**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

CAROLINE SOUZA DOS ANJOS

**AVALIAÇÃO DE microRNAs COMO BIOMARCADORES DE
EVOLUÇÃO MALIGNA EM PACIENTES COM DIAGNÓSTICO DE
GLIOMA**

**Ribeirão Preto
2018**

CAROLINE SOUZA DOS ANJOS

**AVALIAÇÃO DE microRNAs COMO BIOMARCADORES DE
EVOLUÇÃO MALIGNA EM PACIENTES COM DIAGNÓSTICO DE
GLIOMA**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutora em Ciências Médicas.

Área de concentração: Clínica Cirúrgica - opção: Cirurgia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daniela Pretti da Cunha Tirapelli

Ribeirão Preto

2018

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES
TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA
FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.**

FICHA CATALOGRÁFICA

Anjos, Caroline Souza dos

Avaliação de microRNAs como biomarcadores de evolução
maligna em pacientes com diagnóstico de Glioma. Ribeirão
Preto, 2017.

84 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Doutorado direto, apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Cirurgia.

Orientador: Tirapelli, Daniela Pretti da Cunha.

1. Gliomas. 2. microRNAs. 3. Evolução maligna. 4.
Biomarcador.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: ANJOS, Caroline Souza dos

Título: Avaliação de microRNAs como biomarcadores de evolução maligna em pacientes com diagnóstico de Glioma

Tese apresentada ao Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção título de Doutora em Ciências Médicas.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Nome: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Nome: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Nome: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Nome: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Nome: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Aos pacientes oncológicos e à nossa eterna
esperança e busca pela cura.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus. Apenas sua imensidão e eterno amor são capazes de nos transmitir toda a força para suplantar as barreiras e dificuldades. Agradeço por ter sido contemplada com a VIDA como presente e por possuir todas as pessoas citadas abaixo sempre presentes mesmo diante dos entraves geográficos.

À Josemilda, Malu, cubinhos de gelo. Minha mãe. Sem dúvida nenhuma a pessoa mais linda que tenho em minha vida. Mãe em toda significância e profundidade da denominação. Obrigada por me escolher, acreditar, esperar, incentivar e seguir sempre ao meu lado. A senhora, com toda certeza, é minha fonte de coragem, determinação, resiliência e inspiração.

Ao Alcir, meu pai. Poeta, crítico, razão e predestinação. Obrigada por sempre acreditar que sim, eu e meus irmãos seríamos capazes.

Aos meus queridos irmãos: Luciana e André. As melhores partes do meu passado, presente e futuro. Os melhores presentes que recebi de meus pais. Os respeito, admiro e amo profundamente.

Ao meu grande amor – Anderson (Dãozinho). Não conseguirei agradecer suficientemente a Deus por ter permitido nosso encontro com tanto amor, parceria, respeito e amizade. Você, com toda certeza, é a minha maior torcida e o meu maior incentivador. Só posso escrever que te amo. Muito mais do que eu consiga demonstrar e você imaginar.

Às Gardners: Suellen e Polyana. Irmãs que a vida me deu. Minha maior herança da faculdade de Medicina. Muito obrigada pela amizade, meninas. Obrigada por serem um porto seguro firme nas dificuldades e por serem excelentes parceiras para compartilhar as alegrias, vitórias e dificuldades. Fico lisonjeada por nossa fortaleza e vínculo eterno. Não poderia deixar de agradecer aos meus pretinhos: Samuel e Sávio. Presentes que a família da Suellen me deu. Obrigada por me ensinarem uma nova modalidade de amor. Tia Carola sente saudades imensas de vocês.

Aos metástases: Clau, Evandrim, Godoy, Victor. O melhor de Ribeirão Preto. Obrigada pela parceria, amigos! Nossas conversas leves, divertidas e sarcásticas no café boutique mantiveram meu equilíbrio emocional e tornaram o cotidiano da Oncologia possível. Agradeço, em especial, ao Victor (Vitu), um

irmão mais novo que ganhei. Você bem sabe que o ombro um do outro, muitas vezes, foi a única coisa que havia para se apoiar. Agradeço à Priscila (Prik/Pi) por estar sempre ali, a seu modo, e por ser a pessoa leal, ética, justa e humana que é. Amo muito todos vocês.

Aos animaniacs- Renan, Talita e Antônio (*in memoriam*) - Livia, Ana, Herlen e Eugis pela amizade de 16 anos.

Agradeço aos novos (que parecem velhos) amigos: Paulinha, Juliana, Sileno, pequena Maria, Pablo, Alessandra, Melissa, Pablinho e a afilhada Maria Alice. O convívio com vocês me faz ter plena certeza de que nosso encontro já estava mais que acertado nos planos divinos. Obrigada pela presença amiga de todas as horas.

À professora Doutora Daniela Pretti da Cunha Tirapelli, minha orientadora. Aproveito a oportunidade para demonstrar minha enorme e eterna gratidão. Agradeço por acreditar, incentivar, apoiar e por ser um exemplo de mulher forte e determinada que consegue ser firme sem perder a doçura. A admiro, profundamente, por desempenhar tão bem todos os seus papéis sociais. Agradeço ainda ao Dr. Carlos Gilberto Carlotti Junior pelo seu exemplo profissional grandioso, humildade e atenção sempre concedidas. À Dra. Fernanda Peria por ter me dito a frase adequada no momento certo: Deus fecha uma porta e abre uma janela. Dita a seu jeito espontâneo. Talvez não saiba, mas foi determinante para retomar a busca pela pós-graduação quando as dificuldades pareciam ser enormes e intransponíveis.

À Renata e Luana.... Faltam-me palavras.... Muito obrigada meninas! Vocês foram meu maior presente do laboratório! Talvez não imaginem o quanto foram e são importantes em minha vida. Obrigada por todos os ensinamentos e por não desistirem. Obrigada por todas as conversas e por serem exatamente como são. Aprendi muito sobre mim com vocês.

Ao Neto, Andressa, Côco, Fabiana, Dani, Marcela, Juliana (secretária do departamento de cirurgia)... Agradeço em nome de todos vocês, todos aqueles que cruzaram meu caminho durante essa jornada. Sem dúvida, todos deixaram ensinamentos ao longo do caminho.

À Dona Vera, S. Guga, Junior, Luciana, Dona Fátima, Vinícius, Felipe, Maria Clara, Dona Prazairinha, Maíse, Miguel, por serem a família que ganhei

após meu casamento. Em especial à dona Vera. Mulher guerreira e corajosa. Nossas diferenças e semelhanças me ensinam muito sobre mim. Obrigada.

Aos meus queridos pacientes. Primeiramente a dona Belina, que me fez escolher a Oncologia aos 7 anos de idade. Estudar e lutar por vocês, diariamente, é o sentido de toda busca por conhecimento. Obrigada por nos entregarem o seu maior bem, a saúde, confiar e seguir a luta árdua com resiliência e coragem. Chegará, sem dúvida, o dia de vencer o câncer, então, nada terá sido em vão.

Agradeço ainda ao Dr. William Hiromi Fuzita (Fuzika). Literalmente o ressurgimento da minha esperança de Medicina e Oncologia de qualidade. Obrigada por simplesmente ser quem é: competente, simples, comprometido, inteligente, humilde e parceiro. Agradeço à minha família Manauara: Sensumed Oncologia. Obrigada pelo carinho diário e pelo vínculo afetivo. Vamos em frente.

“A persistência é o caminho do êxito”

Charles Chaplin

RESUMO

ANJOS, C. S. **Avaliação de microRNAs como biomarcadores de evolução maligna em pacientes com diagnóstico de Glioma.** 2017. 84 p. : il. ; 30 cm. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

INTRODUÇÃO: Os gliomas são tumores neuroepiteliais e correspondem a aproximadamente 24,6% de todos os tumores primários cerebrais. Na última década, grande esforço tem sido feito em meio acadêmico para caracterização molecular dos gliomas na tentativa de descrever comportamento clínico, definir prognóstico e prever resposta terapêutica. Ferramentas de bioinformática estimam que os microRNAs possam regular cerca de 60% dos genes humanos, incluindo um número significativo de oncogenes, genes supressores tumorais e genes relacionados a quimio e radioressistência. Uma problemática atual na prática clínica é a ausência de ferramentas moleculares para prever a evolução dos gliomas classificados como baixo grau, uma vez que, durante o seguimento clínico-radiológico pós-cirúrgico, esses pacientes podem ter recidiva tumoral e confirmação histopatológica de glioma de alto grau. A transformação tumoral em glioma de alto grau implica em pior prognóstico e redução das possibilidades terapêuticas. **OBJETIVOS:** O objetivo deste trabalho é analisar a expressão dos microRNAs miR-124a, miR-138, miR-155, miR-1275 em amostras de tumor primário humano e sangue periférico de pacientes com diagnóstico de gliomas de baixo e alto graus (astrocitoma grau I, astrocitoma grau II, astrocitoma grau III, glioblastoma, oligodendroglioma grau II e oligodendroglioma grau III). **PACIENTES E MÉTODOS:** As análises da expressão dos microRNAs foram realizadas utilizando-se a técnica de *PCR* em tempo real. Foram analisados 65 pacientes adultos (entre 18 e 65 anos de idade) com diagnóstico histopatológico confirmado de glioma com material biológico tumoral criopreservado armazenado junto ao Banco de Tumores do Sistema Nervoso Central do HCFMRP. Foram coletadas informações contidas no prontuário médico referentes às características clínicas, epidemiológicas, de evolução clínica e radiológica e tempo para recidiva e óbito. Considerando-se um nível de

significância de 5%, a associação das variáveis qualitativas categóricas e expressão de microRNAs foi realizada pelo teste de *Mann-Whitney*. A análise de sobrevida foi realizada pelo método não-paramétrico de Kaplan-Meier.

RESULTADOS: Os microRNAs em estudo não apresentaram hiperexpressão em tecido tumoral de pacientes diagnosticados com Glioblastoma. Apenas o miR-1275 apresentou expressão aumentada em pacientes com diagnóstico de astrocitoma pilocítico e oligodendroglioma grau II. Além disso, tumores de linhagem oligodendroglial, de baixo e alto graus, demonstraram hiperexpressão do miR-1275. Em sangue periférico, observou-se significativa hipoexpressão dos miR-1275, miR-124 e miR-138 em amostra de glioblastoma. Observou-se, ainda, acentuada hipoexpressão do miR-138 em amostras de oligodendroglioma grau III. **CONCLUSÃO:** Os microRNAs miR-124a, miR-138, miR-155 e miR-1275 não apresentaram hiperexpressão em tecido tumoral de pacientes diagnosticados com GBM. O miR-1275 apresentou expressão aumentada em pacientes com diagnóstico de astrocitoma pilocítico e o miR-155 foi hiperexpresso apenas em amostras de oligodendroglioma grau II. Além disso, tumores de linhagem oligodendroglial, de baixo e alto graus, demonstraram hiperexpressão do miR-1275 e miR-124a. Em sangue periférico, observou-se significativa hipoexpressão dos miR-1275, miR-124 e miR-138 em amostra de glioblastoma assim como acentuada hipoexpressão do miR-138 em amostras de oligodendroglioma grau III.

Palavras-chave: glioma de baixo grau; glioma de alto grau; MicroRNAs; evolução maligna.

ABSTRACT

ANJOS, C.S. **Evaluation of microRNAs as biomarkers of malignant evolution in patients with diagnosis of Glioma.** 2017. 84 p. : il. ; 30 cm. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

INTRODUCTION: Gliomas are neuroepithelial tumors and correspond to approximately 24.6% of all primary brain tumors. In the last decade, great effort has been made in academic circles to characterize gliomas in an attempt to describe clinical behavior, define prognosis and predict therapeutic response. Bioinformatics tools estimate that microRNAs can regulate about 60% of human genes, including a significant number of oncogenes, tumor suppressor genes, and chemo and radioresistance genes. A current problem in clinical practice is the absence of molecular tools to predict the evolution of gliomas classified as low grade, since during postoperative radiological follow-up these patients may have tumor recurrence with histopathological confirmation of high glioma degree. Tumor transformation in high-grade glioma has a worsening of prognosis and reduction of therapeutic possibilities

OBJECTIVES: The objective of this project is to analyze the expression of miR-124a, miR-138, miR-155, miR-1275 in human primary and peripheral blood samples from patients diagnosed with low and high grade gliomas (astrocytoma grade I, astrocytoma grade II, astrocytoma grade III, glioblastoma, oligodendroglioma grade II and oligodendroglioma grade III). **PATIENTS AND METHODS:** MicroRNA expression analyzes were performed using the real-time PCR technique. Sixty-five adult patients (18-65 years of age) with confirmed histopathological diagnosis of glioma with cryopreserved tumor biological material stored at the Bank of Tumors of the Central Nervous System of HCFMRP were analyzed. Information collected in the medical records regarding clinical, epidemiological, clinical and radiological characteristics and time for recurrence and death were collected. Considering a level of significance of 5%, the association of categorical qualitative variables and microRNA expression were performed by the Mann-Whitney test. Survival analysis was performed using the

Kaplan-Meier non-parametric method. **RESULTS:** The microRNAs under study did not present hyperexpression in tumor tissue of patients diagnosed with glioblastoma. Only miR-1275 showed increased expression in patients diagnosed with pilocytic astrocytoma and grade II oligodendroglioma. In addition, tumors of low and high grade oligodendroglial lineage demonstrated overexpression of miR-1275. In peripheral blood, significant hypoexpression of miR-1275, miR-124 and miR-138 were observed in a glioblastoma sample. There was also a marked hypoexpression of miR-138 in samples of grade III oligodendroglioma. **CONCLUSION:** The microRNAs miR-124a, miR-138, miR-155 and miR-1275 did not show hyperexpression in tumor tissue of patients diagnosed with GBM. MiR-1275 showed increased expression in patients diagnosed with pilocytic astrocytoma and miR-155 was hyperexpressed only in samples of grade II oligodendroglioma. In addition, tumors of oligodendroglial lineage, of low and high grades, demonstrated hyperexpression of miR-1275 and miR-124a. In peripheral blood, significant hypoexpression of miR-1275, miR-124 and miR-138 were observed in the GBM sample as well as marked hypoexpression of miR-138 in samples of grade III oligodendroglioma.

