser numerada em sobrescrito pela ordem de apresentação.
- Correções ortográficas serão feitas, visando manter a homogeneidade e a qualidade da publicação, respeitando, porém, o estilo do autor. Recomenda-se que o texto seja previamente encaminhado a um revisor técnico especialista no idioma.
- Tabelas e ilustrações devem estar numeradas e impressas em folhas separadas, com as respectivas legendas, em formato que permita sua reprodução e incluídas no disquete. Os locais para inserção deverão ser indicados no texto, com destaque.
- Ilustrações não serão aceitas em negativo e a impressão de fotos a cores será cobrada dos autores.
- Agradecimentos deverão ser mencionados antes das referências.
- As referências devem ser apresentadas ao final, numeradas e em ordem alfabética. No texto, citá-las apenas pelo número. Dever ser usado o estilo que se segue:

■ Artigos de revistas

1. Artigo padrão

Vega KJ, Pina I, Krevsky B. Heart transplantation is associated with an increased risk for pancreatobiliary disease. *Am Intern Med* 1996 jun 1; 124:980-3. (a NLM lista até 25 autores. Caso haja mais que 25, liste os primeiros 24 seguidos da expressão et al.) (Caso o periódico tenha paginação contínua ao longo do volume, o mês e a edição devem ser omitidos.)

2. Uma organização como autor

The Cardiac Society of Australia and New Zealand. Clinical exercise stress testing. Safety and performance guidelines. *Med J Aust* 1996;164:282-4.

3. Ausência de autor

Cancer in South Africa [editorial]. *S Afr Med J* 1994;84:15.

4. Volume com suplemento

Shen HM, Zhang QF. Risk assessment of nickel carcinogenicity and occupational lung cancer. *Environ Health Perspect* 1994;102 Suppl 1:275-82.

5. Número com suplemento

Payne DK, Sullivan MK, Massie MJ. Women's psychological reactions to breast cancer. *Semin Oncol* 1996;23 (1 Suppl 2):89-97.

6. Volume em partes

Ozben T, Nacitarhan S, Tuncer N. Plasma and urine sialic acid in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Ann Clin Biochem* 1995;32 (Pt 3):303-6.

7. Número em partes

Poole GH, Mills SM. One hundred consecutive cases of flap lacerations of the leg in ageing patients. *NZ Med J* 1994;107 (986 Pt 1):377-8.

8. Número sem volume

Turan I, Wredmark T, Fellander-Tsai L. Arthroscopic ankle arthrodesis in rheumatoid arthritis. *Clin Orthop* 1995;(320):110-4.

9. Sem número nem volume

Browell DA, Lennard TW. Immunologic status of the cancer patient and the effects of blood transfusion on antitumor responses. *Curr Opin Gen Surg* 1993;325-33.

■ Livros e outras obras monográficas

1. Autor(es) pessoal(is)

Ringsven MK, Bond D. Gerontology and leadership skills for nurses. 2nd ed. Albany (NY):Delmar publishers; 1996.

2. Editor(es), compilador(es) como autor(es)

Norman IJ, Redfern SJ, editors. Mental health care for elderly people. New York: Churchill Livingstone; 1996.

3. Organização como autor e editor

Institute of Medicine(US). Looking at the future of medical program. Washington: The institute; 1992.

4. Volume com complemento

Phillips SJ, Whisnant JP. Hypertension and stroke. In: Laragh JH, Brenner BM, editors. Hypertension: pathophysiology, diagnosis and management. 2nd ed. New York: Raven Press; 1995, p. 465-78.

5. Anais de congressos

Kimura J, Shibasaki H, editors. Recent advances in clinical neurophysiology. Proceedings of the 10th International Congress of EMG and Clinical Neurophysiology: 1995 Oct 15-19; Kyoto, Japan. Amsterdam: Elsevier; 1996.

6. Trabalho de congresso

Bengtsson S, Solheim BG. Enforcement of data protection, privacy and security in medical informatics. In: Lun KC, Degoulet P, Piemme TE, Rienhoft O, editors, MEDINFO92. Proceedings of the 7th World Congress on Medical Informatics; 1992, p. 1561-5.

