

GLIOBLASTOMA PEDIÁTRICO

Estudo clínico patológico de 12 casos com imunoistoquímica para proteína p53

Leonora Zozula Blind Pope¹, Maria José Serapião², Carlos José Serapião³, Maria Marcelina Silva Teive Oliveira⁴, Paulo Roberto Benites Filho⁵, Elizabeth Scheneider Gugelmin⁶, Luiz Fernando Bleggi-Torres⁷

RESUMO - Glioblastoma é um dos tumores primários mais letais do sistema nervoso central (SNC). Apesar dos significativos progressos, há poucas análises em crianças. Com o objetivo de avaliar localização, idade, sexo, sobrevida e imunoistoquímica para proteína p53, foram coletados casos de glioblastomas pediátricos do "Banco de Tumores do SNC de Curitiba", durante 1987-2003 e do Hospital Municipal Jesus, Rio de Janeiro, de 1970 a 1988. Doze preencheram os critérios de inclusão. A idade variou até 12 anos (média 7), sendo sete do sexo feminino e cinco do masculino. A sobrevida média foi 7,9 meses. Localizavam-se em hemisférios cerebrais (58,4%), mesencéfalo e tronco (33,3%) e um no cerebelo. A imunoistoquímica demonstrou p53 positivo em 9 (75%). Em conclusão, glioblastoma tem comportamento semelhante entre crianças e adultos, sendo nestas menos frequentes. Acomete hemisférios cerebrais com maior frequência que estruturas infratentoriais, mostrando alta sensibilidade com a imunomarcagem para proteína p53, sendo nestes casos mais agressivos, com menor sobrevida.

PALAVRAS-CHAVE: glioblastoma pediátrico, proteína p53, tumor cerebral pediátrico.

Pediatric glioblastoma: a clinicopathological study of 12 cases with p53 protein immunohistochemistry

ABSTRACT - Glioblastoma is one of the most lethal central nervous system (CNS) primary tumor. Although significant progress, only few analysis have been made in pediatric glioblastoma, which are less common and have worse prognosis than in adults. To evaluate gender, site, age, survival, and immunohistochemistry to p53, we selected cases of pediatric glioblastoma of "CNS Tumors Database in Curitiba", 1987-2003 and of the Hospital Municipal Jesus, Rio de Janeiro, 1970-1988. Twelve tumors were included. The age ranged from up to 12 years (median 7). There were 7 females and 5 males. The median survival was 7.9 months. Location was: cerebral hemispheres (58.4%), mesencephalon and brainstem (33.3%) and one case in the cerebellum. Immunostained to p53 in 9 (75%) cases. In conclusion, glioblastoma behaves similarly in children and adults. It is rare in children, affects both cerebral hemispheres more than brainstem and cerebellum and shows strong immunohistochemistry to p53.

KEY WORDS: childhood glioblastoma, p53 protein, pediatric brain tumor.

O glioblastoma (GB) é neoplasia astrocitária maligna, atingindo pacientes da quarta a sétima décadas de vida, cuja sobrevida pós-operatória, apesar do tratamento, é de 12 meses¹. Muito se tem estudado sobre a biologia molecular das neoplasias, em busca de melhores entendimentos e acima de tudo da possibilidade de ofertar ao paciente um melhor prognósti-

co. Existem muitas pesquisas sobre os GB, observando-se grande número de alterações cromossômicas, genes e suas respectivas proteínas com conseqüente importância para o conhecimento desta neoplasia. Os GB pediátricos são raros e letais e os pesquisadores identificam algumas particularidades nesta população²⁻⁵. Um melhor conhecimento acerca desta neopla-

¹Médica Patologista e Mestre, Universidade Federal do Paraná, Curitiba PR, Brasil (UFPR); ²Médico Patologista, Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Dona Helena, Joinville SC, Brasil; ³Professor de Patologia, Universidade de Joinville, Joinville SC, Brasil (UNIVILLE), Chefe do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Dona Helena, Joinville SC, Brasil; ⁴Médico Patologista, Chefe do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Municipal Jesus, Rio de Janeiro RJ, Brasil; ⁵Bolsista de Iniciação Científica, Departamento de Patologia Médica UFPR; ⁶Médico Patologista, Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Nossa Senhora das Graças, Curitiba PR, Brasil (HNSG); ⁷Professor Titular de Patologia Médica UFPR, Chefe do Serviço de Anatomia Patológica do HNSG.

