

FACULDADE DE MEDICINA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE

JÚLIO CÉSAR THOMÉ DE SOUZA SILVA

CORRELAÇÃO DA LOCALIZAÇÃO TOPOGRÁFICA E DO EDEMA PERITUMORAL EM
PACIENTES COM GLIOMA RECIDIVO COM A RESPOSTA TERAPÊUTICA AO
ÁLCOOL PERÍLICO

NITEROI

2010

JÚLIO CÉSAR THOMÉ DE SOUZA SILVA

CORRELAÇÃO DA LOCALIZAÇÃO TOPOGRÁFICA E DO EDEMA PERITUMORAL
EM PACIENTES COM GLIOMA RECIDIVO COM A RESPOSTA TERAPÊUTICA AO
ÁLCOOL PERÍLICO

Ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas da
Universidade Federal Fluminense, como requisito
parcial para a obtenção do Grau de Mestre. Área de
Concentração: Ciências Médicas.

Orientador: Prof. CLÓVIS ORLANDO PEREIRA DA FONSECA
Co-orientadora: Profa. THEREZA QUIRICO DOS SANTOS

NITEROI

2010

S586 Silva, Júlio César Thomé de Souza

Correlação da localização topográfica e do edema peritumoral em pacientes com glioma recidivo com a resposta terapêutica ao álcool perfílico / Júlio César Thomé de Souza Silva. – Niterói: [s.n.], 2010.

56 f.:il., 30 cm.

**Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) –
Universidade Federal Fluminense, 2010.**

1. Glioma. 2. Neoplasias Encefálicas. 3. Monoterpeno - Uso Terapêutico. 4. Administração Intranasal. 5. Topografia Médica. I. Título.

CDD 616.994

JULIO CESAR THOMÉ DE SOUZA SILVA

CORRELAÇÃO DA LOCALIZAÇÃO TOPOGRÁFICA E DO EDEMA PERITUMORAL
EM PACIENTES COM GLIOMA RECIDIVO COM A RESPOSTA TERAPÊUTICA AO
ÁLCOOL PERÍLICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre. Área de Concentração: Ciências Médicas.

Aprovada em 06 de dezembro de 2010

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. BENI OLEJ

Prof. Dr. JOSÉ ALBERTO LANDEIRO

Prof. Dr. CARLOS GILBERTO CARLOTTI JÚNIOR

Prof. Dr. CÉSAR FANTEZIA ANDRAUS

Prof^a. Dr^a. MARIA EMILIA COSENZA ANDRAUS

NITEROI

2010

Dedico esta tese

Aos meus pais, pelo exemplo de ética e respeito ao próximo.

AGRADECIMENTOS

Durante o período de elaboração desta tese muito aconteceu em minha vida. O apoio de você Tereza foi, sem dúvida alguma, fundamental para que conseguisse terminá-la, principalmente emocional e intelectualmente. Co-protagonista neste episódio, somente você sabe tudo o que passei e passamos juntos. Tenho certeza de que sem você nada disto estaria acontecendo. Você é tudo para mim, e, espero continuar fazendo por merecer-te ao meu lado.

Ao terminar este Mestrado encerra-se mais um ciclo na minha vida, com a convicção de que a ciência torna-se, a cada dia, mais importante para a sobrevivência da humanidade. Acredito também em uma LUZ DIVINA, a qual chamo de DEUS, que fortaleceu meu espírito e não me deixou esmorecer nestes tantos anos desta dura e longa estrada chamada MEDICINA.

Neste caminho inúmeros são os amigos a quem devoto eterna gratidão, por terem me ajudado de algum modo a tornar realidade o sonho inicial de ser médico, em especial ao meu parceiro DR. MARLO STEINER FLORES, com o qual divido todo o meu desenvolvimento como médico e pessoa e ao PROF. DR. ALBERTO POUSA ISIDORO, *in memoriam*, que me ensinou os primeiros passos na arte da neurocirurgia.

Fico feliz em poder participar desta pesquisa e não poderia deixar de agradecer às pessoas que me “moldaram” cientificamente, e me fizeram ter, ainda mais, a certeza de que esta é uma batalha em que vale a pena lutar. Inicialmente ao PROF. DR. CLÓVIS ORLANDO PEREIRA DA FONSECA, amigo que mais me questionou, desafiou e incentivou meus questionamentos e, tal o quê, me fez ver, que grandes idéias só aparecem a quem trabalha por elas. À PROF^a DR^a THEREZA QUIRICO-SANTOS, que me ensinou tudo que sei sobre gliomas e morte celular e com a qual aprendi a

importância de manter-me focado durante este período como mestrando, e que estendi como padrão para minha vida. É um privilégio tê-los como meus orientadores, que acreditaram nas minhas idéias e me apresentaram uma nova visão da ciência.

A todas as pessoas do Laboratório de Patologia Molecular, em especial a DR^a REGINA LÚCIA DE OLIVEIRA CAETANO, aos alunos de Graduação da Faculdade de Medicina da UFF, PATRÍCIA BUIÚ e RAPHAEL MOREIRA TEIXEIRA pela imensa colaboração, organização e atendimento dos pacientes no Ambulatório de NeuroOncologia, no processamento das amostras tumorais e que me ajudaram na coleta e compilação dos dados adquiridos. Agradeço também à UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE, seus docentes e funcionários, que proporcionaram a melhor estrutura possível para a realização desta dissertação. Espero fazer jus aos diplomas que carrego. E claro, agradeço também ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Universidade Federal Fluminense, na pessoa da PROF^a DRA^a SOLANGE ARTIMOS DE OLIVEIRA pela sua grande compreensão dos momentos pessoais difíceis que passei.

À FUNDAÇÃO EUCLIDES DA CUNHA de Apoio Institucional a UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE, peça fundamental na viabilização do projeto, ao permitir que fosse aberta uma conta vinculada ao PROJETO ÁLCOOL PERÍLICO para receber doações financeiras. Desta forma o projeto pôde ser executado com êxito, sendo possível adquirir reagentes, materiais e o álcool perílico.

À DR^a. LARA ALEXANDRE BRANDÃO pela sua expressiva colaboração na interpretação das imagens radiológicas. A DR^a. JANAÍNA NAGEL do Serviço de Patologia do Hospital Estadual Getulio Vargas, pela sua visão anatomopatológica. Aos médicos e funcionários do HOSPITAL ESTADUAL GETÚLIO VARGAS e do

HOSPITAL FEDERAL DE IPANEMA, pela colaboração, mesmo que involuntária, neste projeto, ao dedicarem suas atenções aos nossos pacientes.

E, sem dúvida alguma, o maior agradecimento de todos irá para minha esposa, TEREZA CRISTINA LESSA THOMÉ DE SOUZA E SILVA, amiga, companheira, pela infinita paciência e incentivo sempre presente nos momentos mais difíceis por todo e sempre e também à meus pais, ANTENOR SANTIAGO e JOSEPHINA THOMÉ DE SOUZA, *in memoriam*, que, embora já desencarnados desta dimensão, estarão orgulhosos, onde estejam.

Por último aos 119 pacientes, sujeitos deste estudo por terem fornecido amostras e por acreditar e colaborar com este Projeto.

A CAPES e Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas da UFF por terem aceitado o desafio da execução do projeto.

"Pesquisar é ver o que outros viram, e pensar o que nenhum outro pensou."

(Albert Szent-Gyorgyi)

O estudo clínico deste trabalho foi realizado na Unidade de Pesquisa Clínica e no Serviço de Neurocirurgia do Hospital Universitário Antonio Pedro com apoio financeiro da Fundação Euclides da Cunha de Apoio Institucional à UFF e da CAPES. A manipulação do álcool perfílico foi efetuada na Farmácia Universitária da Universidade Federal Fluminense.

RESUMO

Introdução: Gliomas são tumores cerebrais primários caracterizados pelo crescimento difuso e invasivo. Estudo biomatemático de proliferação e migração dos gliomas propõe que o crescimento de tumores na substância cinzenta profunda cerebral teria um intervalo de tempo maior comparado a lesões situadas na substância branca lobar, onde a invasão e migração seriam mais rápidas. *Objetivo:* Estabelecer uma correlação da topografia tumoral e edema peritumoral com a resposta terapêutica à administração intranasal do álcool perfílico (AP) em pacientes com glioblastoma (GBM) recidivo após tratamento convencional. *Métodos:* A coorte incluiu o estudo retrospectivo de 119 pacientes com glioma recidivo, sendo 52 em tratamento paliativo de suporte (grupo controle não pareado) e 67 que foram incluídos no Estudo Fase I/II do álcool perfílico e receberam administração pela via inalatória de 440 mg de AP diariamente durante o período de Janeiro 2005 a Dezembro 2009. Os parâmetros avaliados incluíram aspectos clínicos e de neuroimagem: topografia tumoral, volume tumoral, presença de desvio da linha média e extensão de edema peritumoral; análise dos dados demográficos, sintomas iniciais e sobrevida global. Análise estatística foi realizada usando testes log rank. A sobrevida global foi determinada pelo método de Kaplan-Meier, incluindo intervalos de confiança de 95%. *Resultados:* Pacientes do grupo controle apresentaram sobrevida reduzida ($p < 0,0001$) em relação ao grupo tratado com AP. Dentre os 67 pacientes com GBM, 14 (21%) apresentavam localização talâmica e 53 (79%) localização lobar. Pacientes com tumor localizado na região do tálamo sobreviveram significativamente mais tempo do que aqueles com tumor localizado na região lobar (log rank test, $p = 0,0003$). Pacientes que apresentaram regressão tumoral acompanhada de redução do edema peritumoral apresentaram resposta clínica positiva, enquanto aqueles com regressão tumoral sem redução do edema peritumoral apresentaram evolução clínica desfavorável, independentemente da topografia tumoral. Presença de desvio da linha média (> 1 cm) foi estatisticamente significativa como fator de risco para menor sobrevida (log rank test, $p = 0,0062$). *Conclusões:* Este estudo sugere que: (1) pacientes com tumor localizado na região profunda (tálamo) apresentaram sobrevida média maior do que pacientes com tumor localizado na região lobar; (2) edema peritumoral foi um fator determinante na sintomatologia, provavelmente implicado na morbidade

podendo estar relacionado com a característica de invasividade do glioma maligno. Esses achados apóiam a teoria de que fatores presentes em diferentes microambientes do tecido cerebral (tálamo, córtex) possam contribuir para o processo de progressão tumoral, para o prognóstico clínico e a resposta terapêutica ao álcool perfílico administrado pela vias inalatória.

PALAVRAS-CHAVE: tumor cerebral, glioma, álcool perfílico, topografia

ABSTRACT

Introduction: Gliomas are primary brain tumors are characterized by diffuse and invasive growth. Study biomathematical proliferation and migration of gliomas suggests that the growth of tumors in deep brain gray matter would have a longer time interval compared with lesions in the lobar white matter, where the invasion and migration would be faster.

Objective: To establish a correlation of peritumoral edema and tumor topography with the therapeutic response to intranasal administration of perillyl alcohol (PA) in patients with glioblastoma (GBM) relapsing after conventional treatment.

Methods: The cohort included a retrospective study of 119 patients with relapsing glioma, 52 palliative care support (control group) and 67 that were included in the Study Phase I / II and received perillyl alcohol administration by inhalation of 440 mg AP daily during the period January 2005 to December 2009. The parameters evaluated included clinical and neuroimaging: topography tumor, tumor volume, presence of midline shift and extent of peritumoral edema, analysis of demographic data, initial symptoms and overall survival. Statistical analysis was performed using log rank tests. Overall survival was determined by Kaplan-Meier, including 95% confidence intervals. Glioma is a primary brain tumor characterized by diffuse growth and invasiveness. The pattern of differential tumor growth and invasiveness suggest that patients with tumoral lesion located in the lobar white matter region present lower survival rate than patients with lesion located in deep brain gray matter (thalamo).

