

UNIVERSIDADE DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**ESTUDO DA ATIVIDADE GLIAL EM FUNÇÃO DO CONTEÚDO DE S100B,
GFAP E GLUTAMINA SINTETASE EM ASTROCITOMAS HUMANOS.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
RODRIGO MACIEL DE FREITAS

ORIENTADOR: PROF. CARLOS ALBERTO GONÇALVES
CO-ORIENTADORA: PROF^a. CARMEM GOTTFRIED

PORTO ALEGRE

2006

Quem conhece os outros é inteligente,
Quem conhece a si mesmo é iluminado.
Quem vence os outros é forte,
Quem vence a si mesmo é invencível.

Tao Te King, 33DC.

Agradecimentos

Aos Professores Carlos Alberto e Carmem, pela amizade e carinho durante todo o tempo em que convivemos. Muito obrigado!

Aos meus Professores, colegas e amigos Dr. Nelson Ferreira e Dr. Marcelo Ferreira, pessoas que me ensinaram que exercer medicina de uma forma ética e responsável era o caminho a ser tomado, além de terem me ensinado o ofício da neurocirurgia. Não existem palavras que possam mensurar a minha gratidão!

À Lúcia, minha conterrânea e amiga, que pacientemente recebeu todas as amostras, mesmo as de última hora. Colega a amiga sempre solícita!

À Fran, grande amiga e colega, primeira pessoa a me receber no Laboratório.

À Patrícia e Ana Carolina, grandes amigas e colaboradoras.

À Marina, que solícitamente ajudou na maior parte das dosagens de forma absolutamente gentil.

Aos demais colegas e amigos do Laboratório 33, todos importantes colaboradores deste trabalho.

À Professora Matilde, pela amizade e apoio.

À Andréia, secretária do PPG em Neurociências, pela atenção e disponibilidade em minhas solicitações.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre, instituições que tornaram esta minha conquista possível.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES).

Aos pacientes e seus familiares que participaram voluntariamente deste estudo o meu mais sincero voto de agradecimento e respeito.

À minha família, que torna esta e todas as minhas outras conquistas importantes.

Muito obrigado!

Resumo

Gliomas constituem um grupo heterogêneo de tumores cerebrais. Eles podem ser divididos em duas principais categorias: astrocíticos e oligodendrogliais. Os astrocíticos, objetos deste estudo, são classificados patologicamente em quatro subtipos baseado na presença ou ausência de atipia nuclear, mitose, neovascularização e necrose. Esta classificação é útil para definir tratamento e prognóstico. A origem glial é comumente confirmada pela detecção imunistoquímica para GFAP. Neste trabalho nós investigamos o imunoc conteúdo das proteínas marcadoras astrocíticas GFAP e S100B por ELISA e a atividade da enzima glutamina sintetase (GS) em tumores gliais e tecidos peritumorais de sete pacientes submetidos à ressecção cirúrgica. Os resultados demonstram elevados níveis de S100B em tecidos peritumorais não correlacionados com o grau de malignidade do tumor. Esta elevação poderia contribuir para manifestações convulsivas observadas em alguns pacientes. Em contraste com os dados obtidos pela imunistoquímica para filamentos gliais, encontrou-se uma aparente correlação positiva entre o conteúdo de GFAP e o grau de malignidade do glioma. É possível que este aumento no conteúdo de GFAP seja referente a GFAP total (frações solúvel e insolúvel), em contraste com o conteúdo insolúvel (fibrilar e granular) detectado pela imunistoquímica. A alta taxa GFAP/S100B (GFAP elevada/S100B reduzida) está de acordo com a sua elevada atividade mitótica, que pela sua vez poderia ser inibida pela S100B. Além disso, houve uma correlação positiva entre a atividade da GS e o grau de malignidade do tumor.

Índice

Dedicatória	Página II
Agradecimentos	Página II
Resumo	Página IV
1. Introdução	Página 6
2. Objetivos	Página 13
3. Manuscrito	Página 14
4. Discussão	Página 40
5. Referências Bibliográficas	Página 44

1. INTRODUÇÃO

1.1. Tumores cerebrais

Os tumores cerebrais são uma das causas mais comuns de morbidade e mortalidade precoce em humanos. Aproximadamente vinte mil novos casos de tumores cerebrais são diagnosticados a cada ano nos EUA (LANDIS et al., 1999). Neoplasia primária do sistema nervoso central é a causa de morte em aproximadamente 13 mil pessoas por ano apenas nos Estados Unidos (POSNER, 1995). Inúmeras estatísticas têm mostrado um significativo aumento na incidência de gliomas malignos nos últimos anos (WERNER et al., 1995; LEGLER et al., 1999).

Os gliomas malignos são tumores muito agressivos, usualmente associados com um rápido desfecho fatal, porém se tem reconhecido, mais recentemente, que mesmo os gliomas de baixo grau apresentam um prognóstico reservado. Contudo, existe uma tendência otimista sobre este assunto em função das tecnologias que atualmente contribuem para a detecção, avaliação e caracterização de tumores. Esta esperança de que o prognóstico destes tumores possa melhorar está baseado, pelo menos em parte, nas novas técnicas de neuroimagem, com a tomografia computadorizada e a ressonância nuclear magnética, e no desenvolvimento de marcadores biológicos, que contribuem para o diagnóstico da doença em estágio inicial, enquanto os tumores ainda estão pequenos e não sofreram malignização. O desenvolvimento de técnicas terapêuticas de sucesso para estas lesões requer esforços continuados de clínicos e pesquisadores.

Gliomas constituem um grupo heterogêneo de tumores cerebrais. Quanto ao tipo de célula, eles podem ser divididos em duas principais categorias: astrocíticos e

oligodendrogliais. Estes tumores exibem características biológicas únicas. A sua origem histológica precisa ainda permanece obscura. Em geral eles apresentam uma alta taxa de infiltração e crescimento invasivo no cérebro, porém raramente metastatizam para fora do sistema nervoso central. As células dos gliomas comprometem o mecanismo imunocelular de defesa. Estas células também são altamente resistentes à indução de morte celular programada (apoptose), tornando inútil todas as terapias atualmente usadas no tratamento do câncer. Os gliomas podem ser tanto de alto quanto de baixo grau de malignidade. Os de alto grau podem surgir sozinhos (por exemplo, glioblastoma primário) ou podem ser provenientes de um tumor de baixo grau preexistente (glioblastoma secundário). Desta forma, levando em conta o grau de malignidade, os tumores gliais são divididos patologicamente em quatro graus, de acordo com a área de maior malignidade encontrada, baseado no sistema da Organização Mundial de Saúde, que leva em conta a presença de atipia nuclear, mitose, proliferação microvascular e necrose (KLEIHUES et al., 2002). A classificação patológica precisa é essencial porque ela define o tratamento e prognóstico dos tumores. O mais comum dos tumores gliais de grau I de malignidade, o astrocitoma pilocítico, é uma lesão benigna e essencialmente um tumor que surge na infância e adolescência. Já os gliomas grau II, III e IV têm crescimento difuso, são infiltrativos e apresentam estágios distintos de malignização dentro desta família de tumores (gliomas), sendo o glioblastoma (grau IV) o mais maligno e a variante mais comum. Astrocitomas grau I são tumores circunscritos, com crescimento lento e com baixa densidade celular. Astrocitomas grau II são tumores bem diferenciados com um padrão de crescimento infiltrativo difuso. Astrocitomas anaplásicos (grau III) apresentam maior densidade celular e aumento de atipia nuclear e de atividade mitótica. Glioblastomas (grau IV) são

caracterizados por todos os achados descritos acima, além de proliferação vascular proeminente ou áreas de necrose (KLEIHUES et al., 2002).

As causas da origem da maioria dos gliomas ainda permanecem obscuras. Para a maioria dos gliomas os fatores genéticos não parecem ter importância. Similarmente, nenhum fator ambiental foi relacionado ao desenvolvimento de gliomas, exceto irradiação craniana, que parece aumentar a sua incidência (DEANGELIS, 2001).

2. Marcadores bioquímicos de tumores gliais

Em função da diversidade de gliomas e dos diferentes graus de malignidade encontrados, é necessário que se intensifique os estudos com proteínas que possam servir de marcadores bioquímicos para os diversos tipos de tumores gliais.

Glutamina sintetase

A Glutamina sintetase (GS) é uma enzima que medeia a conversão de glutamato em glutamina no citoplasma de astrócitos. Apesar da GS ser detectada em vários órgãos do corpo, no sistema nervoso central ela tem expressão específica nos astrócitos. Isto tem incitado seu uso como um marcador astrocítico e também como um indicador de atividade celular.