Recebido 28 Fevereiro 2007, recebido na forma final 14 Junho 2007. Aceito 13 Agosto 2007.

Dra. Leonora Zozula Blind Pope - Serviço de Anatomia Patológica / Hospital Dona Helena / 4º andar - Rua Blumenau 123 - 89204-250 Joinville SC - Brasil. E-mail: leonora.pope@donahelena.com.br

sia, por parte de toda a equipe multidisciplinar, pode conduzir a mais adequada ação terapêutica, resultando num melhor prognóstico, incluindo mesmo as ainda consideradas alternativas, como a terapia gênica. Torna-se, pois, importante estudar e relacionar as características morfológicas, índices prognósticos como a proteína codificada pela mutação do gene supressor tumoral p53 do glioblastoma quando presente na criança. Há evidências de que glioblastomas primários e secundários constituem entidades diferentes, envolvendo vias genéticas próprias, pacientes em distintas faixas etárias e com respostas variadas ao tratamento⁶⁻⁸. Alguns autores relatam que na faixa etária pediátrica, os glioblastomas primários ou "de novo" correspondem a grande maioria dos casos⁹.

Sobre a biologia molecular dos glioblastomas pediátricos, os dados atuais indicam uma ativação preferencial da via do gene supressor tumoral p53¹⁰⁻¹². Ganigi et al.¹³, estudaram 54 casos de glioblastomas em pacientes de 0 a 15 anos e suas expressões imunohistoquímicas para proteína p53, relacionando com a sobrevida e topografia dos tumores. A imunorreatividade foi 53,7%, predominando nos talâmicos (75%), e hemisférios cerebrais (62,2%), seguido do tronco encefálico com positividade em 30% dos casos. Associaram ainda, maior expressão desta proteína em pacientes com pior prognóstico.

O objetivo deste estudo foi analisar as características epidemiológicas dos GB pediátricos, avaliando idade, sexo, topografia, sobrevida, e verificar a participação da proteína codificada pela mutação do gene supressor tumoral p53.

MÉTODOS

A casuística utilizada derivou, em parte, do "Banco de Patologia Tumoral do Sistema Nervoso Central", na cidade de Curitiba. Para tanto, foram pesquisados os livros de registros ou arquivos de biópsias do período de novembro de 1987 a dezembro de 2003 dos Serviços de Anatomia Patológica dos principais hospitais da cidade de Curitiba que são responsáveis por mais de 95% da rotina neurocirúrgica do município. O "Banco de Patologia Tumoral do Sistema Nervoso Central", apresentou um total de 3318 biópsias de neoplasias cerebrais. Destas, 353 (10,6%) correspondem a glioblastomas multiformes, adultos e pediátricos. Na faixa etária pediátrica, até 12 anos, foram identificados 21 casos (3,37%), sendo esta a população alvo do estudo.

A outra parte da casuística derivou do Hospital Municipal Jesus - RJ, no período de 1970 a 1988. Todos os casos foram de crianças que faleceram neste intervalo, sendo submetidas à necropsia pelo mesmo grupo de patologistas.

O estudo foi aprovado pelas Comissões de Ética das instituições.

Os critérios de inclusão para o presente estudo foram a presença de história clínica, incluindo tempo de evolução,

sobrevida e acompanhamento dos pacientes; presença nos arquivos, de lâminas e blocos de parafina para estudo histológico e imunohistoquímico; e material em boas condições de preservação.