Keywords: low grade glioma; high grade glioma; MicroRNAs; malignant evolution.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Dados clínico- epidemiológicos dos pacientes com diagnóstico de glioma de baixo grau.	57
Tabela 2	Dados clínico-epidemiológicos dos pacientes com diagnóstico de glioma de alto grau.	59
Tabela 3	Hiperexpressão dos microRNAs em tecido tumoral	62
Tabela 4	Hipoexpressão dos microRNAs em sangue periférico	63
Tabela 5	Caraterísticas clínico-epidemiológicas dos pacientes com evolução atípica (glioma de baixo grau).	69
Tabela 6	Caraterísticas clínico-epidemiológicas dos pacientes com evolução atípica (glioma de alto grau).	72

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Curva de Kaplan-Meier com a sobrevida dos pacientes com diagnóstico de glioma de baixo grau	60
Gráfico 2	Curva de Kaplan-Meier com a sobrevida dos pacientes de acordo com o grau tumoral.	61
Gráfico 3	Expressão do microRNA-1275 em tecido tumoral.	63
Gráfico 4	Expressão do microRNA-1275 em sangue periférico.	64
Gráfico 5	Expressão do microRNA-155 em tecido tumoral.	65
Gráfico 6	Expressão do microRNA-155 em sangue periférico.	65
Gráfico 7	Expressão do microRNA-124a em tecido tumoral	66
Gráfico 8	Expressão do microRNA-124a em sangue periférico.	67
Gráfico 9	Expressão do microRNA-138 em tecido tumoral.	68
Gráfico10	Expressão do microRNA-138 em sangue periférico.	68
Gráfico11	Expressão do microRNA-155 em amostras de tumor primário de pacientes com glioma de baixo grau e evolução atípica.	70
Gráfico12	Expressão do microRNA-124a em amostras de sangue periférico de pacientes com glioma de baixo grau e evolução atípica.	70
Gráfico13	Expressão do microRNA-1275 em amostras de sangue periférico de pacientes com glioma de alto grau e evolução atípica.	71
Gráfico14	Expressão do microRNA-1275 em amostra de tecido tumoral de pacientes com glioma de alto grau e evolução atípica.	73
Gráfico15	Expressão do microRNA-124a em amostra de tecido tumoral primário de pacientes com glioma de alto grau e evolução atípica.	74

Gráfico16	Expressão do microRNA-138 em amostra de tecido tumoral primário de pacientes com glioma de alto grau e evolução atípica.	74
Gráfico17	Expressão do microRNA-1275 em amostra de sangue periférico de pacientes com glioma de alto grau e evolução atípica.	75
Gráfico18	Expressão do microRNA-124a em amostra de sangue periférico de pacientes com glioma de alto grau e evolução atípica.	75
Gráfico19	Expressão do microRNA-138 em amostra de sangue periférico de pacientes com glioma de alto grau e evolução atípica.	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP	astrocitoma pilocítico
AII	astrocitoma grau II
AIII	astrocitoma grau III
AIV	astrocitoma grau IV
CSCs	<i>cancer stem cells</i>
BCNU	Carmustina
BRAF	<i>B-Raf proto-oncogene</i>
CBTRUS	<i>Central Brain Tumor Registry of United States</i>
cDNA	DNA complementar
CT	Cycle Threshold
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DEPC	Substância que inativa enzimas RNAses (Dietilpirocarbonato)
dNTP	Desoxirribonucleosídeos trifosfato
EORTC	<i>The European Organisation for Research and Treatment of Cancer</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
EUA	Estados Unidos da América
FLAIR	<i>Fluid Attenuated Inversion Recovery</i>
FMRP-USP	Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto
FDGFR	Fator de Crescimento derivado de Plaqueta
GBM	Glioblastoma Multiforme
Gy	Gray
IDH 1 e 2	Isocitrato desidrogenase 1 e 2
INCA	Instituto Nacional do Câncer

IHQ	Imunoistoquímica
KPS	<i>Karnofsky Performance Scale</i>
Ki67	Índice de proliferação celular
LASSO	<i>least absolute shrinkage and selection operator</i>
MGMT	0-6 metilguanina-DNA metiltransferase
miRNA/miRs	microRNA
NOS	<i>Not Otherwise Specified</i>
OII	Oligodendroglioma grau II
OIII	Oligodendroglioma grau III
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	<i>phosphatase buffered saline</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDGFR	Fator de Crescimento derivado de Plaqueta
PTEN	<i>Tensin Homolog Phosphatase</i>
PCV	Procarbazina/Lamustina/Vincristina
PS	Performance status
1p	braço curto do cromossomo 1
19q	braço longo do cromossomo 19
q.s.p	quantidade suficiente para
QT	Quimioterapia
RNA	Ácido Ribonucléico
rpm	rotações por minuto
RT	Radioterapia
RNAse	Enzima RNA polimerase
RNM	Ressonância Nuclear Magnética
SLP	Sobrevida Livre de Progressão

SG	Sobrevida Global
SNC	Sistema Nervoso Central
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TGF-β	<i>transforming growth factor beta</i>
TERT	<i>Telomerase Reverse Transcriptase</i>
TMZ	Temozolamida
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TP53	gene TP53

Sumário

1. INTRODUÇÃO	22
1.1. Gliomas de baixo grau	26
1.2. Gliomas de alto grau	33
1.3. Biologia molecular	37
1.4. Evolução maligna	40
2. OBJETIVO	48
2.1. Objetivo geral	48
2.2. Objetivos específicos	48
3. PACIENTES E MÉTODOS	50
3.1. Pacientes	50
3.1.1. Critérios de inclusão	50
3.1.2. Critérios de exclusão	50
3.2. Métodos	51
3.2.1. Extração do DNA	51
3.2.2. Síntese do DNA complementar	52
3.2.3. PCR em tempo real	52
3.2.4. Análise estatística	54
4. RESULTADOS	56
4.1. Dados clínico-epidemiológicos	56
4.1.1. Gliomas de baixo grau	56
4.1.2. Gliomas de alto grau	58
4.2. Quantificação da expressão dos microRNAs	62
4.2.1. microRNA-1275	63
4.2.2. microRNA-155	64
4.2.3. microRNA-124a	66
4.2.4. microRNA-138	67
4.3. Quantificação da expressão dos microRNAs dos pacientes com evolução atípica	69
4.3.1. Gliomas de baixo grau	69
4.3.2. Gliomas de alto grau	71
5. DISCUSSÃO	78
5.1. microRNA 1275	79
5.2. microRNA-155	80
5.3. microRNA-124a	81
5.4. microRNA-138	82
6. CONCLUSÃO	84

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
ANEXOS	97
Anexo A	97
Anexo B	98
Apêndices	100
Apêndice A	100
Apêndice B	103

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Em 1865, o ilustre patologista alemão *Rudolf Virchow* introduziu o termo glioma para definir os tumores de linhagem neural. Nessa ocasião, os tumores foram separados em categorias hoje reconhecidas como neoplasias de baixo grau e alto grau. Em 1926 *Bailey e Cushing* descreveram as células tumorais da neoplasia mais agressiva do Sistema Nervoso Central e a denominaram *spongioblastoma multiforme*. Este termo permaneceu consagrado até a década de 40 quando foi sugerida a denominação de glioblastoma multiforme (DEANGELIS; MELLINGHOFF, 2011).

Os tumores do Sistema Nervoso Central (SNC) formam um grupo heterogêneo de neoplasias com diferentes padrões de crescimento, estratégias terapêuticas adotadas e resultados alcançados. Os tumores primários vêm cursando, ao longo dos últimos 30 anos, com aumento progressivo da incidência por razões ainda desconhecidas (SIEGEL; MA; ZOU; JEMAL, 2014).

Os gliomas são tumores neuroepiteliais, correspondem a aproximadamente 24,6% de todos os tumores primários cerebrais e são classificados de acordo com sua origem celular, sendo agrupados de acordo com a agressividade tumoral. Por possuírem semelhanças com as células gliais normais, considera-se, classicamente, que em relação à histologia os tumores advêm de astrócitos, oligodendrócitos e células ependimárias, podendo, inclusive, ter características de mais de uma linhagem celular sendo considerados tumores mistos como os oligoastrocitomas. Mais recentemente, aventou-se a possibilidade do surgimento desses tumores a partir de uma célula progenitora considerada célula-tronco tumoral (POKHREL; VOVORAS; TSOROS, 2012).

Assim como as neoplasias malignas hematológicas, os tumores apresentam um pequeno grupo de células neoplásicas em meio ao tumor que têm a capacidade de proliferar-se extensivamente dando origem a novos tumores (REYA et al, 2001). Essas células foram chamadas de “*cancer stem cells*” (CSCs) e tem capacidade de auto- renovação, proliferação, diferenciação *in vitro* e são caracterizadas pela expressão de CD 133⁺ (SINGH et al, 2004).

A transformação neoplásica primária do SNC em suas diversas linhagens histológicas é um processo complexo e envolve alterações em vários genes, incluindo oncogenes, genes supressores de tumor, genes de reparo do DNA e genes associados à apoptose. Durante este processo, características importantes como o controle da proliferação celular e interação célula-célula são perdidas (LOUIS; POMEROY; CAIRNCROSS, 2002).

A patogênese dos tumores cerebrais permanece incerta. Sabe-se que os tumores cerebrais malignos se desenvolvem a partir de acúmulos de mutações genéticas que permitem a evasão celular dos mecanismos regulatórios e escape da destruição pelo sistema imunológico. Além disso, há síndromes genéticas que promovem alterações cruciais em genes de controle do ciclo celular como o *TP53* e podem levar a ocorrência de dano ao DNA celular sendo potencialmente deflagradoras da neurocarcinogênese. As síndromes genéticas mais relacionadas com o aumento do risco para a ocorrência de gliomas são neurofibromatose tipo 1 e Li- Fraumeni e ambas possuem padrão de herança autossômica dominante (WRENSCH *et al*, 2002).

A classificação dos tumores do SNC foi publicada em 1979 pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e agrupou todas as neoplasias de linhagem neural. Esse sistema de classificação passou por revisões em 1993, 2000 e 2007 com inclusão do grau tumoral para especificar os grupos de acordo com prognóstico, comportamento tumoral, abordagem terapêutica preconizada e seguimento posterior (LOUIS; OHGAKI; WIESTLER; CAVENEE, 2007).

Em 2016, foi publicada atualização da classificação proposta em 2007. Pela primeira vez na história dos tumores cerebrais, foram utilizados parâmetros moleculares com finalidade diagnóstica, uma vez que, anteriormente, a classificação era apenas baseada na histogênese com agrupamento dos tumores de acordo com semelhanças microscópicas independentemente se havia igualdade na evolução clínica (LOUIS; OHGAKI; WIESTLER; CAVENEE, 2016).

As duas últimas décadas promoveram elucidação das bases genéticas da tumorigênese, proporcionando a incorporação de parâmetros moleculares aos dados de microscopia com uso integrado de fenótipo e genótipo, propiciando maior

objetividade à nova classificação proposta, além de maior acurácia diagnóstica, melhora do manejo clínico dos pacientes, determinação mais acurada do prognóstico, predição de resposta clínica e redução de variabilidade interobservador (LOUIS; PERRY; BURGER; ELLISON, 2014).

A partir da atualização, todos os gliomas infiltrativos, astrocitomas (graus II, III e IV) ou oligodendrogliomas (graus II e III), são agrupados sob a denominação gliomas difusos. Essa reunião decorre, pois, os mesmos compartilham o mesmo perfil de crescimento e comportamento clínico, além disso, possuem marcadores prognósticos e definição terapêutica semelhantes. Portanto, após o diagnóstico histopatológico, todos os gliomas devem ser submetidos a testes moleculares para pesquisa de mutação de *IDH* e *1p19q* (LOUIS *et al*, 2016).

De forma geral, as lesões de baixo grau apresentam aumento da celularidade e atipia, porém não cursam com figuras de mitose, proliferação vascular ou necrose tecidual. São tumores de curso clínico indolente, porém apresentam o risco de evolução para tumores de alto grau com deterioração importante do prognóstico (LOUIS; OHGAKI; Wiestler, 2007). Dentre as lesões primárias classificadas como alto grau, o astrocitoma anaplásico (grau III) e o glioblastoma multiforme (grau IV) são as neoplasias do SNC mais comuns na população adulta, correspondendo a 6% e 54%, respectivamente (OSTROM; GITTLEMAN; FARAH, 2013).

Após publicação da nova classificação, a determinação do grau tumoral ainda é determinada por critérios histológicos e deverá ser escrito apenas em algarismo romano. Quanto à nomenclatura proposta, a denominação histopatológica deve ser acompanhada com vírgula seguida da alteração molecular presente, como por exemplo: astrocitoma anaplásico, *IDH* mutado. Quando os testes genéticos não estiverem disponíveis ou quando os dados patológicos, genéticos e clínicos são insuficientes para classificação mais específica, a denominação histológica deve ser acompanhada do termo *NOS* (*Not Otherwise Specified*); (LOUIS; OHGAKI; Wiestler; CAVENEE, 2016).

Nos Estados Unidos da América (EUA) foram constatados em 2014 cerca de 23.380 novos casos de tumores primários do SNC. Estimou-se ainda, que esse

tipo de neoplasia maligna, seria responsável por aproximadamente 14.320 óbitos no mesmo ano (SIEGEL; MA; ZOU; JEMAL, 2014). No Brasil, segundo estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) foram esperados para o ano de 2014 cerca de 9.090 novos casos dessa neoplasia, sendo 4.960 casos na população masculina e 4.130 na população feminina. As neoplasias de SNC ocupam o décimo lugar dentre as neoplasias malignas mais diagnosticadas em homens e são tumores mais prevalentes em pacientes com maior poder sócio- econômico o que pode refletir maior acesso aos métodos diagnósticos, como por exemplo, a ressonância nuclear magnética (INCA, 2014).

Estudo estatístico recente sobre tumores primários do SNC diagnosticados nos EUA entre 2007 e 2011 do *Central Brain Tumor Registry of United States* (CBTRUS) descreveu aspectos epidemiológicos importantes destes tumores. Com relação à incidência tumoral, dentre a população até 19 anos de idade, é de 5,53 para cada 100.000 habitantes e dentre a população com 20 ou mais anos de idade 27,85 para cada 100.000 habitantes. Quanto à localização, dentre os tumores localizados no parênquima cerebral, 23,2% estavam no lobo frontal, 17% no lobo temporal, 10,9% no lobo parietal e 2,9% no occipital. O tumor maligno mais diagnosticado foi o GBM (45,6%) e o não maligno, o meningioma (53,7%). A incidência foi maior em homens para tumores germinativos, de linhagem glial, linfomas e tumores embrionários. Por fim, os tumores de origem nas células gliais foram cerca de duas vezes mais comuns na população caucasiana (OSTROM *et al*, 2013).