McCormick e colaboradores (1990) determinaram a atividade da GS em 224 tumores intracranianos primários e secundários e em 18 biópsias, nas quais não foi detectado tumor, mas havia gliose reativa significativa. Entre os tumores avaliados, os maiores níveis de GS foram encontrados entre os astrocitomas e oligodendrogliomas e não houve diferença significativa entre estes dois grupos. Entretanto, a atividade da GS foi duas vezes maior no

tecido que sofreu gliose reativa. Houve considerável similaridade entre os níveis de GS nos outros grupos de tumores estudados (ependimomas, meningiomas, neurinomas, carcinomas secundários e adenomas pituitários). A atividade da GS para diferentes graduações histológicas de astrocitomas também foi detectada em cada um dos grupos e os valores encontrados foram semelhantes, não apresentando diferenças significativas. Em contraste com os resultados descritos acima, Pilkington e Lantos (1982) demonstraram por imunocitoquímica, que os três oligodendrogliomas da série de neoplasias intracranianas foram negativos para GS. Eles ainda verificaram, neste mesmo estudo, uma diferença entre os níveis de GS (imunoconteúdo) em tumores astrocíticos e o grau de malignidade. Houve uma redução no imunoconteúdo com o aumento do grau de malignidade. Isto corrobora com o que foi encontrado no estudo de Akimoto (1993). Em tumores cerebrais primários, a imunorreatividade para GS apenas foi detectada nas células de astrocitomas e foi observada uma correlação inversa entre a malignidade histológica e a expressão de GS. Isto sugere que a expressão de GS em astrocitomas pode não apenas ser útil como um marcador diagnóstico para estes tumores, mas também na avaliação do seu potencial de malignidade.

Proteína ácida fibrilar glial

A proteína ácida fibrilar glial (GFAP) compõe os filamentos intermediários dos astrócitos, sendo portanto uma das proteínas marcadoras destas células. Pilkington e Lantos (1982) estudaram tecidos de tumores cerebrais obtidos de 17 casos de biópsias e 3 casos de autópsias. Todos os tumores astrocíticos foram positivos para GFAP e houve uma redução no número de células imunorreativas com o aumento do grau de malignidade.

McLendon e colaboradores (1986), avaliaram 71 tumores cerebrais, que consistiam de 18 glioblastomas multiformes, 4 astrocitomas anaplásicos, 7 astrocitomas, 6

oligodendrogliomas, 2 endimomas, 5 gangliogliomas, 4 schwannomas, 4 meningiomas, 2 papilomas de plexo coróide, 2 cordomas, 1 craniofaringioma, 2 meduloblastoma e 14 carcinomas metastáticos. O estudo imunoistoquímico localizou imunorreatividade para GFAP em 28 dos 29 astrocitomas e em todos os oligodendrogliomas, endimomas e gangliogliomas. GFAP não foi detectada nos demais tipos de tumores avaliados. Nos tumores astrocíticos, o número de células imunorreativas para GFAP está correlacionado com a queda da anaplasia celular.

Chen e Zhang (1989) estudaram 174 casos de tumores cerebrais, utilizando anticorpos monoclonais para demonstrar por imunoistoquímica, a GFAP nas preparações do tecido tumoral cerebral. Todos os tumores astrocíticos estudados (78 casos) foram GFAP imunorreativos (GFAP-ir). A intensidade da imunorreatividade e o número de células reativas variaram entre os tumores astrocíticos. Com o aumento da anaplasia menos células positivas foram identificadas e menos células foram intensamente coradas. Enquanto 20-40% das células foram GFAP-ir nos astrocitomas anaplásicos, alguns astrocitomas altamente anaplásicos tiveram poucas células marcadas. Já nos oligodendrogliomas, a GFAP-ir foi observada em 5-20% das células tumorais em 11 dos 13 casos examinados. Cinco dos 30 endimomas mostraram uma reação para anticorpos anti-GFAP. Em 4 dos 7 meduloblastomas alguns astrócitos apresentaram GFAP-ir, enquanto a maioria das células tumorais foi inteiramente negativa. A imunorreatividade foi negativa em todas as neoplasias metastáticas e em todos os outros tumores cerebrais primários examinados: meningioma, schwannoma, linfoma primário, hemangiopericitoma, adenoma pituitário e germinoma.

Muitos outros autores (DUFFY et al., 1980; TASCOS et al., 1982; SCHIFFER et al., 1983), também observaram uma relação inversa entre GFAP-IR e o grau de malignidade

nos tumores astrocíticos. Com o aumento na anaplasia nos astrocitomas, menos células reativas para GFAP são observadas. Este fenômeno pode estar relacionado à baixa concentração de GFAP e talvez ao desarranjo dos filamentos gliais nos astrócitos mais malignos.

O papel da GFAP no desenvolvimento e progressão de tumores astrocíticos é um pouco controverso. Vários estudos *in vitro* têm sugerido uma correlação negativa entre os níveis da expressão de GFAP e a diferenciação e transformação de astrócitos. Em células de astrocitomas humanos a supressão da expressão da GFAP leva a uma redução da diferenciação celular e a perda da capacidade de estender processos em resposta a estímulos neuronais (WEINSTEIN et al., 1991). A restauração da expressão da GFAP reverte este fenômeno (CHEN and LIEM, 1994). Em outro estudo, Wilhelmsson e colaboradores (2003), demonstraram que a expressão da GFAP não contribuiu para o desenvolvimento ou progressão dos astrocitomas.

Proteína S100B

A S100B é uma proteína ligante de cálcio, expressa no sistema nervoso central, particularmente por astrócitos. Esta proteína pertence à família S100 envolvida na regulação de proliferação e morfologia celular (DONATO, 2003; VAN ELDIK & WAINWRIGHT, 2003). A S100B tem sido um suposto alvo para muitos alvos intracelulares, tanto no citoplasma (por ex. a GFAP) quanto no núcleo (por ex. a proteína supressora de tumor p53). Além de uma função intracelular, a S100B é secretada e exerce um efeito regulatório sobre células vizinhas: astrócitos, neurônios e microglia. O efeito extracelular da S100B observado em cultura de células depende de sua concentração, sendo neurotrófica em níveis nanomolares e apoptótica a níveis macromolares. Existem muitas evidências para sugerir que, a concentrações nanomolares, a S100B estimula a proliferação

glial, a sobrevivência neuronal e protege neurônios contra a excitotoxicidade induzida pelo glutamato (AHLENMEYER et al., 2000; KOGEL et al., 2004). A expressão da S100B, particularmente S100B extracelular, é usada como um parâmetro de ativação glial ou comprometimento em várias situações de injúria cerebral.

Superóxido dismutase

A superóxido dismutase (SOD) é uma metaloenzima responsável pela dismutação do radical superóxido a H_2O_2 e O_2 (JHONSON & GIULIVI 2005). Em mamíferos, foram identificados três diferentes tipos de SOD: SOD1 ou SODCuZn, presente no citoplasma; SOD2 ou SODMn, encontrada exclusivamente na mitocôndria e SOD3 ou SODEC, direcionada para o espaço extracelular (ZELCO et al., 2002). A sua atividade tem sido utilizada como um marcador de susceptibilidade e/ou dano ao estresse oxidativo.

Baseado nos resultados descritos acima é possível entender que os estudos com marcadores biológicos propiciam conhecimento detalhado das alterações em gliomas e também assumem um importante papel no entendimento dos diferentes tipos de câncer. Este enfoque possibilita novas oportunidades terapêuticas e um melhor estabelecimento do prognóstico.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi voltar a atenção para a atividade e expressão de algumas proteínas gliais e correlacionar estes achados com o grau de malignidade dos gliomas astrocíticos em humanos. Para este propósito, quatro marcadores bioquímicos foram utilizados: GS, GFAP, S100B (especificamente gliais) e SOD.

2.2. Objetivos Específicos

1. Determinar o imunoconteúdo de S100B e GFAP e avaliar a atividade da enzima GS em fragmentos de tumores intracranianos de origem glial e em tecido peritumoral;
2. Comparar o imunoconteúdo de S100B e de GFAP entre astrocitomas com diferentes graus de malignidade;
3. Medir a atividade da SOD em astrocitomas e tecido peritumoral.

3. PUBLICAÇÃO

Manuscrito submetido ao periódico *Chimica Clinica Acta* em março de 2006:
“Quantitative biochemical analysis of human gliomas and peritumoral tissues: a preliminary study on GFAP, S100B and glutamine synthetase”.

Quantitative biochemical analysis of human astrocytoma and peritumoral tissues: a preliminary study on GFAP, S100B and glutamine synthetase.

Rodrigo Freitas^{1,3}, Lucia MV Almeida², Marina C Leite², Patrícia Nardin, André Q Santos², Cristina Andreazza², Marcelo P Ferreira³, Carmem Gottfried² and Carlos-Alberto Gonçalves^{1,2}

¹ Programa de Pós-graduação em Neurociências and ² Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; ³ Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

Acknowledgments: Brazilian funds from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES).

Corresponding author: Carlos-Alberto Gonçalves

Departamento de Bioquímica, UFRGS

Ramiro Barcelos, 2600-Anexo

90.035-003, Porto Alegre, Brazil

Fax:+55-51-316 5535

casg@ufrgs.br

Key words: GFAP, glutamine synthetase, human glioma, S100B, SOD

Abstract

Background: Astrocytomas constitute a heterogeneous group of brain tumors graded pathologically in four main types, based on nuclear atypia, mitosis, neovascularization and necrosis. The astrocytic origin is commonly confirmed by immunohistochemistry for glial fibrillary acidic protein (GFAP). This classification is helpful for defining treatment and prognosis. *Methods:* In this study, we investigated the immunocontent of GFAP and S100B by ELISA, and glutamine synthetase (GS) activity in glial tumors and peritumoral tissues from 7 patients submitted to surgical resection. *Results:* We found elevated levels of S100B in peritumoral tissue not correlated with glioma grade. This elevation could contribute to convulsive manifestations observed in some patients. An apparent positive correlation was also observed between GFAP content and glioma grade, in contrast to the immunohistochemical data obtained for glial filaments. Moreover, we observed a positive correlation between GS activity and tumor malignancy. *Conclusions:* Our data possibly demonstrate total GFAP (soluble and insoluble fraction), rather than just the insoluble content (fibrillary and granular) detected by immunocytochemistry. The higher relative ratio GFAP/S100B (elevated GFAP/low S100B) in astrocytoma is in agreement with its high mitotic activity, since GFAP depolymerization is induced by phosphorylation during mitosis, which in turn could be inhibited by S100B. However, in face of the small number of subjects in this analysis, these findings should be considered preliminary.