A idade definida foi até 12 anos, valor de referência utilizado pela OMS.

Os dados epidemiológicos como idade, sexo, localização do tumor, sintomatologia, exame físico e tempo de evolução, foram obtidos a partir de revisão dos prontuários médicos.

O método imunoenzimático utilizado foi a estreptavidina-biotina-peroxidase. O anticorpo utilizado foi o marcador de proliferação celular p53, um anticorpo monoclonal (Zy Méd, 1:200).

Para a avaliação histológica dos casos, foram examinados cortes corados em HE, avaliando-se a presença de áreas de necrose, proliferação vascular, atipias celulares, atividade mitótica e os padrões celulares encontrados. Todos os casos foram revisados e aplicados os critérios diagnósticos.

A imunohistoquímica foi avaliada se utilizando uma grátícula (*Graticules LTD, Tonbridge Kent, UK*), adaptada a ocular do microscópio reproduzindo em campos de grande aumento sem necrose e repletos de células tumorais, um total aproximado de 522 células fora das linhas de intersecção do campo microscópico. Em cada um dos casos foram contadas 2610 células (5 a 10 CGA). As áreas selecionadas foram as mais representativas, com maior concentração do corante, chamadas de "hot spots"¹⁴⁻¹⁶.

Para determinar o número mínimo de células a serem contadas, os resultados foram analisados se utilizando a teoria da distribuição binomial, com um intervalo de confiança de 95%, de acordo com a fórmula de Montgomery e Runger¹⁷:

$$N > \frac{Z^2 pq}{e^2}$$

onde:

Z: estatística padronizada Z; p: proporção de células neoplásicas imunorreativas; q: proporção de células neoplásicas não imunorreativas; e: erro amostral admitido.

RESULTADOS

O número total de casos avaliados foi 12. Quanto ao gênero, 7 (58,3%) dos pacientes eram do sexo feminino e 5 (41,7%) do masculino. A relação feminino:masculino foi 1,4:1. A faixa etária foi 0 a 12 anos, com média de 7 anos de idade. Dois casos foram identificados em pacientes muito jovens, um lactente e uma criança de 1 ano. Três crianças tinham 5 anos e duas 7. As demais crianças (5) eram maiores e tinham entre 9 a 12 anos. Topograficamente, 7 (58,4%) estavam localizados em hemisférios cerebrais: dois parieto-occipitais, 3 fronto-parietais, 1 fronto-temporal, e 1 frontal. Quanto à lateralidade, 4 à direita e 3 à esquerda. Foram identificados 4 casos (33,3%) em mesencéfalo e tronco encefálico, todos eram bastante volumosos, com destruição e invasão da ponte, bulbo e tálamo (Fig 1). Um caso (8,3%) foi primário de cerebelo. A sobrevida média foi 7,9 meses (Tabela).

Tabela. Distribuição dos pacientes com glioblastoma de acordo com os critérios clínicos e imunoistoquímicos estudados.

Caso	Sexo	Idade (anos)	Local	Sobrevida (meses)	Total de células	Células p53 +
1	M	12	Parieto-ocipital E	7	2610	180
2	F	5	Fronto-temporal D	6	2610	199
3	F	1	Parieto-ocipital E	0	2610	205
4	F	11	Fronto-parietal D	11	2610	1985
5	F	12	Frontal D	15	2610	0
6	M	9	Fronto-parietal E	13	2610	2154
7	F	0	Fronto-parietal D	10	2610	323
8	F	5	Tronco encefálico	7	2610	0
9	F	7	Ponte	12	2610	0
10	M	10	Cerebelo	7	2610	1870
11	M	7	Mesencéfalo e tálamo	1	2610	208
12	M	5	Ponte	6	2610	270

