

Expressão das proteínas BCL-2 e BAX em tumores astrocíticos humanos

Primeira submissão em 08/12/05
Última submissão em 04/04/06
Aceito para publicação em 22/05/06
Publicado em 20/08/06

Expression of BCL-2 and BAX proteins in human astrocytic tumors

Mário Henrique Girão Faria¹; Régia Maria do Socorro Vidal do Patrocínio²;
Manoel Odorico de Moraes Filho³; Sílvia Helena Barem Rabenhorst⁴

unitermos	resumo
Astrocitomas	<p>Introdução: Os astrocitomas constituem os mais freqüentes tumores primários do sistema nervoso central (SNC). Admite-se que parte do crescimento tumoral seja resultante da inibição da morte celular programada: a apoptose. Tal fenômeno é basicamente regulado pelo equilíbrio entre moléculas antiapoptóticas (ex.: <i>B-cell lymphoma protein 2</i> [BCL-2]) e pró-apoptóticas (ex.: <i>BCL-2 associated protein X</i> [BAX]). Objetivo: O presente estudo objetivou avaliar a expressão de BCL-2 e BAX em tumores astrocíticos humanos. Material e métodos: Procedeu-se ao estudo imuno-histoquímico dessas proteínas utilizando-se o método da avidina-biotina-peroxidase em 55 astrocitomas (13 do grau I, 14 do II, sete do III e 21 do grau IV) e cinco amostras de tecido cerebral não-tumoral (grupo controle). Resultados: Os índices de positividade para BCL-2 e BAX demonstraram propensão ao acréscimo, de acordo com a gradação tumoral, com positividade geral de 43,26% e 24,67%, respectivamente. Essas proteínas não foram detectadas entre os espécimes não-tumorais. Os escores de marcação para BCL-2 apresentaram tendência ao aumento conforme a progressão histológica, enquanto os para BAX mostraram-se semelhantes nas diversas gradações. A análise conjunta dessas proteínas demonstrou significativa correlação com a gradação tumoral ($p < 0,05$; teste H), sendo mais evidente nos glioblastomas (grau IV) em comparação com os astrocitomas de baixo grau (I e II) ($p < 0,05$; teste U). A relação BCL-2/BAX indicou o aumento da orientação à sobrevivência celular dos tumores astrocíticos de acordo com a progressão maligna. Conclusões: Tais resultados indicam as alterações na expressão das proteínas BCL-2 e BAX como resultantes do processo tumorigênico nos astrocitomas, com o crescente predomínio do perfil antiapoptótico de acordo com a transformação maligna. Nesse sentido, sugere-se que a superexpressão de BCL-2 nos tumores astrocíticos possa ser indicativa de fenótipos mais agressivos, configurando ainda um potencial alvo terapêutico.</p>
BCL-2	
BAX	
Apoptose	
Imuno-histoquímica	

abstract key words

Background: Astrocytomas represent the most frequent primary tumors of the central nervous system. Admittedly, part of tumor growth is due to inhibition of programmed cell death: the apoptosis. This phenomenon is basically regulated by the balance between anti-apoptotic (e.g.: B-cell lymphoma protein 2 [BCL-2]) and pro-apoptotic (e.g.: BCL-2 associated protein X [BAX]) molecules. Objective: The present study aimed to evaluate the expression of BCL-2 and BAX in human astrocytic tumors of different histopathological grades. Material and Method: An immunohistochemical study of those proteins using the avidin-biotin-peroxidase method was performed in 55 astrocytomas (13 grade I, 14 grade II, seven grade III and 21 grade IV) and five samples of non-tumor brain tissue (control group). Results: The BCL-2 and BAX positive indices tended to increase according to astrocytomas graduation, with general positivity of 43.26% and 24.67%, respectively. These proteins were not detected among non-tumor specimens. BCL-2 labeling scores demonstrated a tendency to increase in accordance with histopathological advancing, while BAX values were similar in all graduations. The combined analyses of these proteins expression presents a significant correlation with tumor grade ($p < 0.05$; H test), which is more evident among glioblastomas (grade IV) in comparison with low-grade astrocytomas (I and II) ($p < 0.05$; U test). BCL-2/BAX ratio denoted increasing of cellular survival orientation of the astrocytic tumors according to malignant progression. Conclusions: The results indicate alterations in BCL-2 and BAX proteins expression as resultant of the tumorigenic process in astrocytomas, with increasing predominance of the anti-apoptotic profile in consonance of malignant transformation. In this way, we propose that BCL-2 overexpression in astrocytic tumors may be indicative of more aggressive phenotypes, furthermore configuring a potential therapeutic target.

Astrocytomas
BCL-2
BAX
Apoptosis
Immunohistochemistry

1. Médico; mestre em Farmacologia; pesquisador do Laboratório de Genética Molecular (LABGEM) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

2. Médica patologista pelo Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina (DPML/FM) da UFC; patologista do Laboratório Biomédica, Pesquisas e Serviços Ltda. (BIOPSE®) (Fortaleza-CE); membro da Sociedade Brasileira de Patologia (SBP).