Introduction

Glial fibrillary acid protein (GFAP) is the most widely used marker for astrocytes and astrocytic tumors. This protein is extremely useful for distinguishing these tumors from schwannomas, meningiomas, pituitary adenomas and metastatic tumors, which are negative for GFAP [1] and immunocytochemistry for GFAP is presently a routine cytopathological assay for characterization of astrocytomas.

Astrocytomas constitute a heterogeneous group of brain tumors and are graded pathologically into four main types, based on the presence nuclear atypia, mitosis, microvascular proliferation, and necrosis, according to the World of Health Organization. This classification is helpful to define treatment and prognosis [2]. In general, astrocytomas exhibit a highly infiltrative and invasive growth pattern, but rarely metastasize outside the central nervous system. These tumors are also highly resistant to the induction of apoptotic death.

Several *in vitro* studies have suggested a negative correlation between GFAP content and the dedifferentiation of astrocytes [3-5] and many high-grade gliomas appear to lose GFAP expression [6,7]. However, the loss of GFAP expression in high-grade gliomas is not associated with tumor progression [8].

Several other markers such as vimentine, PCNA, p21 and p53 [9,10] have been used for the immunohistochemical characterization of gliomas. However, in addition to GFAP, two astrocyte-specific proteins, S100B and glutamine synthetase, have been used for astrocytoma characterization as well as markers for glial reactivity in brain injury.

The S100B protein belongs to the S100 family of calcium binding proteins involved in cell growth and differentiation [11,12]. This protein is primarily expressed by astrocytes and secreted by these cells, having a neurotrophic effect on neighboring cells. Extracellular

S100B stimulates the proliferation of astrocytes and C6 glioma cells, increases survival of neurons and promotes neurite extension. On the other hand, high levels of S100B can induce apoptosis in astrocytes and neurons and high extracellular levels of S100B could be involved in the pathogenesis of degenerative diseases [13]. Serum S100B also has been used in the follow up of brain tumors diseases [14] and, importantly, most immunohistochemical characterizations of gliomas use anti-S100 antibody, which detects S100A1-6 from glial and non-glial origin, in addition to S100B [9]. In fact, significant modifications occur in the level of S100A1 protein expression (and, to a lesser extent, in S100A4 and S100B protein levels) in relation to increasing levels of glioma malignancy [15].

Glutamine synthetase (GS) has been proposed as an additional immunomarker for astrocytic tumors [16], since its enzymatic activity could be used to indicate cell activity in glial tumors [17,18]. GS, together with glutamate uptake, makes the astrocyte essential for glutamatergic transmission [19] and its activity is the main source of glutamine for tumor proliferation.

In this study, we investigated the immunocontent of GFAP and S100B, and GS activity in astrocytomas and peritumoral tissues from 7 patients submitted to surgical resection. We also measured the activity of superoxide dismutase (SOD), a key enzyme for superoxide clearance that (in contrast to the other analyzed parameters) is not astrocyte specific, since SOD activity could be a useful marker of oxidative sensitivity of glioma and peritumoral tissue [20].Material and methods

Tumor and peritumoral tissue samples. This study was approved by the ethical board at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil (Proc 05-109). Samples were obtained by surgical resection from previously untreated patients at the Neurosurgical Unit of the HCPA. Central mass tumors, corresponding to regions with contrast enhancement by preoperative computerized tomography (CT) or magnetic resonance

images (MRI), as well as peripheral fragments and macroscopically normal tissue from each patient were separated for histological and biochemical characterization. The glutamine synthetase assay was carried out immediately after resection. The remaining tissue was rapidly frozen and stored at -70°C for other biochemical analyses.

Histopathology. Glioma grading performed, according to the WHO classification, led to the diagnosis of 1 grade I (pilocytic astrocytoma), 2 grade II (astrocytoma), 1 grade III (anaplastic astrocytoma) and 3 grade IV (glioblastoma multiform) tumors. Patient profile, tumor size, location and diagnosis are indicated in Table 1.

ELISA for S100B and GFAP. Immunocontent of S100B was measured by ELISA, as described previously [21]. Briefly, 50 μL of brain homogenate (at a final protein concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) plus 50 μL of barbital buffer were incubated for 3 h on a microtiter plate previously coated with monoclonal anti-S100B (SH-B1, from Sigma). The plate was then incubated with peroxidase-conjugated anti-S100 (from DAKO) for 1 h and a color reaction with o-phenylenediamine was measured at 492 nm. The standard S100B curve ranged from 0.25 to 2.5 ng/mL. The ELISA for GFAP was carried out by coating the microtiter plate with 100 μL samples containing 100 ng of protein for 48 h at 4°C . Incubation with a polyclonal anti-GFAP from rabbit (DAKO) for 2 h was followed by incubation with a secondary antibody conjugated with peroxidase for 1h, at room temperature. A colorimetric reaction with o-phenylenediamine was measured at 492 nm. The standard human GFAP (from Calbiochem) curve ranged from 0.1 to 10 ng/mL. Antibody specificity was determined by western blotting. Samples were measured in triplicate and those with a coefficient of variation $> 5\%$ were repeated; the interassay

coefficient of variation in our sample was < 6 % and protein was measured by Lowry's method using bovine serum albumin as a standard.

Glutamine synthetase activity. The enzymatic assay was performed according to Petito et al. [22]. Homogenate (0.1 mL) was added to 0.2 mL of reaction mixture containing (in mM): 10 MgCl₂ ; 50 L-glutamate; 100 imidazole-HCl buffer (pH 7.4); 10 2-mercaptoethanol; 50 hydroxylamine-HCl; 10 ATP and incubated for 15 min at 37°C. The reaction was stopped by the addition of 0.8 mL of a solution containing (in mM): 370 ferric chloride; 670 HCl; 200 trichloroacetic acid. After centrifugation, the supernatant was measured at 530 nm and compared to the absorbance generated by standard quantities of γ -glutamylhydroxamate (from Sigma) treated with ferric chloride reagent.

SOD assay. SOD activity was carried out with the RANSOD kit (Randox, USA) [23]. This method is based on the formation of red formazan from the reaction of 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride (INT) and superoxide radical (produced in the incubation medium from xanthine oxidase reaction), which is assayed in a spectrophotometer at 505 nm. The inhibition of the chromogen produced is proportional to the activity of the SOD present in the sample. A 50% inhibition is defined as one unit of SOD and specific activity is expressed as units per mg protein.

Statistical analysis. Although this study involved a small number of samples an evaluation based on Kolmogorovi-Smirnov test suggested a parametric analysis of data. Data are presented as mean \pm standard error (Figures 1 and 3) and biochemical parameters in glioma and peritumoral tissues were analyzed by Student t test; or presented in individual values (Figures 2 and 4) for a linear correlation analysis with malignancy grade. The level of

significance was defined as $p < 0.05$ (two-tailed). All analysis was implemented with the SPSS 10.0 for Windows.

Results

Contents of GFAP and S100B in tumor and peritumoral tissue are shown in Fig 1, independent of histopathological classification. GFAP content (Fig 1A) was not different between glioma and peritumoral tissue, but a significant difference was found in the S100B content ($p < 0.05$) (Fig 1B). Moreover, when each glioma was compared with its corresponding peritumoral tissue (assumed as being 100%) the glioma S100B content dropped to 6% ($p < 0.01$).

A positive correlation ($R = 0.673$) between tumoral GFAP and malignancy grade was observed (Fig 2A), with a low significance ($p = 0.098$). Conversely, a positive correlation ($R = 0.783$) was found between S100B and malignancy in peritumoral tissue (Fig 2B), also with a low significance ($p = 0.117$).

Fig 3 demonstrates glutamine synthetase and superoxide dismutase activities in tumor and peritumoral tissues. No significant difference was found in GS activity; however, a strong and significant positive correlation ($R = 0.766$, $p = 0.045$) was observed between GS activity and malignancy grade in tumors, but not in peritumoral tissue ($R = 0.100$, $p = 0.873$) (Fig 4A). No difference in SOD activity was found between gliomas and peritumoral tissues when absolute values were compared (Fig 3); however, when each glioma was compared with its corresponding peritumoral tissue (assumed as being 100%) the glioma SOD activity dropped to 51% ($p < 0.05$). A weak non-significant correlation was found between SOD and malignancy grade (4B) in tumors ($R = 0.556$, $p = 0.195$) and peritumoral tissue ($R = 0.152$, $p = 0.808$), respectively.

Based on immunohistochemical studies, the consensus opinion is that GFAP content has an inverse relationship with astrocytoma malignancy grade [3-5, 7]. However, the presence of a population of GFAP non reactive cells is not a sign of high-grade tumor anaplasia [24]. Moreover, a study by Camby et al (2000) observed no statistically significant difference between astrocytomas and anaplastic astrocytomas with respect to immunocytochemistry

for GFAP coupled to computer associated-microscopy [25], although vimentin was useful for distinguishing these glioma types.