Objective: To establish a correlation between tumor topography and peritumoral edema with the therapeutic response to intranasal administration of perillyl alcohol (POH).

Methods: This retrospective study analyzed 119 patients with recurrent glioma being 52 under supportive treatment (control group) and 67 included in the Phase I/II clinical trial that received intranasal administration of 440 mg daily AP from January 2005 to December 2009. The following parameters were analyzed: clinical assessment; demographic data, symptoms and overall survival, neuroimage analysis of topography including tumor volume, midline shift and extent of peritumoral edema. Statistical analysis was performed using log rank tests. The overall survival was determined by the Kaplan-Meier method, including 95% confidence intervals. *Results:* Patients from control group showed reduced overall survival ($p < 0,0001$) in comparison with patients included in the Phase I/II that received treatment with perillyl alcohol. Among 67 GBM patients, 14 (21%) had tumoral lesion in the thalamic region and 53 (79%) in the lobar region. Patients with thalamic tumor survived significantly longer than those with tumor located in the lobar region (log rank test, $p = 0.0003$). Patients with tumor regression with reduction of peritumoral edema had positive clinical response, whereas poor prognosis was observed in those with tumor regression but without reduction of peritumoral edema. Presence of midline shift (> 1 cm) was statistically significant as a risk factor for shorter survival (log rank test, $p = 0062$).

Conclusions: This study indicates that: 1) patients with tumoral lesion in the deep region (thalamic) have longer overall survival than GBM patients with tumors in the lobar region; 2) presence of peritumoral edema contributes strongly to symptoms and is likely to influence morbidity and the invading potential of malignant glioma. These findings support the hypothesis that interaction between glioma cells and different brain microenvironment

(thalamo, cortex) can influence the process of glioma progression, clinical prognosis and therapeutic response to intranasal delivery perillyl alcohol.

KEY WORDS: cerebral tumor, glioma, perillyl alcohol, topography.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. Introdução..... | 16 |
| 2. Revisão da Literatura e Fundamentos Teóricos..... | 18 |
| 2.1- Aspectos gerais da biologia molecular do glioblastoma..... | 18 |
| 2.2- Álcool perílico e inibição da p21-Ras nos gliomas de alto grau..... | 21 |
| 2.3- Administração intranasal de princípio ativo | 24 |
| 3. Objetivo geral..... | 26 |
| 3.1- Objetivos específicos..... | 26 |
| 4. Metodologia..... | 27 |
| 4.1- População de estudo..... | 27 |
| 4.2- Critérios para inclusão..... | 27 |
| 4.3- Critérios de inelegibilidade..... | 28 |
| 4.4- Proposta de tratamento..... | 28 |
| 4.5- Avaliação clínica e laboratorial..... | 28 |
| 4.6- Avaliação de parâmetros de neuroimagem..... | 30 |
| 4.7- Avaliação de resposta ao tratamento | 30 |

| | |
|---|----|
| 4.8- Análise estatística..... | 31 |
| 5. Resultados..... | 32 |
| 6. Discussão..... | 41 |
| 7. Conclusão..... | 45 |
| Referencias Bibliográficas..... | 46 |
| Anexo I – Projeto foi aprovado pelo Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) com registro número (CONEP 9681 nº 25000.009267/2004-25 aprovado em Julho de 2004) | |
| Anexo II – Protocolo de administração do álcool perílico e aprovação pelo CEP de aditivo para administração intranasal | |
| Anexo III – Escore de Karnofsky | |
| Anexo IV – Publicação em revista internacional indexada | |

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Fórmula estrutural do álcool perílico.

Figura 2. Vias de transdução de sinal da Ras.

Figura 3. Intervalo livre de progressão no 6^o mês de tratamento de pacientes com glioma maligno recidivo em tratamento com AP (GBM, AA e OA).

Figura 4. Curva de sobrevida global de pacientes em tratamento com AP versus grupo controle.

Figura 5. Curva de sobrevida dos pacientes com glioma maligno primário de acordo com a localização do tumor.

Figura 6. Imagem ilustrativa de glioma com localização da lesão na região profunda.

Figura 7. Imagem ilustrativa de glioma com localização da lesão na região lobar.

Figura 8. Diferença na sobrevida de acordo com a extensão do edema peritumoral.

Figura 9. Imagem ilustrativa de lesão na região lobar com edema peritumoral e desvio da linha média.

Figura 10. Diferença na sobrevida de acordo com o desvio da linha média.

Tabela 1. Características dos pacientes com glioma primário recidivo.

LISTAS DE ABREVIATURAS SIGLAS E SIMBOLOS

| | |
|-------------|---|
| AA | Astrocitoma Anaplásico |
| AP | Álcool perfílico |
| BHE | Barreira hematoencefálica |
| DCC | <i>Deleted in Colon Cancer</i> |
| CDKs | <i>Cyclin-Dependent Kinase</i> |
| CDKN2A | <i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i> |
| DMBT1 | <i>Deleted in Malignant Brain Tumors 1</i> |
| EGFR | Receptor do fator de crescimento epitelial |
| ERK | Cinase regulada por sinal extracelular; do inglês <i>extracellular signal-regulated kinase</i> |
| GBM | Glioblastoma multiforme |
| Grb2 | Growth factor receptor-bound protein 2 |
| kDa | kilo Dalton |
| LOH | perda de heterozigosidade. |
| MAPK | Cinase ativada por mitogeno; do inglês Mitogen activated kinase |
| MDM2 | <i>Murine Double Minute clone 2.</i> |
| PDGFR | Receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas |
| pRb | proteína do retinoblastoma |
| p16 | Proteína de 16 kDa |
| p21-Ras | Oncoproteína de 21 kDa |
| p53 | Proteína de 53kDa |
| PTEN/MMAC1- | <i>Phosphatase and Tensin homology / Mutated in Multiple Advance Cancer 1</i> |
| RAF | Proteína serina treonina quinase específica, derivada do inglês <i>Rapidly Accelerated Fibrosarcoma</i> |
| Shc | <i>SHC-transforming protein 1</i> |
| SNC | Sistema nervoso central |
| TP53 | Gene de proteína de supressão tumoral P53 |

1 Introdução

A maioria das neoplasias surge a partir da expansão clonal de uma única célula que sofreu transformação neoplásica causada por agentes que direta e irreversivelmente afetaram genes que controlam o ciclo celular, e que, no sistema nervoso central estão implicados na iniciação dos tumores de origem glial e na progressão para o glioma de alto grau (Brat, D.J. et al, 2007; Scheithauer, B.W. et al, 2008; Rosenblum, M.K., 2007). Uma característica importante das células neoplásicas é a instabilidade genômica e a capacidade de sofrer uma rápida mudança influenciada pelas interações com o microambiente tumoral (Shipitsin, M. and Polyak, K., 2008). Gliomas podem ocorrer em todo o cérebro, porém usualmente afetam os hemisférios cerebrais e de acordo com a interação com o microambiente cerebral podem ser localizados ou difusos (Arismendi-Morillo, 2005). Os astrocitomas localizados têm um padrão de crescimento circunscrito e limitado potencial invasivo, diferente dos astrocitomas difusos, que são caracterizados por elevada invasividade (Cassoni, P. et al, 2007). Dentre os gliomas de alto grau, a faixa etária de início dos sintomas situa-se entre a 4ª e 5ª décadas nos Astrocitomas Anaplásicos (AA) e a partir da 6ª década no glioblastoma multiforme (GBM) primário, mas a prevalência em adultos jovens (45 anos ou menos) é também observada no GBM secundário (Keihues, P. et al, 2000; DeAngelis, L. M., 2001).

Glioma maligno, o mais comum dentre os tumores primários do tecido cerebral, é um tumor bastante agressivo, altamente invasivo e com marcante heterogeneidade histológica (Nutt, C.L. et al, 2003). O crescimento da massa tumoral promove também a

proliferação de astrócitos normais que circundam o tumor, provoca gliose reativa e a indefinição dos limites de distinção entre tumor e tecido normal adjacente. Os exames neuroradiológicos podem evidenciar áreas com alto percentual de células com intensa angiogênese sem diferenciação da característica celular proliferativa (Padma, M.V. et al, 2003). Um dos impedimentos para eficácia do tratamento convencional preconizado de ressecção cirúrgica, radioterapia, quimioterapia e/ou terapia genética, tem sido o grau de invasividade das células gliomatosas no tecido circundante e o microambiente peritumoral (Mitchell, P. et al, 2005). O modelo biomatemático de proliferação e migração dos gliomas propõe que o crescimento de tumores na substância cinzenta profunda cerebral, teria um intervalo de tempo maior comparado a lesões situadas na substância branca - lobar, onde a invasão e a migração seriam mais rápidas (Harpold, H.L. et al, 2007; Swanson, K.R. et al, 2007). Células gliais transformadas interagem com células estromais no microambiente e invadem preferencialmente estruturas com axônios mielinizados, a membrana basal vascular e o subepêndima (Lefranc, F., 2007). Essas interações parecem também influenciar na sobrevivência do paciente.. Estes dados indicam o papel crítico que o microambiente tem na iniciação e progressão tumoral e as manifestações clínicas mais precoces em pacientes com glioma profundo.

O edema peritumoral parece também ser um fator determinante na sintomatologia por causar efeito de massa, que resulta em aumento da pressão intracraniana, seguido de distúrbios neurológicos devido à perda da homeostase tecidual pela redução do fluxo sanguíneo cerebral e hipóxia. O edema peritumoral está geralmente associado com a menor sobrevida e alta recidiva dos pacientes com glioma maligno. Isto indica-o como um fator adicional a ser considerado ao se traçar estratégias terapêuticas para tumores cerebrais de alto grau (Kostic, A. et al, 2007). Embora a padronização do uso de corticosteróides tenha melhorado os sintomas nos estágios

iniciais, seu uso de forma prolongada nos pacientes com glioma maligno recidivo causa efeitos colaterais marcantes. A visão simplificada de uma entidade única tumor-edema provavelmente não procede porque, contrastando com o edema que circunda metástases ou meningiomas, o edema peritumoral associado ao glioma de alto grau caracteriza-se por extensa angiogênese e infiltração de células tumorais (Stummer, W., 2007; Wick, W. et al, 2004). Estes dados mostram a importância de um melhor entendimento dos mecanismos de patogênese do edema peritumoral visando desenvolvimento de estratégias adequadas para sua inibição (Wick W. et al, 2004).

O presente estudo correlaciona a resposta terapêutica da administração intranasal do AP com a topografia tumoral e o edema peritumoral em uma série clínica de pacientes adultos com glioblastoma recidivo. Em virtude da compreensão das etapas de proliferação e migração da célula tumoral ser aspecto importante para buscar novos procedimentos terapêuticos, procuramos discutir a influência do microambiente tumoral e sua influência na progressão e invasão do glioma maligno.