As alterações macroscópicas encontradas no exame de necropsia foram: 3 pacientes apresentaram lesões em mesencéfalo e tronco cerebral (casos 8, 9 e 12). No exame a fresco dos encéfalos, foram encontradas sufusões hemorrágicas em leptomeninges, hérnia de uncus e aumento volumétrico do tronco encefálico. Após fixação e análise dos cortes, identificaram-se extensas neoplasias com substituição parcial do mesencéfalo, ponte e bulbo; deformação do 4º ventrículo, com aderências entre o assoalho e o teto (Fig 1A,B). No caso 11, a neoplasia acometia mesencéfalo e tálamo, era necrótica, hemorrágica e volumosa, com hidrocefalia, dilatação do 3º ventrículo, compressão do aqueduto do mesencéfalo e colapso do 4º ventrículo (Fig 1C). Os demais apresentaram extensas lesões necrótico-hemorrágicas em hemisférios cerebrais e um em cerebelo.

Microscopicamente foram encontradas áreas de necrose, de formato geográfico ou focal, envoltas por paliçada de células neoplásicas, proliferação vascular com formação de glomerulóides, em todos os casos (Fig 2A,B). A celularidade era aumentada, com atipias citológicas, pleomorfismo e figuras de mitose (Fig 2C). O tipo de células variou de caso para caso, em alguns se evidenciavam células gemistocíticas (caso 1), em outros, um padrão de células pequenas (casos 5, 6 e 10). Por vezes, predominavam as células gigantes com acentuado pleomorfismo (casos 8 e 11). Todos os casos revisados confirmaram o diagnóstico prévio de glioblastoma.

Os resultados imunoistoquímicos para o anticorpo p53 tiveram positividade nuclear. Nove casos (75%) foram positivos e 3 casos (25%) foram negativos. En-

tre os casos positivos, 3 deles demonstraram imunoreatividade difusa e em 6 a marcação foi focal, porém de moderada a forte. A positividade máxima foi 2154 células (Fig 2D).

DISCUSSÃO

As neoplasias cerebrais em crianças são freqüentes, 20-30% correspondendo a gliomas de baixo grau¹⁸, dependendo da localização topográfica para a definição do comportamento biológico, tendo índices de sobrevida em 5 anos de 70-82%¹⁹. Neoplasias malignas astrocitárias na infância são infreqüentes, entre elas o glioblastoma, com uma sobrevida média de 12 meses^{2,3,4,20}. Os glioblastomas pediátricos, devido a sua baixa freqüência, têm características clínicas, modalidades terapêuticas e sobrevida, pouco definidas na literatura.

O glioblastoma é um tumor bastante estudado. Apesar do pouco conhecimento que se dispõe, conseguiu-se entender um pouco da biologia molecular em pacientes adultos²¹⁻²⁶, numa tentativa de prever o prognóstico e tentar oferecer melhores alternativas terapêuticas. Permanece, no entanto, a dúvida de que aquela mesma via genética possa levar ao desenvolvimento de glioblastomas em crianças e, neste caso, se a mesma terapêutica mostrar-se-ia eficaz.

A amostra estudada foi válida. A revisão da literatura demonstrou que as grandes séries de glioblastomas pediátricos variam de 2 a 13 casos³, a maior casuística encontrada foi a de Ganigi et al.¹³, que estudaram 54 casos, entre 0 e 15 anos; a faixa etária na presente casuística foi 0 a 12 (OMS).