1.1. Gliomas de baixo grau

Na população jovem (20-34 anos), os gliomas correspondem a aproximadamente 32% dos tumores primários do SNC e 17% deles derivam da linhagem celular astrocítica. Como a maioria dos dados epidemiológicos existentes não diferenciam os gliomas entre baixo e alto grau, há dificuldade em se estimar a real incidência anual dos gliomas de baixo grau na população mundial (OSTROM *et al*, 2014). Quanto à sobrevida mediana descrita em 1, 5 e 10 anos, os tumores de linhagem astrocítica apresentam 91,6%, 58,5% e 40,7%, enquanto os tumores de linhagem oligodendroglial cursam com 94,2%, 79,5% e 63,6%, respectivamente (MARKO; WEIL, 2013).

A definição do grau tumoral através dos achados histopatológicos leva em consideração a presença de atipia citológica, anaplasia, proliferação microvascular, necrose tecidual e atividade mitótica. Os tumores classificados como grau I não apresentam nenhuma das características citadas acima, enquanto que nos tumores grau II observa-se atipia citológica isoladamente (FORST; NAHED; LOEFLER; BATCHELOR, 2014). Os subtipos histológicos descritos são: astrocitoma difuso, oligodendroglioma, oligoastrocitoma, xantoastrocitoma pleomórfico e astrocitoma pilomixóide. Entretanto, a definição dessas categorias histopatológicas apresenta variações de acordo com os observadores, sobretudo nos graus II e III, e não prediz de forma adequada a evolução clínica dos pacientes (YANG *et al*, 2015). De fato, essas cinco categorias tumorais representam entidades clínicas e moleculares distintas, o que faz com que o agrupamento dos mesmos sob a denominação 'gliomas de baixo grau' seja cada vez mais questionada (MARKO; WEIL, 2013). Após a nova classificação publicada em 2016, permanecem apenas como variantes distintas: astrocitoma *gemistocytic* e xantoastrocitoma pleomórfico anaplásico (LOUIS *et al*, 2016).

Os gliomas de baixo grau são neoplasias infiltrativas e ocorrem predominantemente entre a segunda e a quarta décadas de vida. Cerca de 80% dos pacientes são diagnosticados após cursar com episódio convulsivo inérito. Outros sintomas relacionados são: déficit motor focal, alteração cognitivo- comportamental e sintomas relacionados ao aumento da pressão intracraniana (cefaléia, papiledema),

entretanto, alguns pacientes podem estar assintomáticos ao diagnóstico (POURATIAN *et al*, 2007).

Os astrocitomas pilocíticos (grau I) correspondem a cerca de 5 a 6% de todos os gliomas, porém apesar da baixa incidência, são os tumores do SNC mais comuns na faixa etária de 5 a 19 anos. Caracterizam-se por se apresentar como lesões císticas, bem circunscritas e que raramente cursam com progressão. São tumores indolentes e cujos sinais e sintomas relacionados dependem da extensão e localização da lesão (JONES *et al*, 2015). O tratamento preconizado é ressecção macroscópica total e em caso de doença residual irresssecável, há a possibilidade do uso de radioterapia e/ou quimioterapia no cenário adjuvante (FORST; NAHED; LOEFLER; BATCHELOR, 2014).

Portanto, os astrocitomas grau I são os gliomas de melhor prognóstico. Provavelmente, o fenótipo tumoral indolente está associado com mutações de genes de fusão de BRAF (KIAA1549- BRAF e BRAF V600E- mais raramente) e outras alterações que provocam a ativação da via de transdução de sinal ERK/MAPK. Acredita-se que esta, quando ativada, seja responsável por indução de proliferação e ativação de senescência celular (JONES *et al*, 2015).

Após suspeita clínica inicial na Ressonância Nuclear Magnética (RNM) observa-se lesão homogênea com sinal hipointenso em sequência T1 e hiperintensidade em sequências T2 e FLAIR (*Fluid Attenuated Inversion Recovery*); (PIRZKALL *et al*, 2002). Posteriormente, é indicado abordagem cirúrgica cujos objetivos principais são obter diagnóstico histopatológico e promover a ressecção do maior volume tumoral possível. Utilizando-se propedêutica com tractografia e RNM funcional pré-operatórios, assim como monitorização neurofisiológica intra- operatória é possível maximizar a ressecção da lesão com segurança, sobretudo quando envolve áreas cerebrais eloquentes. Entretanto, na presença de exame de imagem duvidoso ou na existência de condições clínicas de alto risco para abordagem cirúrgica, está indicada biópsia estereotáxica. Nesse contexto, é considerado que se trata de uma classe tumoral com elevada heterogeneidade e a amostra pode não refletir o grau mais elevado da neoplasia. A acurácia descrita do procedimento está entre 51 e 83% (POURATIAN *et al*, 2007).

Na última década, grande esforço tem sido feito em meio acadêmico para caracterização molecular dos gliomas na tentativa de descrever comportamento clínico, definir prognóstico e prever resposta terapêutica. A descrição do índice de proliferação (ki-67) é uma estratégia utilizada para prever as características descritas anteriormente. Através de métodos de imunohistoquímica (IHQ), a taxa mitótica dos tumores é estabelecida e são considerados valores baixos de proliferação se <4% para astrocitoma, entre 3 e 5% para oligodendrogliomas e <6% para oligoastrocitomas (SCHIFF; BROWN; GIANNINI, 2007). Outro fator prognóstico é o *status* de Metilguanina-Metiltransferase (*MGMT*). Trata-se de um gene de reparo de DNA cuja metilação está relacionada à maior resposta terapêutica e aumento da sobrevida livre de progressão (SLP) no grupo de pacientes tratados com quimioterapia baseada em agente alquilante. O *MGMT* é inativado irreversivelmente quando sofre remoção do grupo alquil da posição O⁶ da guanina (EVERHARD *et al*, 2006).

O EORT (*The European Organisation for Research and Treatment of Cancer*) criou um sistema de escore prognóstico baseado em análises multivariadas dos diversos fatores prognósticos descritos. Diante disso, foram considerados fatores de pior prognóstico: idade maior ou igual a 40 anos, tumor de linhagem astrocítica, tumor com tamanho maior ou igual a 6 cm no maior diâmetro, tumores que cruzam a linha média e a presença de sintomas neurológicos anteriormente a abordagem cirúrgica (BAUMERT; STUPP, 2008).

Já são descritas deleções em regiões específicas no braço curto do cromossomo 1 (*1p*) e no braço longo do cromossomo 19 (*19q*) em gliomas de baixo grau com importância, sobretudo, nos tumores de linhagem oligodendroglial. Cita-se a perda da região *1p36* que ocorre em 18% dos astrocitomas e 73% dos oligodendrogliomas e a perda da região *19q13.3* que ocorre em 11% dos astrocitomas e 64% dos oligodendrogliomas. A codeleção de ambas as regiões (*1p19q*) ocorre em 11% dos astrocitomas e 64% dos oligodendrogliomas. Na linhagem Oligodendroglial essa característica está associada a maior sobrevida independente do grau tumoral. A mesma associação positiva não ocorre com os astrocitomas e oligoastrocitomas (SMITH; ALDERETE; MINN, 1999).

Outra mutação genética descrita nos gliomas de baixo grau ocorre no gene Isocitrato desidrogenase 1 e 2 (*IDH 1* e *IDH 2*). Mais de 70% dos astrocitomas e

oligodendrogliomas grau II e grau III apresentam mutação no aminoácido 132 do *IDH 1*, bem como o Glioblastoma que provém de tumores de graus inferiores (GBM secundário); (ANDRONESI; KIM; GERSTNER, 2012). A mutação de *IDH 2* é mais rara e se faz presente em cerca de 6% dos tumores de baixo grau. Ambas as mutações são relacionadas com aumento de sobrevida e maior sensibilidade ao tratamento proposto, sobretudo se houver indicação do uso de Temozolamida adjuvante para complementação terapêutica (HOUILLIER *et al*, 2010).

Devido à história natural variável, o manejo terapêutico ótimo continua controverso. A partir de escolha individualizada as opções terapêuticas possíveis são: observação clínica, neurocirurgia, radioterapia (RT), quimioterapia (QT) e radioterapia associada a quimioterapia. A decisão depende dos fatores prognósticos clínicos e moleculares, extensão dos sintomas neurológicos, risco estimado de transformação maligna e risco de toxicidade aguda e tardia associada ao tratamento proposto (BAUMERT *et al*, 2016).

A modalidade terapêutica dos pacientes com diagnóstico de glioma de baixo grau inicia, geralmente, com abordagem cirúrgica com ressecção do máximo volume tumoral possível sem que haja prejuízos funcionais. Entretanto, estudos são discordantes quanto ao melhor momento para neurocirurgia. Muitos profissionais defendem a abordagem logo ao diagnóstico e descrevem ganho de sobrevida global, aumento do tempo para transformação em lesões de alto grau, além de poder atuar como adjuvante no controle dos sintomas apresentados como as crises convulsivas. Em contrapartida, há quem acredite que *watchful waiting* é uma alternativa segura, sobretudo em pacientes pouco sintomáticos ou assintomáticos. Porém, estudo retrospectivo recente evidenciou ganho de sobrevida no grupo de pacientes submetidos à ressecção neurocirúrgica logo após o diagnóstico (JAKOLA *et al*, 2012).

Outro ponto controverso envolve o tratamento com RT adjuvante com relação ao *timing* de indicação (precoce *versus* tardia) e a dose prescrita (baixa *versus* alta dose). O estudo EORTC 22845 randomizou 314 pacientes em 24 centros médicos europeus para RT precoce (após a abordagem cirúrgica inicial ou após biópsia) e RT tardia (após progressão de doença). Os resultados demonstraram benefício em sobrevida livre de progressão (SLP) no braço de pacientes com tratamento precoce (5,3 anos x 3,4 anos), porém não evidenciou ganho de sobrevida global (SG); (7,4

anos x 7,2 anos). Foi observado ainda que os pacientes submetidos à radioterapia precoce não evoluíram com maior risco de recidiva com elevação de grau tumoral, entretanto, cursaram com neurotoxicidade relacionada ao tratamento com prejuízo cognitivo a longo prazo (KARIM; MAAT; HATLEVOLL, 1996).

Em relação à dose da RT, estudo EORTC 22844 foi desenhado para verificar relação dose-resposta e randomizou 379 pacientes. Um braço do estudo recebeu 45Gy em 5 semanas e o outro 59,4Gy em 6,6 semanas. Após um *follow-up* de 74 meses não foi observada diferença em SG (58 *versus* 59%) e tampouco em SLP (47 *versus* 50%) em relação à dose da RT. Ressalta-se que o uso de dose alta de RT é associado a maior incidência de efeitos adversos relacionados ao tratamento (VAN DEN BENT *et al*, 2005).

A QT é uma modalidade terapêutica utilizada com frequência nos pacientes com diagnóstico de glioma de alto grau, entretanto, o seu papel no grupo de pacientes com glioma de baixo grau permanece em investigação. Quinn et al (2003), conduziu um estudo fase II para avaliar o uso de Temozolamida (TMZ) no esquema 200mg/m² de D1 a D5 a cada 28 dias nos gliomas de baixo grau. Os pacientes recrutados estavam evoluindo com progressão de doença e a taxa de resposta objetiva foi de 61% e apenas 35% dos pacientes apresentaram doença estável. A TMZ é um agente alquilante que induz dano ao DNA por metilação da porção O⁶ da guanina (QUINN *et al*, 2003).

Pouratian et. al (2007), com o objetivo de avaliar segurança e toxicidade do uso de TMZ em dose baixa protraída (75mg/m² de D1 a D21 a cada 28 dias) conduziu um estudo fase II retrospectivo com avaliação de 25 pacientes que preenchiam os critérios de inclusão. O racional para esquema protraído de dose seria a possível promoção do aumento de dose cumulativa e consequente depleção de *MGMT*. Dentre os efeitos adversos observados estavam fadiga (76%), linfopenia (48%), constipação (56%), náuseas (52%). Em conclusão, o perfil dos efeitos adversos difere dos apresentados pelo esquema padrão (200mg/m² de D1 a D5 a cada 28 dias), porém trata-se de um protocolo seguro e bem tolerado. Faz-se uma crítica ao número de pacientes incluídos no estudo (N= 25) e ressalta-se a necessidade da realização de novos estudos. Em concordância com a informação descrita sobre a dose protraída da TMZ, Kesari *et al* (2009) conduziu estudo de fase II semelhante com resultados

concordantes e ressaltou que nos protocolos *standard* de TMZ a SLP foi de 31 meses, enquanto que na dose protraída foi de 38 meses, demonstrando ainda que o status de metilação de *MGMT* e co-deleção de *1p/19q* são correlacionados com SG. Não há evidência de superioridade de um dos esquemas, até o momento (KESARI *et al*, 2009).

Para avaliar o benefício da realização de 06 ciclos de QT adjuvante após RT em comparação com a indicação de RT isolada, Shaw *et al* (2012) conduziu um estudo randomizado (RTOG 9802), prospectivo, fase III com inclusão de pacientes com menos de 40 anos submetidos a ressecção lesional subtotal ou biópsia e pacientes com 40 anos ou mais submetidos a qualquer tipo de ressecção neurocirúrgica. O esquema de QT proposto foi PCV, que consiste em Procarbazina 60mg/m² via oral (D8 ao D21), Lamustina 100mg/m² via oral (D1) e Vincristina 1,4mg/m² intravenoso (D8 e D29) por 6 ciclos após tratamento radioterápico com dose total de 54Gy em 06 semanas. Foram incluídos 251 pacientes e em dois anos, não houve benefício de SG e SLP. Entretanto, no grupo de pacientes que permaneceu vivo após dois anos, os pacientes que realizaram quimioterapia obtiveram benefício em SLP em relação aos pacientes que realizaram radioterapia isolada (SHAW *et al*, 2012).

De forma semelhante ao RTOG 9802, Buckner *et al* (2016) conduziu estudo selecionando pacientes com diagnóstico de glioma grau II submetidos a ressecção subtotal ou biópsia lesional. Cerca de 251 pacientes foram randomizados em dois braços: radioterapia associado a 06 ciclos de PCV *versus* radioterapia isolada. Após 11,9 anos de follow-up observou-se ganhos de SG (13,3 anos *versus* 7,8 anos), SLP em 10 anos (51% *versus* 21%) e SG em 10 anos (60% *versus* 40%) a favor do braço do tratamento combinado (Buckner *et al*, 2016).