3. Médico oncologista; doutor em Farmacologia; professor-adjunto do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da FMUFC; coordenador do Laboratório de Oncologia Experimental (LOE) da UFC.

4. Bióloga; doutora em Genética; professora-adjunta do DPML da Faculdade de Medicina da UFC; coordenadora do LABGEM/UFC.

Artigo baseado na dissertação de mestrado *Estudo imuno-histoquímico das alterações moleculares nos tumores astrocíticos: vias tumorigênicas e indicadores de resistência* apresentada na Faculdade de Medicina da UFC, em 2005. Trabalho selecionado para apresentação oral/premiação no XXV Congresso Brasileiro de Patologia, Natal-RN, 12 a 15 de outubro de 2005.

Introdução

Os astrocitomas constituem o principal tipo histológico entre os tumores primários do sistema nervoso central (SNC). 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⁽¹³⁾. Em grande parte, essa graduação resulta do reconhecimento de indicadores de anaplasia (atipia nuclear, pleomorfismo, atividade mitótica, hiperplasia endotelial e necrose) típicos de cada variante tumoral através da análise histológica rotineira por microscopia ótica. 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⁽¹⁷⁾.

A despeito da complexidade de tais desordens moleculares, elas parecem convergir para a promoção do crescimento tumoral através do estímulo à proliferação celular e/ou da inibição da morte celular, notadamente do mecanismo *programado*: a apoptose. O fato de os tumores astrocíticos humanos apresentarem, via de regra, baixos índices proliferativos em relação às outras neoplasias desperta o interesse pela determinação do *status* apoptótico nesses tumores⁽⁷⁾. Dessa forma, admite-se que o estudo dos reguladores da apoptose possa desvendar alguns aspectos enigmáticos acerca do processo de tumoração e da progressão dos astrocitomas, revelando ainda novas possibilidades terapêuticas.

Os eventos bioquímicos responsáveis pela apoptose dependem de uma família de proteases denominadas caspases, as quais são sintetizadas a partir de seus precursores inativos, ou procaspases. Uma vez ativadas, as caspases clivam (e assim ativam) outras procaspases, resultando na amplificação da cascata proteolítica. Esse mecanismo, além de destrutivo e autopropagado, é também irreversível⁽¹⁾.

A ativação das caspases pode ser deflagrada através de estímulos intra e/ou extracelulares. Células normais, como os linfócitos T *killer*, podem induzir a apoptose de células tumorais pela produção de FAS (também conhecido por APO-1, de *apoptosis inducing protein 1*), um ligante específico dos receptores CD95. A ligação FAS-CD95 ativa o receptor, que se acopla à proteína *FAS-associated death domain* (FADD), uma carreadora da procaspase iniciadora tipo 8. Essa interação permite a liberação das procaspases,

que, após sofrerem auto-ativação, desencadeiam a liberação de caspases executoras⁽²⁰⁾.

A caspase-8 também pode ativar proteínas pró-apoptóticas que promovem a formação de poros na membrana externa mitocondrial, denominada fenômeno *mitochondrial-outer-membrane permeabilization* (MOMP). Isso ativa a liberação do citocromo C no citoplasma, o qual, associado ao *apoptotic protease-activating factor 1* (APAF1) e à procaspase-9, forma o chamado apoptossomo. Na presença de trifosfato de adenosina (ATP), a procaspase-9 é ativada, levando à liberação em cadeia de caspases executoras, incluindo a caspase-3⁽²⁾.

As proteínas intracelulares que regulam diretamente o processo de ativação das caspases constituem a denominada família BCL-2^(5,6). Os membros dessa família podem ser divididos em moléculas pró-apoptóticas (BAX, BAK, BCL-x_s, BAD, BID, BIK, HRK, BIM e BOK) e antiapoptóticas (BCL-2, BCL-x_l, BCL-w, BFL-1, BRSAG-1, MCL-1, A1, E1B19K, LMW5-HL e EBV BHRF1). O equilíbrio relativo entre as diferentes proteínas, refletindo a formação de homodímeros e heterodímeros (neutralização), define a via de atuação sobre o mecanismo de morte celular programada⁽²⁵⁾.

A *BCL-2 associated protein X* (BAX), codificada pelo gene localizado na região cromossômica 19q13.3-q13.4, representa o protótipo das proteínas pró-apoptóticas. Na presença de um sinal apoptótico, a BAX é translocada do citoplasma para as proximidades das mitocôndrias, onde sofre ativação e modificação conformacional, aderindo à membrana mitocondrial externa. Pequenas unidades de proteínas BAX ativadas tendem ao agrupamento, formando oligômeros que acabam por penetrar a membrana mitocondrial externa. Essa integração possibilita a rápida liberação do citocromo c⁽³⁾.

Por outro lado, a *B-cell lymphoma protein 2* (BCL-2), codificada pelo gene localizado no cromossomo 18q21, favorece a sobrevivência celular. Ela impede o escape do citocromo c, possivelmente pela formação de heterodímeros com moléculas pró-apoptóticas como a proteína BAX⁽²⁾.