A distribuição por gênero, demonstrou um discre-

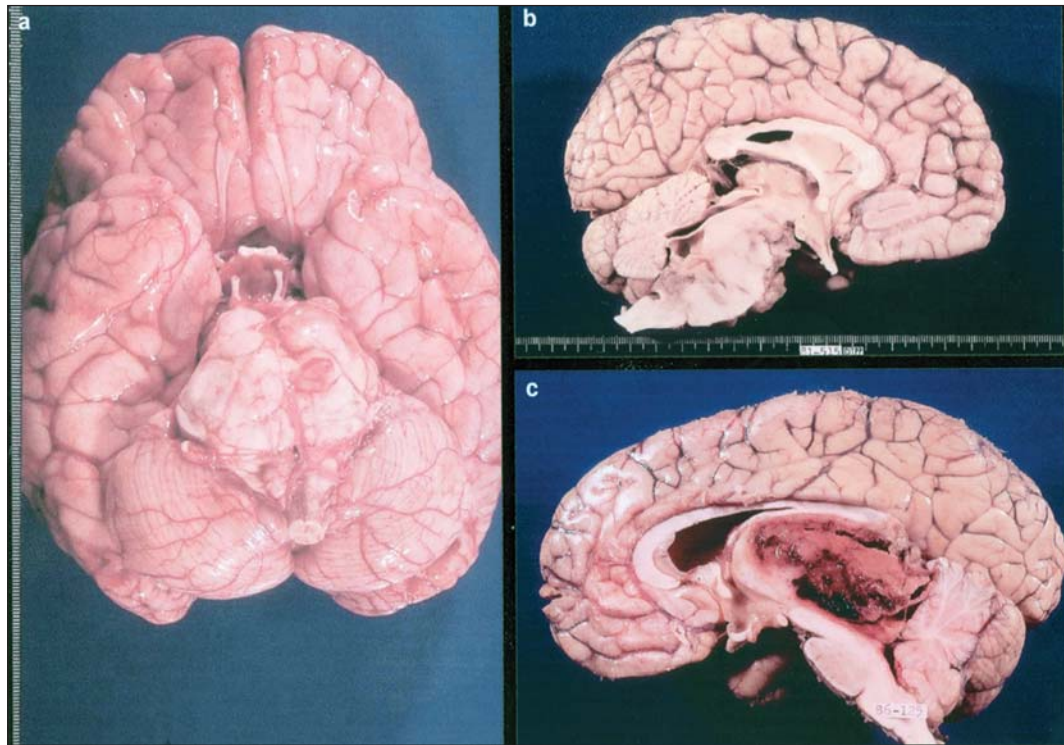


Fig 1. (A) Caso 8, encéfalo não fixado com aumento volumétrico do tronco encefálico; (B) Caso 9, corte médio sagital, tumor em ponte, com infiltração do mesencéfalo e compressão do 4º ventrículo; (C) Caso 11, corte médio sagital, tumor em tálamo e mesencéfalo.