In this study we used for first time, to our knowledge, an ELISA for determining GFAP and S100B content in human gliomas after surgical resection. Western blotting and ELISA have been used with glioma cell cultures (e.g. [18] and [26]), but immunocytochemistry is the most common method for evaluating GFAP expression. We found an apparent positive correlation ($p = 0.098$) between GFAP content and malignancy grade. To explain this discrepancy, a number of factors should be taken into account. Firstly immunohistochemical studies for GFAP in gliomas describe, in addition to reduced levels, different arrangements [1] from a fibrillary (insoluble) to a homogeneous granular (less insoluble) distribution within the cytoplasm, demanding a very experienced observer. Secondly, GFAP measurement by antibody recognition can be affected by neighboring proteins [27] and, thirdly, there are very few studies available reporting possible changes in the immunodetection of GFAP due to posttranslational alterations, particularly phosphorylation. In fact, in mitotic cells, the glial filaments are depolymerized by a process modulated by phosphorylation and S100B protein [11, 28, 29]. It is possible that our data demonstrate total GFAP (soluble and insoluble fraction), in contrast to just the insoluble content (fibrillary and granular), as detected by immunocytochemistry; however, it will not be possible to determine whether GFAP detected by ELISA is total GFAP until a large-scale ELISA study for GFAP measurement is carried out. Moreover, using *in situ* hybridization, higher levels of GFAP mRNA were found in high-grade glioma than in low-grade glioma, based on mitotic figures, necrosis and neovascularization [30]. It should be emphasized that our data regarding GFAP content do not contest previous results nor the use of the immunohistochemical characterization of brain tumors.

With respect to the S100B, we confirmed its poor ability to discriminate between glioma types [15], in contrast to other S100 proteins, such as S100A1, A3 and A6. Moreover, serum S100B does not appear to be a useful marker for astrocytomas in children [31], but could be used in the follow up of brain tumor diseases [14] and in the evaluation of expansive intracranial lesions [32].

An interesting observation, however, was made in the peritumoral tissue, where elevated levels of S100B were found. A non-significant increase was also observed in the peritumoral content of GFAP. These changes may reflect a glial reactivity around the tumor. An increase in S100B (without a corresponding augment in GFAP) has been found in some epileptogenic lesions of the temporal lobe [13]. Indeed, the two patients with the highest levels of peritumoral S100B (one of them with temporal location of the tumor) exhibited convulsive behavior, however, a direct correlation cannot be established at present.

GS has been suggested as an additional marker for astrocytic tumors, but its presence does not allow any conclusion regarding its astrocytic origin [16]. Moreover, GS activity could be useful to indicate cell activity and proliferation in glial tumors [17,18], since an increased glutamine/glutamate ratio has been observed in gliomas [33, 34]. In fact, biopsy from human samples indicated a high activity of GS in gliomas, but a correlation with malignancy grade was not possible [17]. Here, we found a direct and significant correlation between GS activity and astrocytoma grade; interestingly, some tumors (e.g. hepatomas and breast carcinoma) do not depend on external source of this substrate and may undergo GS up-regulation following glutamine deprivation, an important observation about the necessity of glutamine for proliferation [35]. Therefore, size and vascularization could also

affect GS activity in gliomas, although it was not possible to establish a correlation between size and GS activity with these data ($R = 0.604$, $p = 0.151$).

In agreement with other authors, we found a decrease in glioma SOD activity [20, 36]. This decrease in SOD activity could result in a decrease in GS activity, due its sensitivity to oxidative stress [37]. On the other hand, the glioma excitotoxicity, due to glutamate release [38], could induce an increment in GS activity [39]. Both these factors may contribute to the resulting glioma GS activity.

Some limitations of this study should be considered. Firstly, this was a preliminary study involving a small number of patients. Secondly, the values obtained were not paired with suitable samples from healthy subjects of the same sex, age and brain region. There are no reference values for these parameters, which would be important for the definition of/ comparison with gliosis or glial reactivity in each case, due to the regional glial heterogeneity. These limitations demand further studies. Large-scale investigation will allow us to examine any possible relationship between the specific astrocyte parameters evaluated in function of the glial heterogeneity in the different brain regions and tumor types.

In summary, these data instigate a discussion regarding the existent consensus of an inverse correlation between GFAP and the malignancy grade of astrocytomas. It may be more suitable to suggest the existence of an inverse correlation between GFAP filaments and astrocytoma grade. Interestingly, a positive and significant correlation was found between GS activity and astrocytoma grade and an elevated S100B content was found in the peritumoral tissue. This elevation could contribute to the convulsive manifestations observed in some patients. Furthermore, the higher relative GFAP/S100B ratio (elevated GFAP/low S100B) observed in glioma is in agreement with its high mitotic activity, since

GFAP depolymerization is induced by phosphorylation during mitosis, which in turn may be inhibited by S100B.

References

- [1]. Chen Y, Zhang YX. Use of monoclonal antibodies to glial fibrillary acidic protein in the cytologic diagnosis of brain tumors. *Acta Cytol* 1989; 33:922-28
- [2]. Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, Rorke LB, Reifenberger G, Burger PC, Cavenee WK. The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002; 61:215-25;
- [3]. Murphy KG, Hatton JD, U HS. Role of glial fibrillary acidic protein expression in the biology of human glioblastoma U-373MG cells. *J Neurosurg* 1998; 89:997-1006.
- [4]. Pekny M, Eliasson C, Chien CL, Kindblom LG, Liem R, Hamberger A, Betsholtz C. GFAP-deficient astrocytes are capable of stellation in vitro when cocultured with neurons and exhibit a reduced amount of intermediate filaments and an increased cell saturation density. *Exp Cell Res* 1998; 239:332-43.
- [5]. Toda M, Miura M, Asou H, Sugiyama I, Kawase T, Uyemura K. Suppression of glial tumor growth by expression of glial fibrillary acidic protein. *Neurochem Res* 1999; 24:339-43.
- [6]. Velasco ME, Dahl D, Roessmann U, Gambetti P. Immunohistochemical localization of glial fibrillary acidic protein in human glial neoplasms. *Cancer* 1980; 45:484-94.

- [7]. Kajiwaru K, Orita T, Nishizaki T, Kamiryo T, Nakayama H, Ito H. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression and nucleolar organizer regions (NORs) in human gliomas. *Brain Res* 1992; 572:314-18.
- [8]. Wilhelmsson U, Eliasson C, Bjerkvig R, Pekny M. Loss of GFAP expression in high-grade astrocytomas does not contribute to tumor development or progression. *Oncogene* 2003; 22:3407-11.
- [9]. Koperek O, Gelpi E, Birner P, Haberler C, Budka H, Hainfellner JA. Value and limits of immunohistochemistry in differential diagnosis of clear cell primary brain tumors. *Acta Neuropathol* 2004; 108:24-30.
- [10]. Korshunov A, Golanov A, Sycheva R. Immunohistochemical markers for prognosis of cerebral glioblastomas. *J Neurooncol* 2002; 58:217-36.
- [11]. Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol* 2001; 33:637-68.
- [12]. Marenholz I, Heizmann CW, Fritz G. S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 322:1111-22.

- [13]. Griffin WS, Yeralan O, Sheng JG, Boop FA, Mrak RE, Rovnaghi CR, Burnett BA, Feoktistova A, Van Eldik LJ. Overexpression of the neurotrophic cytokine S100 beta in human temporal lobe epilepsy. *J Neurochem* 1995; 65:228-33.
- [14]. Ortiz-Munoz B, Menendez-Lopez A, Yaya-Tur R, Arribas-Alpuente L, Maiquez-Richart J, Bordes-Monmeneu M. S100 protein in tumours of the central nervous system. *Rev Neurol*. 2003; 36:1011-15.
- [15]. Camby I, Nagy N, Lopes MB, Schafer BW, Maurage CA, Ruchoux MM, Murmann P, Pochet R, Heizmann CW, Brotchi J, Salmon I, Kiss R, Decaestecker C. Supratentorial pilocytic astrocytomas, astrocytomas, anaplastic astrocytomas and glioblastomas are characterized by a differential expression of S100 proteins. *Brain Pathol* 1999; 9:1-19.
- [16]. Pilkington GJ, Lantos PL. The role of glutamine synthetase in the diagnosis of cerebral tumours. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1982; 8:227-36.
- [17]. McCormick D, McQuaid S, McCusker C, Allen IV. A study of glutamine synthetase in normal human brain and intracranial tumours. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1990; 16:205-11.
- [18]. Moretto G, Brutti N, De Angelis V, Arcuri C, Bocchini V. A time-dependent increase in glial fibrillary acidic protein expression and glutamine synthetase

activity in long-term subculture of the GL15 glioma cell line. *Cell Mol Neurobiol* 1997; 17:509-19.

[19]. Hertz L, Zielke HR. Astrocytic control of glutamatergic activity: astrocytes as stars of the show. *Trends Neurosci* 2004; 27:735-43.

[20]. Popov B, Gadjeva V, Valkanov P, Popova S, Tolekova A. Lipid peroxidation, superoxide dismutase and catalase activities in brain tumor tissues. *Arch Physiol Biochem* 2003; 111:455-59.