Nesse contexto, a presente investigação objetivou avaliar a expressão de genes reguladores da apoptose (BCL-2 e BAX) em tumores astrocíticos humanos de diferentes graduações histopatológicas (segundo a OMS).

Material e métodos

Casuística

Realizou-se levantamento dos tumores astrocíticos humanos fixados em formalina e incluídos em parafina pro-

venientes do arquivo do Laboratório Biomédica, Pesquisas e Serviços Ltda. (BIOPSE®), em Fortaleza, Ceará, referentes aos exames histopatológicos rotineiros realizados no período entre 1999 e 2003. Admitiram-se como critérios de inclusão a existência de mais de uma amostra (bloco) para cada caso, o bom estado de conservação dos blocos e a adequação da gradação histológica utilizada quando do diagnóstico em relação à padronizada pela OMS⁽¹³⁾. Dessa forma, 55 astrocitomas foram selecionados: 13 do grau I, 14 do II, sete do III e 21 do grau IV, configurando uma amostragem não-probabilística.

Como parâmetro de normalidade, cinco amostras de tecido cerebral não-tumoral fixadas em formalina e incluídas em parafina foram obtidas do material de rotina do Setor de Necropsia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (FMUFC). Foram selecionados casos em que a causa imediata da morte e a doença de base em nada remetessem à presença de neoplasia intra ou extracerebral.

A coleta das amostras foi autorizada pelos responsáveis de cada instituição, sendo o projeto de pesquisa aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do complexo hospitalar da UFC sob protocolo 32/04, dentro das normas que regulamentam a pesquisas em seres humanos segundo as Resoluções nºs 196/96 e 251/97 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde (CNS/MS).

Preparo das lâminas e dos cortes histológicos

Procedeu-se à manufatura de cortes histológicos a 5µm em lâminas tratadas com silano a 4%. Uma lâmina de cada bloco foi destinada à coloração por hematoxilina e eosina para reavaliação histopatológica e as restantes, para o estudo proteômico *in situ* (imuno-histoquímica).

Reação imuno-histoquímica

No presente ensaio foram estudadas as proteínas BCL-2 e BAX através dos anticorpos primários BCL2 (clone 124 – DakoCytomation®, EUA; diluição 1:80) e BAX (policlonal – DakoCytomation®, EUA; diluição 1:400). Utilizou-se o método imuno-histoquímico da estreptoavidina-biotina-peroxidase (SABP) modificado⁽¹¹⁾, constando de: a) passagem das lâminas em estufa pré-aquecida a 60°C por 120 minutos; b) desparafinização e hidratação em gradiente xileno/álcool/água; c) bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3%; d) recuperação antigênica em forno de microondas utilizando tampão ci-

trato 10mM pH = 6 (± 99°C) por 15 minutos; e) incubação das lâminas com o anticorpo primário (± 4°C) por 16 horas; f) detecção pelo sistema LSAB+ (DakoCytomation®, EUA); g) revelação pelo sistema DAB+ (DakoCytomation®, EUA), conforme orientações do fabricante; h) contracoloração com hematoxilina de Harrys a 40%; i) desidratação em gradiente água/álcool/xileno, montagem com lamínula e bálsamo do Canadá.

Análise imuno-histoquímica

A avaliação imuno-histoquímica, bem como a revisão histopatológica, foi realizada por três analistas experientes de forma independente. Os eventuais resultados conflitantes foram discutidos pelos mesmos em conjunto para definição consensual da análise.

Considerou-se *marcação* a coloração distinta em marrom (castanho) no citoplasma celular em contraposição ao azul/violeta da contracoloração (hematoxilina). A expressão dos marcadores foi quantificada através da contagem manual por microscopia ótica de pelo menos mil células astrocíticas, em diferentes campos representativos, utilizando magnificação de 400x. Procedeu-se então ao cálculo do *labelling index* (LI)⁽¹⁶⁾, segundo a fórmula:

$$LI (\%) = (\text{número de células imunopositivas}) / (\text{número total de células contadas}) \times 100$$

Admitiu-se como critério de *positividade* a presença dos antígenos pesquisados em no mínimo 5% das células analisadas (LI ≥ 5). Realizou-se também contagem semi-quantitativa da mesma amostragem celular, levando-se em consideração a *intensidade* de marcação. Foram atribuídos os valores 0 (ausente), 1+ (fraca), 2+ (moderada) e 3+ (intensa), de acordo com a intensidade observada. Tais valores configuram índices aos quais foram multiplicados os valores percentuais (%) da fração de células que representam a respectiva categoria de intensidade, sendo calculado o H-score⁽¹⁹⁾:

$$H\text{-score} = (\% 0) \times 0 + (\% 1+) \times 1 + (\% 2+) \times 2 + (\% 3+) \times 3.$$

Análise estatística

Os escores referentes à análise imuno-histoquímica foram tabulados utilizando-se o programa SPSS® 13.0. Os dados foram comparados através de abordagens não-paramétricas (teste de Shapiro-Wilk, teste H de Kruskal-Wallis e teste U de Mann-Whitney), sendo os resultados expressos como média ± 2 desvios padrão da média (DPM). Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.