Após demonstração de benefício de sobrevida, mesmo que questionável, com associação de quimioterapia a radioterapia após a publicação do RTOG 9802, Whal *et al* (2016) conduziu um estudo de fase II comparando RT *versus* TMZ (200mg/m², 05 dias, via oral, a cada 28 dias). O objetivo do autor ao desenhar o trabalho era evitar a toxicidade tardia associada a radioterapia. Cerca de 120 pacientes foram randomizados entre os braços terapêuticos e após um *follow-up* de cerca de 7,5 anos, observou-se apenas 6% de taxa de resposta global e não houve

diferença significativa de SLP (4,5 anos *versus* 4,3 anos) e nem em SG (10 anos *versus* 10,2 anos). Observou-se ainda que os pacientes com codeleção *1p19q* não apresentaram, durante o seguimento, risco de progressão e, portanto, talvez esse subgrupo de pacientes fosse candidato a omissão de tratamento adjuvante pelo melhor prognóstico associado (WHAL *et al*, 2016).

Recentemente, foi conduzido estudo de fase III e cerca de 707 pacientes (com pelo menos um fator de risco) foram randomizados para RT *versus* QT com TMZ (75mg/m², via oral, por 21 dias, a cada 28 dias). Após cerca de 48 meses de *follow-up*, não foi observada diferença de sobrevida livre de progressão entre os grupos (BAUMERT *et al*, 2016).

Após extensa discussão, observa-se a grande heterogeneidade dos gliomas classificados como de baixo grau. Um comportamento clínico indolente é esperado para esse grupo de pacientes, porém, observa-se que alguns apresentam progressão rápida de doença e evoluem com transformação maligna alcançando grau tumoral superior o que causa deterioração do quadro clínico e piora importante de prognóstico com queda de SG (MARKO; WEIL, 2013). A identificação do perfil molecular dos pacientes para agrupamento dos mesmos de acordo com o risco de evolução clínica não favorável é de extrema importância para adoção de novas estratégias terapêuticas e para otimizar os resultados obtidos e proporcionar ganho de sobrevida.

1.2. Gliomas de alto grau

Os gliomas de alto grau são representados pelo astrocitoma grau III (anaplásico), astrocitoma grau IV (glioblastoma), oligoastrocitoma anaplásico e oligodendroglioma anaplásico. Dentre eles, o astrocitoma anaplásico e o glioblastoma são as neoplasias do SNC mais comuns na população adulta, correspondendo a 6% e 54%, respectivamente (OSTROM; GITTLEMAN; FARAH, 2013).

À histologia, o astrocitoma grau III apresenta anaplasia, aumento de celularidade, elevada atividade mitótica e atipia nuclear, enquanto que o GBM, além dos achados anteriores, apresenta figuras de mitose aberrantes, proliferação microvascular e necrose. Essas duas últimas características são imprescindíveis para a caracterização histológica do GBM (LOUIS *et al*, 2014). Já os Oligodendrogliomas anaplásicos correspondem a um subtipo tumoral raro e se caracterizam por aumento de celularidade, presença de pleomorfismo nuclear, figuras de mitoses frequentes, proliferação endotelial e necrose. Assim, os Oligodendrogliomas anaplásicos podem simular o GBM, entretanto, o estudo da deleção dos cromossomos *1p* e *19q* pode auxiliar na diferenciação dos mesmos. Clinicamente, os oligodendrogliomas anaplásicos apresentam melhor prognóstico quando comparados aos astrocitomas anaplásicos e ao GBM, assim como evoluem com melhor resposta terapêutica (CAIRNCROSS *et al*, 2006).

A intervenção terapêutica *standard* é pautada em abordagem multidisciplinar com equipe médica que inclui neurocirurgião, neuroradiologista, neuropatologista, radioterapeuta e oncologista clínico. A conduta inicial é a ressecção do maior volume tumoral, uma vez que, é relacionado a aumento de sobrevida livre de progressão. Nos casos em que a lesão se encontra em áreas cerebrais eloquentes, a escolha é proceder biópsia estereotáxica para diagnóstico histopatológico e estudo das mutações relacionadas ao prognóstico do paciente (LACROIX *et al*, 2001). Posteriormente, é indicada radioterapia com dose padrão de 60Gy. O hipofracionamento (aumento da dose por fração e redução do tempo de tratamento) da dose está indicado em pacientes idosos ou naqueles com prejuízo de *performance status* (ROA *et al*, 2004).

A primeira tentativa de prescrever quimioterapia citotóxica nos gliomas de alto grau aconteceu em 1970 com o uso de *Mithramycin* em GBM, porém o estudo falhou em demonstrar aumento de sobrevida (mediana: 24 semanas). Entretanto, observou-se maior sobrevida no grupo de pacientes expostos a radioterapia além de ter sido a primeira ocasião em que o GBM foi estudado de forma randomizada apesar do prognóstico reservado desse subtipo tumoral.

Posteriormente, baseado em dois estudos de fase II, aventou-se a possibilidade do uso de nitrosuréias, pois a droga possui capacidade de ultrapassar a barreira hematoencefálica. Nesses estudos iniciais, foi descrito taxa de resposta de até 50% em pacientes com gliomas de alto grau recorrentes. Estudo de fase III randomizou pacientes para quatro braços distintos: cuidados de suporte, BCNU (carmustina), radioterapia associado à BCNU e radioterapia isolada. O resultado de sobrevida evidenciou 14 semanas, 18 semanas, 34 semanas e 36 semanas, respectivamente. Todas as modalidades terapêuticas foram superiores aos cuidados de suporte isoladamente, entretanto, o acréscimo da quimioterapia em associação a radioterapia não foi superior à radioterapia isolada (WALKER *et al*, 1978).

A temozolamida é um derivado 3-metil da mitozolomide e trata-se de um quimioterápico alquilante que atravessa facilmente a barreira hematoencefálica. Esse quimioterápico demonstrou atividade antitumoral e baixa toxicidade em estudos clínicos de pacientes diagnosticados com GBM. Após o período de radiosensibilização, o paciente recebe a mesma droga em caráter adjuvante por 06 meses. Todo o tratamento descrito demonstrou, pela primeira vez, benefício em sobrevida global nesse grupo de tumores, promovendo aumento de sobrevida de 12,1 para 14,6 meses quando comparados cirurgia associado a radioterapia e cirurgia associado a radioquimioterapia, respectivamente (STUPP *et al*, 2005).

Entretanto, uso de temozolamida radiosensibilizante e adjuvante nunca foi avaliado prospectivamente nos tumores grau III. Wick *et al* (2009) conduziu um estudo fase III em que os pacientes com diagnóstico de glioma anaplásico após abordagem cirúrgica eram randomizados para radioterapia (braço A), PCV (braço B) ou temozolamida (braço C). Após um *follow-up* de 54 meses, a sobrevida livre de progressão foi de 30,6 meses no braço da radioterapia e 31,9 meses no braço da quimioterapia. Não houve diferença em sobrevida global entre os grupos. Os

pacientes com *MGMT* metilado, mutação de *IDH* e tumores de origem oligodendroglioma apresentaram menor risco de recorrência (WICK *et al*, 2009).

Carncross *et al* (2013), para avaliar pacientes com diagnóstico histológico de oligodendroglioma e oligoastrocitoma anaplásicos, conduziram um estudo fase III em que os pacientes eram randomizados para duas modalidades terapêuticas após neurocirurgia: PCV associado a radioterapia e radioterapia isolada. Entretanto, o estudo falhou em demonstrar benefício de sobrevida global associado ao tratamento combinado (4,6 anos x 4,7 anos) e os pacientes randomizados para concomitância evoluíram com maiores taxas de toxicidade, sobretudo, mielossupressão, alteração cognitiva, neuropatia periférica e autonômica, vômitos, disfunção hepática e *rash* alérgico (CARNCROSS *et al*, 2013). Van den Bent *et al* (2013) conduziu estudo semelhante e demonstrou ganho de sobrevida global e sobrevida livre de progressão nos pacientes que receberam quimioterapia após radioterapia adjuvante. Ambos evidenciaram melhores taxas de resposta no grupo de pacientes com co- deleção *1p/19q* (VAN DEN BENT *et al*, 2013).

A despeito da controvérsia envolvendo a indicação de tratamento adjuvante combinado, uma metanálise avaliando 12 estudos e incluindo cerca de 3.000 pacientes com diagnóstico de glioma de alto grau, demonstrou ganho de sobrevida nos pacientes que receberam tratamento sistêmico citotóxico e descreveu redução do risco de morte em aproximadamente 15% com acréscimo em sobrevida de cerca de 2 meses. Apesar dos dados serem positivos a favor da quimioterapia, faz-se uma crítica, pois nenhum dos estudos incluídos possuía apenas pacientes com tumores anaplásicos (ÁFRA *et al*, 2002).

O GBM é o câncer de SNC mais letal, sendo que menos de 5% dos pacientes diagnosticados permanecerá vivo dentro de cinco anos e apresentam sobrevida mediana de aproximadamente 13 meses- variando de 2,5 a 70 meses- (SANA *et al*, 2014). Devido à agressividade tumoral inata, assim como pelos mecanismos de resistência à terapêutica, é o glioma com o pior prognóstico. Os principais fatores prognóstico são idade e *performance status* do paciente ao diagnóstico (CURRAN. SCOTT; HORTON, 1993).

A abordagem terapêutica do GBM, assim como nos tumores anaplásicos, é pautada em intervenção multidisciplinar, uma vez que, o paciente será submetido à neurocirurgia, quimioterapia e radioterapia. Além de promover acesso ao diagnóstico e melhorar sintomas secundários à hipertensão intracraniana, o principal objetivo da intervenção neurocirúrgica é promover a ressecção máxima possível do volume tumoral sem que haja comprometimento cognitivo importante pós-operatório. A exérese macroscópica total é associada a impacto prognóstico positivo nesse grupo de pacientes (PICHLMIEIER *et al*, 2008). Nova abordagem cirúrgica tem seu papel na recorrência tumoral e pode beneficiar um grupo seletivo de pacientes (BARKER; CHANG; GUTIN, 1998).

De acordo com protocolo de tratamento padrão descrito por Stupp *et al* (2005), após ressecção neurocirúrgica, o paciente será submetido a 30 sessões de radioterapia, numa dose total de 60Gy, associado a quimioterapia radiosensibilizante com temozolamida. O papel da radioterapia é de reduzir o risco de recidiva tumoral propiciando lesão direta e indireta ao DNA tumoral (KRISTIANSEN *et al*, 1981). Após as sessões de radioterapia e quimioterapia radiosensibilizante, o paciente será submetido a seis ciclos de Temozolamida adjuvante conforme descrito anteriormente (STUPP *et al*, 2005).

Entretanto, pelo comportamento extremamente agressivo do GBM, a maioria dos pacientes apresenta recidiva de doença em média dois anos após o diagnóstico inicial. Mesmo as células de GBM *in situ* são consideradas radorresistentes (JAMAL *et al*, 2010). Neste contexto, estudo das vias moleculares associadas à radorresistência pode fornecer uma base racional para novas estratégias capazes de aumentar a radiosensibilidade e a sobrevida destes pacientes.

1.3. Biologia molecular

Quanto à biologia molecular, o primeiro oncogene relacionado ao GBM foi o *EGFR* (*Epidermal Growth Factor Receptor*) em 1984. Demonstrou-se amplificação do mesmo sendo este responsável por codificar o fator de crescimento epidérmico (*EGF*). Posteriormente, foi descrito a mutação em *TP53* em GBM sendo esse supressor tumoral responsável, em atividade normal, por interferir na regulação celular normal, permitir reparo no DNA danificado e induzir apoptose em células danificadas. Em 1997 o *PTEN* (*Tensin Homolog Phosphatase*) emerge como um segundo supressor tumoral exercendo sua função através da via *PI3K* que é responsável por indução de proliferação celular a partir de estímulos de fatores de crescimento celular. No GBM o *PTEN* pode estar suprimido deixando a via *PI3K* ativada o que pode estar relacionado com a agressividade tumoral (VAN MEIER *et al*, 2010).

Estudo de perfil gênico em larga escala tem determinado que o perfil transcricional reflete a biologia tumoral e pode ser usado para classificação tumoral e predição de resposta ao tratamento de forma mais fidedigna que a classificação tumoral em graus de malignidade, refletindo a necessidade de uma medicina personalizada. Torna-se claro, de acordo com esses estudos, que é possível agrupar perfis moleculares de GBM em *clusters* baseado na combinação de genes que estão suprimidos ou hiperexpressos em cada grupo. Com esse objetivo o TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) tem o GBM como uma das prioridades para análise de DNA (número de cópias), sequenciamento genético, avaliação do perfil epigenético de metilação, estudo do RNA mensageiro para perfil de expressão gênica e estudo de microRNAs (reguladores da expressão gênica). Dessa forma, o GBM foi classificado em quatro subtipos baseados no perfil molecular: clássico, mesenquimal, proneural e neural (VAN MEIER *et al*, 2010).

Os GBMs secundários são neoplasias que progridem a partir de um astrocitoma de grau mais baixo (astrocitoma difuso, grau II, ou astrocitoma anaplásico, grau III), evoluem de maneira mais lenta, são mais comuns em pacientes mais jovens e têm um prognóstico melhor do que o GBM primário. Mutações no *TP53* são as mais frequentes e são as primeiras alterações genéticas detectáveis, presentes também em 60% dos astrocitomas de baixo grau. A amplificação e superexpressão do *EGFR*

são menos comuns nestas neoplasias. Durante a progressão para GBM, mutações adicionais se acumulam, incluindo a perda de heterozigossidade no *10q25* em aproximadamente 70% dos casos, que inclui o supressor tumoral *PTEN*, sendo esta a alteração mais frequente em ambos os tipos de GBM (OHGAKI; KLEIHUES, 2007).

O gene *PTEN* é um supressor tumoral capaz de inibir a proliferação tumoral e a sobrevivência celular através da inativação da via *PI3K*. A perda da atividade supressora do *PTEN* permite o descontrole dessa via da carcinogênese. A ativação da via de sinalização da *PI3K-Akt* está associada à radiorresistência em diversas neoplasias e sua inibição demonstrou prejuízo no reparo do DNA após RT, resultando em radiosensibilização de diferentes tipos de células, incluindo as de GBM. A inibição da via da *PI3K-Akt* através do tratamento com inibidores de *PI3K* ou expressão do *PTEN* demonstrou aumento da radiosensibilidade das células de GBM (LI; KIM; WALDMAN, 2009).

A mutação de *IDH* é um fator prognóstico bem estabelecido nos gliomas de baixo grau. Menos de 10% dos pacientes com GBM apresentam essa mutação e quando ocorre sugere que se trata de uma neoplasia resultante da evolução de um tumor de baixo grau (GBM secundário). Cerca de 60% dos tumores grau III apresenta o *IDH* mutado e mesmo nos tumores de alto grau, esse achado é associado a um melhor prognóstico e melhor resposta terapêutica (STUM *et al*, 2012).