[21]. Tramontina F, Karl J, Gottfried C, Mendez A, Goncalves D, Portela LV, Goncalves CA. Digitonin-permeabilization of astrocytes in culture monitored by trypan blue exclusion and loss of S100B by ELISA. *Brain Res Protoc* 2000; 6:86-90.

[22]. Petit CK, Chung MC, Verkhovsky LM, Cooper AJ. Brain glutamine synthetase increases following cerebral ischemia in the rat. *Brain Res* 1992; 569:275-80.

[23]. Netto CB, Siqueira IR, Fochesatto C, Portela LV, da Purificacao Tavares M, Souza DO, Giugliani R, Goncalves CA. S100B content and SOD activity in amniotic fluid of pregnancies with Down syndrome. *Clin Biochem* 2004; 37:134-7.

- [24]. Korshunov AG, Sycheva RV. Expression of glial fibrillary acidic protein and protein S-100 in cerebral astrocytic gliomas of varying degrees of malignancy immunohistochemical study. *Arkh Patol* 1995; 57:30-8.
- [25]. Camby I, Lefranc F, Titeca G, Neuci S, Fastrez M, Dedecken L, Schafer BW, Brotchi J, Heizmann CW, Pochet R, Salmon I, Kiss R, Decaestecker C. Differential expression of S100 calcium-binding proteins characterizes distinct clinical entities in both WHO grade II and III astrocytic tumours. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2000; 26:76-90.
- [26]. Ito M, Nagashima T, Hoshino T. Quantitation and distribution analysis of glial fibrillary acidic protein in human glioma cells in culture. *J Neuropathol Exp Neurol* 1989; 48:560-7.
- [27]. O'Callaghan JP, Imai H, Miller DB, Minter A. Quantitative immunoblots of proteins resolved from brain homogenates: underestimation of specific protein concentration and of treatment effects. *Anal Biochem* 1999; 274:18-26.
- [28]. Inagaki M, Nakamura Y, Takeda M, Nishimura T, Inagaki N. Glial fibrillary acidic protein: dynamic property and regulation by phosphorylation. *Brain Pathol* 1994; 4:239-43.

- [29]. Frizzo JK, Tramontina F, Bortoli E, Gottfried C, Leal RB, Lengyel I, Donato R, Dunkley PR, Goncalves CA. S100B-mediated inhibition of the phosphorylation of GFAP is prevented by TRTK-12. *Neurochem Res* 2004; 29:735-40.
- [30]. Theurillat JP, Hainfellner J, Maddalena A, Weissenberger J, Aguzzi A. Early induction of angiogenetic signals in gliomas of GFAP-v-src transgenic mice. *Am J Pathol* 1999; 154:581-90.
- [31]. Rajendra A, Spinella PC, Drott HR, Dominguez TE, Sutton L, Helfaer M. S-100beta protein--serum levels in children with brain neoplasms and its potential as a tumor marker. *J Neurooncol* 2004; 67:345-49.
- [32]. de Vries J, Thijssen WA, Snels SE, Menovsky T, Peer NG, Lamers KJ. Intraoperative values of S-100 protein, myelin basic protein, lactate, and albumin in the CSF and serum of neurosurgical patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001; 71:671-74.
- [33]. Bateman DE, Hardy JA, McDermott JR, Parker DS, Edwardson JA. Amino acid neurotransmitter levels in gliomas and their relationship to the incidence of epilepsy. *Neurol Res* 1988; 10:112-14.
- [34]. Peeling J, Sutherland G. High-resolution ¹H NMR spectroscopy studies of extracts of human cerebral neoplasms. *Magn Reson Med* 1992; 24:123-36.

- [35]. Collins CL, Wasa M, Souba WW, Abcouwer SF. Regulation of glutamine synthetase in human breast carcinoma cells and experimental tumors. *Surgery* 1997; 122:451-63.
- [36]. Pu PY, Lan J, Shan SB, Huang EQ, Bai Y, Guo Y, Jiang DH. Study of the antioxidant enzymes in human brain tumors. *J Neurooncol* 1996; 29:121-8.
- [37]. Levine RL. Oxidative modification of glutamine synthetase. I. Inactivation is due to loss of one histidine residue. *J Biol Chem* 1983; 258:11823-7.
- [38]. Ye ZC, Sontheimer H. Glioma cells release excitotoxic concentrations of glutamate. *Cancer Res* 1999; 59:4383-91.
- [39]. Davenport Jones JE, Fox RM, Atterwill CK. NMDA-induced increases in rat brain glutamine synthetase but not glial fibrillary acidic protein are mediated by free radicals. *Neurosci Lett* 1998; 247:37-40.

Table 1. Patient profile, tumor size, location and histopathology

Patient	Age (years) /Sex	Location of tumor	Size of tumor (cm ³) ^a	Glioma grade ^b
1	76/man	Temporal lobe	115.5	IV
2	43/woman	Occipital lobe	23.7	III
3	62/woman	Parietal lobe	125.3	IV
4	45/woman	Parieto-Occipital lobe	129.2	IV
5	49/man	Parietal lobe	11.8	II
6	10/man	Occipital lobe	124	II
7	23/man	Parietal lobe	60.7	I

^a Value estimated by MRI and CT. ^b Glioma gradation based on WHO classification (I, pilocytic astrocytomas - circumscribed tumor with low cellularity; II, astrocytomas - well-differentiated tumors with a diffusely infiltrative growth pattern; III, anaplastic astrocytomas - enhanced cellularity, nuclear atypia, and increased mitotic activity; IV, multiform glioblastomas - characterized by such features plus prominent microvascular proliferation or areas of necrosis).

Figure legends

Figure 1. *GFAP and S100B immunocontent in gliomas (G) and peritumoral tissues (PTT).*

GFAP and S100B were measured by ELISA. Each value is a mean (\pm standard error) of samples of 7 patients performed in triplicate. ^a Significantly different from peritumoral tissue (Student t test, $p < 0.05$). ^b When each value of S100B glioma was normalized (assuming S100B PTT as being 100%) the resulting mean is 6% (Student t test, $p < 0.01$).

Figure 2. *Correlation between GFAP (A) or S100B (B) content in glioma and peritumoral*

tissue, classified according to the malignancy grade. GFAP and S100B were measured by ELISA. Glioma gradation was based on WHO classification. Values are mean of GFAP or S100B contents performed in triplicate from glioma (full circles) or peritumoral tissue (open circles). ^a An apparent positive correlation ($R = 0.673$, $p = 0.098$) was found between tumoral GFAP and malignancy grade. Other correlations had an even lower significance.

Figure 3. *Glutamine synthetase(GS) and superoxide dismutase (SOD) in gliomas (G) and*

peritumoral tissues (PTT). Colorimetric enzymatic essays for GS and SOD were carried out as described in the Material and Methods section. Each value is a mean (\pm standard error) of samples from 7 patients performed in triplicate. ^a Not significantly different from peritumoral tissue when absolute values are compared (Student t test, $p > 0.05$). ^b When each value of S100B glioma was normalized (assuming S100B PTT as being 100%) the resulting mean is 51 % and significantly different (Student t test, $p < 0.01$).

Figure 4. *Correlation between glutamine synthetase (GS in panel A) or superoxide dismutase (SOD in panel B) activities in glioma and peritumoral tissue, classified according to the malignancy grade. Colorimetric enzymatic essays for GS and SOD were carried out as described in the Material and Methods section. Glioma graduation was based on the WHO classification. Values are mean of GS or SOD activities performed in triplicate from glioma (full circles) or peritumoral tissue (open circles).^a A very positive correlation ($R = 0.766$, $p = 0.045$) was found between tumoral GS activity and malignancy grade. Other correlations were not significant.*