Resultados

Exemplos de reações imuno-histoquímicas para BCL-2 e BAX estão ilustrados na **Figura 1** e a **Tabela** apresenta detalhadamente os resultados obtidos. O percentual de casos que demonstraram imunoexpressão da proteína BCL-2 aumentou conforme a malignidade dos tumores astrocíticos (23,07% no grau I; 35,71% no II; 42,86% no III; 71,43% no IV). A expressão da proteína BAX mostrou semelhante tendência (15,38%; 7,14%; 28,57%; 47,62%), apesar da menor positividade verificada entre os astrocitomas de grau II. A positividade para BCL-2 e BAX na totalidade dos tumores astrocíticos investigados foi de 43,26% e 24,67%, respectivamente, sendo a porcentagem de casos imunopositivos para BCL-2 superior à dos imunopositivos para BAX em todas as gradações tumorais. Tais proteínas não foram evidenciadas entre as amostras não-tumorais pesquisadas (**Figura 2**).

Observou-se propensão ao acréscimo dos índices de marcação para BCL-2 (LI [4,3; 6,57; 8,71; 16,85] e H [10,84; 14,42; 18,85; 27,85]), de acordo com a gradação histopatológica dos tumores astrocíticos, enquanto os valores para BAX (LI [5; 0,57; 9,28; 9,38] e H [11,53; 0,57; 17,14; 11,66]) demonstraram escores semelhantes nas diferentes gradações, exceto pelos menores índices novamente verificados para os tumores de grau II (**Figura 3**).

As marcações para BCL-2 (LI) e BAX (LI) manifestaram correlação significativa com a gradação dos astrocitomas

($p < 0,05$; teste H de Kruskal-Wallis), sendo mais freqüente a detecção dessas moléculas nos tumores de grau IV em comparação com os de baixo grau (I e II) ($p < 0,05$; teste U de Mann-Whitney). O balanço qualiquantitativo entre os escores de marcação verificados para BCL-2 (estímulo antiapoptótico) e BAX (estímulo pró-apoptótico) revelou tendência crescente à sobrevida celular, de acordo com a progressão maligna dos tumores astrocíticos (**Figura 4**).

Discussão

No presente estudo, tanto a porcentagem de casos positivos quanto os escores médios de marcação (LI e H) para a proteína antiapoptótica BCL-2 demonstraram tendência de aumento, segundo a gradação dos tumores astrocíticos (Figuras 2 e 3), indicando a superexpressão dessa proteína como um evento freqüente nos astrocitomas e diretamente proporcional ao grau de malignidade tumoral. Fels *et al.*⁽⁹⁾ haviam detectado propensão similar quanto à positividade para BCL-2 nos tumores astrocíticos de alto grau (48% no grau III; 51% no IV), ao passo que Ellison *et al.*⁽⁸⁾ descreveram inclinação oposta (44% no grau II; 42% no III; 28% no IV). Recentemente, Strik *et al.*⁽²²⁾ e Kraus *et al.*⁽¹⁵⁾ confirmaram a tendência de maior positividade entre os astrocitomas grau IV (94,6% e 60,25%, respectivamente), reforçando o perfil aqui reportado. Possíveis comparações semiquantitativas acerca da expressão de BCL-2 em tumores astrocíticos foram impossibilitadas pela inexistência de estudos anteriores