7. Relatório científico ou técnico

Smith P, Golladay K. Payment for durable medical equipment billed during skilled nursing facility stays. Final report. Dallas (TX): Dept. of Health and Human Services (US), Office of Evaluation and Inspections; 1994 Oct. Report n^o.: HHSIGOEI37485300870.

8. Dissertação

Kaplan SJ. Post-hospital home health care: the elderly's access and utilization [dissertation]. St. Louis (MO): Washington Univ.; 1995.

■ Outros materiais publicados

1. Artigo em jornal

Lee G. Hospitalizations tied to ozone pollution: study estimates 50.000 admissions annally. The Washington Post 1996 jun 21; Sect. A:3 (col.5).

2. Material audiovisual

HIV+AIDS: the facts and the future [videocassete]. St. Louis (MO): Mosby-Year Book; 1995.

■ Outros materiais publicados

1. No prelo

Lesner AI. Molecular mechanisms of cocaine addiction. N Engl J Med. In press 1996.

■ Material eletrônico

1. Artigo de revista em formato eletrônico

Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. Emerg Infect Dis [serial online] 1995 jan-mar [cited 1996 jun 5];(1);[24 screens]. Available from: URL: <http://www.cde.gov/ncidod/IED/eid.htm>

2. Monografia em formato eletrônico

CDI, clinical dermatology illustrated [monograph on CD-ROM], Reeves JRT, Maibach H. CMEA Multimedia Group, producers. 2nd ed. Version 2.0. San Diego: CMEA; 1995.

3. Arquivo de computador

Hemodynamics III: the ups and downs of hemodynamics [computer program]. Version 2.2. Orlando (FL): Computerized Educational System;1993.

Instructions to Authors – General Dispositions

The **Neurobiologia** publishes original articles, reviews, lectures, case reports, books and papers review, letters and news, in Portuguese and English, whether original or unpublished, of authors belonging to any research centers of Brazil and foreign countries. The guidelines for original presentation are in accordance with “Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals” of the International Committee of Medical Journals Editors – Vancouver Group – published in the Ann Intern Med 1997;126:36-47, available in digital version <http://www.acponline.org>.

Send all manuscripts and related correspondence to the following address:

NEUROBIOLOGIA JOURNAL

Mestrado e Doutorado em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento da UFPE
Centro de Ciências da Saúde – CCS – UFPE

Av. Prof. Moraes Rego, s/n – Cidade Universitária
50.670-420 Recife/PE Brazil
Tele-fax: 0055-81-2126-8539
E-mail: editor@neurobiologia.org
Home-page: <http://www.neurobiologia.org>

Accepted for publication, the manuscript becomes permanent property of the Neurobiologia Journal, which reserves all the author's rights of the published article in Brazil and in any other foreign country, however allowing its posterior reproduction as transcription, with the proper source citation, through a previous written authorization.

- Having in view protect substantially the author's right, it is necessary to send an authorization letter for publication signed by all authors. In case of studies involving human subjects the authors should state that study was conducted according to the informed consent of each participant or of its legal guardian. It is not allowed the publishing of the manuscript in any other periodical simultaneously.

- Model of the authorization letter:

"The authors signed below transfer with exclusiveness all the publication all the publication rights, in any form or means of the article....., guarantee that the article in unpublished and it is not under consideration by another periodical and that the study was conducted according to the principles outlined in the Declaration of Helsinki" (include complete name, address, telephone, fax, e-mail and the signature of all authors).

Aiming to keep a quality of the to accept the Neurobiologia manuscript it is mandatory to respect the technical rules for publication. After analysis of the accomplishment of these rules by the editor, the manuscript will be addressed to Editors of area who have total authority to decide about its acceptance, can present again to the authors in 30 days, to make the suggested changes in the text.

It will be send one issue of the periodical. The articles should be sent in electronic format, together with two printed copies of the latest version, and they will be not returned under no circumstances.

■ Articles structure

- All pages must be numbered, indicating in the first page the total number of pages.

- The first page must have: title of the manuscript, complete name of the authors including the first name and institutional affiliation of each author.

- Abstracts should be provided in English and Portuguese, including titles, with no more than 200 words. It is recommended that the abstracts be previously addressed to a proofreader expert in the idiom.

- Key words, between 3 and 10, should be presented in both idioms. It must be used terms according to the list of Medical Subject Headings of the Index Medicus or of the list "Descritores em Ciências da Saúde", published by BIREME, for Portuguese articles.