2. Revisão da literatura

2.1 Aspectos gerais da biologia molecular do glioblastoma

A ativação de vias moleculares distintas de sinalização intracelular pode determinar o processo de progressão tumoral para glioma de alto grau (GBM). Uma via comumente observada em pacientes jovens é aquela que ocorre a partir dos astrocitomas grau II ou III para GBM secundário; outra típica, em pacientes idosos sem história precedente de astrocitoma de baixo grau, é o GBM primário ou *de novo*, com origem de células precursoras transformadas (Kanu, O.O. et al, 2009). GBM secundário apresenta perda da heterozigose (LOH) em regiões do cromossomo 10 (10p, 10q23, 25, 26). O gene supressor tumoral *PTEN/MMAC1* (*Phosphatase and Tensin homology / Mutated in*

Multiple Advance Cancer 1) situado no cromossomo 10q23, também pode apresentar mutação (Liu, W. et al, 1997). O gene supressor tumoral *DCC* (*Deleted in Colon Cancer*) localizado no cromossomo 18q21 está ausente em 7% dos astrocitomas de baixo grau e 55% dos pacientes com GBM sugerindo sua participação na gênese desses tumores (Scheck, A.C. et al, 1993; Rao, S.K. et al, 2010). Um possível gene supressor tumoral, o *DMBT1* (*Deleted in Malignant Brain Tumors 1*) situado no cromossomo 10q25-26 encontra-se ausente em 23% a 38% dos pacientes com GBM secundário (Pang, J.C. et al, 2003). Na maioria dos pacientes com GBM primário, ou *de novo*, ocorre amplificação do *EGFR*, um receptor tirosina quinase envolvido no controle da proliferação celular, simultaneamente com a perda do cromossomo 10. Dados da literatura mostram que menos de 10% dos pacientes com GBM primário apresentam mutação do gene supressor *TP53* situado no braço curto do cromossoma 17 (17p13-1), mas sem superexpressão de *EGFR* (Ohgaki, H. et al, 2004). Isto indica que esses eventos são mutuamente exclusivos, reiterando a diferença entre a progressão para tumores *de novo* e secundários, onde é detectada com maior frequência a mutação de *TP53*. Contudo, a atividade transcricional da proteína p53 no GBM primário está algumas vezes abolida devido à formação de complexos com a proteína *MDM2* (Ries, S. et al, 2000). O gene *MDM2* encontrado no cromossomo 12q13-14 está superexpresso em 50% dos pacientes com GBM primário.

Um fator crítico na progressão do astrocitoma de baixo grau para GBM pode ser a falta de regulação do gene *CDKN2A* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*) que ocasiona a perda da expressão do gene supressor tumoral *p16*, a superexpressão e amplificação de *CDKs* (*Cyclin-Dependent Kinase*) e a fosforilação da pRb. A ativação dessas vias é observada em 40% dos pacientes com GBM primário contrastando com 4% nos pacientes com GBM secundário (Chen, K.A. et al, 2006). O aumento na

expressão e ativação dos receptores *EGFR* e *PDGFR* (Arjona, D. et al, 2006) ativa a via da tirosina quinase e a sinalização da Ras (Bredel, M. and Pollack, I.F., 1999). Estudos moleculares sugerem que mutações em genes específicos e aberrações cromossômicas estão envolvidas na progressão tumoral dos gliomas (Tsuda, T. et al, 1995). De fato, 45% dos gliomas apresentam alterações em *TP53* e no cromossomo 17, e 40% apresentam amplificação do gene *EGFR* (Heimberger, A.B. et al, 2005). Os gliomas de alto grau apresentam baixa mutação na p21-Ras (Feldkamp, M.M. et al, 1997), porém alguns estudos mostram ativação acentuada dessa oncoproteína (Kanamori, M. et al, 2004; Guha, A. et al, 1997; Guha, A., 1998). Os mecanismos de ativação excessiva da p21-Ras no glioma de alto grau decorrem tanto da ativação direta como da expressão aumentada dos fatores de crescimento e seus receptores afins (Arvanitis, D. et al, 1991). Existem evidências mostrando que em comparação com o tecido cerebral normal, a expressão da Ras (N-Ras, H-Ras e K-Ras) está aumentada nas células de glioma de alto grau relacionando o aumento na expressão com a atividade proliferativa, malignidade e progressão dos tumores gliais (Zhao, Y. et al, 2008; Salgaller, M. et al, 1990). A diferença na expressão de N-Ras entre GBM recém diagnosticado (inicial) e o GBM recidivo enfatiza a estreita relação entre a expressão elevada de Ras e malignidade tumoral (Tsurushima, H. et al, 1996).

A estimulação dos receptores *PDGFR* e *EGFR* induz a fosforilação do adaptador de proteína Shc e sua associação com Grb2 (proteínas que exercem função central na sinalização dos receptores tirosina quinases), o que sugere um mecanismo pelo qual a via mitogênica da Ras pode ser ativada nas células de glioma maligno humano (Guha, A. et al, 1997; Guha, A., 1998). Este processo por via mitogênica pode levar ao estado de ativação funcional excessivo dessa oncoproteína semelhante ao cenário encontrado nas células que expressam mutação da Ras. Em conjunto, esses estudos sinalizam que a

aplicação de estratégias terapêuticas seletivamente direcionadas para neutralizar alterações na regulação da via de transdução do sinal da p21-Ras podem ser bloqueadores promissores da proliferação anormal dos gliomas malignos (Pincus, M.R. et al, 2000).

2.2 Álcool perílico e inibição da p21-Ras nos gliomas de alto grau

Atualmente, o desenvolvimento de novos produtos terapêuticos visa uma ação específica em determinadas proteínas de membrana, processos e/ou vias de sinalização relacionadas com a tumorigênese, como por exemplo, a apoptose; inibidores da proteína tirosina quinase, inibidores da angiogênese e inibidores da farnesiltransferase (Berzat, A.C. et al, 2005), de modo a aumentar a seletividade e diminuir a toxicidade dos tratamentos quimioterápicos e radioterápicos não específicos.

Os terpenos são compostos lipofílicos da família dos isoprenóides sendo formados de múltiplas unidades de cinco átomos de carbono (Solomons, T.W.G., 1996). Os terpenos desempenham diversas funções como hormônios (giberelinas e ácido abscísico), pigmentos fotossintéticos (fitol e carotenóides), transportadores de elétrons (ubiquinona e plastoquinona), mediadores na formação de complexos de polissacarídeos (poliprenil fosfatos) e componentes estruturais de membrana (fitoesteróis) (McGarvey, D.J. and Croteau, R., 1995; Grabmann, J. and Gerald, L., 2005). Apresentam alta volatilidade, e são obtidos a partir de fragmentos de plantas e disponibilizados como óleos essenciais, resinas e ceras, com grande utilização na indústria de cosméticos, fitoterápicos e polímeros (Crowell, P. et al, 1994; McGarvey and Croteau, 1995]. As principais classes de terpenos encontrados na natureza são: hemiterpenos (C₅), monoterpenos (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅), diterpenos (C₂₀), sesterterpenos (C₂₅),

triterpenos (C30), tetraterpenos (C 40) e politerpenos (C 50) (Solomons, T.W.G., 1996; Bailly, C., 2009; Chaudhary, S.C. et al, 2009).

Álcool perílico (Figura 1), com estrutura química p-meta-1,7-dieno-6-ol ou 4-isopropenil-ciclohexeno-carbinol é um monoterpene natural monocíclico hidroxilado isolado a partir do óleo essencial de lavanda, sálvia, hortelã, erva-doce, menta, cerejas, sementes de aipo, casca de frutas cítricas dentre várias outras plantas (Belanger, J., 1998; Greenwald, P., 2004; Bhatia, S.P. et al, 2008; Bailly, C., 2009).

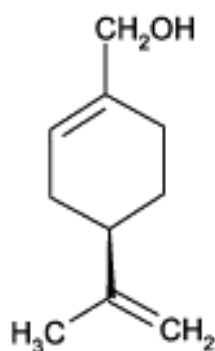


Figura 1. Fórmula estrutural do álcool perílico.

Estudos em animais mostram que o AP é um agente quimioterápico e quimiopreventivo eficaz na regressão de tumores sólidos, (Haag, J.D. et al, 1994; Lluria-Prevatt, M. et al, 2002; Greenwald, P., 2004; Burke, Y.D. et al, 2002; Bailey, H.H. et al, 2004; Chung, B. H. et al, 2006). O AP inibe a farnesilação da proteína Ras e consequentemente a via de transdução da sinalização de fatores de crescimento associados com a neoangiogênese, a indução de morte celular por apoptose (Loutrari, H. et al, 2004; Chaudhary. S.C. et al, 2009; Fernandes, J. et al, 2005) e também a enzima Na^+/K^+ ATPase (Guldenhaupt. J, et al, 2008; Garcia, D.G. et al, 2010). A ativação da Ras ativa consequentemente a cascata de fosforilação das serina e treonina quinases como a RAF e das quinases ativadas por mitógenos (*MAPK*) que são responsáveis pela

fosforilação de várias proteínas citosólicas e nucleares, incluindo outras proteínas quinases e fatores de transcrição responsáveis pela proliferação celular (Rowinsky, E.K. et al, 1999; Bonni, A. et al, 1999) (Figura 2). O ácido trans-farnesil thiosalicílico, também um inibidor da farnesilação da Ras S-trans, diminui a atividade da Rac-1 e promove alterações marcantes na morfologia, na reorganização da actina e montagem de adesões focais de células de glioblastoma humano, e, desta maneira inibe a migração, proliferação, ancoragem e a transformação celular (Goldberg, L. and Kluog, Y, 2006).

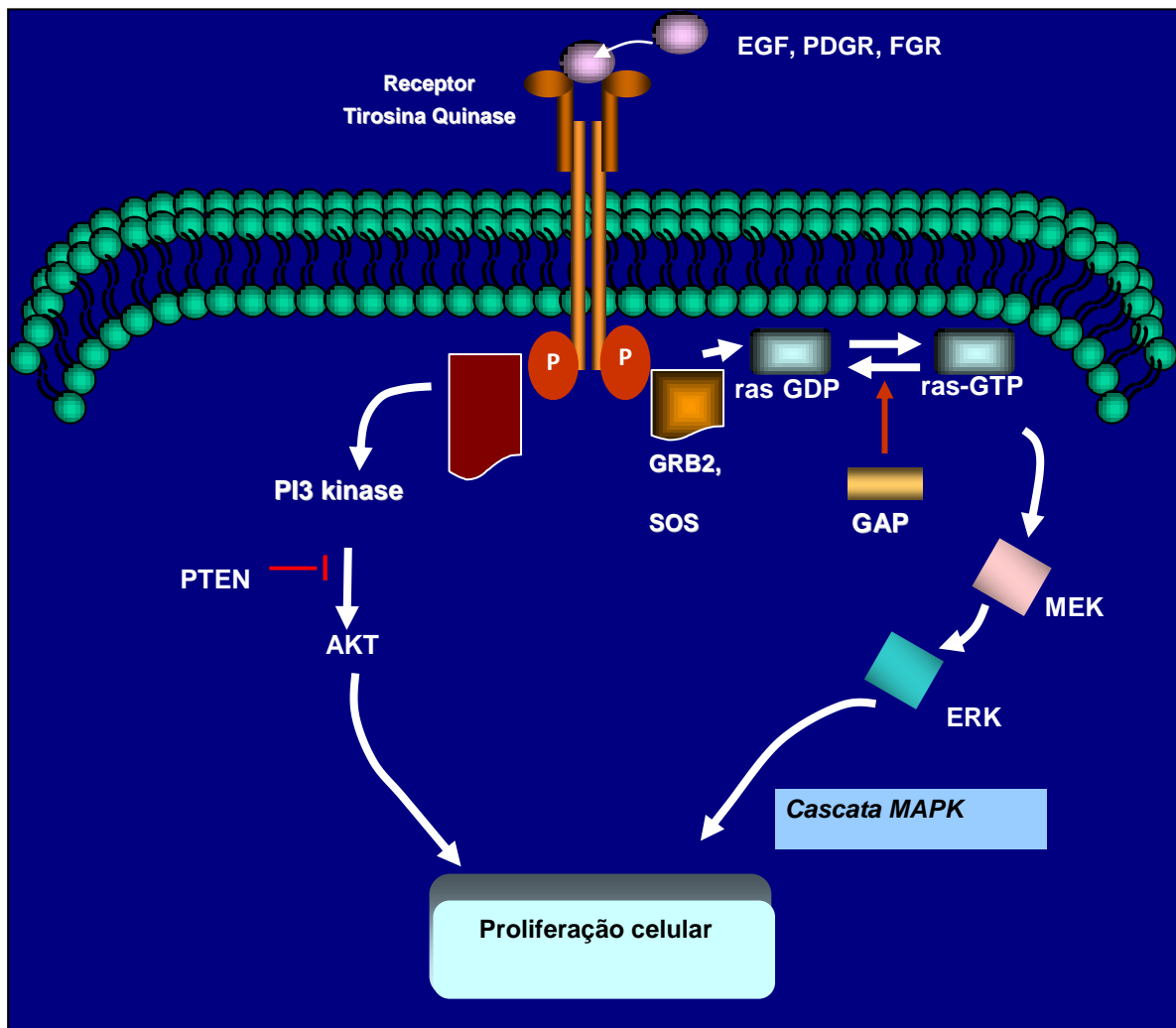


Figura 2. Ativação da cascata das quinases: serina/treonina quinases (RAF, MEK) e proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) (Pan J. et al., 2005).