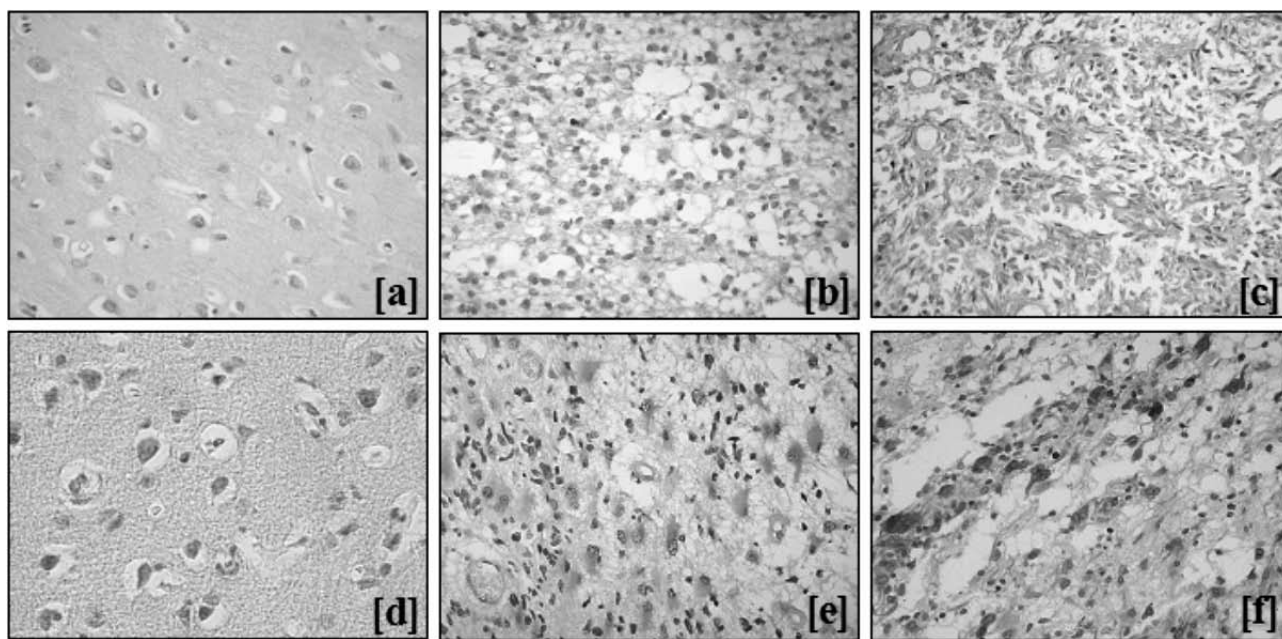


Figura 1 – Expressão das proteínas BAX (a, b, c) e BCL-2 (d, e, f) detectadas por imuno-histoquímica (400x). [a] Córtex cerebral não-tumoral: ausência de marcação; [b] astrocitoma grau I (OMS): marcação moderada; [c] astrocitoma grau IV (OMS): marcação intensa; [d] córtex cerebral não-tumoral: ausência de marcação; [e] astrocitoma grau III (OMS): marcação moderada, predominante em células gemistocíticas; [f] astrocitoma grau I (OMS): marcação intensa

Tabela **Histopatologia, epidemiologia geral e achados imuno-histoquímicos referentes aos casos avaliados**

Caso	Histopatologia		Epidemiologia		Marcadores: apoptose					
					BCL-2			BAX		
	Grau (OMS)	Subtipo	Idade	Sexo	H-score	LI	Padrão	H-score	LI	Padrão
NT01	NT	-	48	M	0	0	-	0	0	-
NT02	NT	-	14	M	0	0	-	0	0	-
NT03	NT	-	55	F	0	0	-	0	0	-
NT04	NT	-	15	F	0	0	-	0	0	-
NT05	NT	-	57	F	0	0	-	0	0	-
T01	I	Pilocítico	10	M	3	3	F	3	3	F
T02	I	Pilocítico	19	M	70	25	D	0	0	-
T03	I	Pilocítico	34	F	5	5	D	2	2	F
T04	I	Pilocítico	6	M	3	3	MF	0	0	-
T05	I	Pilocítico	17	F	60	20	MF	0	0	-
T06	I	Pilocítico	4	F	0	0	-	0	0	-
T07	I	Pilocítico	16	M	0	0	-	0	0	-
T08	I	Pilocítico	4	F	0	0	-	0	0	-
T09	I	Pilocítico	14	M	0	0	-	0	0	-
T10	I	Pilocítico	3	M	0	0	-	0	0	-
T11	I	Pilocítico	-	F	0	0	-	70	25	D
T12	I	Pilocítico	42	M	0	0	-	0	0	-
T13	I	Pilocítico	13	F	0	0	-	75	35	D
T14	II	Fibrilar	56	M	3	3	D	0	0	-
T15	II	Gemistocítico	34	F	8	4	MF	0	0	-
T16	II	Fibrilar	23	M	6	2	MF	0	0	-
T17	II	Fibrilar	36	M	75	30	MF	0	0	-
T18	II	Fibrilar	47	M	28	10	D	8	8	D
T19	II	Fibrilar	4	M	25	15	MF	0	0	-
T20	II	Fibrilar	2	M	22	8	D	0	0	-
T21	II	Fibrilar	37	F	35	20	MF	0	0	-
T22	II	Fibrilar	33	M	0	0	-	0	0	-
T23	II	Fibrilar	67	M	0	0	-	0	0	-
T24	II	Fibrilar	23	F	0	0	-	0	0	-
T25	II	Fibrilar	48	M	0	0	-	0	0	-
T26	II	Fibrilar	43	M	0	0	-	0	0	-
T27	II	Fibrilar	28	F	0	0	-	0	0	-
T28	III	Anaplásico	71	M	11	8	D	0	0	-
T29	III	Anaplásico	56	M	30	15	D	0	0	-
T30	III	Anaplásico	40	M	8	4	D	0	0	-
T31	III	Anaplásico	62	F	8	4	D	90	45	D
T32	III	Anaplásico	28	F	75	30	D	0	0	-

Cont. →

→ Cont.