- Grammatical corrections will be made, aiming to keep the homogeneity and the quality of the publication, respecting the author's style. It is recommended that the text be addressed to a technical proofreader expert in the idiom.

- Tables and illustrations should be numbered and prepared in separate pages with its respective legends in a format that allows its reproduction and its inclusion in a diskette. The places for the inclusion should be highlighted in the text.

- Illustrations will not be accepted in negative and impression of color pictures will be charged to the authors.

- Thanks should be mentioned before references.

- References should be presented at the end, numbered and in alphabetical order. In text should be mentioned by number. The following is an example of reference:

■ Articles in newspaper

1. Standard Article

Vega KJ, Pina I, Krevsky B. Heart transplantation is associated with an increased risk for pancreatobiliary disease. *Am Intern Med* 1996 jun 1; 124:980-3.

2. An organization as Author

The Cardiac Society of Australia and New Zealand. Clinical exercise stress testing. Safety and performance guidelines. *Med J Aust* 1996;164:282-4.

3. Absence of Author

Cancer in South Africa [editorial]. S Afr Med J 1994;84:15.

4. Volume with supplement

Shen HM, Zhang QF. Risk assessment of nickel carcinogenicity and occupational lung cancer. Environ Health Perspect 1994;102 Suppl 1:275-82.

5. Number as supplement

Payne DK, Sullivan MK, Massie MJ. Women's psychological reactions to breast cancer. Semin Oncol 1996;23 (1 Suppl 2):89-97.

6. Volume in parts

Ozben T, Nacitarhan S, Tuncer N. Plasma and urine sialic acid in non-insulin dependent diabetes mellitus. Ann Clin Biochem 1995;32 (Pt 3):303-6.

7. Number in parts

Poole GH, Mills SM. One hundred consecutive cases of flap lacerations of the leg in ageing patients. NZ Med J 1994;107 (986 Pt 1):377-8.

8. Number without volum

Turan I, Wredmark T, Fellander-Tsai L. Arthroscopic ankle arthrodesis in rheumatoid arthritis. Clin Orthop 1995;(320):110-4.

9. Neither number volum

Browell DA, Lennard TW. Immunologic status of the cancer patient and the effects of blood transfusion on antitumor responses. Curr Opin Gen Surg 1993;325-33.

■ Books and other monographies

1. Personal(s) author(s)

Ringsven MK, Bond D. Gerontology and leadership skills for nurses. 2nd ed. Albany (NY):Delmar publishers; 1996.

2. Editor(s), compiler(s) as author(s)

Norman IJ, Redfern SJ, editors. Mental health care for elderly people. New York: Churchill Livingstone; 1996.

3. Organization as author and editor

Institute of Medicine(US). Looking at the future of medical program. Washington: The institute; 1992.

4. Chapter in one book

Phillips SJ, Whisnant JP. Hypertension and stroke. In: Laragh JH, Brenner BM, editors. Hypertension: pathophysiology, diagnosis and management. 2nd ed. New York: Raven Press; 1995, p. 465-78.

5. Annals of Congresses

Kimura J, Shibasaki H, editors. Recent advances in clinical neurophysiology. Proceedings of the 10th International Congress of EMG and Clinical Neurophysiology: 1995 Oct 15-19; Kyoto, Japan. Amsterdam: Elsevier; 1996.

6. Congress work

Bengtsson S, Solheim BG. Enforcement of data protection, privacy and security in medical informatics. In: Lun KC, Degoulet P, Piemme TE, Rienhoft O, editors, MEDINFO92. Proceedings of the 7th World Congress on Medical Informatics; 1992, p. 1561-5.

7. Technical or Scientific Report

Smith P, Golladay K. Payment for durable medical equipment billed during skilled nursing facility stays. Final report. Dallas (TX): Dept. of Health and Human Services (US), Office of Evaluation and Inspections; 1994 Oct. Report no.: HHSIGOEI37485300870.

8. Essay

Kaplan SJ. Post-hospital home health care: the elderly's access and utilization [dissertation]. St. Louis (MO): Washington Univ.; 1995.