2.3 Administração intranasal de princípio ativo

A utilização da via de administração intranasal terapêutica para o cérebro como estratégia para tratar doenças neurológicas foi proposta pela primeira vez e patenteado em 1989 por William H. Frey (Thorne, R.G. et al, 2004). Medicamentos aplicados por via intranasal exercem sua ação no trato respiratório superior, com atuação na região das fossas nasais, faringe e laringe. A intensidade da resposta terapêutica sistêmica obtida por essa via deve-se à elevada vascularização da mucosa nasal, a sua extensa superfície com aproximadamente 150 cm^2 , e, não incorre no efeito de metabolização sistêmica com inativação, na primeira passagem hepática (Oliveira, M.C., 2003). As preparações nasais de uso tópico geralmente visam a obtenção dos efeitos de vasoconstrição, antiinflamatório ou antiinfecioso. O interesse da utilização dessa via para efeito sistêmico aplica-se, sobretudo, à moléculas sensíveis a degradação por enzimas do trato gastrointestinal (Oliveira, M.C., 2003). A administração medicamentosa do AP pela via parenteral (subcutânea, intramuscular e endovenosa) tem se mostrado ser desconfortável aos pacientes, comprometendo a adesão do paciente ao tratamento. A via intranasal tem sido usada como alternativa para aplicação de princípios ativos, hormônios e medicamentos, tais como insulina, progesterona, metoclopramida, propranolol, dihidroergotamina, desmopressina, atropina, vitamina B12 (Oliveira, M.C., 2003; (Ducharme, N. et al, 2010). Estudos clínicos mostram um aumento de seis vezes na concentração sanguínea, velocidade de absorção em dobro e um aumento de 2,5 vezes nas quantidades mensuráveis de vitamina B12 até 48 horas após sua administração (Vyas, T.K. et al, 2005). Entre as vantagens da administração nasal está o fato de ser um método não invasivo; a rica vasculatura e alta permeabilidade da mucosa nasal acentua a absorção do agente terapêutico, ultrapassando facilmente a barreira hematoencefálica (BHE) com acesso direto ao

sistema nervoso central (SNC), e não requer nenhuma modificação do agente terapêutico; proporciona aplicação de drogas combinadas e faz com que os níveis sistêmicos e a atividade farmacológica sejam alcançados rapidamente e com mínimos efeitos colaterais.

Moléculas administradas por via intranasal após a passagem pela placa cribiforme atingem o lobo olfatório seguindo uma rota de distribuição que inclui o líquido cefalorraquidiano e o parênquima cerebral. Desta maneira atingem concentrações elevadas em menos de 10 minutos principalmente no líquido cefalorraquidiano, nervo trigêmeo e através de distribuição rostral e caudal difunde-se do lobo olfatório ao hipocampo, hipotálamo, região do tronco cerebral e cerebelo (Shi, Z, et al 2005; Hashizume, R. et al, 2008; Danielyan, L. et al, 2009; Dhuria, S.V. et al, 2010; Ducharme, N. et al, 2010).

Numerosos princípios ativos podem ser preparados na forma de soluções ou suspensões nasais com princípio ativo suficientemente volátil facilitando a inalação e absorção principalmente de substâncias lipofílicas com baixo peso molecular que são bem absorvidas pela mucosa nasal através da via transcelular (Capsoni, S. et al, 2002) (Danielyan, L. et al, 2009). No caso de princípio ativo hidrofílico como peptídeos e proteínas, o fator importante para sua absorção parece ser a massa molar e a biodisponibilidade é inversamente proporcional à massa molar: moléculas menores são rapidamente absorvidas indicando um mecanismo de absorção por difusão, através dos poros aquosos da mucosa nasal (Shi, Z. et al, 2005; Danielyan, L. et al, 2009; Ducharme, N. et al, 2010).

3 Objetivo geral

Estudos clínicos prévios do grupo mostraram uma sobrevida global diferente entre pacientes portadores de glioma maligno incluídos no protocolo do álcool perfílico. Neste contexto, este trabalho propõe estabelecer uma possível correlação entre a localização da lesão tumoral e da extensão do edema peritumoral com a resposta terapêutica a administração intranasal do álcool perfílico (AP) em pacientes com GBM recidivo após tratamento convencional.

3.1 Objetivos específicos

- 1- Comparar a eficácia do monoterpene álcool perfílico administrado pela via inalatória na sobrevida global de pacientes com glioblastoma recidivo versus grupo controle.
- 2- Comparar o efeito do monoterpene álcool perfílico administrado pela via inalatória com a localização topográfica da lesão.
- 3- Comparar o efeito do monoterpene álcool perfílico administrado pela via inalatória com a extensão do edema peritumoral e desvio da linha média nos pacientes com glioblastoma recidivo.

4 Metodologia

4.1 População de estudo

Coorte composta por 119 pacientes com diagnóstico comprovado de glioblastoma recidivo matriculados no Hospital Universitário Antonio Pedro – UFF e referenciados de outros Serviços em acompanhamento clínico no ambulatório do Serviço de Neurocirurgia. Desse total, 52 pacientes com GBM recidivo em tratamento paliativo sintomático formaram o grupo controle não pareado e 67 o grupo de estudo de pacientes incluídos de acordo com critérios de elegibilidade, no “Estudo fase I/II do monoterpene álcool perílico em pacientes com glioma recidivo”. Todos os pacientes foram amplamente esclarecidos dos protocolos de estudo, inclusive sendo disponibilizado documentos de autorização do estudo pelos comitês de ética do governo Federal, da UFF e da UFRJ. O projeto foi aprovado pelo Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) com registro número (CONEP 9681 nº 25000.009267/2004-25 aprovado em Julho de 2004) (Anexo I). O consentimento livre e informado foi lido pelo investigador ao paciente e/ou seu familiar responsável e a anuência foi formalizado pela assinatura do documento de consentimento livre e informado fornecido pela equipe de investigadores.

4.2 Critérios de elegibilidade para inclusão

Foram incluídos pacientes com GBM recidivo com idade entre 20 e 80 anos (28 – 78 anos) no ato de entrada no programa e Escore de Karnofsky ≥ 70 (Anexo III), independentemente de gênero, etnia e tempo de recidiva do tumor. Como critérios de elegibilidade foram considerados: tratamento prévio convencional específico para este tipo de tumor (ablação cirúrgica, radioterapia e/ou quimioterapia); os valores basais dos exames laboratoriais de rotina bioquímica do sangue e hematológicos; a avaliação

cardiológica (ritmo cardíaco sinusal); avaliação de imagem pulmonar (ausência de lesão parenquimatosa). Os critérios de inclusão foram seguidos de modo rigoroso.

4.2.1 Critérios para inclusão em grupo controle

Foram incluídos no grupo controle pacientes com GBM recidivo com idade entre 20 e 80 anos (28 – 78 anos) no ato de entrada no programa e Escore de Karnofsky < 70 (Anexo III), independentemente de gênero, etnia e tempo de recidiva do tumor. Foram considerados os critérios de elegibilidade para inclusão no programa e sua associação à presença de deterioração neurológica importante pela lesão cerebral, o comprometimento de áreas eloqüentes vitais em hemisfério dominante e a ocorrência de localização topográfica bilateral com acometimento de ambos os hemisférios, atravessando a linha média. Foi considerado também o grau de incapacidade neurológica cognitiva e a necessidade de hospitalização e/ou assistência domiciliar. Como critérios de elegibilidade foram considerados: tratamento prévio convencional específico para este tipo de tumor (ablação cirúrgica, radioterapia e/ou quimioterapia); os valores basais dos exames laboratoriais de rotina bioquímica do sangue e hematológicos; a avaliação

4.3 Critérios de inelegibilidade

Não foram incluídos: pacientes com doença maligna sistêmica; mulheres grávidas ou amamentando; tratamento prévio ou concomitante com qualquer droga experimental nos últimos 90 dias; metástases à distância; alteração nas provas de função hematológica, renal, cardiovascular ou hepática; infecção em atividade; presença de doença concomitante sem controle clínico adequado que pudesse interferir na sua inclusão no estudo.

4.4 Proposta de tratamento

Os pacientes receberam recomendação informando os procedimentos para utilização do AP pela via inalatória. O volume (23 gotas) equivalente a 55mg de álcool perfílico a 96% acondicionado num frasco de vidro âmbar de tampa rosqueada deveria ser diluído em 3 ml de água mineral natural no reservatório do nebulizador no momento do uso, e, com a prescrição para 4 vezes ao dia. Inicialmente a administração totalizava 220 mg ao dia seguido de dosagens crescentes até atingir 46 gotas, totalizando 440 mg ao dia (Anexo II). A recomendação foi para armazenar a medicação em ambiente refrigerado (geladeira) após a preparação da solução para nebulização e efetuar as nebulizações antes das refeições.

4.5 Avaliação clínica e laboratorial

Os pacientes foram examinados mensalmente durante o tratamento, pelo período mínimo de 06 meses e acompanhados clinicamente através de exames de sangue, urina, tomografia de tórax e tomografia computadorizada e/ou ressonância nuclear magnética (RNM) do crânio a cada 3 meses. A toxicidade foi avaliada de acordo com critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS), avaliando-se os parâmetros:

- Hematológicos e bioquímicos, com recomendação para descontinuação da medicação e exclusão do protocolo caso houvesse mudança acentuada nos valores basais;
- Neurológicos: evidência clínica de neuropatia periférica ou neuropatia autônoma causando constipação temporária ou persistente, implicando em suspender por duas semanas ou descontinuar o tratamento;
- Renal: caso os valores de creatinina sérica fossem maiores do que 1,3 mg/dL foi atrasado por 1 semana a administração do AP e repetido o exame após este período;

na persistência da alteração (superior a 1,3 mg/dL) o paciente era excluído do estudo;

- Ototoxicidade: exame clínico otológico evidenciando perda da audição (grau 3) implicaria na suspensão e exclusão do protocolo

O uso de medicações auxiliares pelos pacientes foi permitido quando recomendado pelos médicos participantes do estudo, devendo ser especificadas no cadastro e relacionadas pelo nome genérico, dose, tempo de tratamento, via de administração e indicação. Os pacientes não fizeram uso de outros agentes e protocolos experimentais. Os pacientes foram informados a reportar imediatamente ao corpo clínico responsável do projeto a ocorrência de qualquer efeito colateral, considerando-se evento adverso qualquer evento indesejável associado com a utilização do AP, tais como toxicidade ou reações de sensibilidade, além de qualquer alteração laboratorial ou clínica incomum. Como evento adverso sério foi considerado qualquer evento que incluísse risco imediato de morte, necessitando hospitalização e/ou que fosse incapacitante, levando a imediata suspensão da administração do AP.