Fig 1

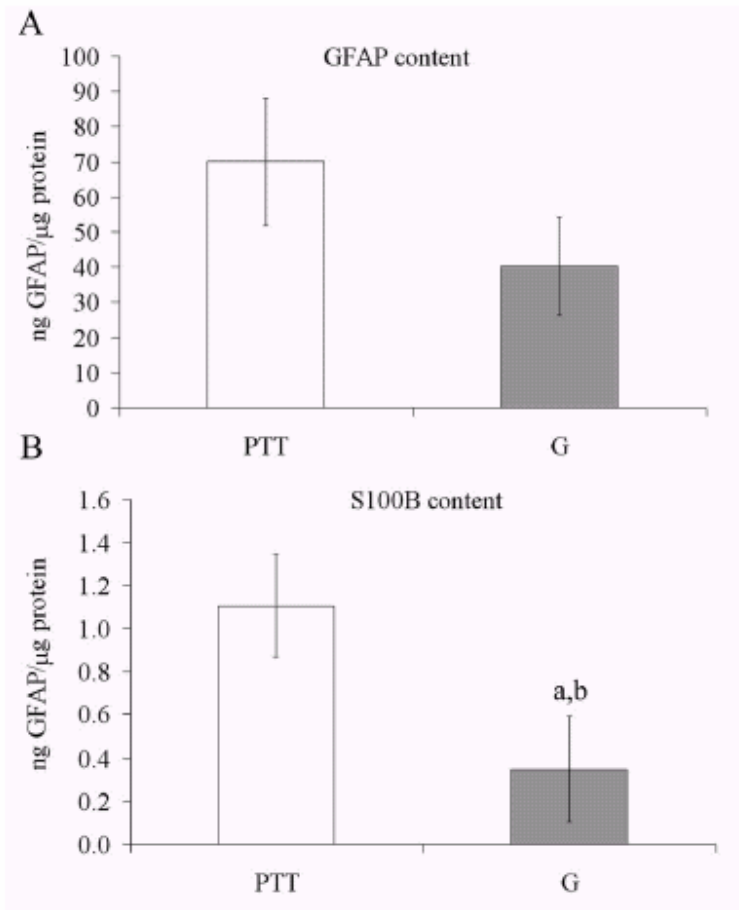


Fig 2

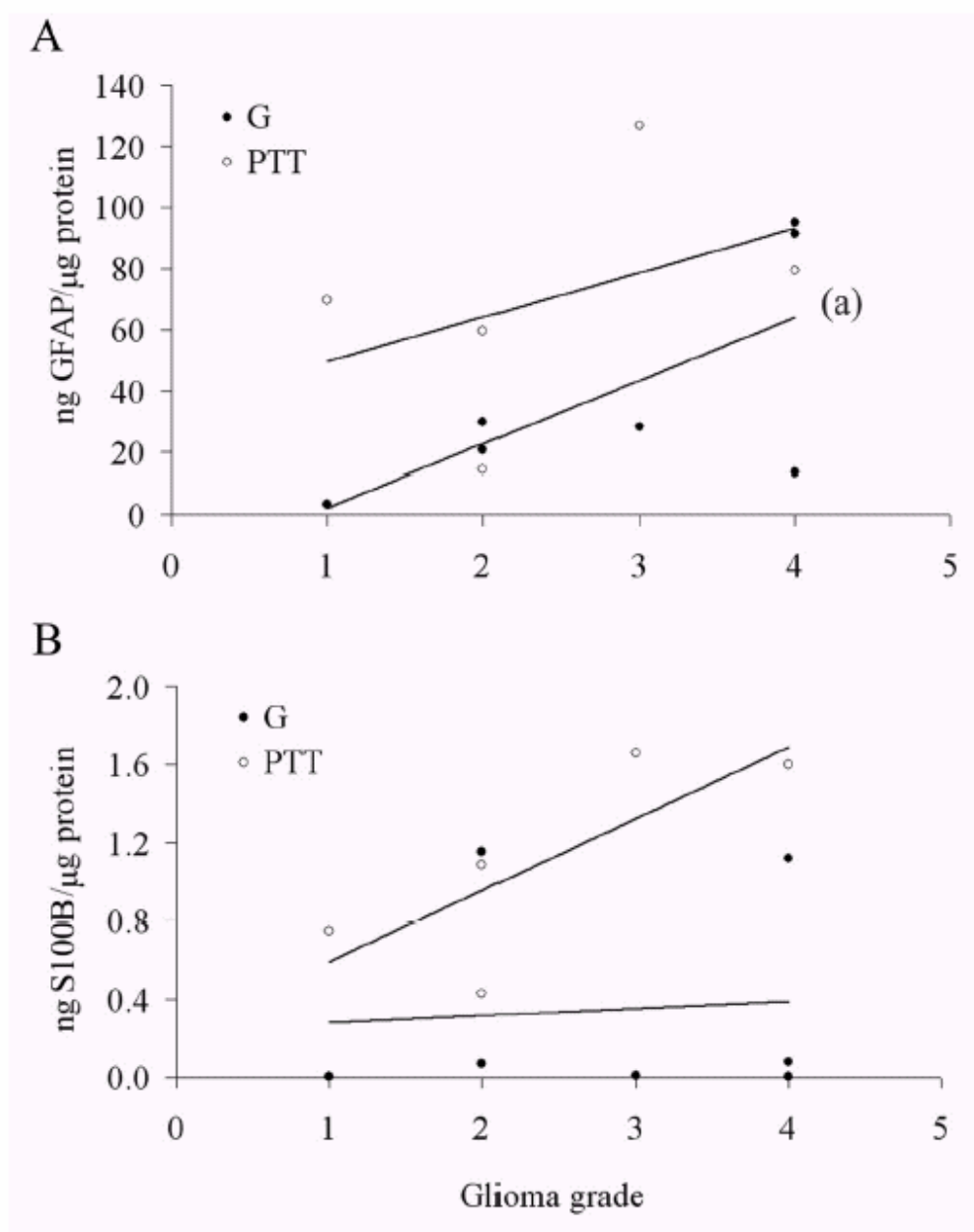


Fig 3

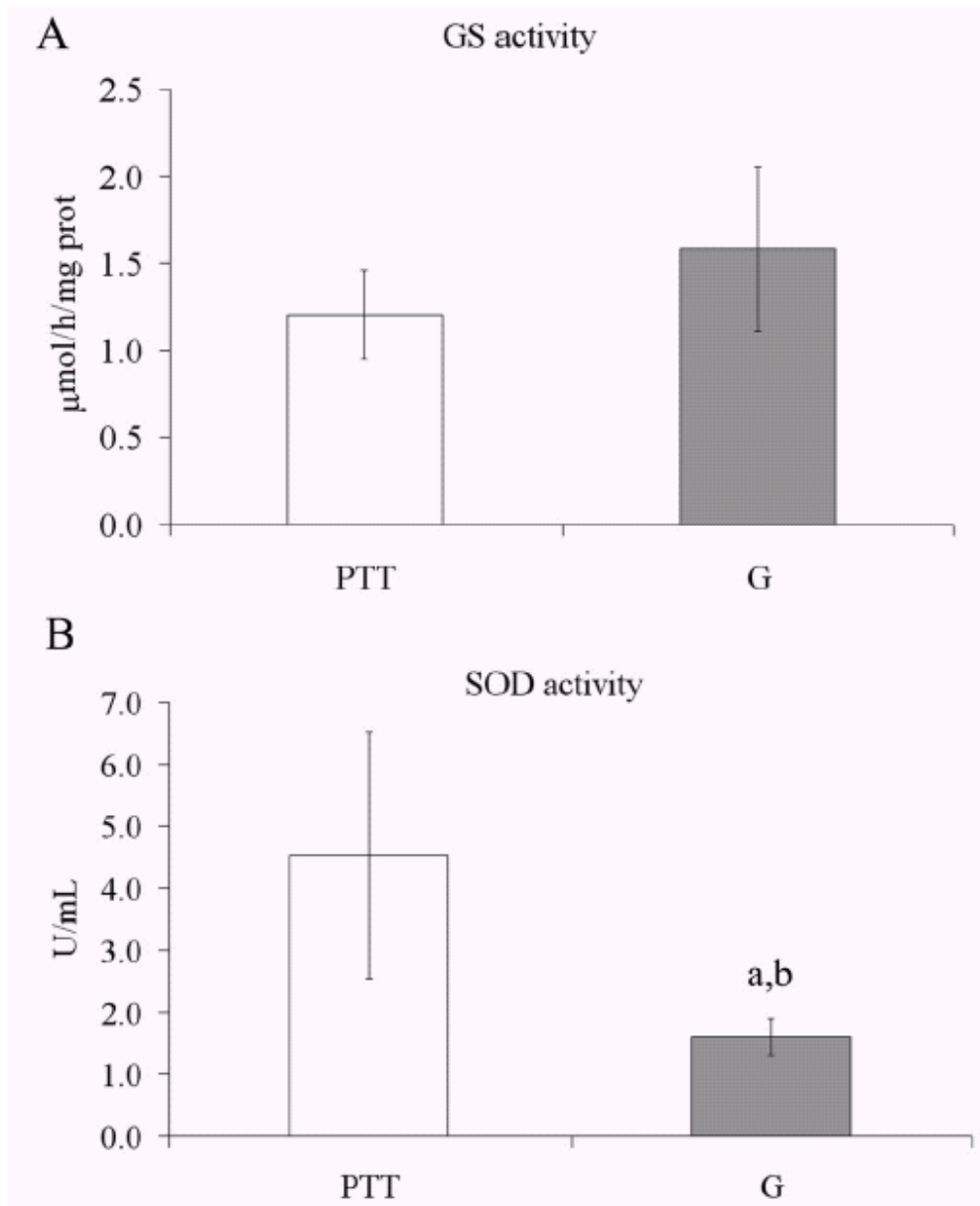
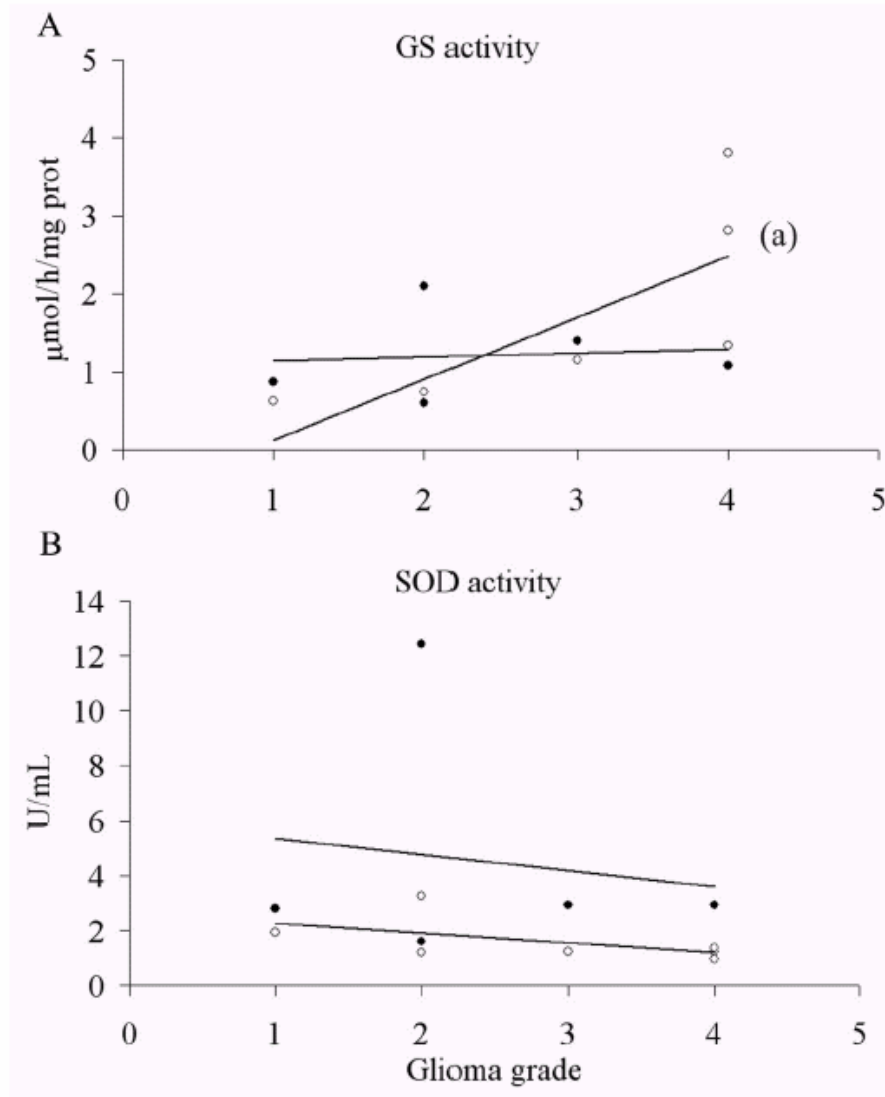