■ Other published materials

1. Journal article

Lee G. Hospitalizations tied to ozone pollution: study estimates 50,000 admissions annually. The Washington Post 1996 Jun 21; Sect. A:3 (col.5).

2. Audiovisual material

HIV+AIDS: the facts and the future [videocassette]. St. Louis (MO): Mosby-Year Book; 1995.

■ Non-published material

1. Printing press

Lesner AI. Molecular mechanisms of cocaine addiction.
N Engl J Med. In press 1996.

■ Electronic Material

1. Newspaper`s article in electronic format

Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. Emerg Infect Dis [serial online] 1995 jan-mar [cited 1996 jun 5];(1);[24 screens]. Available from: URL: <http://www.cde.gov/ncidod/IED/eid.htm>

2. Monograph in electronic format

CDI, clinical dermatology illustrated [monograph on CD-ROM], Reeves JRT, Maibach H. CMEA Multimedia Group, producers. 2nd ed. Version 2.0. San Diego: CMEA; 1995.

3. Computador file

Hemodynamics III: the ups and downs of hemodynamics [computer program]. Version 2.2. Orlando (FL): Computerized Educational System;1993.

ANEXO B- NORMAS DA REVISTA ARQUIVOS DE NEURO-PSIQUIATRIA

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

- [Purpose and objectives](#)
- [Form of articles](#)
- [Article's submission](#)

Purpose and objectives

ARQUIVOS DE NEURO-PSIQUIATRIA (*Arq Neuropsiquiatr* - ISSN 0004-282X) is the official journal of the Brazilian Academy of Neurology. Volume is annual with quarterly numbers in March, June, September and December.

The aim of **Arquivos de Neuro-Psiquiatria** is to publish original scientific-technological articles in the field of Neurology and Applied Neurosciences. The texts must be unpublished, clear and concise in English. However, consensus, standardization or validation of diagnostic tests may be in Portuguese.

TYPES OF CONTRIBUTION – The following topics will be accepted for review:

- (1) *Articles*: original research related to the study of causes, mechanisms, diagnosis, development, treatment and prevention of diseases.
- (2) *Clinical or technical notes*: clinical reports of interest (rare cases, atypical presentations or outcome, unexpected effects of treatment, use of new techniques).

- (3) *Historical notes*: history of neurology, detailed sign descriptions, neurological diseases or syndromes.
- (4) *Views and Review articles*: critical analysis on actual topics by invitation.
- (5) *Theses abstracts*: abstract reproduction of the theses.
- (6) *Letters to the editors*: comments on published articles, up to 400 words and 5 references in English.
- (7) *Book analysis*: critical analysis of publications in neuroscience, up to 400 words.

Form of articles

Arquivos de Neuro-Psiquiatria adopts the editorial standards of the International Committee of Medical Journal Editors: ICMJE uniform requirements submitted to biomedical journals October 2005 update (www.icmje.org). The authors should refer to the original word-processor WORD, source 12 (Arial or Times New Roman). The text should include, in this order:

- (a) **Presentation (cover page)**: (a) Title synthetic and precise, up to 100 characters; (b) Author: name and, on behalf, as if desired for indexing; (c) Additional information: name of the institution where the study was made, city and country; grade and position of the author; declaration of conflict of interest; financing; postal address and e-mail.
- (b) **Abstract**: (a) Articles: up to 150 words, containing structured information on: espective and purpose of the study, method, results, concluzion; (b) Clinical, technical and/or historical notes: do not have abstract; (c) Review

articles: up to 200 words. Title and Abstract in Portuguese should follow the english abstract.

(c) **Key Words:** (a) Articles and review articles: in english and in portuguese, after the abstract, following the Descriptors of Health Science (<http://decs.bvs.br/>); (b) Clinical, technical, historical notes, theses abstracts and letters to the editor: do not have Key Words.

(d) **Text:** (a) Articles: up to 3000 words, excluding the references, including: introduction and purpose; method (subjects and procedures, explicit reference regarding compliance with the applicable ethical standards, including the name of the Ethics Commission which approved the study and the agreement of patients or their relatives); (d) results; discussion; acknowledgments; references. Do not repeat in the text the data from tables and illustrations. (b) clinical, technical and historical notes, the text should not exceed 1000 words, excluding the references; (c) review articles: up to 5000 words, not counting the references, including analysis of data of other authors or metanalyses, critical evaluation of the data from the literature and considerations based on personal experience.