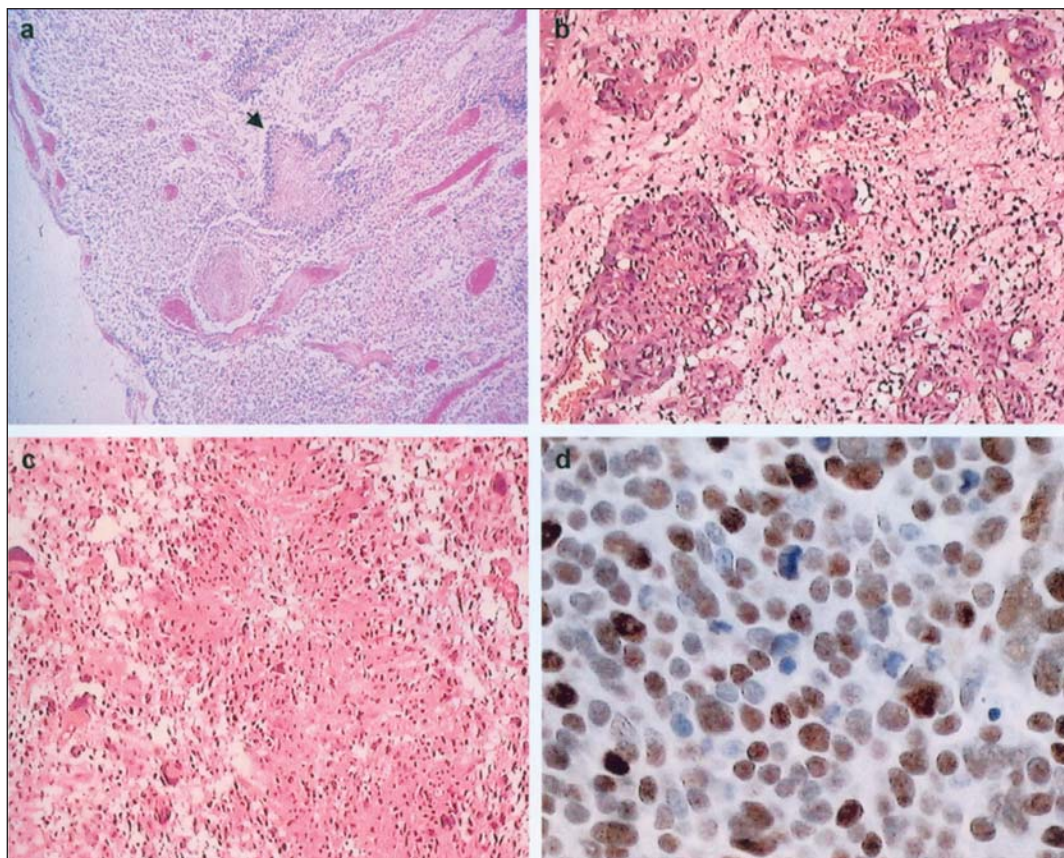


Fig 2. (A) Neoplasia com áreas de necrose em paliçada (seta); (B) vasos glomerulóides; (C) atipias celulares; (D) imunohistoquímica para p53, positividade nuclear.

to predomínio do sexo feminino em relação ao sexo masculino, numa proporção de 1,4:1. Resultados diferentes dos disponíveis na literatura mundial, que demonstram um discreto predomínio do sexo masculino, com a relação masculino:feminino variando de 1,7:1 a 3:2^{2,3,4,20}.

A faixa etária foi 0 a 12 anos, com média de 7 anos. Cinco crianças (41,7%) tinham acima de 9 anos de idade. Este resultado é comparável aos da literatura que demonstra que os glioblastomas pediátricos em hemisférios cerebrais ocorrem em crianças por volta dos 12 anos, enquanto os de tronco cerebral em crianças mais jovens^{2,3,4,20}. Os nossos resultados são semelhantes aos da literatura, em que a média etária esta em torno dos 10 anos e os casos em crianças menores de 5 anos são pouco freqüentes. Em nossa série, apenas 2 casos tinham menos de 5 anos e a media de idade foi um pouco menor, 7 anos. É importante observar que a maioria das séries inclui como criança a idade de 0 a 18 anos, no presente estudo, utilizamos os critérios da OMS, e a idade máxima foi de 12 anos^{2,3,4,20}.

Os gliomas malignos em crianças, nas maiores séries descritas, acometem os hemisférios cerebrais, o tronco encefálico, cerebelo e até medula espinhal, com leve predomínio hemisférico, diferentemente dos adultos em que o achado fora dos hemisférios cerebrais é excepcional^{2,3,4,20}. Os nossos achados são comparáveis aos descritos, em que há leve predomínio de tumores em hemisférios cerebrais, mas 33,3% dos casos eram de tronco encefálico, além de um caso em cerebelo, também pouco encontrado na literatura. O local mais freqüente, descrito na literatura é o lobo frontal (27%), seguido pela ponte (25%)^{3,4,20}. Em nosso estudo 5 (41,6%) tumores acometeram o lobo frontal e 3 (25%) a ponte.

A sobrevida máxima foi 15 meses e a média 7,9. Os tumores de tronco encefálico acometeram crianças entre 5 e 7 anos e tiveram sobrevida pequena; já os tumores em hemisfério cerebral, atingiram as crianças de maior idade, exceto o caso 7, e exibiram sobrevida um pouco maior, chegando até 15 meses. Estes resultados são comentados na literatura^{3,4,20}. A sobrevida descrita é 12 meses, 4 meses acima do encontrado nesta população, talvez por diagnósticos mais tardios, diminuindo a sobrevida global.