Outra via gênica alterada comum no GBM, tanto primário como secundário, é a hipermetilação da região promotora do gene O-6-metilguanina-DNA metiltransferase (*MGMT*); (HEGI *et al*, 2005). A enzima *MGMT* possui a capacidade de remover os grupos alquila da posição O6 da guanina no DNA, danificados previamente pela exposição a tratamentos quimioterápicos com drogas alquilantes. A potência da atividade desta enzima permite que a célula tumoral consiga ser recuperada do dano causado pela quimioterapia, levando à resistência aos quimioterápicos alquilantes, como a temozolamida. Estima-se que o gene *MGMT* esteja metilado em aproximadamente 35% dos casos de GBM (HEGI *et al*, 2005).

O gene *TERT* (*Telomerase Reverse Transcriptase*) codifica a subunidade catalítica da telomerase, pré-requisito para imortalização celular, e é reativado aberrantemente em muitas malignidades inclusive no GBM. Análises multivariadas

demonstraram que a ativação do *TERT* é associado a *IDH* em sua forma selvagem e a perda do cromossomo *10q*, independente do grau tumoral. Interessantemente, a atividade da telomerase é associado com a perda do cromossomo 10. Esta contém no alelo *10p15* um repressor da atividade de telomerase (DI STEFANO et al, 2012).

Atualmente, o perfil epigenético da metilação do *MGMT* é um importante biomarcador disponível para a prática clínica, com valor prognóstico e preditivo para a eficácia da temozolamida no tratamento do GBM. A presença da enzima *MGMT* em sua forma metilada é um fator prognóstico favorável para uma maior sobrevida global e sobrevida livre de progressão, uma vez que existe uma maior probabilidade de resposta tumoral ao tratamento quimioterápico realizado (HEGI et al, 2005).

Um dos principais objetivos da pesquisa relacionada ao GBM é encontrar um biomarcador prognóstico com sensibilidade para predizer resultados clínicos do tratamento instituído e servir de base para terapias de alvo molecular. Uma das formas mais modernas de caracterização tumoral molecular é baseada na expressão de microRNA. Ferramentas de bioinformática estimam que os microRNAs possam regular cerca de 60% dos genes humanos incluindo um número significativo de oncogenes, genes supressores tumorais e genes relacionados a quimioradioressistência (SANA et al, 2014).

1.4. Evolução maligna

Os tumores de origem glial apresentam grande variabilidade em relação ao comportamento clínico. Os tumores de baixo grau apresentam, de forma geral, sobrevida mediana de 5 a 10 anos, enquanto que, o GBM apresenta sobrevida mediana de 14 meses. Entretanto, cerca de 50 a 75% dos pacientes diagnosticados com tumores de baixo grau irão apresentar deterioração prognóstica por progressão da doença como tumores ainda de baixo grau ou degeneração tumoral para grau de malignidade superior. Sabe-se que pacientes com lesões grandes (sobretudo maiores que 6 cm) e aqueles submetidos a ressecção tumoral subtotal apresentam maior risco para os dois eventos anteriores, entretanto, as demais razões para evolução maligna ainda permanecem desconhecidas na atualidade (CHAICHANA *et al*, 2010).

Com o objetivo de elucidar o comportamento clínico dos tumores de baixo grau, estudo recente categorizou as alterações moleculares de cada subgrupo. Ressalta-se que o astrocitoma grau II é considerado por alguns pesquisadores como um estágio precoce dos tumores de alto grau (anaplásico e GBM secundário) uma vez que a genética e epigenética desses tumores é muito semelhante. Nos astrocitomas grau II a alteração genética mais comum é a perda completa da forma selvagem de *P53* por mutação do gene *TP53* que ocorre em 60 a 80% dos pacientes. A mutação do *TP53* também é elevada nos GBMs primários e secundários, o que torna factível a hipótese do astrocitoma grau II representar um estágio precoce da mesma doença (OHGAKI; KLEIHUES, 2009).

Cerca de 12% dos GBMs primários apresentam mutação de *IDH1*. Esta, no entanto, é mais comum nos astrocitomas de grau III, GBM secundário e pode chegar a 80% nos tumores de grau II. Alguns autores aventam a possibilidade das mutações no *IDH* não possuírem potencial oncogênico, mas sim, agirem em mecanismos proteicos que podem interferir no metabolismo tumoral. Quanto à alteração do Fator de Crescimento derivado de Plaqueta (*PDGFR*), acredita-se que o mesmo esteja hiperexpresso em gliomas de todos os graus. Esse receptor de tirosina kinase age através da via *RAS* (e consequentemente, com *PI3K*, *PTEN*, *AKT* e *mTOR*) e acredita-se que, apesar de dados escassos, haja hiperexpressão do mesmo em até

60% dos astrocitomas grau II (MARKO; WEIL, 2013). Outra hipótese é que a hiperexpressão, assim como ocorre com o *EGFR*, seja mais comum nos GBMs primários e ocorra de forma mais rara nos tumores secundários. Ambas as descrições fornecem evidências de que os receptores de tirosina kinase seriam ferramentas úteis para diferenciar o tumor primário do tumor resultante de evolução maligna de um tumor de grau inferior. Além disso, acredita-se que a hiperexpressão de *PDGFR* e *EGFR* nos astrocitomas grau II estejam relacionados a menor sobrevida dos pacientes, assim como a hipermetilação do *MGMT* está associada a maiores taxas de resposta terapêutica e ganho em sobrevida nesse mesmo grupo de pacientes (WATANABE *et al*, 1996).

A alteração molecular mais comum nos tumores de linhagem celular oligodendroglial de baixo grau é a codeleção *1p/19q*. Esta é relacionada com melhor resposta terapêutica ao tratamento instituído e aumento da sobrevida dos pacientes. Apesar de não ser específica dos oligodendrogliomas, a codeleção parece ser mutuamente exclusiva de outras anormalidades moleculares como *17p*, *TP53* e *LOH*. Dessa forma, as alterações moleculares encontradas podem dividir a fisiopatogenia dos oligodendrogliomas em dois grupos de acordo com o perfil molecular. Assim como nos tumores de linhagem astrocítica de baixo grau, a mutação de *IDH1* e *IDH2* ocorre em até 80% dos oligodendrogliomas e, curiosamente, os tumores que possuem mutação de *IDH* são mais propensos a apresentarem codeleção *1p/19q*. Outras anormalidades cromossômicas menos frequentemente descritas são deleções nos cromossomos 4,6, braço curto do 14 (*14p*), 9,10 e braço longo do 22 (*22q*). Entretanto, o significado dessas permanece incerto (OHGAKI *et al*, 2004).

Ainda em relação aos oligodendrogliomas grau II, amplificação de *EGFR* é descrita em até 50% dos pacientes, porém esses dados provêm de estudos com poucos pacientes incluídos. Quanto ao *MGMT*, esses tumores apresentam baixos níveis de expressão quando comparados aos astrocitomas grau II e os níveis de hipermetilação podem chegar a 80% (YAN *et al*, 2009).

Estudo recente apontou o *TGF-β* como via de sinalização envolvida na proliferação celular, progressão e invasão tumoral, sendo, portanto, uma possível via para terapia de alvo-molecular para tratamento do GBM. Adicionalmente, expressão aberrante de microRNAs (miRNAs) tem sido demonstrado na maioria das neoplasias

como, por exemplo, câncer de mama e hepatocarcinoma. Nesse contexto, o miRNA-146a é bem estabelecido e o aumento induzido da sua expressão, foi associado com inibição do crescimento tumoral *in vitro* sendo um dos mecanismos da inibição do *EGFR* (responsável pela progressão, migração e invasão tumoral). Porém, o mecanismo responsável pela diminuição da expressão do miRNA-146a permanece desconhecido (LV *et al*; 2014).

MicroRNAs são uma classe de RNA não codificante. São constituídos por cerca de 18 a 25 nucleotídeos e regulam a estabilidade e transcrição dos RNAs mensageiros. São relacionados à proliferação, migração, invasão e apoptose. Podem agir como oncogenes ou supressores tumorais e podem regular a expressão genética através de RNAs mensageiros. Muitos miRNAs apresentam expressão anormal em GBM e são relacionados ao desenvolvimento do mesmo, podendo, inclusive, definir subgrupos moleculares com reflexo prognóstico (MOHAMMAD *et al*, 2014). Ferramentas de bioinformática estimam que os microRNAs possam regular cerca de 60% dos genes humanos incluindo um número significativo de oncogenes, genes supressores tumorais e genes relacionados a quimioradioressistência. Assim, agem como reguladores de processos fundamentais da tumorigênese como proliferação, invasão, migração celular e angiogênese (SANA *et al*, 2014). Devido ao papel central na regulação do ciclo celular, os miRNAs podem representar moléculas-alvo para definição de diagnóstico, prognóstico e *targets* para tratamento de diversos tumores (VISANI *et al*, 2014).

Yan *et al* (2014), demonstrou através de análise de cinco miRNAs que a expressão dos mesmos pode ter relação com a evolução maligna dos tumores de baixo grau para alto grau, porém não foi observada a correlação positiva do achado na evolução maligna dos astrocitomas anaplásicos para GBM secundário. O mesmo estudou e estratificou, de acordo com a expressão dos miRNAs, os pacientes com diagnóstico de GBM pró-neural com perfil molecular desfavorável e piores resultados clínicos (YAN *et al*, 2014).

Estudos demonstram que alguns miRNAs apresentam papel descrito na patogênese dos GBMs. Por exemplo, o miRNA-21 está fortemente hiperexpresso em GBM e poderia induzir a deterioração tumoral através do bloqueio de genes relacionados a apoptose celular. Além disso, está envolvido com crescimento e

invasão celular típicas do GBM (SONG *et al*, 2014). Estudo recente evidenciou que a expressão do miRNA-21 é negativamente correlacionada com a sensibilidade à radioterapia. Ou seja, quanto mais expresso, menos sensíveis são as células do GBM à radiação. Essa radiorresistência ocorre através da regulação dos genes *PDCD4* e *hMSH2*. Outros fatores relacionados à radiorresistência são localização e tamanho tumoral (CHAO; XIONG; LIU; CHEN; ZHANG, 2013). Já o miRNA-449a foi relacionado negativamente com o grau histopatológico dos gliomas. A superexpressão leva à inibição da proliferação celular, migração, invasão e induz apoptose em culturas de células de GBM. Confirmando esses dados, demonstrou-se expressão bastante reduzida em culturas de células de GBM (YAO *et al*, 2014).

SANA *et al* (2014), conduziu um estudo que identificou 108 miRNA superexpressos (principalmente miRNA-21 e miRNA-155) e 108 hipoexpressos (principalmente miRNA-220 e miRNA-1247) em 58 amostras de GBM. Nessa amostra, utilizando regressão de Cox para analisar cada miRNA especificamente, chegaram a seis miRNAs preditores de sobrevida global (miRNAs miR-31, miR-224, miR-432, miR-454, miR-672 e miR-885-5p). Os seis miRNAs foram utilizados para cálculo de risco em cada amostra. Pacientes classificados com alto e baixo risco apresentaram sobrevida livre de progressão de 4,4 e 9,4 meses, respectivamente. A mediana de sobrevida global foi de 7,5 e 16,2 meses, respectivamente. Esses dados demonstram que o perfil de risco baseado nos seis miRNAs definidos foram fator prognóstico independente para sobrevida global e sobrevida livre de progressão. Entretanto, apenas quatro miRNAs (miR-31, miR-224, miR-432, miR-454-3p) foram validados com base nos dados do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA).

Há descrição de uma nova metodologia, conhecida como LASSO (*least absolute shrinkage and selection operator*), que foi utilizada com dados de GBM do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) para identificar nove miRNAs preditores de sobrevida. Dessa forma, criou-se um algoritmo com escore de risco para estratificação dos pacientes em relação ao prognóstico. Participaram do estudo conduzido por HAYES *et al* (2014), pacientes (n= 475) tratados com radioterapia e algum esquema adicional de quimioterapia e os mesmos foram separados em baixo e alto risco após análise. Destes, apenas 187 pacientes realizaram radioterapia e fizeram uso de temozolamida conforme protocolo padrão definido por Stupp e colaboradores (2005).

$$\text{Risk score} = -0,044E_miR-370 + 0,062_miR-124a + -0,066E_miR-145 + 0,005E_miR-34a + 0,015_miR-10b + 0,092E_miR-148a + 0,162E_miR-222 + -0,032E_miR-9 + -0,021E_miR-182$$

Dados finais demonstraram que pacientes classificados como alto risco, tiveram sobrevida mediana de 9,5 meses, enquanto isso, nos pacientes no grupo de baixo risco a sobrevida foi de 13,1 meses (HAYES *et al*, 2014). Visani *et al* (2014), conduziu estudo para avaliar o perfil de expressão de 19 miRNAs em GBM e em tumores de SNC de grau inferior (graus I ao III). Foram incluídas 60 amostras de GBM, 7 oligodendrogliomas anaplásicos, 3 astrocitomas anaplásicos, 7 oligodendrogliomas grau II e 1 astrocitoma grau II. Os miRNAs hiperexpressos no GBM foram miR-21 e miR-10b. Este último encontrava-se hiperexpresso ainda nos tumores anaplásicos e hipoexpresso nos tumores de baixo grau, enquanto os demais demonstraram concordância de expressão entre os diversos graus tumorais.

Recentemente, após análise de 365 miRNAs em GBM e astrocitomas anaplásicos, foi observada hipoexpressão importante do miR-105 nas amostras de glioma grau IV. Análises posteriores demonstraram hipoexpressão também nos astrocitomas difusos, porém em menor proporção quando comparado ao encontrado no GBM. Quando comparado com tecido cerebral normal utilizado para controle no estudo, todos os tumores de linhagem astrocítica possuíam níveis extremamente reduzidos do miR-105. Análise estatística posterior demonstrou que a expressão reduzida desse microRNA estava relacionada com tumores mais avançados, maior idade ao diagnóstico, menor *performance status* pré-operatória e menor sobrevida global (GUAN *et al*, 2015). Dados semelhantes foram descritos em relação ao miR-124: níveis reduzidos em gliomas quando comparados ao tecido cerebral normal e níveis reduzidos em relação inversamente proporcional ao grau tumoral com impacto em sobrevida global e sobrevida livre de progressão (CHENG; WANG; LI; XU, 2015). Estudo com desenho semelhante demonstrou resultados parecidos em relação ao miR-128 (SUN *et al*, 2015).