4.6 Avaliação de parâmetros de neuroimagem

Os parâmetros avaliados incluíram as características clínicas e os achados de neuroimagem. O método de estimativa simples cartesiana do volume tumoral intracraniano conhecido como XYZ/2 ou ABC/2 foi utilizado para avaliação inicial. Foram revisadas todos os exames de neuroimagem dos 67 pacientes com tumoração hemisférica unilateral. A avaliação subsequente da extensão peritumoral foi realizada através de RMN por técnica voxel-a-voxel, através de imagens por perfusão e medições simples construídas em T1 e hipersinal em T2 para o volume do tumor, subtraídas. A análise volumétrica assistida por computador foi considerada como padrão-ouro. As imagens tumorais foram marcadas pelo radiologista em cada corte axial. O uso de programas de computação em estações DICOM permitiu que fosse determinada a área

tumoral exata de cada corte em cm^2 . A soma de cada volume encontrado determinou o volume tumoral total. Nas imagens de tomografia computadorizada (TC) ou ressonância magnética (RM) foram considerados dados importantes a localização da lesão tumoral (lobar ou talâmica) e o tamanho (em cm^2). A extensão do edema peritumoral e os efeitos de massa causando o desvio da linha média (todos em cm) foram avaliados no início e no decorrer do tratamento com a administração intranasal do AP. Tumores lobares foram definidos como qualquer lesão tumoral que não envolvia os gânglios basais.

Todos os tumores limitados aos gânglios da base ou envolvendo-os foram classificados como lesões de substância cinzenta profunda. O tamanho do tumor foi mensurado por neuroimagem em reforço de contraste-axial usando a escala dos maiores diâmetros perpendicular da lesão. O tamanho do edema peritumoral foi medido nos mesmos cortes axiais utilizados para medições do tamanho do tumor, subtraindo o tumor do diâmetro do edema. A comparação foi mantida constante com o mesmo tipo de imagem axial (TC ou RM).

4.7 Avaliação de resposta ao tratamento

A resposta terapêutica foi avaliada por periodicidade de 30 dias utilizando-se indicadores de tratamento laboratoriais e através de neuroimagem realizada após 3 e 6 meses, do início da administração do álcool perfílico. Os indicadores de avaliação obedeceram ao seguinte critério:

Resposta completa - desaparecimento da doença vista ao exame clínico e por exame de imagem, sem uso de corticosteróides.

Resposta parcial - redução de mais de 50% do volume tumoral ao exame de imagem e com uso de corticosteróides

Doença estável - sem alteração do volume tumoral ou do quadro clínico

Ausência de resposta e progressão da doença - aumento em 25% do volume tumoral e/ou aparecimento de nova lesão

4.8 Análise estatística

A associação das variáveis categóricas com a sobrevida foi avaliada utilizando curvas de Kaplan-Meier e teste log-rank, e o significado das variáveis contínuas utilizando modelos de regressão Cox univariada. As variáveis que foram associadas com a sobrevida em análise univariada ($p = 0,3$) foram consideradas potenciais para inclusão no modelo multivariado.

5 Resultados

O grupo controle de 52 pacientes com glioma recidivo era constituído por 30 homens e 22 mulheres (razão 1:36) com idade média de 60 anos (42 a 78). O grupo de estudo deste estudo era formado por 67 pacientes com glioma recidivo (38 homens e 29 mulheres) com idade média de 50 anos (42 a 72).

Nesta coorte com 67 pacientes avaliamos isoladamente a sobrevida global dos pacientes com GBM recidivo. Comparamos a taxa de sobrevida dos pacientes com glioma recidivo tratados com o AP por via inalatória versus 52 pacientes com GBM recidivo sob tratamento paliativo de suporte clínico. Os resultados mostram uma diferença significativa ($P < 0,0001$) na sobrevida global, onde àqueles incluídos no protocolo de tratamento com AP apresentaram sobrevida maior do que o grupo controle (Figura 3)

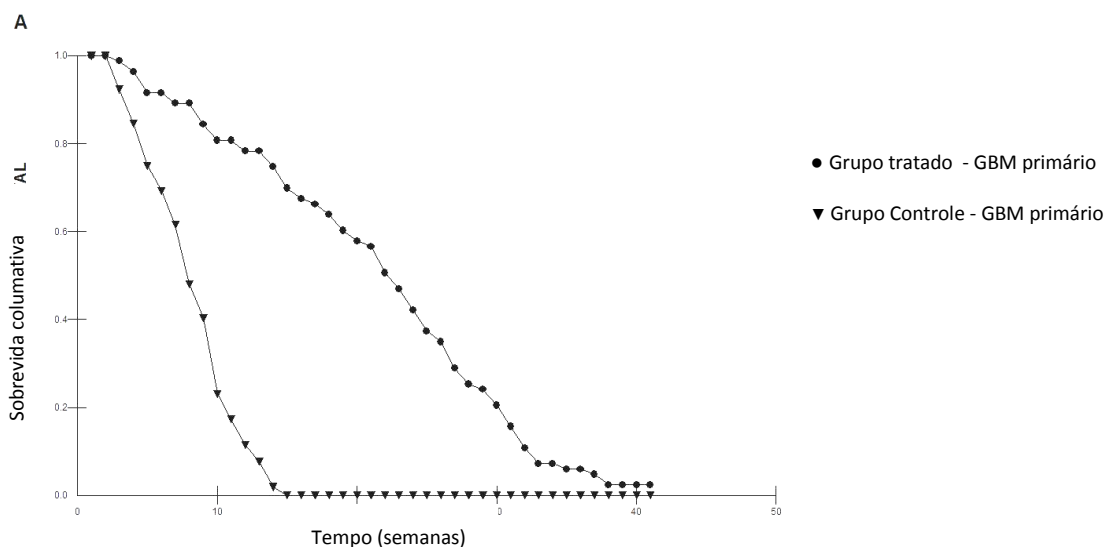


Figura 3 - Curva de sobrevida global de pacientes em tratamento com AP e grupo controle. Estimador de Kaplan-Meier mostrando diferença significativa ($P < 0,0001$) na sobrevida global dos pacientes com uma recorrência GBM primário tratados com AP e grupo sem tratamento.

Nossas observações também indicaram diferentes taxas de sobrevida global entre os pacientes com GBM recidivo tratados com AP. A análise de acordo com a topografia tumoral para estabelecer possível influência de diferentes microambientes no crescimento tumoral mostrou que 53 pacientes apresentavam lesão com localização lobar e 14 de localização talâmica (Tabela 1). Todos os pacientes com tumor inicial com localização lobar foram tratados previamente com cirurgia, radioterapia e quimioterapia, enquanto aqueles com localização nos gânglios da base foram submetidos à biopsia (sem ablação cirúrgica) e depois radioterapia e quimioterapia.

A sobrevida livre de progressão no 6º mês dos pacientes com GBM recidivo tratados com AP foi de 61% nos pacientes com tumor com localização talâmica e 39% dos pacientes com localização lobar. Os pacientes com tumor localizado nos gânglios basais apresentaram sobrevida significativamente maior (teste log rank: $p = 0,0001$) que aqueles com lesão tumoral com localização na região lobar (Figura 4).

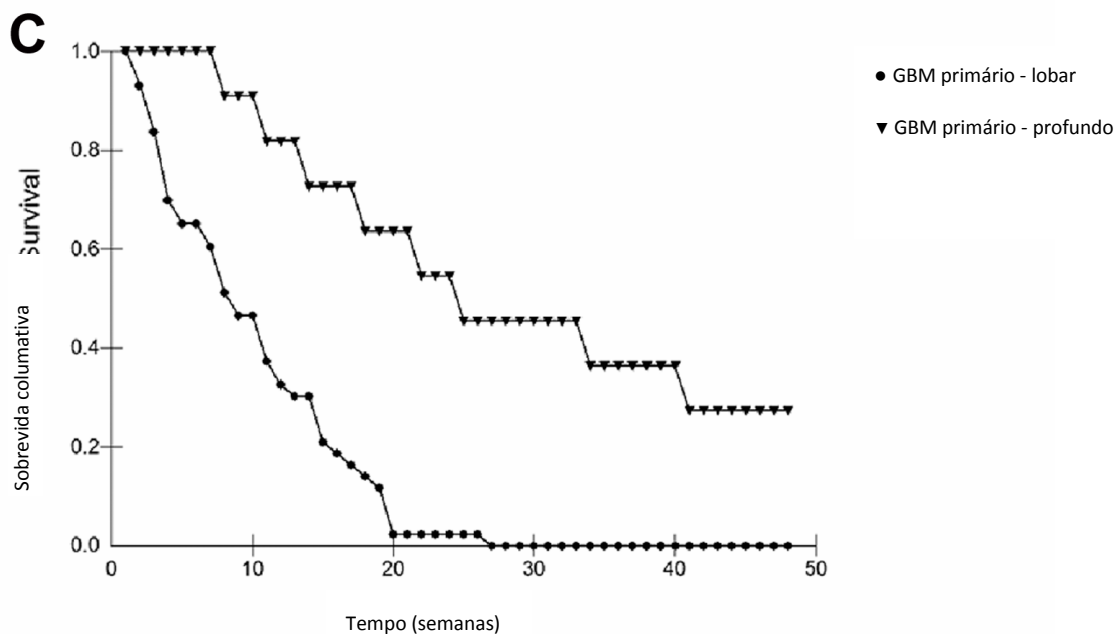


Figura 4 – Curva de sobrevida total de acordo com a localização do tumor. Curva de Kaplan-Meier mostrando diferença de sobrevida num período de 50 semanas de acordo com a localização lobar e talâmica em pacientes com glioma primário recidivo tratado com AP pela via inalatória.

| | Lobar | Profundo | Controle |
|---|------------|------------|-----------------|
| Total de pacientes | 53 | 14 | 52 |
| Idade | | | |
| Média | 50 | 54 | 63 |
| Limite | 28 - 72 | 42 - 66 | 42 - 78 |
| Gênero | | | |
| Homens | 30 | 8 | 30 |
| Mulheres | 23 | 6 | 22 |
| Tratamento de tumor inicial | | | |
| Ablação cirúrgica | 100% | 0 | 0 |
| Biópsia | 0 | 100% | 100% |
| Radioterapia | 100% | 100% | 100% |
| Quimioterapia | 100% | 100% | 100% |
| Sobrevida livre de progressão | | | |
| (6° mês) | 48,2% | 61% | 0% (média 2.3m) |
| Edema no tumor inicial (RNM) | | | |
| Ausente | 6 (8,3%) | 2 (10,5%) | 0 |
| <5 cm | 26 (37,2%) | 13 (68,4%) | 0 |
| > 5 cm | 38 (54,6%) | 4 (21%) | 52 (100%) |
| Edema no tumor recidivo (RNM) | | | |
| < 5 cm | 26 (37,1%) | 16 (84,2%) | 0 |
| > 5 cm | 44 (62,9%) | 3 (15,7%) | 52 (100%) |
| Desvio de linha média no tumor inicial (RNM) | | | |
| Ausente | 10 (15,3%) | 4 (25%) | 0 |
| < 1 cm | 26 (37%) | 7 (36%) | 0 |
| > 1 cm | 34 (44%) | 8 (38%) | 52 (100%) |
| Desvio de linha média no tumor recidivo (RM) | | | |
| Ausente | 0 | 0 | |
| < 1 cm | 24 (35,5%) | 16 (84,2%) | 0 |
| > 1 cm | 46 (64,5%) | 3 (15,7%) | 52 (100%) |

Tabela 1. Características dos pacientes com glioblastoma primário recidivo.

A Figura 5 ilustra a imagem da ressonância magnética do crânio de um paciente com tumor em região profunda apresentando dimensão e volume maior que 5 cm no momento da sua inclusão no projeto e a imagem obtida 6 meses após o tratamento com AP administrado pela via inalatória. Nota-se claramente redução da lesão em aproximadamente 2 cm, redução do edema peritumoral e discreto desvio da linha média. Em contraste, pacientes com tumor na região lobar (Figura 6) apresentaram uma resposta desfavorável ao tratamento com AP pela via inalatória, não sendo observada redução significativa da massa tumoral. Eventualmente, esses pacientes após uma pequena redução inicial, apresentaram aumento significativo da massa tumoral. Um caso ilustrativo é a imagem de RNM obtida no momento da inclusão de paciente no protocolo e após 6 meses do início de tratamento com AP mostrando aumento da lesão.