O p53 foi positivo em 9 casos (75%) e negativo em apenas três, demonstrando assim um acúmulo desta proteína em nível nuclear, detectado por via imunotoquímica e não por métodos de biologia molecular, significando mutação no gene p53. A principal via genética para o surgimento desta neoplasia parece ser o

p53, devido à positividade imunotoquímica em 75% de nossos casos. A mutação do gene p53 em tumores cerebrais na infância tem sido estudada por muitos autores, relacionando-a ao prognóstico e sobrevida. Pollack e colaboradores¹² estudaram a mutação e superexpressão do p53 em 29 crianças com gliomas malignos em relação ao prognóstico e observaram que 38% dos pacientes apresentaram a mutação e que os pacientes sem a mutação apresentaram uma sobrevida maior, em comparação com as que demonstraram a alteração; Pollack, em outro estudo, verificou a associação entre a idade e a freqüência de mutações no gene p53¹¹. Ganigi et al.¹³, também relacionaram a superexpressão do p53 e do bcl-2 a um pior prognóstico. No presente estudo, nove das crianças tiveram a imunomarcagem positiva para o p53 e a sobrevida foi pequena, com uma média de 6,7 meses, menor que a sobrevida global. Entre os três casos negativos, a sobrevida foi 7, 12 e 15 meses, maior que a média geral. O caso de maior sobrevida no estudo, 15 meses teve negatividade para o anticorpo p53. Ainda que com pequeno número de casos, a alta positividade para o p53 parece se relacionar com a baixa sobrevida dos pacientes, justificando assim o mau prognóstico desta doença também em crianças.

Se, glioblastomas resultam de uma transformação neoplásica de astrócitos com anaplasia em uma contínua desdiferenciação de células gliais (secundário), não é irracional imaginarmos que surjam tardiamente na vida como resultado de uma transformação neoplásica. Esta observação pode ser suportada pela predominância de astrocitomas na infância e pelo aumento da incidência de glioblastomas em adultos. Se, glioblastomas são o resultado de uma transformação neoplásica astrocitária, estes achados suportam a idéia de que glioblastomas na infância não se originam de astrocitomas preexistentes, mas sim de astrócitos com prováveis mutações no genoma, "de novo", preenchendo critérios para GB primário². Apoiamos o fato de que, na criança, a maior parte dos casos surjam "de novo" e que a principal via molecular seria a mutação no gene p53, associado a um prognóstico pior, quando comparado aos casos de adultos.

REFERÊNCIAS

1. Rosai. Special techniques in surgical pathology. In Rosai and Ackerman's surgical pathology, 9.Ed. St. Louis, Missouri: Mosby, 2004:37-91.
2. Koh SJ, Brown RE, Simmons JCH. Glioblastoma in children. *Pediatric Pathol* 1985;4:67-79.
3. Dohrmann GJ, Farwell JR, Flannery JT. Glioblastoma multiforme in children. *J Neurosurg* 1976;44:442-448.
4. Phuphanich S, Edwards MSB, Levin VA, et al. Supratentorial malignant gliomas of children: results of treatment with radiationtherapy and chemotherapy. *J Neurosurg* 1984;60:495-499.
5. Badhe PB, Chauhan PP, Mehta NK. Brainstem gliomas: a clinicopatho-