(e) **Tables:** (a) Articles and review articles: up to 5, submitted on separate pages, with: order number, title and legend. Do not use bars to separate rows or columns; (b) clinical, technical and historical notes: up to 2, with format similar to that described for the articles.

(f) **Illustrations:** (a) Article and review articles: up to 3, graphics or photos of good quality with subtitles in separate pages. Reproduction of published illustrations: attach authorization of publishing and author; (b) Clinical, technical,

and historical notes: up to 2, with format similar to that described for the items above. Illustrations in color: costs will be send to the author.

(g) **References:** (a) articles: up to 30, restricted to those essences to the content of the article; (b) clinical, technical and historical notes: up to 10; (c) review articles: up to 60. The references must be: (1) numbered consecutively in the order of their citation along the text; (2) follow the pattern of the Index Medicus; (3) included all authors when up to 6; when 7 or more, list the first 3 followed by "et al."

Prepare references according to the following norms: (a) Articles: author (s). Title. Journal year; volume: initial-final pages (with all digits); (b) Books: Author(s) or Editor(s). Title. Edition, if not the first. Translator(s), if any. City publication: publisher, year: initial-final pages; (c) Chapters of books: Author(s). Title. Editor(s) of the book and the other data on it, as in previous item; (d) Summaries: Author(s). Title, followed by (abstr.). Publication year; Volume (Supplement and its number, if applicable): page(s). When it is not published in a journal: Title of publication. City where publishing was, year: page(s); (e) Textbook or text online: author(s). Title. Available at www... (Name of the site). Accessed (month, day, year); (f) Personal communications should only be mentioned in the text, in brackets.

References appearing on papers of this number are useful examples.

Articles must be submitted online to the Editorial Board: www.scielo.br/anp with a letter signed by all authors. E-mail: arq.neuropsiquiatria@terra.com.br ;address: ARQUIVOS DE NEURO-PSIQUIATRIA - Praça Amadeu Amaral 47/33 - 01327-010 - S. Paulo - SP - Brasil.

Upon receipt, the Editorial Board members:

- (a) check the article if it is within the context of the journal, refuse it if it does not meet this condition;
- (b) send the elected articles for the analysis to at least two researchers in the area of the subject of the article, within the system of arbitration by peers (peer-review) that, within 30 days, must assess the content and form of the text;
- (c) receive and analyze referees opinions, rejecting the articles judged unsatisfactory;
- (d) provide knowledge of the opinions of the referees and suggestions of the authors, along with their suggestions on content, structure, and writing the text;
- (e) within 30 days, receive the revised text of the authors;
- (f) within 30 days, verify if the new text of the article includes the recommended changes and suggestions and, if necessary, send the new text to the authors for additional corrections;
- (g) accepts or rejects the article for publication.

ACCEPT OF THE ARTICLE - The manuscripts will be accepted by chronological order, after conclusion of the processing steps. All manuscripts will be submitted to a reviewer in English language with experience in the neurological area, with cost running on account of the

authors.

PUBLICATION OF THE ARTICLE - It is understood that the authors agree with: (a) publishing the article in this journal exclusively; (b) the automatical transference of rights and permissions for publisher of this journal. The authors assume the responsibility for the intellectual and legal considerations and the results presented.



REVISTA NEUROBIOLOGIA

NEUROBIOLOGIA JOURNAL

www.neurobiologia.org



DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o artigo de revisão intitulado: **O ESTUDO DA VASCULATURA DOS ASTROCITOMAS DO PONTO DE VISTA HISTOQUÍMICO AUXILIANDO NA ESCOLHA TERAPÊUTICA: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA**, de autoria de Ana Paula de Souza e Pinto, Anacássia Fonseca de Lima, Juliana Pedrosa de Holanda Marques, Livia Bandeira Costa, Roberto José Vieira de Mello, Luciano Tavares Montenegro e Nicodemos Teles de Pontes Filho, foi aceito para publicação na REVISTA NEUROBIOLOGIA, vol. 74(1) de 2011. O referido é verdade e dou fé.

Recife/PE, 23 de outubro de 2010.

Prof. Dr. Carlos Augusto Carvalho de Vasconcelos

Editor Assistente