T33	III	Anaplásico	22	M	0	0	-	0	0	-
T34	III	Anaplásico	27	M	0	0	-	30	20	D
T35	IV	Glioblastoma	5	F	13	10	D	0	0	-
T36	IV	Glioblastoma	57	M	150	80	F	20	15	MF
T37	IV	Glioblastoma	43	F	11	8	MF	0	0	-
T38	IV	Glioblastoma	62	M	5	5	D	0	0	-
T39	IV	Glioblastoma	32	M	0	0	-	30	20	MF
T40	IV	Glioblastoma	50	M	8	8	MF	15	15	MF
T41	IV	Glioblastoma	-	F	110	60	D	0	0	-
T42	IV	Glioblastoma	34	M	40	25	F	0	0	-
T43	IV	Glioblastoma	54	M	0	0	-	13	10	F
T44	IV	Glioblastoma	81	F	15	15	D	0	0	-
T45	IV	Glioblastoma	72	F	40	25	D	30	25	D
T46	IV	Glioblastoma	44	M	40	30	D	30	20	D
T47	IV	Glioblastoma	62	F	0	0	-	15	15	MF
T48	IV	Glioblastoma	43	M	0	0	-	2	2	D
T49	IV	Glioblastoma	55	M	10	10	D	0	0	-
T50	IV	Glioblastoma	53	M	3	3	D	0	0	-
T51	IV	Glioblastoma	50	M	50	30	D	40	30	D
T52	IV	Glioblastoma	51	F	20	15	D	35	30	MF
T53	IV	Glioblastoma	65	M	0	0	-	15	15	MF
T54	IV	Glioblastoma	55	M	65	25	D	0	0	-
T55	IV	Glioblastoma	55	M	5	5	D	0	0	-

NT: não-tumoral; T: tumoral; idade: em anos completos; M: masculino; F: feminino; F: focal; MF: multifocal; D: difuso; -: ignorado/não procede.

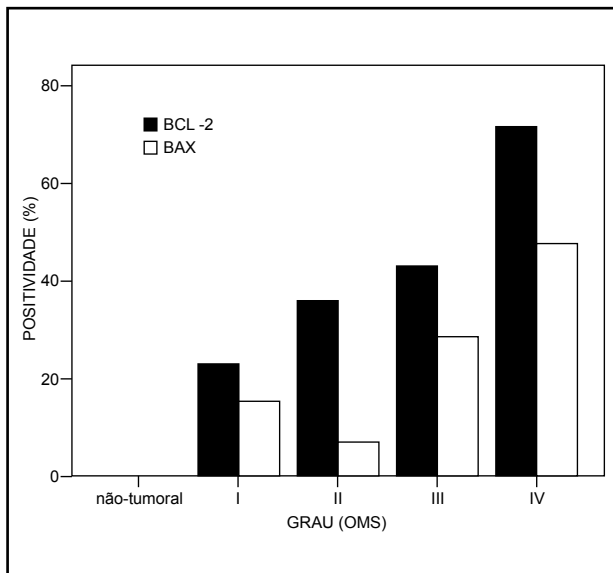


Figura 2 – Percentuais de positividade imuno-histoquímica para as proteínas BCL-2 e BAX segundo a classificação histológica dos casos avaliados

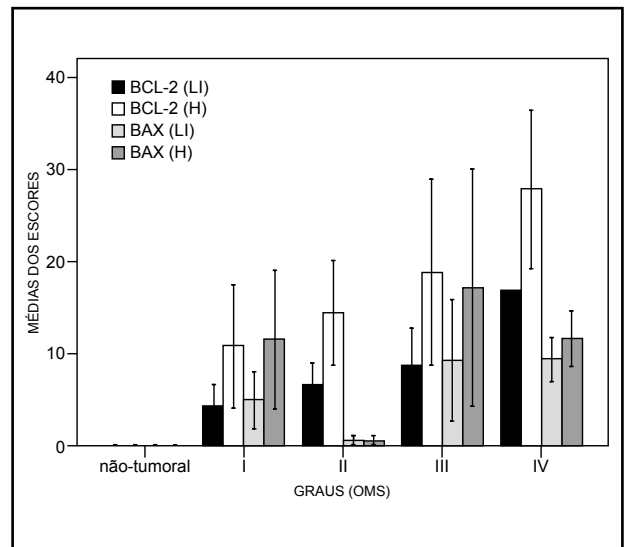


Figura 3 – Médias dos escores atribuídos à expressão das proteínas BCL-2 e BAX (LI e H) detectada por imuno-histoquímica segundo a classificação histológica dos casos avaliados. LI: labelling index; H: H-score