- logical study of 45 cases with p53 immunohistochemistry. *Indian J Cancer* 2004;41:170-174.
6. Watanabe K, Tachibana O, Sato K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol* 1996;6:217-224.
 7. Kleihues P, Ohgaki H. Genetics of glioma progression and the definition of primary and secondary glioblastoma. *Brain Pathol* 1997;7:1131-1136.
 8. Tohma Y, Gratas C, Biernat W, et al. PTEN mutation are frequent in primary glioblastomas but not in secondary glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998;57:684-689.
 9. Sung T, Miller DC, Hayes RL, Alonso M, Yee H, Newcomb EW. Preferential Inactivation of the p53 tumor suppressor pathway and lack of EGFR amplification distinguish de novo high grade pediatric astrocytomas from de novo adult astrocytomas. *Brain Pathol* 2000;10:249-259.
 10. Litofsky NS, Hinton D, Raffel C. The lack of a role for p53 in astrocytoma in pediatric patients. *Neurosurg* 1994;34:967-973.
 11. Pollack IF, Hamilton RL, Finkelstein SD, et al. The relationship between TP53 mutations and overexpression of p53 and prognosis in malignant gliomas of childhood. *Cancer Res* 1997;57:304-309.
 12. Pollack IF, Finkelstein SD, Burnham J, et al. Age and TP53 mutation frequency in childhood malignant gliomas. *Cancer Res* 2001;61:7404-7407.
 13. Ganigi PM, Santosh V, Anandh B, Chandramouli BA, Sastry VRK. Expression of p53, EGFR, pRb and bcl-2 proteins in pediatric glioblastoma multiforme: a study of 54 patients. *Pediatr Neurosurg* 2005;41:292-299.
 14. Elie N, Plancoulaine B, Signolle J, Herlin P. A simple way of quantifying immunostained cell nuclei on the whole histologic section. *Cytometry* 2003;56:37-45.
 15. Seidal T, Balaton AJ, Battifora H. Interpretation and quantification of immunostains. *Am J Surg Pathol* 2001;25:1204-1207.
 16. Nakasu S, Okabe H, Nakajima M, Matsuda M. Significance of MIB-1 staining indices in meningiomas: comparison of two counting methods. *Am J Surg Pathol* 2001;25:472-478.
 17. Montgomery DC, Runger GC. Estatística aplicada e probabilidade para engenheiros. Editora LTC, 2.Ed., Rio de Janeiro, 2003.
 18. Bleggi-Torres LF, Jacob GVV, Reis-Filho JS, Noronha L. Tumores pediátricos primários do sistema nervoso central: estudo anatomopatológico de 623 casos. *Arq Neuropsiquiatr* 1997;55:795-800.
 19. Butler D, Jose B, Summe R, et al. Pediatric astrocytomas: the Louisville experience 1978-1988. *Am J Clin Oncol* 1994;17:475-479.
 20. Geyer JR, Finlay JL, Boyett JM, et al. Survival of infants with malignant astrocytomas: report from the childrens cancer group. *Câncer* 1995;75:1045-1050.
 21. Araújo JC. A proteína do gene p53 e do receptor do fator de crescimento epidérmico na gênese e prognóstico do glioblastoma. Tese. Curitiba, 2003.
 22. Bleggi-Torres LF, Reis-Filho JS, Gasparetto EL, Faoro LN, Tironi FA. Atualização em glioblastomas. *Ars Cvrandi* 2000;3:18-20.
 23. Deimling VA, Ammon VK, Schoenfeld D, Wiestler OD, Seizinger BR, Louis DN. Subsets of glioblastoma multiforme defined by molecular genetic analysis. *Brain Pathol* 1993;3:19-26.
 24. Lang FF, Miller DC, Koslow M, Newcomb EW. Pathways leading to glioblastoma multiforme: a molecular analysis of genetic alterations in 65 astrocytic tumours. *J Neurosurg* 1994;81:427-436.
 25. Tortosa A, Ino Y, Odell N, et al. Molecular genetics of radiographically defined de novo glioblastoma multiforme. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2000;26:544-552.
 26. Sarkar C, Karak AK, Nath N, et al. Apoptosis and proliferation: correlation with p53 in astrocytic tumours. *J Neurooncol* 2005;73:93-100.