Baseado na expressão molecular de *TERT*, *IDH* e *1p19q*, estudo recente categorizou pacientes com diagnóstico de glioma em cinco grupos. Dentre 615

pacientes com diagnóstico de glioma graus II e III, 29% foi considerada triplo-positivo, 5% apresentavam mutação de *IDH* e *TERT*, 45% apenas mutação de *IDH*, 7% triplo negativo e 10% tinham apenas mutação de *TERT*. Já nos 472 pacientes com diagnóstico de GBM, 1% era triplo positivo, 2% tinham mutação de *TERT* e *IDH*, 7% apenas *IDH* mutado, 17% triplo negativo e 74% apenas mutação de *TERT*. Em análise estatística posterior, este último grupo foi relacionado a piores taxas de sobrevida global (ECKEL- PASSOW *et al*, 2015).

Bart e colaboradores (2015), ainda com o objetivo de promover classificação tumoral além do agrupamento por caracteres histopatológicos, analisou 93 tumores de graus II e III. Após classificação molecular, os mesmos foram agrupados em três grupos: 1) mutação de *IDH* e codeleção de 1p/19q; 2) mutação de *IDH* e ausência de codeleção 1p/19q; 3) *IDH wild type*. Após clusterização dos tumores, análise de número de cópias de DNA e descrição de características clínicas dos pacientes envolvidos, foram descritos achados interessantes como por exemplo, comportamento clínico agressivo semelhante ao GBM no grupo de paciente com *IDH wild type*. Além disso, a maioria dos pacientes com mutação de *IDH* e ausência de codeleção 1p/19q apresentavam mutação de *TP53*. Indiscutivelmente, os tumores de grau II e III com mutação de *IDH* e codeleção de 1p/19q apresentaram melhor evolução clínica (BART *et al*, 2015).

Após dados preliminares do projeto de doutorado intitulado “Expressão global de microRNAs em neuroesferas e células aderidas de culturas primárias de glioblastoma tratadas com temozolomida e radiação ionizante”, conduzido pela pós-graduanda Andressa Romualdo Rodrigues com orientação da Professora Doutora Daniela Pretti da Cunha Tirapelli, foram selecionados quatro miRNAs com expressão diferencial em GBM após análise de 47 selecionados após vasta revisão da literatura.

Dentre os quatro miRNAs selecionados, o miR-124a, considerado supressor tumoral, apresenta níveis hipoexpressos em células de GBM (hipermetilado em 82%) em contraste com expressão elevada em tecido cerebral normal. Não há dados elucidativos sobre a expressão discrepante do mesmo, porém, níveis elevados inibem proliferação, migração e invasão celular (TIVNAM *et al*, 2013).

O miR-138 é descrito como supressor tumoral em outras neoplasias malignas, porém, em células de GBM, sua superexpressão está relacionado à manutenção de sobrevivência celular associado à resistência a TMZ *in vitro* e progressão tumoral *in vivo*, podendo ser particularmente importante na resistência adquirida e constitutiva à terapia padrão-ouro atual para tratamento do GBM (STOJCHEVA *et al*, 2016). É ainda descrito que o miR-138 regula inúmeros processos biológicos como morfogênese embriológica e desenvolvimento e diferenciação de células-tronco tumorais, além disso, aventa-se a possibilidade de efeito imune antitumoral potente com a administração de miR-138 *in vivo* (WEI *et al*, 2015).

Sabe-se, atualmente, que a expressão diferencial dos miRs tem associação na tumorigênese e transformação maligna. O miR-155 regula a apoptose celular, proliferação, invasão, capacidade de metástases, angiogênese tumoral e metabolismo. É superexpresso em inúmeros tumores malignos que são associados a prognóstico ruim, como por exemplo, cólon, mama, pulmão e pâncreas. Nesse grupo de neoplasias, há superexpressão e ação como oncogene. Entretanto, o mesmo miR age como supressor tumoral, estando hipoexpresso, em tumores de estômago, melanoma e ovário. Nos gliomas, há superexpressão quando comparado a tecido cerebral normal. Além disso, a superexpressão do miR-155 nos gliomas é relacionado a piora de sobrevivência global e sobrevivência livre de progressão sobretudo nos tumores de alto grau (SUN *et al*, 2014).

Cerca de 20% dos casos de GBM apresenta componente oligodendroglial em sua composição. Este é responsável por melhor prognóstico e resulta em maior sobrevivência. Recentemente, observou-se que o miR-1275 quando hipoexpresso é responsável pela indução de expressão de proteínas de linhagem oligodendroglial, como a *CLDN11*, sendo responsável, ainda, por supressão de proliferação tumoral. Dessa forma, foi caracterizado um mecanismo epigenético, dentro um subgrupo de neoplasia marcada por elevada heterogeneidade tumoral, que pode se caracterizar como biomarcador prognóstico (KATSUSHINA *et al*, 2012).

OBJETIVOS

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

Analisar a expressão dos microRNAs miR-124a, miR-138, miR-155 e miR-1275 em amostras de tumor primário humano e sangue periférico de pacientes com diagnóstico de glioma de baixo e alto graus (astrocitoma grau I, astrocitoma grau II, astrocitoma grau III, glioblastoma, oligodendroglioma grau II e oligodendroglioma grau III).

2.2. Objetivos específicos

a) Correlacionar a expressão dos microRNAs e a sobrevida dos pacientes, assim como realizar a associação com os pacientes que recidivaram com evolução maligna;

b) Predizer, através da expressão diferencial dos microRNAs, a evolução clínica dos pacientes.

PACIENTES E MÉTODOS

3. PACIENTES E MÉTODOS

3.1. Pacientes

Foram estudadas 65 pacientes com amostras tumorais criopreservadas e armazenadas no Banco de Tumores do Sistema Nervoso Central de tumores primários de pacientes com diagnóstico histopatológico confirmado de glioma (cinco amostras de astrocitomas grau I; quatro de astrocitomas grau II; cinco de astrocitoma grau III; doze de oligodendrogliomas grau II; dez de oligodendrogliomas grau III e vinte e nove amostras de GBM).

Todos os pacientes foram abordados em sua consulta médica com a equipe de Oncologia Clínica ou Neurocirurgia para a apresentação, explicação do estudo e, em havendo concordância, assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A).

3.1.1. Critérios de inclusão

a) Pacientes entre 07 e 75 anos de idade com diagnóstico histopatológico confirmado de glioma de baixo ou alto grau (astrocitoma graus I, II, III e IV e oligodendroglioma graus II e III);

b) Possuir material biológico tumoral criopreservado armazenado junto ao Banco de Tumores do Sistema Nervoso Central do HCFMRP-USP (atualização nº 11006/2005 do processo nº 7645/1999 do Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP).

3.1.2. Critérios de exclusão

a) Casos que não possuíam informações clínicas detalhadas a respeito das características epidemiológicas e dados referentes à evolução clínica e radiológica destes pacientes com descrição da recidiva tumoral e análise histopatológica;

b) Pacientes que não possuíam amostra de sangue periférico armazenada no Banco de Tumores do Sistema Nervoso Central;

c) Amostras com RNA degradado;

d) Pacientes com diagnóstico histopatológico de oligastrocitoma;

3.2. Métodos

O presente trabalho foi desenvolvido junto ao Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto (FMRP-USP). Trata-se de um estudo retrospectivo e observacional.

Foram coletadas, retrospectivamente, em forma de tabela (Apêndice B), informações do paciente relacionadas às características clínicas, epidemiológicas, evolução clínica e radiológica e desfecho relacionado à progressão da doença e evolução maligna (baixo para alto grau) contidas no prontuário médico.

A avaliação dos microRNAs de interesse foi realizada no sangue periférico do paciente (já armazenado após centrifugação junto ao banco de tumor) e na amostra do tumor primário cerebral. Os quatro miRNAs de estudo foram selecionados após dados preliminares do projeto de doutorado intitulado “Expressão global de microRNAs em neuroesferas e células aderidas de culturas primárias de glioblastoma tratadas com temozolomida e radiação ionizante”, conduzido pela pós-graduanda Andressa Romualdo Rodrigues com orientação da Professora Doutora Daniela Pretti da Cunha Tirapelli.

3.2.1. Extração do DNA

Foram adicionados às amostras 250µl de PBS (*phosphate-buffered saline*) e 750µl de Trizol® (Invitrogen, EUA). O fragmento de tecido foi homogeneizado com a utilização do aparelho Politron®. Após permanência em temperatura ambiente por 5 minutos, foi acrescentado 200µl de clorofórmio, agitando-se vigorosamente por 15 segundos. A solução final foi centrifugada a 4°C por 15 minutos a 14.000 rpm

(rotações por minuto) e a fase aquosa (superior) de cada frasco foi transferida para novos tubos. O RNA precipitou-se com 500µl de álcool isopropílico 100% e permaneceu a -20°C por pelo menos 12 horas.

No dia seguinte, a amostra foi centrifugada a 4°C por 15 minutos a 14.000 rpm, desprezando-se o sobrenadante a seguir. Acrescentou-se então 1000µl de etanol a 75% seguido novamente de centrifugação refrigerada por 15 minutos a 14.000 rpm. Desprezou-se então a fase superior e o precipitado seco foi dissolvido com água tratada com DEPC (dimetil pirocarbonato) por pelo menos 15 minutos. Esse material foi, em seguida, identificado e armazenado a -80°C.

Utilizou-se em seguida um equipamento chamado *Thermo Scientific NanoDrop 2000*. Trata-se de um espectrofotômetro que fornece a concentração de RNA em uma amostra de 1 a 2µl. Além da concentração, este aparelho nos fornece valores de uma razão referentes à integridade das amostras (razão 260/280). Para valores menores do que 1,6 considera-se que o material esteja degradado, e para valores maiores do que 2,0 pode ter havido interferência do clorofórmio. A faixa ideal a ser obtida é de 1,7 a 1,9.

3.2.2. Síntese do DNA complementar

Após quantificação do RNA, a síntese do cDNA foi realizada com a utilização do Kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit – Applied Biosystems®* a partir de 1µg de RNA. Para cada reação de transcrição reversa com volume final de 7,5µl, foram utilizados 0,75µL de *buffer* (multiplicado pelo número de amostras), 0,075µL de dNTP, 2,5µL de *Random Primers*, 0,5µL de *multiscribe*, 0,63µL de *RNase OUT*, água DEPC q.s.p 7,5 µL, 1,5 µL de primer específico além de 5 ng de RNA. Os reagentes e o RNA foram submetidos ao termociclador onde foram realizados os ciclos de 30 minutos a 16°C, 30 minutos a 42°C, 5 minutos a 85°C e fase *hold* a 4°C. Posteriormente, as amostras de cDNA foram armazenadas a -20°C.

3.2.3. PCR em tempo real

As análises da expressão relativa dos miRNAs miR-124a, miR-138, miR-155, miR-1275 foram realizadas utilizando-se a técnica de PCR (Reação em Cadeia

de Polimerase) em tempo real (método *TaqMan Mix*) no aparelho *7500 Real-Time PCR System*® (*Applied Biosystems*). O método de PCR em tempo real foi utilizado para a confirmação da expressão diferencial dos miRNAs. A partir do cDNA obtido das amostras, foi realizada a amplificação PCR, quantitativa em tempo real (RQ-PCR), com a utilização do reagente *TaqMan Master Mix* (*Applied Biosystems*). Para a análise quantitativa da expressão de miRNAs, foram utilizados os sistemas disponíveis comercialmente *TaqMan Assay-on-demand*, compostos por oligonucleotídeos e sondas (*Applied Biosystems*).

Considerando-se as diferenças causadas por quantidades distintas de cDNA utilizadas nas reações, os valores de CT determinados para as diferentes amostras, foram normalizados. O CT determinado para uma amostra (para um determinado miRNA) foi subtraído do CT determinado para um gene *house-keeping* (neste caso, a média do U6) na mesma amostra, originando o chamado ΔCT . Os valores de ΔCT podem, para um mesmo gene, ser comparados de maneira diferente, obtendo-se uma quantificação relativa da expressão deste gene em diferentes amostras. A cada ciclo, o número de cópias em uma reação de PCR duplica. Assim, o número de ciclos que separa o ΔCT de uma amostra do ΔCT do calibrador, neste caso, utilizamos a média das amostras do grupo controle, tendo como resultado $\Delta\Delta CT$. Esta diferença, em termos de nível de expressão gênica relativa, é obtida de forma aproximada, aplicando a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Realizou-se a quantificação relativa dos microRNAs nas quais as reações de PCR em tempo real foram realizadas em duplicata, utilizando o reagente *Taqman Master Mix* (*Applied Biosystems*, EUA). A amplificação foi feita em um volume final de 10µl, utilizando 5µl do reagente específico *Taqman Master Mix*, 0,5µl de cada sonda específica e 4,5µl de cDNA. Utilizou-se um aparelho de detecção de PCR em tempo real *7500 Real Time PCR System* (*Applied Biosystems*), juntamente com o *software Sequence Detection System* para a obtenção dos valores de CT. Os dados foram, então, exportados para planilhas do *software Excel* para cálculo dos valores de ΔCT . O *software GraphPad Prism 4.0* (*GraphPad Prism, Inc, San Diego, CA, EUA*), foi utilizado para gerar os gráficos e calcular a significância estatística. A condição padrão de amplificação foi 95°C por 10 minutos, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto (anelamento e extensão simultânea). Todas as

reações foram realizadas em duplicata e analisadas no aparelho 7500 *Sequence Detection System* (Applied Biosystems). Os dados foram constantemente coletados durante o PCR e analisados em ABI-7500 SDS “*software package*”.

3.2.4. Análise estatística

A partir dos dados de $\Delta\Delta C_t$ gerados pelo *software* QuantStudio™ 12K Flex, e utilizando o ambiente R (versão 3.2.5) e pacotes do *Bioconductor*, foram realizados dois testes estatísticos ANOVA (função *aov* do pacote *stats* do R): o primeiro utilizando-se a amostra tumoral primária e posteriormente a amostra tumoral recidivada. Os *p-values* foram ajustados por FDR (função *p.adjust* do pacote *stats* do R), e foram gerados *heatmaps* utilizando o pacote *ComplexHeatmap* (versão 1.6.0). Separadamente, analisou-se os pacientes que evoluíram de forma clínica inesperada (gliomas de baixo grau com progressão rápida da doença e gliomas de alto grau com evolução indolente) para verificar a possível existência de expressão diferencial dos miRNAs em estudo.