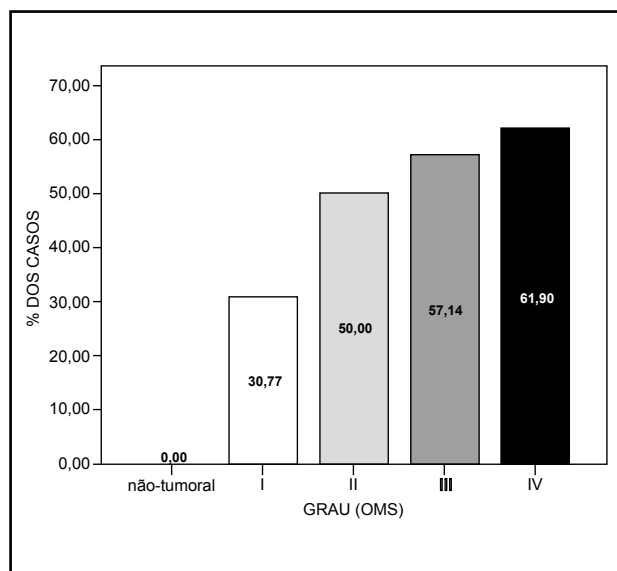


Figura 4 – Distribuição percentual das diferentes classificações histológicas segundo a tendência à sobrevida estimada pelo equilíbrio entre as expressões das proteínas BCL-2 e BAX detectadas por imuno-histoquímica

que apresentassem escores de marcação compatíveis com os aqui realizados, reafirmando o ineditismo da corrente investigação.

Com relação à expressão da proteína pró-apoptótica BAX, demonstraram-se propensão ao acréscimo na positividade e relativa constância entre as médias de marcação (LI e H), conforme a graduação dos tumores astrocíticos, excetuando-se a relativa redução verificada em todos os valores referentes aos astrocitomas grau II (Figuras 2 e 3). Tais resultados confirmam a superexpressão de BAX como decorrente do processo de tumoração nos astrocitomas, sendo tal fenômeno cada vez mais freqüente conforme a malignidade desses tumores. Quanto à intrigante redução da marcação para BAX nos tumores de grau II, admite-se que particularidades referentes à histogênese dessa classe tumoral possam provocar variações na expressão de moléculas relacionadas à apoptose⁽¹⁰⁾, consolidando as diferenças entre os tumores do grau I estudados (astrocitomas pilocíticos) e os astrocitomas grau II, esses últimos sabidamente propensos à progressão para fenótipos mais malignos⁽¹³⁾. Todavia essas variações podem ser mais bem compreendidas quando avaliadas ante o equilíbrio entre as tendências pró e antiapoptótica⁽²⁵⁾. Os escassos estudos até então publicados acerca da expressão imuno-histoquímica de BAX nos tumores astrocíticos relatam apenas a alta freqüência da detecção de BAX nos glioblastomas (78%⁽²²⁾,

94%⁽⁴⁾, 98%⁽¹⁴⁾), diferentemente da moderada positividade reportada no presente estudo (47,62%).

A despeito da ausência de significância estatística verificada entre os índices de marcação (LI e H) para BCL-2 e BAX na análise seqüencial (teste U) das diferentes graduações dos astrocitomas, o exame do conjunto dos valores (teste H) relativos à fração de células positivas (LI) para essas proteínas demonstrou correlação significativa com o grau histopatológico. Tal distinção foi reforçada pela expressiva superioridade dos escores para BCL-2 e BAX nos tumores de grau IV (glioblastomas) em relação aos de baixo grau (I e II) (teste U). Diante do exposto, notabilizou-se o aumento paralelo na detecção das proteínas BAX e BCL-2, conforme a graduação dos astrocitomas (notadamente entre os de baixo e alto graus), sugerindo mecanismos de co-regulação entre a expressão dessas proteínas durante a progressão maligna dos tumores astrocíticos⁽¹⁸⁾.

Além disso, através da comparação quantitativa entre os índices de marcação (LI) das proteínas BCL-2 e BAX, foi demonstrada crescente orientação à sobrevida celular consoante a progressão dos tumores astrocíticos (Figura 4). Acredita-se que essa diminuição gradual do estímulo apoptótico, associada ao pressuposto aumento progressivo do incentivo proliferativo, resulte na promoção cada vez maior das células mais anaplásicas (mais alteradas geneticamente), contribuindo para a evolução do fenótipo maligno dos astrocitomas⁽²³⁾. Apesar disso, nenhuma correlação prognóstica categórica foi detectada a partir da expressão das proteínas BCL-2 e BAX nos tumores astrocíticos até este momento^(9, 10, 21, 22).

Por fim, a constatação do aumento na expressão da proteína antiapoptótica BCL-2 conforme a progressão dos tumores astrocíticos, resultando em crescente tendência à sobrevida celular, abre espaço para abordagens que promovam o bloqueio transcricional dessa proteína e, assim, estimulem o mecanismo apoptótico. Neste sentido, Zhu *et al.*⁽²⁴⁾ reportaram considerável inibição do crescimento tumoral, completa perda do potencial tumoral e significativo incremento da sensibilidade à cisplatina em culturas de astrocitomas malignos humanos tratados com oligonucleotídeos *antisense* para BCL-2. Jiang *et al.*⁽¹²⁾ obtiveram semelhantes resultados com o uso de oligonucleotídeos *antisense* para BCL-2/BCL-x_l (biespecíficos) nas linhagens de glioblastomas U87 e NS008.