Fig 4



4. DISCUSSÃO

Atualmente, baseado em estudos imunoistoquímicos, existe um consenso de que o conteúdo da GFAP tem uma relação inversa com o grau de malignidade dos gliomas (KAJIWARA et al., 1992; PEKNY et al., 1998; MURPHY et al., 1998; TODA et al., 1999). Entretanto, a presença de uma população de células não imunorreativas para GFAP não é indicativo de um tumor com alto grau de anaplasia (KORSHUNOV & SYCHEVA, 1995). Além disso, ainda não foi observada diferença estatisticamente significativa entre astrocitomas e astrocitomas anaplásicos com relação a imunocitoquímica para GFAP (CAMBY et al., 2000). Nesse mesmo estudo, a vimentina foi útil para distinguir estes dois tipos de tumores. *Western blotting* e ELISA têm sido utilizados com culturas de células de gliomas (e.g. ITO et al., 1989; MERETTO et al., 1997), mas a imunocitoquímica é o método mais comum para avaliar a expressão de GFAP.

Neste trabalho nos usamos, pela primeira vez dentro do nosso conhecimento, um ELISA para determinar o conteúdo de GFAP e S100B em tumores de origem glial de humanos após a ressecção cirúrgica. Surpreendentemente, achamos uma aparente correlação positiva ($p = 0.098$) entre o conteúdo de GFAP e o grau de malignidade. Algumas considerações devem ser entendidas para explicar esta contradição. Primeiro, estudos imunoistoquímicos para GFAP descrevem, em adição à redução da marcação, um arranjo diferente dos filamentos intermediários (CHEN & ZHANG, 1998) que vão do fibrilar (insolúvel) para o granular homogêneo (menos insolúvel) distribuídos pelo citoplasma. Segundo, o reconhecimento de GFAP por anticorpo pode ser afetado por proteínas vizinhas (O'CALLAGHAN et al., 1999). Terceiro, não existem estudos suficientes sobre as possíveis interferências das alterações pós-tradução, particularmente fosforilação, no

imunorreconhecimento da GFAP. De fato, em células mitóticas, os filamentos gliais são despolimerizados por um processo modulado pela fosforilação e pela proteína S100B (INAGAKI et al., 1990; FRIZZO et al., 2004). Desta forma, é possível que o aumento de GFAP que nós encontramos represente a quantidade total de GFAP (frações solúvel e insolúvel), em contraste com o conteúdo insolúvel (fibrilar e granular) detectado pela imunocito/istoquímico por outros autores já citados. Entretanto, esta questão permanecerá aberta até que se faça um estudo em larga escala usando ELISA para medir GFAP. Além disso, usando hibridização *in situ*, foram encontrados níveis mais elevados de mRNA da GFAP em gliomas com alto grau de malignidade do que nos de baixo grau, baseados nas figuras mitóticas, necrose e neovascularização (INAGAKI et al., 1990; FRIZZO et al., 2004). É importante enfatizar que os nossos dados sobre o conteúdo de GFAP não contrapõem os resultados prévios ou o valor da caracterização imunohistoquímica dos tumores cerebrais.

Com relação à S100B, os dados parecem confirmar sua pouca utilidade para discriminar os diferentes tipos de gliomas (CAMBY et al., 1999), diferentemente de outras proteínas da família S100 tais como S100A1, A3 e A6. Além disso, a S100B (serica) não parece ser um marcador útil para astrocitomas em crianças (RAJENDRA et al., 2004), mas pode ser utilizado no acompanhamento da evolução destes tumores (ORTIZ-MUNOZ et al., 2003) e na evolução das lesões expansivas intracranianas (DE VRIES et al., 2001).

Entretanto, um aspecto muito interessante foi identificado em tecidos peritumorais: níveis elevados de S100B. E ainda um aumento não significativo do conteúdo de GFAP peritumoral. Estas modificações podem ser reflexos de uma reatividade glial na volta do tecido tumoral. Um aumento de S100B (sem um aumento da GFAP correspondente) foi identificado em algumas lesões epileptogênicas do lobo temporal (GRIFFIN et al., 1995).

De fato, dois pacientes com elevados níveis de S100B peritumoral (um deles com o tumor de localização temporal) apresentaram crises convulsivas. Entretanto, uma correlação direta não pode ser estabelecida até o presente momento.

GS tem sido apontada como um marcador adicional para tumores astrocíticos, porém a sua presença não permite concluir uma origem astrocítica do tumor (PILKINGTON & LANTOS, 1982). Foi identificada uma correlação inversa nos astrocitomas entre o imunocnteúdo de GS e o grau de malignidade destes tumores (AKIMOTO, 1993), indicando que a atividade da GS pode ser útil para indicar atividade celular e proliferação em tumores gliais (McCORMICK et al., 1990; MORETTO et al., 1997). Além disso, foi encontrado um aumento na razão glutamina/glutamato em gliomas (BATEMAN et al., 1988; PEELING et al., 1992). De fato, biópsia em humanos indicou aumentada atividade da GS em gliomas, porém não foi possível correlacionar com o grau de malignidade (McCORMICK et al., 1990). Neste trabalho nós achamos uma correlação direta e significativa entre a atividade da GS e o grau de malignidade dos tumores estudados. Além disso, é importante mencionar que, devido à importância da glutamina para proliferação, alguns tumores (e.g. hepatomas e carcinoma de mama) são independentes deste substrato e eles podem ter uma supra-regulação da GS induzida pela privação de glutamina (COLLINS et al., 1997). Portanto, tamanho e vascularização podem afetar a atividade da GS em gliomas também. Entretanto, não foi possível estabelecer a correlação entre tamanho do tumor e atividade da GS com estes dados ($R = 0.604$, $p = 0.151$).

Em concordância com outros autores nós encontramos um decréscimo da atividade de SOD em gliomas (PY et al., 1996; POPOV et al., 2003). Esse decréscimo da atividade da SOD pode resultar em um decréscimo da atividade da GS, devido a sua sensibilidade ao estresse oxidativo (LEVINE, 1983). Por outro lado, a excitotoxicidade do glioma

secundária a liberação de glutamato (ZU-CHENG et al., 1999) pode induzir a um aumento da atividade da GS (DAVENPORT et al., 1998). Ambos estes fatores estariam contribuindo para a resultante atividade da GS em gliomas.

É importante considerar algumas limitações deste estudo. Primeiro, este foi um estudo preliminar envolvendo um pequeno número de pacientes. Segundo, os valores obtidos não foram pareados com os de indivíduos sadios do mesmo sexo, idade e regiões do cérebro.

Não existem valores de referência para estes parâmetros e isto seria importante para discutir gliose ou reatividade glial em cada caso, secundária a heterogeneidade glial regional. Estas limitações demandam estudos futuros. Investigações em larga escala nos permitirão examinar possíveis relações entre parâmetros astrocíticos específicos avaliados em função da heterogeneidade glial em diferentes regiões do cérebro e em diferentes tipos de tumores.