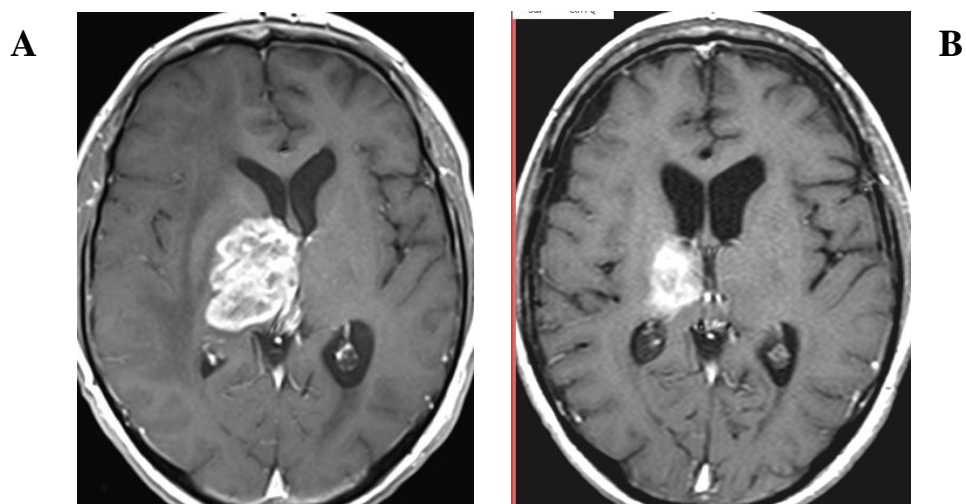


Figura 5. _ Imagem ilustrativa de glioma com lesão na região profunda. Ressonância Nuclear Magnética de paciente com glioblastoma recidivo. Axial T1 com contraste evidencia lesão ovalada com realce heterogêneo pelo gadolínio, comprometendo notadamente o tálamo direito e comprimindo o terceiro ventrículo (A). Observa-se redução das dimensões da lesão e desaparecimento do efeito compressivo sobre o terceiro ventrículo (B) após 6 meses de tratamento com AP administrado pela via inalatória.

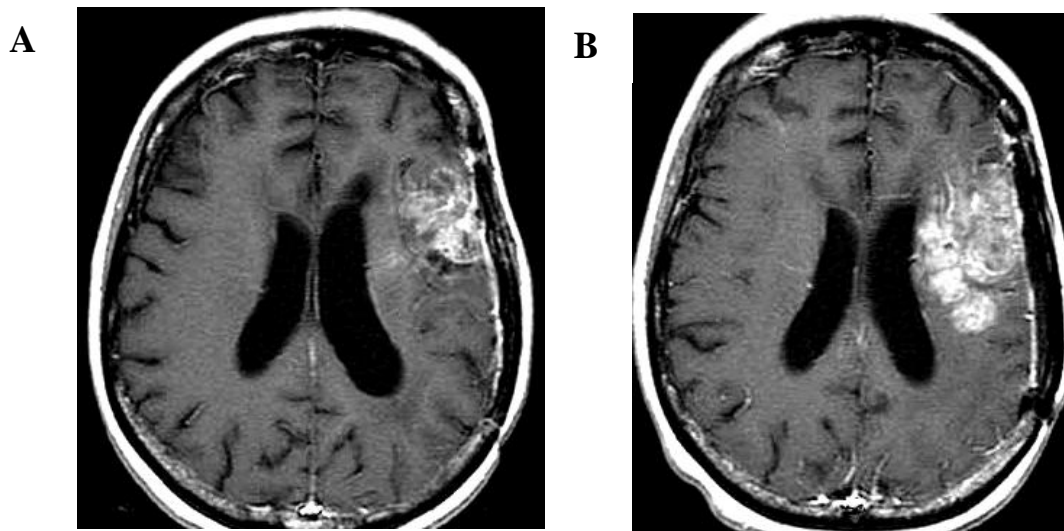


Figura 6. Imagem ilustrativa de glioma com lesão na região lobar. Ressonância Nuclear Magnética de paciente com glioma recidivo. Axial T1 com contraste evidencia área de impregnação não homogênea na região frontal esquerda, junto ao sítio cirúrgico (A). A imagem controle obtida após 6 meses de tratamento com AP por via inalatória mostra aumento na dimensão da lesão e suave compressão sobre o ventrículo em adjacência (B).

Os pacientes com edema cerebral extenso (> 5 cm) apresentaram sobrevida global menor na estimativa de Kaplan-Meier durante 40 semanas, que aqueles com edema moderado (Figura 7) independente da região de localização da lesão. Também foi observado que os pacientes com lesão na região lobar geralmente apresentavam edema peritumoral mais extenso e persistente. Edema cerebral < 5 cm foi observado em 37,7% dos pacientes com tumor lobar enquanto 85,7% apresentavam tumor na região talâmica. Em contraste, 54,8% dos pacientes com tumor na região lobar e 21,5% dos pacientes com lesão na região talâmica apresentavam área de edema cerebral > 5 cm.

Na Figura 8 são apresentadas imagens obtidas de paciente com lesão na região lobar no momento da inclusão no projeto e três meses após o tratamento com o AP pela via inalatória, mostrando claramente a manutenção do edema peritumoral e desvio de linha média (maior que 5 cm).

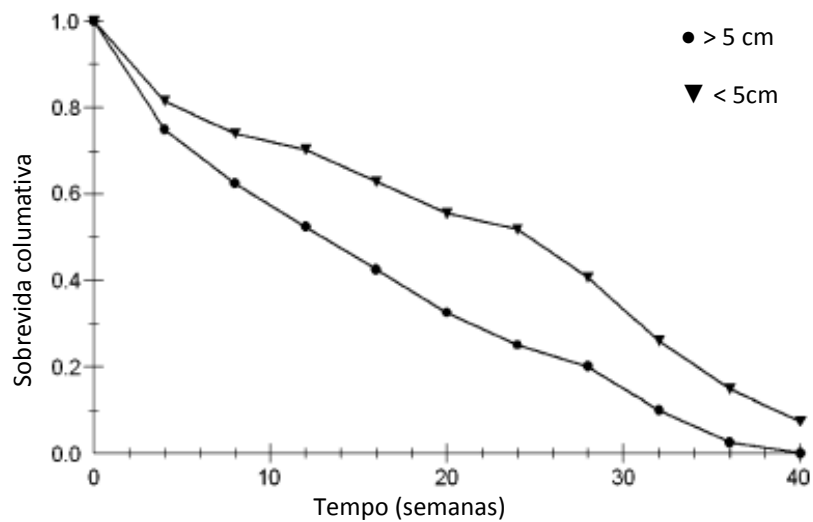


Figura 7 - Diferença na sobrevida de acordo com a extensão do edema peritumoral. Curva de sobrevida de Kaplan-Meier mostrando a influência da extensão do edema peritumoral na sobrevida global de pacientes com glioma maligno recidivo após 40 semanas de tratamento com AP pela via inalatória.

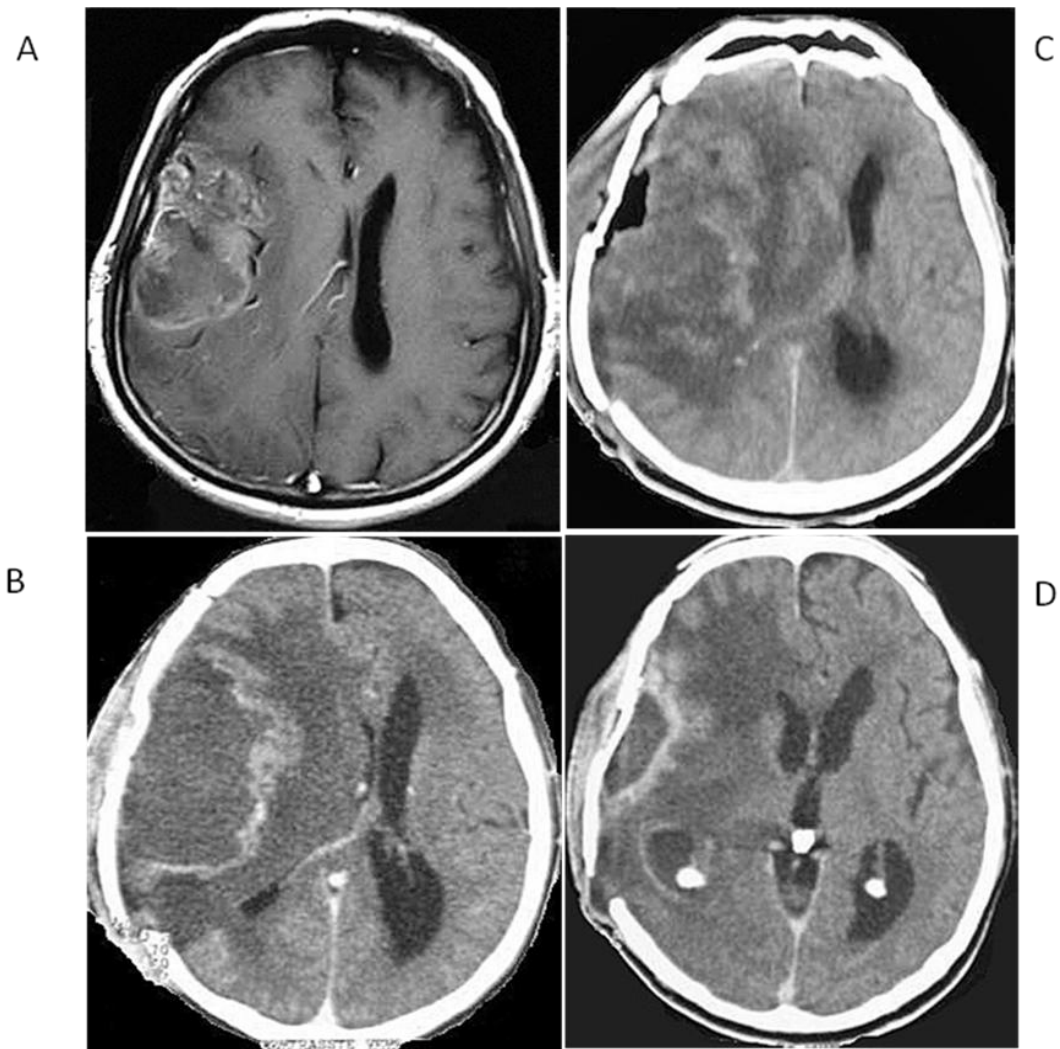


Figura 8. Imagem ilustrativa de lesão na região lobar com edema peritumoral e desvio da linha média. Ressonância Nuclear Magnética pré-operatória revelando a extensão do tumor no hemisfério direito (A), imagem obtida de recidiva tumoral após cirurgia e radioterapia (C). Resposta à administração intranasal do álcool perfílico, após 3 (B) e 6 meses (D) de tratamento mostrando persistência do edema peritumoral e desvio da linha média.