Em seguida, com uso do *software* GraphPad Prism® versão 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California USA) realizou-se análise estatística individualmente para cada microRNA, a partir dos dados de *fold* gerados pelo *software* QuantStudio™ 12K Flex, pelo teste estatístico de *Kruskal-Wallis Test* com pós-teste de *Dunn's Multiple Comparison Test*. Com utilização do *software* GraphPad Prism® também foi analisada a viabilidade celular das amostras através do *t-test* e pós-teste de Bonferroni. Em todas as análises, os valores de *p* foram considerados significativos quando inferiores a 0,05.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Dados clínico-epidemiológicos

Para obtenção dos dados clínicos, utilizamos o prontuário dos pacientes. Ao total, foram revisados 65 prontuários para extração dos dados clínico-epidemiológicos, de progressão da doença e evolução maligna.

4.1.1. Gliomas de baixo grau

Dentre os pacientes avaliados, 21 apresentavam diagnóstico de glioma de baixo grau (cinco astrocitomas pilocíticos, quatro astrocitomas grau II e doze oligodendrogliomas grau II). Destes, 61,9% eram do sexo masculino e 38,1% do sexo feminino (relação aproximada de cerca de 1,6 homem para cada 1,0 mulher diagnosticada). Quanto à faixa etária, a mediana foi de 31,6 anos e 90,5% apresentavam *KPS (Karnofsky performance status)* de pelo menos 90% ao serem diagnosticados.

Apenas 23,8% apresentavam ao diagnóstico, lesão tumoral com desvio de linha média cerebral e 33,3% foram submetidos a ressecção macroscópica total da lesão neoplásica. Quanto aos pacientes submetidos à terapia adjuvante pós-cirúrgica, apenas 23,8% foram submetidos à quimioterapia e 33,3% à radioterapia adjuvantes, respectivamente.

Após a conclusão do tratamento proposto e início do seguimento clínico-radiológico, 33,4% dos pacientes evoluíram com progressão de doença e indicação de reabordagem cirúrgica, destes 28,57% apresentaram evolução maligna com elevação do grau tumoral e deterioração clínica progressiva. Apenas um paciente (4,7%) evoluiu a óbito durante o tempo de seguimento. O mesmo havia sido diagnosticado inicialmente com oligodendroglioma grau II com posterior progressão de doença e evolução maligna para oligodendroglioma grau III após cerca de 16 meses do diagnóstico e abordagem terapêutica inicial, com sobrevida de 11 meses após piora do grau tumoral (Tabela 1).

Tabela1: Dados clínicos-epidemiológicos dos pacientes com diagnóstico de Glioma de baixo grau.		Total de casos (%)	Mediana
Astrocitoma grau I		5 (23,9%)	
Astrocitoma grau II		4(19%)	
Oligodendroglioma grau II		12 (57,1%)	
Sexo			
Masculino		13 (61,9%)	
Feminino		8 (38,1%)	
Faixa etária			
10-20 anos		3 (14,2%)	
21- 30 anos		5 (23,8%)	
31-40 anos		11 (52,3%)	31,6 anos
41-50 anos		1 (4,85%)	
51-60 anos		1 (4,85%)	
KPS			
≥90%		19 (90,4%)	
<90%		2 (9,6%)	
Desvio de linha média			
Sim			
Não		5 (23,9%)	
		16 (76,1%)	
Abordagem cirúrgica			
Total		7 (33,3%)	
Subtotal		14 (66,6%)	
Radioterapia adjuvante			
Sim		7 (33,3%)	
Não		14 (66,6%)	
Quimioterapia adjuvante			
Sim		5 (23,9%)	
Não		16 (76,1%)	
Progressão de doença			
Sim		7 (33,3%)	
Não		14 (66,6%)	
Evolução maligna			
Sim		2 (9,6%)	
Não		19 (90,4%)	

Fonte: Elaboração própria.

4.1.2. Gliomas de alto grau

Os pacientes diagnosticados com glioma de alto grau somavam 44 (5 astrocitomas grau III, 44 glioblastomas e 10 oligodendrogliomas grau III). Destes, 59,0% eram do sexo masculino e 41,0% do sexo feminino (relação aproximada de cerca de 1,4 homem para cada 1,0 mulher diagnosticada). Quanto a faixa etária, a mediana foi de 47,1 anos e 68,1% apresentavam KPS (*Karnofsky performance status*) de pelo menos 90% ao serem diagnosticados o que pode ser reflexo da biologia tumoral mais agressiva quando comparado aos gliomas de baixo grau, consequente a isso, provocando deterioração clínica mais precoce.

Cerca de 70,4% dos pacientes apresentavam, ao diagnóstico, lesão tumoral com desvio de linha média cerebral e 50,0% foram submetidos a ressecção macroscópica total da lesão neoplásica. A maioria dos pacientes foram submetidos à terapia adjuvante pós-cirúrgica: radioterapia (95,4%) e quimioterapia (93,2%). Os pacientes não candidatos ao tratamento complementar apresentavam declínio rápido e progressivo de KPS após abordagem cirúrgica inicial.

Após a conclusão do tratamento proposto e início do seguimento clínico-radiológico, 68,1% dos pacientes evoluíram com progressão de doença, porém não houve nenhum caso de evolução maligna (Tabela 2). Ressaltamos que durante coleta dos dados, evidenciou-se evolução clínica atípica de 07 pacientes com diagnóstico de glioma de alto grau. Assim segue para GBM: paciente masculino, 39 anos, ressecção total sem progressão de doença após 60 meses; paciente masculino, 33 anos, ressecção total sem progressão de doença após 36 meses; paciente masculino 34 anos, ressecção subtotal, sem progressão de doença após 20 meses; oligodendroglioma grau III: paciente feminina, 31 anos, ressecção subtotal sem evidência de doença após 68 meses; paciente masculino, 30 anos, ressecção total, sem evidência de doença após 101 meses; paciente feminina, 39 anos, ressecção total com posterior progressão e nova abordagem cirúrgica com ressecção total, sem evidência de doença há 116 meses; astrocitoma grau III: paciente feminina, 46 anos, ressecção subtotal, sem progressão de doença há 72 meses.

Tabela2: Dados clínicos-epidemiológicos dos pacientes com diagnóstico de Glioma de alto grau.

	Total de casos (%)	Mediana
Astrocitoma grau III	5 (11,3%)	
Glioblastoma	29 (65,9%)	
Oligodendroglioma grau III	10 (22,8%)	
Sexo		
Masculino	26 (59%)	
Feminino	18 (41,0%)	
Faixa etária		
10-20 anos	0	
21- 30 anos	5 (11,3%)	
31-40 anos	12 (27,2%)	47,1 anos
41-50 anos	9 (20,4%)	
51-60 anos	10 (22,7%)	
61-70 anos	7(15,9%)	
71-80 anos	1(2,5%)	
KPS		
≥90%	30 (68,1%)	
<90%	14 (31,9%)	
Desvio de linha média		
Sim		
Não	31 (70,4%)	
	13 (29,5%)	
Abordagem cirúrgica		
Total	22 (50%)	
Subtotal	22 (50%)	
Radioterapia adjuvante		
Sim	42 (95,4%)	
Não	2 (4,6%)	
Quimioterapia adjuvante		
Sim	41 (93,2%)	
Não	3 (6,8%)	
Progressão de doença		
Sim	30 (68,1%)	
Não	14 (31,9%)	
Evolução maligna		
Não	44 (100%)	

Fonte: Elaboração própria.

Após avaliação das características clínico-epidemiológicas de acordo com o grau tumoral, foi realizada avaliação de sobrevida através da curva de Kaplan-Meier. Percebe-se que há de fato impacto do KPS em sobrevida dos pacientes recém-diagnosticados. Portanto, trata-se de um fator prognóstico, ou seja, pacientes diagnosticados com a funcionalidade clínica preservada ($KPS \geq 90\%$) apresentam maior sobrevida quando comparados aos pacientes diagnosticados com prejuízo funcional (Gráfico 1). Outra correlação realizada para a sobrevida, foi com o grau tumoral. Como é esperado pelo comportamento biológico e evolução clínica dos gliomas de baixo grau, esse grupo de pacientes apresentou maior sobrevida quando comparado aos pacientes diagnosticados com glioma de alto grau (Gráfico 2).

Gráfico 1 – Curva de Kaplan-Meier com a sobrevida dos pacientes diagnosticados com Glioma de baixo grau.

Fonte: Elaboração própria (software GraphPad Prism® versão 5.00).

Gráfico 2 – Curva de Kaplan-Meier com a sobrevida dos pacientes de acordo com o grau tumoral ao diagnóstico.

Fonte: Elaboração própria (software GraphPad Prism® versão 5.00).

4.2. Quantificação da expressão dos microRNAs

Os microRNAs em estudo não apresentaram hiperexpressão em tecido tumoral de pacientes diagnosticados com GBM, o glioma de grau mais elevado e que apresenta evolução clínica desfavorável. Apenas o miR-1275 apresentou expressão aumentada em pacientes com diagnóstico de astrocitoma pilocítico ($p < 0,0001$) e o miR-155 foi hiperexpresso apenas em amostras de oligodendroglioma grau II ($p = 0,0133$). Além disso, tumores de linhagem oligodendroglial, de baixo e alto graus, demonstraram hiperexpressão do miR-1275 ($p < 0,0001$) e miR-124a ($p < 0,0001$). Está demonstrado, na tabela 3, a hiperexpressão de forma individualizada na dependência do diagnóstico anátomo-patológico e determinação do grau tumoral.

Em sangue periférico, observou-se significativa hipoexpressão dos miR-1275, miR-124 e miR-138 em amostra de GBM ($p < 0,0001$). Observou-se, ainda, acentuada hipoexpressão do miR-138 em amostras de oligodendroglioma grau III ($p < 0,0001$). Demonstra-se, na tabela 4, a hipoexpressão individualizada dos microRNAs em estudo.

Tabela 3: Hiperexpressão dos microRNAs em tecido tumoral.

miR-1275 ($p < 0,0001$)	miR-155 ($p = 0,0133$)	miR-124a ($p < 0,0001$)	miR-138 ($p = 0,0061$)
AP	OD II	A II	A II
A II		OD II	OD III
A III		OD III	
OD II			
OD III			

Fonte: Elaboração própria. AP: astrocitoma pilocítico; AII: astrocitoma grau II; AIII: astrocitoma grau III; OD II: oligodendroglioma grau II; OD III: oligodendroglioma grau III.

Tabela 4: Hipoexpressão dos microRNAs em sangue periférico.

miR-1275 (p<0,0001)	miR-155 (p<0,0001)	miR-124a (p< 0,0001)	miR-138 (p< 0,0001)
AP	A III	AP	A III
GBM	OD II	A III	GBM
OD II		GBM	OD II

Fonte: Elaboração própria. AP: astrocitoma Pilocítico; AII: astrocitoma grau II; AIII: astrocitoma grau III; GBM: glioblastoma; OD II: oligodendroglioma grau II; OD III: oligodendroglioma grau III.

4.2.1. microRNA-1275

O microRNA-1275 apresentou expressão significativamente aumentada ($p < 0,0001$), em comparação ao controle, em tecido tumoral de pacientes com diagnóstico de gliomas de baixo grau (astrocitoma graus I e II e oligodendroglioma grau II) além de hiperexpressão nos gliomas de grau III (astrocitoma e oligodendroglioma). Não se observou, entretanto hiperexpressão em pacientes com diagnóstico de GBM (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Expressão do microRNA-1275 em tecido tumoral. O microRNA-1275 teve sua expressão significativamente aumentada em pacientes com diagnóstico de AP, AII, A III, OD II e OD III (*Kruskal-Wallis Test*, $p < 0,0001$), pós-teste de *Dunn's Multiple Comparison Test*. (AP- astrocitoma pilocítico; AII- astrocitoma grau II; A III- astrocitoma grau III; A IV- astrocitoma grau IV; OD- oligodendroglioma grau II; OD III- oligodendroglioma grau III).

Fonte: Elaboração própria (software GraphPad Prism® versão 5.00).

Em contrapartida, no sangue periférico, houve hipoexpressão do miR-1275 em pacientes com diagnóstico de astrocitoma pilocítico, glioblastoma e oligodendroglioma grau II. Observou-se expressão diferencial quando comparadas amostras de astrocitoma grau II e oligodendroglioma grau III (hiperexpressão significativa) com glioblastoma ($p < 0,0001$), sendo evidenciadas hiperexpressão e hipoexpressão, respectivamente (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Expressão do microRNA-1275 em sangue periférico. O microRNA-1275 teve sua expressão significativamente aumentada em pacientes com diagnóstico de astrocitoma grau II e oligodendroglioma grau III em comparação aos pacientes com glioblastoma (*Kruskal-Wallis Test*, $p < 0,0001$), pós-teste de *Dunn's Multiple Comparison Test*. (AP- astrocitoma pilocítico; A II- astrocitoma grau II; A III- astrocitoma grau III; A IV- astrocitoma grau IV; OD- oligodendroglioma grau II; OD III- oligodendroglioma grau III).

Fonte: Elaboração própria (software GraphPad Prism® versão 5.00).

4.2.2. microRNA-155

Análise no tecido tumoral

O microRNA-155 apresentou expressão significativamente aumentada ($p < 0,0133$) em tecido tumoral apenas de pacientes com diagnóstico de oligodendroglioma grau II (Gráfico 5). Já no sangue periférico, observou-se hipoexpressão significativa ($p < 0,0001$) em amostras de astrocitoma grau III e oligodendroglioma grau II em comparação ao controle (Gráfico 6).

Gráfico 5 - Expressão do microRNA-155 em tecido tumoral. O microRNA-155 teve sua expressão significativamente aumentada em tecido tumoral de pacientes com diagnóstico de oligodendroglioma grau II (*Kruskal-Wallis Test*, $p=0,0133$), pós-teste de *Dunn's Multiple Comparison Test*. (AP- astrocitoma pilocítico; A II- astrocitoma grau II; A III- astrocitoma grau III; A IV- astrocitoma grau IV; OD- oligodendroglioma grau II; OD III- oligodendroglioma grau III).

Fonte: Elaboração própria (software GraphPad Prism® versão 5.00).

Gráfico 6 - Expressão do microRNA-155 em sangue periférico. O microRNA-155 teve sua expressão significativamente reduzida de pacientes com diagnóstico de oligodendroglioma grau II e astrocitoma grau III (*Kruskal-Wallis Test*, $p< 0,0001$), pós-teste de *Dunn's Multiple Comparison Test*. (AP- astrocitoma pilocítico; A II- astrocitoma grau II; A III- astrocitoma grau III; A IV- astrocitoma grau IV; OD- oligodendroglioma grau II; OD III- oligodendroglioma grau III).

Fonte: Elaboração própria (software GraphPad Prism® versão 5.00).