Em resumo, estes dados preliminares fomentam a discussão sobre alguns aspectos dos gliomas humanos: (i) sobre o existente consenso da correlação inversa entre GFAP e o grau de malignidade dos astrocitomas. Talvez seja mais prudente estabelecer a existência de uma correlação inversa entre os filamentos de GFAP e o grau de malignidade do astrocitoma; (ii), a correlação positiva e significativa encontrada entre a atividade da GS e o grau de malignidade dos astrocitomas; (iii) o conteúdo elevado de S100B encontrado em tecidos peritumorais, que poderia contribuir para manifestações convulsivas observadas em alguns pacientes; (iv) o aumento da razão GFAP/S100B em gliomas que está de acordo com a sua elevada atividade mitótica, porque a despolimerização de GFAP é induzida pela fosforilação durante a mitose, que por sua vez poderia ser inibida pela S100B.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chen Y, Zhang YX. Use of monoclonal antibodies to glial fibrillary acidic protein in the cytologic diagnosis of brain tumors. *Acta Cytol*, 33:922-28; 1989.
2. Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, Rorke LB, Reifenberger G, Burger PC, Cavenee WK. The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol*, 61:215-25; 2002.
3. Murphy KG, Hatton JD, U HS. Role of glial fibrillary acidic protein expression in the biology of human glioblastoma U-373MG cells. *J Neurosurg*, 89:997-1006; 1998.
4. Pekny M, Eliasson C, Chien CL, Kindblom LG, Liem R, Hamberger A, Betsholtz C. GFAP-deficient astrocytes are capable of stellation in vitro when cocultured with neurons and exhibit a reduced amount of intermediate filaments and an increased cell saturation density. *Exp Cell Res*, 239:332-43; 1998.
5. Toda M, Miura M, Asou H, Sugiyama I, Kawase T, Uyemura K. Suppression of glial tumor growth by expression of glial fibrillary acidic protein. *Neurochem Res*, 24:339-43; 1999.

6. Velasco ME, Dahl D, Roessmann U, Gambetti P. Immunohistochemical localization of glial fibrillary acidic protein in human glial neoplasms. *Cancer*, 45:484-94; 1980.
7. Kajiwara K, Orita T, Nishizaki T, Kamiryo T, Nakayama H, Ito H. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression and nucleolar organizer regions (NORs) in human gliomas. *Brain Res*, 572:314-18; 1992.
8. Wilhelmsson U, Eliasson C, Bjerkvig R, Pekny M. Loss of GFAP expression in high-grade astrocytomas does not contribute to tumor development or progression. *Oncogene*, 22:3407-11; 2003.
9. Koperek O, Gelpi E, Birner P, Haberler C, Budka H, Hainfellner JA. Value and limits of immunohistochemistry in differential diagnosis of clear cell primary brain tumors. *Acta Neuropathol*, 108:24-30; 2004.
10. Korshunov A, Golanov A, Sycheva R. Immunohistochemical markers for prognosis of cerebral glioblastomas. *J Neurooncol*, 58:217-36; 2002.
11. Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol*, 33:637-68; 2001.

12. Marenholz I, Heizmann CW, Fritz G. S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochem Biophys Res Commun*, 322:1111-22; 2004.
13. Griffin WS, Yeralan O, Sheng JG, Boop FA, Mrak RE, Rovnaghi CR, Burnett BA, Feoktistova A, Van Eldik LJ. Overexpression of the neurotrophic cytokine S100 beta in human temporal lobe epilepsy. *J Neurochem*, 65:228-33; 1995.
14. Ortiz-Munoz B, Menendez-Lopez A, Yaya-Tur R, Arribas-Alpuente L, Maiquez-Richart J, Bordes-Monmeneu M. S100 protein in tumours of the central nervous system. *Rev Neurol*, 36:1011-15; 2003.
15. Camby I, Nagy N, Lopes MB, Schafer BW, Maurage CA, Ruchoux MM, Murmann P, Pochet R, Heizmann CW, Brotchi J, Salmon I, Kiss R, Decaestecker C. Supratentorial pilocytic astrocytomas, astrocytomas, anaplastic astrocytomas and glioblastomas are characterized by a differential expression of S100 proteins. *Brain Pathol*, 9:1-19; 1999.
16. Pilkington GJ, Lantos PL. The role of glutamine synthetase in the diagnosis of cerebral tumours. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 8:227-36; 1982.
17. McCormick D, McQuaid S, McCusker C, Allen IV. A study of glutamine synthetase in normal human brain and intracranial tumours. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 16:205-11; 1990.

18. Moretto G, Brutti N, De Angelis V, Arcuri C, Bocchini V. A time-dependent increase in glial fibrillary acidic protein expression and glutamine synthetase activity in long-term subculture of the GL15 glioma cell line. *Cell Mol Neurobiol*, 17:509-19; 1997.
19. Hertz L, Zielke HR. Astrocytic control of glutamatergic activity: astrocytes as stars of the show. *Trends Neurosci*, 27:735-43; 2004.
20. Popov B, Gadjeva V, Valkanov P, Popova S, Tolekova A. Lipid peroxidation, superoxide dismutase and catalase activities in brain tumor tissues. *Arch Physiol Biochem*, 111:455-59; 2003.
21. Tramontina F, Karl J, Gottfried C, Mendez A, Goncalves D, Portela LV, Goncalves CA. Digitonin-permeabilization of astrocytes in culture monitored by trypan blue exclusion and loss of S100B by ELISA. *Brain Res Protoc*, 6:86-90; 2000.
22. Petit CK, Chung MC, Verkhovsky LM, Cooper AJ. Brain glutamine synthetase increases following cerebral ischemia in the rat. *Brain Res*, 569:275-80; 1992.
23. Netto CB, Siqueira IR, Fochesatto C, Portela LV, da Purificacao Tavares M, Souza DO, Giugliani R, Goncalves CA. S100B content and SOD activity in amniotic fluid of pregnancies with Down syndrome. *Clin Biochem*, 37:134-7; 2004.

24. Korshunov AG, Sycheva RV. Expression of glial fibrillary acidic protein and protein S-100 in cerebral astrocytic gliomas of varying degrees of malignancy: immunohistochemical study. *Arkh Patol*, 57:30-8; 1995.
25. Camby I, Lefranc F, Titeca G, Neuci S, Fastrez M, Dedecken L, Schafer BW, Brotchi J, Heizmann CW, Pochet R, Salmon I, Kiss R, Decaestecker C. Differential expression of S100 calcium-binding proteins characterizes distinct clinical entities in both WHO grade II and III astrocytic tumours. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 26:76-90; 2000.
26. Ito M, Nagashima T, Hoshino T. Quantitation and distribution analysis of glial fibrillary acidic protein in human glioma cells in culture. *J Neuropathol Exp Neurol*, 48:560-7; 1989.
27. O'Callaghan JP, Imai H, Miller DB, Minter A. Quantitative immunoblots of proteins resolved from brain homogenates: underestimation of specific protein concentration and of treatment effects. *Anal Biochem*, 274:18-26; 1999.
28. Inagaki M, Nakamura Y, Takeda M, Nishimura T, Inagaki N. Glial fibrillary acidic protein: dynamic property and regulation by phosphorylation. *Brain Pathol*, 4:239-43; 1994.

29. Frizzo JK, Tramontina F, Bortoli E, Gottfried C, Leal RB, Lengyel I, Donato R, Dunkley PR, Goncalves CA. S100B-mediated inhibition of the phosphorylation of GFAP is prevented by TRTK-12. *Neurochem Res*, 29:735-40; 2004.
30. Theurillat JP, Hainfellner J, Maddalena A, Weissenberger J, Aguzzi A. Early induction of angiogenetic signals in gliomas of GFAP-v-src transgenic mice. *Am J Pathol*, 154:581-90; 1999.
31. Rajendra A, Spinella PC, Drott HR, Dominguez TE, Sutton L, Helfaer M. S-100beta protein--serum levels in children with brain neoplasms and its potential as a tumor marker. *J Neurooncol*, 67:345-49; 2004.
32. de Vries J, Thijssen WA, Snels SE, Menovsky T, Peer NG, Lamers KJ. Intraoperative values of S-100 protein, myelin basic protein, lactate, and albumin in the CSF and serum of neurosurgical patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 71:671-74; 2001.
33. Bateman DE, Hardy JA, McDermott JR, Parker DS, Edwardson JA. Amino acid neurotransmitter levels in gliomas and their relationship to the incidence of epilepsy. *Neurol Res*, 10:112-14; 1988.
34. Peeling J, Sutherland G. High-resolution ¹H NMR spectroscopy studies of extracts of human cerebral neoplasms. *Magn Reson Med*, 24:123-36; 1992.

35. Collins CL, Wasa M, Souba WW, Abcouwer SF. Regulation of glutamine synthetase in human breast carcinoma cells and experimental tumors. *Surgery*, 122:451-63; 1997.
36. Pu PY, Lan J, Shan SB, Huang EQ, Bai Y, Guo Y, Jiang DH. Study of the antioxidant enzymes in human brain tumors. *J Neurooncol*, 29:121-8; 1996.
37. Levine RL. Oxidative modification of glutamine synthetase. I. Inactivation is due to loss of one histidine residue. *J Biol Chem*, 258:11823-7; 1983.
38. Ye ZC, Sontheimer H. Glioma cells release excitotoxic concentrations of glutamate. *Cancer Res*, 59:4383-91; 1999.
39. Davenport Jones JE, Fox RM, Atterwill CK. NMDA-induced increases in rat brain glutamine synthetase but not glial fibrillary acidic protein are mediated by free radicals. *Neurosci Lett*, 247:37-40; 1998.
40. DeAngelis LM. Brain Tumors. *N Engl J Med*, 344(2):114-23; 2001.