A presença de desvio de linha média (maior que 1 cm) é considerado como fator de risco para uma sobrevida global menor entre pacientes com AA e GBM (Figura 9). Não foi observada diferença significativa na sobrevida analisada pela extensão do procedimento cirúrgico (biópsia versus ressecção parcial ou total). (Dados não mostrados)

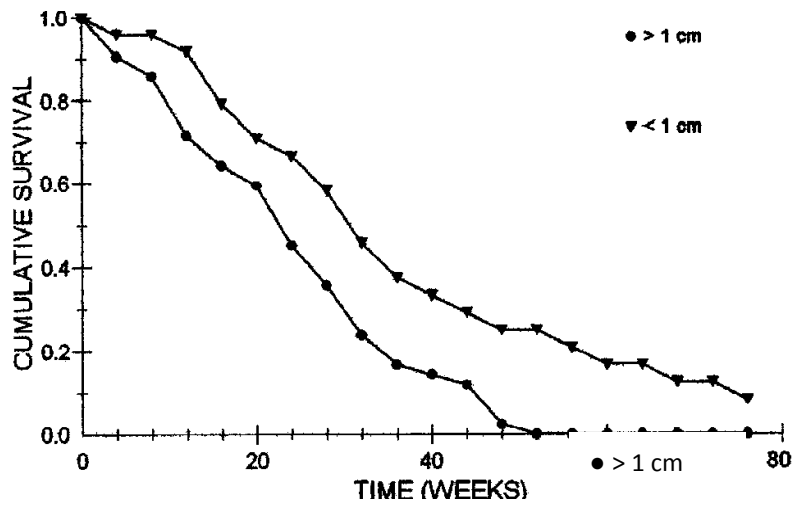


Figura 9. Influência do desvio da linha média na sobrevida global

Estimador de Kaplan Meier mostrando diferença na sobrevida global de pacientes com glioma maligno recidivo

Sobrevida columulativa

Tempo (semanas)

6. Discussão

A observação mais importante desse estudo é que pacientes com tumor localizado na região talâmica e nos gânglios da base independentemente do grau histológico apresentaram sobrevida maior que aqueles com tumor localizado na região lobar. Além disso, a persistência do edema peritumoral associado à presença de desvio da linha média foi estatisticamente significativo e um fator de menor sobrevida global.

Embora os gliomas malignos não produzam metástases, as células tumorais migram ativamente no parênquima cerebral determinando novos focos tumorais geralmente imperceptíveis para ressecção cirúrgica eficaz (Stadlbauer, A. et al, 2007). O crescimento da massa tumoral promove forte ativação dos astrócitos normais que circundam a lesão tumoral induzindo gliose reacional (Billottet, C. et al, 2008). Acredita-se que a migração das células tumorais aumente com o tempo, embora a densidade de células infiltrantes possa diminuir com a distância a partir da massa tumoral inicial (Lefranc, F., 2007). A recorrência tumoral após o tratamento nos gliomas malignos geralmente surge cerca de 2 cm da lesão original (Mentrikoski, M. et al, 2008). Atribui-se o desenvolvimento tumoral à influência de células ativadas no estroma do microambiente peritumoral e tumoral que produzem fatores de crescimento, citocinas e componentes da matriz extracelular influenciando na ativação de células precursoras para formação de novas células endoteliais necessárias para a neovascularização do tumor (Billottet, C. et al, 2008; Quirico-Santos, T. et al, 2010). A migração das células gliomatosas inclui sinalização autócrina de receptores por fatores de crescimento secretados que difundem no estroma peritumoral influenciando a atividade das células do parênquima que circundam a massa tumoral (Hoelzinger, D.B. et al, 2007). Reciprocamente, células do parênquima cerebral normal que secretam ligantes podem ativar receptores cognatos nas células tumorais criando um

microambiente permissivo de progressão para estágio de maior malignidade. Essas interações possivelmente refletem a diferença na migração das células gliomatosas em distintos microambientes influenciando a sobrevida dos pacientes (Ramnarayan, R. et al, 2007). De fato neste trabalho mostramos que pacientes com lesão na região talâmica e gânglios da base sobreviveram estatisticamente mais tempo do que pacientes com glioma localizado na região lobar.

Modelos matemáticos usados para quantificar o crescimento e invasividade de gliomas mostraram que: (1) a velocidade de expansão é linear com o tempo, variando cerca de 4 mm /ano para o glioma de baixo grau para cerca de 3 mm / mês nos casos de glioma de alto grau; (2) as células de glioma migram mais lentamente na substância cinzenta profunda em comparação com células tumorais localizadas na substância branca da região lobar (Swanson, K.R. et al, 2003). Além disso, a invasividade dos gliomas requer a conjunção de fatores incluindo a motilidade celular e crescimento proliferativo. Nossas observações estão consoantes com esses resultados porque pacientes com lesão tumoral inicialmente localizada nos gânglios basais sobreviveram significativamente mais tempo do que aqueles com lesão na região lobar. Também foi observado que nos tumores lobares a presença de edema peritumoral é maior do que nos tumores com localização profunda. Neste contexto estudos posteriores irão confirmar esta observação e determinar quais fatores do microambiente estariam influenciando esta característica.

Dados de estudos retrospectivos de pacientes com glioma maligno mostram que a sobrevida e os fatores associados a prognóstico favorável são: menor faixa etária, ausência de déficit neurológico, grau histológico e localização em áreas não eloquentes (Mitchell, P. et al, 2006), porém dados de um estudo observacional (Laws, E.R. et al, 2003) indicam a ressecção cirúrgica como fator importante na sobrevida de pacientes

com glioma maligno. Enquanto gliomas com localização na região lobar podem ser tratados com excisão cirúrgica (Pathy, S. et al, 2002), a biópsia estereotáxica é recomendada para gliomas com localização na região talâmica, mas os resultados não mostraram melhoria significativa na sobrevida após ressecção extensa. No presente trabalho, pacientes com glioma na região do tálamo não fizeram cirurgia citorrredutora enquanto pacientes com localização lobar foram submetidos à excisão cirúrgica.

Em um estudo retrospectivo (Pavličević, G. et al, 2003) realizado em 145 pacientes operados, sendo 102 com GBM e 43 com astrocitoma anaplásico, o resultado após tratamento cirúrgico foi influenciado pela idade do paciente e pelas condições clínicas pré-operatórias, assim como a localização, a extensão da lesão e da ressecção do tumor. A ressecção radical foi realizada em 46,3% e a ressecção parcial em 29,3% dos pacientes. A extensão do procedimento cirúrgico, biópsia versus ressecção parcial ou total, não determinou diferença na sobrevida dos pacientes com AA e GBM, indicando que os resultados favoráveis dependem da localização da lesão, da extensão do edema peritumoral e do estado clínico do paciente no pré-operatório.

Num estudo em 114 pacientes com GBM que foram tratados com ressecção cirúrgica e radioterapia, foi observado que o desvio da linha média pode ser considerado fator prognóstico independente (Gamburg, E.S. et al, 2000). Em nosso estudo para estabelecer correlação entre a presença do desvio da linha média maior que 1 cm e sobrevivência entre pacientes tratados com AP, observamos que esse desvio foi um fator de risco estatisticamente significativo para sobrevida mais curta, enquanto que a ausência de desvio de linha média após o tratamento com AP pode ser considerada prognóstico favorável.

Em relação ao edema vasogênico os dados da literatura são conflitantes, sendo considerado um fator prognóstico para o meningioma e metástase cerebral, mas não

para os gliomas (Stummer, W., 2007) enquanto outros grupos de pesquisadores (Hammoud, M.A. et al, 1996) mostraram que a extensão do edema peritumoral era um fator significativo na sobrevida global dos pacientes com glioma maligno. No presente estudo foi observado que a extensão do edema peritumoral em tumores iniciais e recidivos pode ser um importante fator prognóstico para resposta terapêutica ao AP, sendo observado inclusive que os Astrocitomas Anaplásicos e o GBM se assemelham na apresentação do edema cerebral vasogênico. Em conjunto, os resultados nos permitem considerar como uma resposta negativa ao tratamento com AP a regressão do volume tumoral sem a regressão do edema peritumoral, e como resposta positiva a regressão tumoral concomitante à redução do edema peritumoral independente do tipo histológico do tumor. Deve ser ressaltado que não se considerou como resposta positiva a imagem de regressão tumoral sem a concomitante regressão do edema peritumoral.

7. Conclusão

Nosso estudo demonstrou que a administração intranasal do monoterpene álcool perílico aumenta a sobrevida global dos pacientes com GBM recidivos em comparação grupo controle; pacientes com lesão tumoral localizada nos gânglios da base apresentaram sobrevida maior do que aqueles com localização lobar; a presença do edema peritumoral e o desvio da linha média correlacionaram-se significativamente com menor tempo de sobrevida global.

Referências Bibliográficas

ARISMENDI-MORILLO, G., CASTELLANO, A. *Tumoral micro-blood vessels and vascular microenvironment in human astrocytic tumors. A transmission electron microscopy study.* J Neurooncol. 2005; 73:211-7.

ARJONA, D., BELLO, M.J., REY, J.A. *EGFR intragenic loss and gene amplification in astrocytic gliomas.* Cancer Genet Cytogenet. 2006; 164: 39-43.

ARVANITIS, D. et al. *Ras p21 expression in brain tumors: elevated expression in malignant astrocytomas and glioblastomas multiforme.* In Vivo.1991; 5: 317-321.

BAILEY, H. H. et al. *A phase I trial of perillyl alcohol administered four times daily for 14 days out of 28 days.* Cancer Chemother Pharmacol. 2004; 54: 368-76.

BAILLY, C. *Ready for a comeback of natural products in oncology.* Biochemical Pharmacology. 2009; 77:1447-1457.

BELANGER, J.T. *Perillyl alcohol: applications in oncology.* Altern Med Rev. 1998; 3: 448-457.

BERZAT, A.C., BRADY, D.C., FIORDALISI, J.J. , COX, A.D. *Using inhibitors of prenylation to block localization and transforming activity.* Methods Enzymol. 2005; 407: 575-597.

BHATIA, S. P. MCGINTY, D., LETIZIA, C.S., API, A.M. *Fragrance material review on p-mentha-1,8-dien-7-ol. Food and Chemical Toxicology.* 2008; 46: S197-S200.

BILLOTTET, C., JOUANNEAU, J. *Tumor-stroma interactions. Bull Cancer.* 2008; 95:51-6.

BONNI, A. et al. *Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. Science.* 1999; 286: 1358-1362.

BRAT, D. J., SCEITHAUER, B.W., FULLER, G.N., TIHAN, T. *Newly codified glial neoplasms of the 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System: angiocentric glioma, pilomyxoid astrocytoma and pituicytoma. Brain Pathol.* 2007; 17: 319-24.

BREDEL M, POLLACK IF. *The p21-Ras signal transduction pathway and growth regulation in human high-grade gliomas. Brain Res Brain Res Rev.* 1999; 29:232-49.

CAPSONI, S., GIANNOTTA, S., CATTANEO, A. *Nerve growth factor and galantamine ameliorate early signs of neurodegeneration in anti-nerve growth factor mice. Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2002; 17:12432-7.

CASSONI, P. et al. *Caveolin-1 expression is variably displayed in astroglial-derived tumors and absent in oligodendrogliomas: concrete premises for a new reliable diagnostic marker in gliomas. Am J Surg Pathol.* 2007; (5):760-9.

CHAUDHARY, S. C., ALAM, M.S., SIDDIQUI, M.S., ATHAR, M. *Perillyl alcohol attenuates Ras-ERK signaling to inhibit murine skin inflammation and tumorigenesis.* Chem Biol Interact. 2009; 179:145-53.

CHEN, K.A. et al. *Fusion of neural stem cells in culture.* Exp Neurol. 2006; 198: 129-135.

CHUNG, B. H., LEE, H.Y., LEE, J.S., YOUNG, C.Y. *Perillyl alcohol inhibits the expression and function of the androgen receptor in human prostate cancer cells.* Cancer Lett. 2006; 236: 222-8.

CROWELL, P.L., REN, Z., LIN, S., VEDEJS, E., GOULS, M.N. *Structure-activity relationships among monoterpene inhibitors of protein isoprenylation and cell proliferation.* Biochem Pharmacol. 1994; 47: 1405-1415.

DANIELYAN, L. et al. *Intranasal delivery of cells to the brain.* Eur J Cell Biol. 2009; 88: 315-24.