Referências

1. ALBERTS, B. et al. *Molecular biology of the cell*. 4. ed. New York: Garland Science, 2002.
2. AMARANTE-MENDES, G. P.; GREEN, D. R. The regulation of apoptotic cell death. *Braz J Med Biol Res*, v. 32, p. 1053-61, 1999.
3. ANTONSSON, B.; MARTINOU, J.-C. The BCL-2 protein family. *Exp Cell Res*, v. 256, p. 50-7, 2000.
4. CARTRON, P. F. et al. Nonredundant role of BAX and BAK in Bid-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol*, v. 23, n. 13, p. 4701-12, 2003.
5. COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, S. L. (eds.). Neoplasia. In: ROBBINS. *Patologia estrutural e funcional*. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. Cap. 8, p. 233-95.
6. DESAGHER, S.; MARTINOU, J.-C. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol*, v. 10, p. 369-77, 2000.
7. ELLISON, D. et al. *Neuropathology: a reference text of CNS pathology*. 2. ed. Los Angeles: Mosby, 2004.
8. ELLISON, D. W. et al. Apoptosis in cerebral astrocytic tumours and its relationship to expression of the Bcl-2 and p53 proteins. *Neuropathol Appl Neurobiol*, v. 21, n. 4, p. 352-61, 1995.
9. FELS, C. et al. BCL-2 expression in higher-grade human glioma: a clinical and experimental study. *J Neuro-Oncol*, v. 48, n. 3, p. 207-16, 2000.
10. HARA, A. et al. Expression of Bax and BCL-2 proteins, regulators of programmed cell death, in human brain tumors. *Neurol Res*, v. 19, n. 6, p. 623-8, 1997.
11. HSU, S. M.; RAINE, L.; FANGER, H. Use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem*, v. 29, p. 577-80, 1981.
12. JIANG, Z.; ZHENG, X.; RICH, K. M. Down-regulation of BCL-2 and BCL-xL expression with bispecific antisense treatment in glioblastoma cell lines induce cell death. *J Neurochem*, v. 84, n. 2, p. 273-81, 2003.
13. KLEIHUES, P. et al. The WHO classification of tumours of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol*, v. 61, n. 3, p. 215-25, 2002.
14. KRAJEWSKI, S. et al. Immunohistochemical analysis of BCL-2, BCL-X, MCL-1 and BAX in tumors of central and peripheral nervous system origin. *Am J Pathol*, v. 150, n. 3, p. 805-14, 1997.
15. KRAUS, J. A. et al. TP53 gene mutations, nuclear p53 accumulation, expression of Waf/p21, Bcl-2, and CD95 (APO-1/Fas) proteins are not prognostic factors in de novo glioblastoma multiforme. *J Neurooncol*, v. 52, n. 3, p. 263-72, 2001.
16. LANDBERG, G.; ROSS, G. Proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 antigen expression in human haematopoietic cells during growth stimulation and differentiation. *Cell Prolif*, v. 26, p. 427-37, 1993.
17. LANTOS, P. L.; ROSENBLUM, M. K.; KLEIHUES, P. Tumours of the nervous system. In: GRAHAN, D. I.; LANTOS, P. L. (eds.). *Greenfield's Neuropathology*. 7. ed. Glasgow: Arnold Publishers, 2002. vol. 2.
18. MARTIN, S. et al. Expression of BCL-2, BAX and BCL-xL in human gliomas: a re-appraisal. *J Neurooncol*, v. 52, n. 2, p. 129-39, 2001.
19. McCARTY Jr., K. S. et al. Correlation of biochemical and immunohistochemical methods using monoclonal antireceptor antibodies. *Arch Pathol Lab Med*, v. 109, n. 8, p. 716-21, 1985.
20. PELENGARIS, S.; KHAN, M.; EVAN, G. c-Myc: more than just a matter of life and death. *Nat Rev Cancer*, v. 2, n. 10, p. 764-76, 2002.
21. RIEGER, L. et al. BCL-2 family protein expression in human malignant glioma: a clinical-pathological correlative study. *J Neurol Sci*, v. 155, n. 1, p. 69-75, 1998.
22. STRIK, H. et al. BCL-2 family protein expression in initial and recurrent glioblastomas: modulation by radiochemotherapy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, v. 67, n. 6, p. 763-8, 1999.
23. YU, S. et al. Relationship of BCL-2 gene expression with cell proliferation and apoptosis in human gliomas. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*, v. 29, n. 1, p. 12-5, 2000.
24. ZHU, C. J. et al. Expression of antisense BCL-2 cDNA abolishes tumorigenicity and enhances chemosensitivity of human malignant glioma cells. *J Neurosci Res*, v. 74, n. 1, p. 60-6, 2003.
25. ZÖRNIG, M. et al. Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta*, v. 1551, p. F1-F37, 2001.

Endereço para correspondência

Mário Henrique Cirão Faria
 LABGEM/DPML/UFC
 Av. Benjamim Brasil, 1.080 - 4/102
 CEP 60712-000 - Fortaleza-CE
 Tel.: (85) 3467-0457
 Fax: (85) 3267-3840
 e-mail: mariofaria@doctor.com