DeANGELIS, L. M. *Brain Tumors.* N Engl J Med. 2001; 344:114-123.

DHURIA, S. V., HASON, L.R., FREY, W.H. 2nd. *Intranasal delivery to the central nervous system: Mechanisms and experimental considerations.* Journal of Pharmaceutical Sciences. 2010; 99: 1654-1673.

DUCHARME, N. et al. *Brain distribution and behavioral effects of progesterone and pregnenolone after intranasal or intravenous administration. European Journal of Pharmacology.* 2010; 641:128-134.

FELDKAMP, M.M., LAU, N., GUHA, A. *Signal transduction pathways and their relevance in human astrocytomas. J Neurooncol.* 1997; 35: 223-248.

FERNANDES, J., DA FONSECA, C.O., TEIXEIRA, A., GATTASS, C.R. *Perillyl alcohol induces apoptosis in human glioblastoma multiforme cells. Oncol Rep.* 2005; 13: 943-7

GAMBURG, E.S. et al. *The prognostic significance of midline shift at presentation on survival in patients with glioblastoma multiforme. Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2000; 48:1359-62.

GARCIA, D. G. et al. *The anticancer drug perillyl alcohol is a Na/K-ATPase inhibitor. Mol Cell Biochem.* 2010; Aug 6.

GOLDBERG, L.; KLOOG, Y. *A Ras inhibitor tilts the balance between Rac and Rho and blocks phosphatidylinositol 3-kinase-dependent glioblastoma cell migration. Cancer Res.* 2006; 66: 11709-17.

GRABMANN, J.; GERALD, L. *Terpenoids as Plant Antioxidants Vitamins & Hormones.* Academic Press. 2005; 505-535.

GREENWALD, P. *Clinical Trials in Cancer Prevention: Current Results and Perspectives for the Future*. J. Nutr. 2004; 134: 3507S-3512.

GULDENHAUPT, J. et al. *Secondary structure of lipidated Ras bound to a lipid bilayer*. FEBS J. 2005; 275: 5910-8.

GUHA, A. *Ras activation in astrocytomas and neurofibromas*. Can J Neurol Sci. 1998; 25: 267-281.

GUHA, A., FELDKAMP, M.M., LAU, N., BOSS, G., PAWSON. A. *Proliferation of human malignant astrocytomas is dependent on Ras activation*. Oncogene. 1997; 15: 2755-2765.

HAAG, J.D., GOULD, M.N. *Mammary carcinoma regression induced by perillyl alcohol, a hydroxylated analog of limonene*. Cancer Chemother Pharmacol. 1994; 34: 477-483.

HAMMOUD, M.A., SAWAYA, R., SHI, W., THALL, P.F., LEEDS, N.E. *Prognostic significance of preoperative MRI scans in glioblastoma multiforme*. J Neurooncol. 1996; 27:65-73.

HARPOLD, H.L, ALVORD, E.C., Jr., SWANSON, K.R. *The evolution of mathematical modeling of glioma proliferation and invasion*. J Neuropathol Exp Neurol. 2007; 66:1-9.

HASHIZUME, R. et al. *New therapeutic approach for brain tumors: Intranasal delivery of telomerase inhibitor GRN163*. *Neuro Oncol.* 2008; 10: 112-20

HEIMBERGER, A.B., SUKI, D., YANG, D., SHI, W., ALDAPE, K. *The natural history of EGFR and EGFRvIII in glioblastoma patients*. *J Transl Med.* 2005; 3: 38.

HOELZINGER, D.B., DEMUTH, T., BERENS, M.E. *Autocrine factors that sustain glioma invasion and paracrine biology in the brain microenvironment*. *J Natl Cancer Inst.* 2007; 99:1583-93.

KANAMORI, M., VANDER BERG, S.R., BERGERS, G., BERGER, M.S., PIEPER, R.O. *Integrin beta3 overexpression suppresses tumor growth in a human model of gliomagenesis: implications for the role of beta3 overexpression in glioblastoma multiforme*. *Cancer Res.* 2004; 64:2751-8.

KANU, O.O. et al. *Glioblastoma Multiforme Oncogenomics and Signaling Pathways*. *Clin Med Oncol.* 2009; 3:39-52.

KLEIHUES, P., CAVENEE, W.K., eds. *Pathology & Genetics of tumours of the nervous system*. World Health Organization, classification of tumors. Lyon, France. IARC Press, 2000.

KOSTIC, A. et al. *Peritumoral edema and karyometric variables in astrocytoma of the brain*. *J BUON.* 2007; 12:239-43.

LAWS, E.R., SHAFFREY, M.E., MORRIS, A., ANDERSON, F.A. Jr. *Surgical management of intracranial gliomas-does radical resection improve outcome?* Acta Neurochir. 2003; 85:47-53.

LEFRANC, F. *Glioblastomas are resistant to apoptosis but less resistant to the autophagic process.* Bull Mem Acad R Med Belg. 2007; 162:331-8.

LOUTRARI, H. et al. *Perillyl alcohol is an angiogenesis inhibitor.* J Pharmacol Exp. 2004; 311: 568-75.

LIU, W., JAMES, C.D., FREDERICK, L., ALDERETE, B.E., JENKINS, R.B. *PTEN/MMAC1 mutations and EGFR amplification in glioblastomas.* Cancer Res. 1997; 57: 5254-5257.

LLURIA-PREVATT, M. et al. *Effects of perillyl alcohol on melanoma in the TPras mouse model.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2002; 11: 573-579.

MCGARVEY, D.J., CROTEAU, R. *Terpenoid metabolism.* Plant Cell. 1995; 7: 1015-1026.

MENTRIKOSKI, M., JONHSON, M.D., KORONES, D.N., SCOTT, G.A. *Glioblastoma multiforme in skin: a report of 2 cases and review of the literature.* Am J Dermatopathol. 2008; 30:381-4.

MITCHELL, P., ELLISON, D.W., MENDELOW, A.D. *Surgery for malignant gliomas: mechanistic reasoning and slippery statistics*. Lancet Neurol. 2005; 4:413-22.

NUTT, C.L. et al. *Gene expression-based classification of malignant gliomas correlates better with survival than histological classification*. Cancer Res. 2003; 63:1602-7.

OHGAKI, H. et al. *Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study*. Cancer Res. 2004; 64: 6892-6899.

OLIVEIRA, M.C., CUNHA, A.S., RAMALDES, G.A., FERREIRA, LAM. *Vias de Administração de Formas Farmacêuticas*. In: Gomes, M.J.V.M. & Reis, A.M.M. Ciências Farmacêuticas: Abordagem em Farmácia Hospitalar 1 ed. São Paulo: Editora Atheneu. 2003; pp 59-61.

PADMA, M.V. et al. *Prediction of pathology and survival by FDG PET in gliomas*. J Neurooncol. 2003; 3:227-37.

PANG, J.C. et al. *Mutation analysis of DMBT1 in glioblastoma, medulloblastoma and oligodendroglial tumors*. Int J Cancer. 2003; 105: 76-81.

PATHY, S. et al. *Prognostic factors influencing the outcome of thalamic glioma*. Neurol India. 2002; 50:37-40.

PAVLIĆEVIĆ, G., ROGANOVIĆ, Z. *Outcome of surgical treatment of malignant astrocytoma of the brain*. Vojnosanit Pregl. 2003; 60:147-54.

PINCUS, M.R., BRANDT-RAUF, P.W., MICHL, J., CARTY, R.P., FRIEDMAN, F.K. *Ras-p21-induced cell transformation: unique signal transduction pathways and implications for the design of new chemotherapeutic agents.* Cancer Invest. 2000; 18: 39-50.

QUIRICO-SANTOS, T., DA FONSECA, C.O., LAGROTA-CANDIDO, J. *Brain sweet brain. Importance of sugars for the cerebral microenvironment and tumor development.* Arquivos de Neuropsiquiatria. 2010.

RAMNARAYAN, R., DODD, S., DAS, K., HEIDECKE, V., RAINOV, N.G.. *Overall survival in patients with malignant glioma may be significantly longer with tumors located in deep grey matter.* J Neurol Sci. 2007; 15:49-56.

RAO, S.K., EDWARDS, J., JOSHI, A.D., SIU, I.M. RIGGINS, G.I.. *A survey of glioblastoma genomic amplifications and deletions.* J.Neurooncol. 2010; 96:169-179.

RIES, S. et al. *Opposing effects of Ras on p53: transcriptional activation of mdm2 and induction of p19ARF.* Cell. 2000; 103: 321-330.

ROSENBLUM, M. K. *The 2007 WHO Classification of Nervous System Tumors: newly recognized members of the mixed glioneuronal group.* Brain Pathol. 2007; 17: 308-13.

ROWINSKY, E.K., WINDLE, J.J., VON HOFF, D.D. *Ras protein farnesyltransferase: A strategic target for anticancer therapeutic development.* J Clin Oncol. 1999; 17: 3631-3652.

SALGALLER, M. et al. *Application of automated image analysis to demonstrate the correlation between ras p21 expression and severity of gliomas.* Biochem Biophys Res Commun. 1990; 169: 482-491.

SCHECK, A.C., COONS, S.W. *Expression of the tumor suppressor gene DCC in human gliomas.* Câncer Res 1993; 53: 5605-5609.

SCHEITHAUER BW, FULLER GN, VANDENBERG SR. *The 2007 WHO classification of tumors of the nervous system: controversies in surgical neuropathology.* Brain Pathol. 2008 ;18:307-16.

SHI, Z., ZHANG, Q., JIANG, X. *A novel method to calculate the extent and amount of drug transported into CSF after intranasal administration.* Int J Pharm. 2005; 289:159-66.

SHIPITSIN, M.; POLYAK, K. *The cancer stem cell hypothesis: in search of definitions, markers, and relevance.* Lab Invest.2008; 88: 459-463.

SOLOMONS, T.W.G. *Química Organica.* Rio de Janeiro: Livros Tecnicos e Cientificos; 1996.

STADLBAUER, A. et al. *Changes in fiber integrity, diffusivity, and metabolism of the pyramidal tract adjacent to gliomas: a quantitative diffusion tensor fiber tracking and MR spectroscopic imaging study.* AJNR. 2007; 28:462-9.

STUMMER, W. *Mechanism of tumor-related brain edema.* Neurosurg Focus. 2007; 15:22(5):E8.

SWANSON, K.R., BRIDGE, C., MURRAY, J.D., ALVORD, E.C. Jr. 2003. Jr. *Virtual and real brain tumors: using mathematical modeling to quantify glioma growth and invasion.* J Neurol Sci. 2003; 15:1-10.

THORNE, R.G., PRONK, G.J., PADMAMABHAN, V., FREY, W.H. 2nd. *Delivery of insulin-like growth factor-I to the rat brain and spinal cord along olfactory and trigeminal pathways following intranasal administration.* Neuroscience. 2004;127:481-9.

TSUDA, T., MARINETTI, M.R., MASUELLI, L., CUTLER, M.L. *The Ras suppressor RSU-1 localizes to 10p13 and its expression in the U251 glioblastoma cell line correlates with a decrease in growth rate and tumorigenic potential.* Oncogene. 1995; 11: 397-403.

TSURUSHIMA, H. et al. *Expression of N-ras gene in gliomas.* Neurol Med Chir (Tokyo). 1996; 36: 704-708.

VYAS, T.K., SHAHIWALA, A., MARATHE, S., MISRA, A. *Intranasal drug delivery for brain targeting*. *Curr Drug Deliv* 2005; 2:165-75.

WICK, W., KUKER, W. *Brain edema in neurooncology: radiological assessment and management*. *Onkologie*. 2004; 27:261-6.

ZHAO, Y. et al. *H-Ras increases urokinase expression and cell invasion in genetically modified human astrocytes through Ras/Raf/MEK signaling pathway*. *Glia*. 2008; 56:917-24.