4.2.3. microRNA-124a

O microRNA-124a apresentou expressão significativamente aumentada ($p < 0,0001$) em tecido tumoral de pacientes com diagnóstico de oligodendroglioma (graus II e III) e astrocitoma grau II (Gráfico 7). No sangue periférico houve hipoexpressão significativa em astrocitoma pilocítico, astrocitoma grau II e glioblastoma em relação ao controle utilizado (Gráfico 8). Observou-se ainda hipoexpressão significativa em glioblastoma quando comparado à oligodendroglioma grau III ($p < 0,0001$).

Gráfico 7 - Expressão do microRNA-124a em tecido tumoral. O microRNA-124a teve sua expressão significativamente aumentada em tecido tumoral de pacientes com diagnóstico de oligodendroglioma graus II e III e astrocitoma grau II (*Kruskal-Wallis Test*, $p=0,0001$), pós-teste de *Dunn's Multiple Comparison Test*. (AP- astrocitoma pilocítico; A II- astrocitoma grau II; A III- astrocitoma grau III; A IV- astrocitoma grau IV; OD- oligodendroglioma grau II; OD III- oligodendroglioma grau III).

Fonte: Elaboração própria (software GraphPad Prism® versão 5.00).

Gráfico 8 - Expressão do microRNA-124a em sangue periférico. O microRNA-124a teve sua expressão significativamente reduzida em tecido tumoral de pacientes com diagnóstico de astrocitoma Pilocítico, astrocitoma grau III e glioblastoma (*Kruskal-Wallis Test*, $p < 0,0001$), pós-teste de *Dunn's Multiple Comparison Test*. (AP- astrocitoma pilocítico; A II- astrocitoma grau II; A III- astrocitoma grau III; A IV- astrocitoma grau IV; OD- oligodendroglioma grau II; OD III- oligodendroglioma grau III).

Fonte: Elaboração própria (software GraphPad Prism® versão 5.00).

4.2.4. microRNA-138

O microRNA-138 apresentou expressão significativamente aumentada ($p = 0,0061$) em tecido tumoral de pacientes com diagnóstico de oligodendroglioma grau III e astrocitoma grau II (Gráfico 9). Entretanto, em sangue periférico (Gráfico 10), houve hipoexpressão em astrocitoma pilocítico, astrocitoma grau III, glioblastoma e oligodendroglioma grau II ($p < 0,0001$).

Gráfico 9 - Expressão do microRNA-138 em tecido tumoral. O microRNA-138 teve sua expressão significativamente aumentada em tecido tumoral de pacientes com diagnóstico de oligodendroglioma grau III e astrocitoma grau II (*Kruskal-Wallis Test*, $p=0,0061$), pós-teste de *Dunn's Multiple Comparison Test*. (AP- astrocitoma pilocítico; A II- astrocitoma grau II; A III- astrocitoma grau III; A IV- astrocitoma grau IV; OD- oligodendroglioma grau II; OD III- oligodendroglioma grau III).

Fonte: Elaboração própria (software GraphPad Prism® versão 5.00).

Gráfico 10 - Expressão do microRNA-138 em sangue periférico. O microRNA-138 teve sua expressão significativamente reduzida em pacientes com diagnóstico de oligodendroglioma grau II e astrocitoma grau III, astrocitoma pilocítico e glioblastoma (*Kruskal-Wallis Test*, $p<0,0001$), pós-teste de *Dunn's Multiple Comparison Test*. (AP- astrocitoma pilocítico; A II- astrocitoma grau II; A III- astrocitoma grau III; A IV- astrocitoma grau IV; OD- oligodendroglioma grau II; OD III- oligodendroglioma grau III).

Fonte: Elaboração própria (software GraphPad Prism® versão 5.00).

4.3. Quantificação da expressão dos microRNAs dos pacientes com evolução atípica

4.3.1. Gliomas de baixo grau

Durante a revisão dos prontuários dos pacientes, observou-se que alguns deles (20), portadores de doença de baixo e alto graus, apresentavam evolução clínica atípica.

Dentre os portadores de glioma de baixo grau, 05 pacientes com oligodendroglioma grau II apresentaram evolução clínica inesperada e dentre esses, um paciente cursou com evolução maligna após recidiva tumoral (oligodendroglioma grau III). A tabela 5 demonstra os dados clínicos- epidemiológicos de relevância.

Tabela 5: Características clínicas-epidemiológicas dos pacientes com evolução atípica (glioma de baixo grau).

Iniciais	Sexo	Idade	Tamanho tumoral	Cirurgia	Tempo para progressão	Sobrevida	Evolução maligna
MBM	M	32A	4,1CM	TOTAL	16 MESES	27 MESES	OD III
SAMR	F	37A	7,0CM	BIÓPSIA	Sem progressão	66 MESES (VIVO)	Não
ACG	M	34A	2,0CM	SUBTOTAL	04 MESES	30 MESES (VIVO)	Não
			NÃO				
CMSF	F	35A	DELIMITADA	TOTAL	26 MESES	134 MESES (VIVO)	Não
KMKS	M	19A	4,6CM	SUBTOTAL	Sem progressão	36 MESES (VIVO)	Não

Fonte: Elaboração própria. OD III: oligodendroglioma grau III.

Após a identificação dos casos descritos, optou-se por avaliar os microRNAs em estudo com o objetivo de determinar expressão diferencial nos casos com desfecho clínico favorável *versus* desfavorável. No tecido tumoral, os pacientes com oligodendroglioma grau II apresentaram hipoexpressão, em relação ao controle utilizado, do miR-155 (Gráfico 11). Já na amostra de sangue periférico, observou-se hipoexpressão do miR-124a (Gráfico 12) e hiperexpressão do miR-1275 (Gráfico 13).

Gráfico 11 - Expressão do microRNA-155 em amostra de tumor primário de pacientes com glioma de baixo grau e evolução atípica. O microRNA-155 teve sua expressão significativamente reduzida em pacientes com diagnóstico de oligodendroglioma grau II *Kruskal-Wallis Test*, $p= 0,0017$), pós-teste de *Dunn's Multiple Comparison Test*. (AP- astrocitoma pilocítico; A II- astrocitoma grau II; A III- astrocitoma grau III; A IV- astrocitoma grau IV; OD- oligodendroglioma grau II; OD III- oligodendroglioma grau III).

Fonte: Elaboração própria (software GraphPad Prism® versão 5.00).

Gráfico 12 - Expressão do microRNA-124a em amostra de sangue periférico de pacientes com glioma de baixo grau e evolução atípica. O microRNA-124a teve sua expressão significativamente reduzida em pacientes com diagnóstico de oligodendroglioma grau II *Kruskal-Wallis Test*, $p= 0,0018$), pós-teste de *Dunn's Multiple Comparison Test*. (AP- astrocitoma pilocítico; A II- astrocitoma grau II; A III- astrocitoma grau III; A IV- astrocitoma grau IV; OD- oligodendroglioma grau II; OD III- oligodendroglioma grau III).

Fonte: Elaboração própria (software GraphPad Prism® versão 5.00).

Gráfico 13 - Expressão do microRNA-1275 em amostra de sangue periférico de pacientes com glioma de baixo grau e evolução atípica. O microRNA-124a teve sua expressão significativamente aumentada em pacientes com diagnóstico de oligodendroglioma grau II *Kruskal-Wallis Test*, $p=0,0012$), pós-teste de *Dunn's Multiple Comparison Test*. (AP- astrocitoma pilocítico; A II- astrocitoma grau II; A III- astrocitoma grau III; A IV- astrocitoma grau IV; OD- oligodendroglioma grau II; OD III- oligodendroglioma grau III).

Fonte: Elaboração própria (software GraphPad Prism® versão 5.00).

4.3.2. Gliomas de alto grau

Dentre os pacientes com diagnóstico de glioma de alto grau que evoluíram de forma atípica, dois eram portadores de astrocitoma grau II, quatro oligodendroglioma grau III e nove glioblastoma. A tabela 6 demonstra os dados clínicos- epidemiológicos de relevância.

Tabela 6: Características clínico-epidemiológicas dos pacientes com evolução atípica (glioma de alto grau).

Iniciais	Sexo	Idade	Diagnóstico	Tamanho tumoral	Cirurgia	Tempo para progressão	Sobrevida	Evolução maligna
DI	M	28A	Astrocitoma III	NÃO DELIMITADA	SUBTOTAL	65 MESES	68 MESES (VIVO)	NÃO
CRAM	F	46A	Astrocitoma III	6,6CM	SUBTOTAL	Sem progressão	77 MESES (VIVO)	NÃO
JRF	M	40A	OD III	NÃO DELIMITADA	TOTAL	91 MESES	98 MESES (VIVO)	NÃO
JCFO	M	30A	OD III	8,6CM	TOTAL	Não progrediu	101 MESES (VIVO)	NÃO
EA	F	39A	OD III	6,0CM	TOTAL	02 MESES	116 MESES (VIVO)	NÃO
AJA	M	31A	OD III	NÃO DELIMITADA	SUBTOTAL	Não progrediu	68 MESES (VIVO)	NÃO
NATO	F	65A	GBM	6,2CM	TOTAL	6 MESES	6 MESES	NÃO
JCCM	F	59A	GBM	8,0CM	SUBTOTAL	6 MESES	25 MESES	NÃO
JAL	M	55A	GBM	4,7CM	SUBTOTAL	8 MESES	28 MESES	NÃO
ESS	F	40A	GBM	5,5CM	TOTAL	27 MESES	53 MESES	NÃO
SBDB	F	56A	GBM	6,0CM	TOTAL	7 MESES	37 MESES	NÃO
DRC	M	27A	GBM	4,6CM	TOTAL	8 MESES	18 MESES	NÃO
EAO	M	39A	GBM	5,7CM	TOTAL	Não progrediu	60 MESES (VIVO)	NÃO
JFF	M	48A	GBM	5,3CM	SUBTOTAL	Não progrediu	44 MESES (VIVO)	NÃO
JJEJ	M	33A	GBM	7,7CM	TOTAL	Não progrediu	36 MESES (VIVO)	NÃO

Fonte: Elaboração própria. OD III: oligodendroglioma grau III; GBM: glioblastoma.

Para determinar a expressão diferencial dos microRNAs em estudo, optou-se por realizar avaliação gráfica dos mesmos. Em amostras de tecido tumoral, observou-se hipoexpressão significativa em comparação ao controle, de pacientes com GBM para os miR-1275 (Gráfico 14), miR-124a (Gráfico 15) e miR-138 (Gráfico 16). Nas amostras de sangue periférico, observou-se hiperexpressão significativa dos miR-1275 (Gráfico 17), miR-124a (Gráfico 18) e miR-138 (Gráfico 19) nos pacientes com diagnóstico de glioblastoma.

Gráfico 14 - Expressão do microRNA-1275 em amostra de tecido tumoral de pacientes com glioma de alto grau e evolução atípica. O microRNA-1275 teve sua expressão significativamente reduzida em pacientes com diagnóstico de glioblastoma (*Kruskal-Wallis Test*, $p = 0,0013$), pós-teste de *Dunn's Multiple Comparison Test*. (AP- astrocitoma pilocítico; A II- astrocitoma grau II; A III- astrocitoma grau III; A IV- astrocitoma grau IV; OD- oligodendroglioma grau II; OD III- oligodendroglioma grau III).

Fonte: Elaboração própria (software GraphPad Prism® versão 5.00).

Gráfico 15 - Expressão do microRNA-124a em amostra de tecido tumoral de pacientes com glioma de alto grau e evolução atípica. O microRNA-124a teve sua expressão significativamente reduzida em pacientes com diagnóstico de glioblastoma (*Kruskal-Wallis Test*, $p= 0,0005$), pós-teste de *Dunn's Multiple Comparison Test*. (AP- astrocitoma pilocítico; A II- astrocitoma grau II; A III- astrocitoma grau III; A IV- astrocitoma grau IV; OD- oligodendroglioma grau II; OD III- oligodendroglioma grau III).

Fonte: Elaboração própria (software GraphPad Prism® versão 5.00).

Gráfico 16 - Expressão do microRNA-138 em amostra de tecido tumoral de pacientes com glioma de alto grau e evolução atípica. O microRNA-138 teve sua expressão significativamente reduzida em pacientes com diagnóstico de glioblastoma (*Kruskal-Wallis Test*, $p= 0,0009$), pós-teste de *Dunn's Multiple Comparison Test*. (AP- astrocitoma pilocítico; A II- astrocitoma grau II; A III- astrocitoma grau III; A IV- astrocitoma grau IV; OD- oligodendroglioma grau II; OD III- oligodendroglioma grau III).

Fonte: Elaboração própria (software GraphPad Prism® versão 5.00).

Gráfico 17 - Expressão do microRNA-1275 em amostra de sangue periférico de pacientes com glioma de alto grau e evolução atípica. O microRNA-1275 teve sua expressão significativamente aumentada em pacientes com diagnóstico de glioblastoma (*Kruskal-Wallis Test*, $p= 0,012$), pós-teste de *Dunn's Multiple Comparison Test*. (AP- astrocitoma pilocítico; A II- astrocitoma grau II; A III- astrocitoma grau III; A IV- astrocitoma grau IV; OD- oligodendroglioma grau II; OD III- oligodendroglioma grau III).

Fonte: Elaboração própria (software GraphPad Prism® versão 5.00).

Gráfico 18 - Expressão do microRNA-124a em amostra de sangue periférico de pacientes com glioma de alto grau e evolução atípica. O microRNA-124a teve sua expressão significativamente aumentada em pacientes com diagnóstico de glioblastoma (*Kruskal-Wallis Test*, $p= 0,0018$), pós-teste de *Dunn's Multiple Comparison Test*. (AP- astrocitoma pilocítico; A II- astrocitoma grau II; A III- astrocitoma grau III; A IV- astrocitoma grau IV; OD- oligodendroglioma grau II; OD III- oligodendroglioma grau III).

Fonte: Elaboração própria (software GraphPad Prism® versão 5.00).

Gráfico 19 - Expressão do microRNA-138 em amostra de sangue periférico de pacientes com glioma de alto grau e evolução atípica. O microRNA-138 teve sua expressão significativamente aumentada em pacientes com diagnóstico de glioblastoma (*Kruskal-Wallis Test*, $p = 0,0178$), pós-teste de *Dunn's Multiple Comparison Test*. (AP- astrocitoma pilocítico; A II- astrocitoma grau II; A III- astrocitoma grau III; A IV- astrocitoma grau IV; OD- oligodendroglioma grau II; OD III- oligodendroglioma grau III).

Fonte: Elaboração própria (software GraphPad Prism® versão 5.00).

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

No presente trabalho, avaliamos 65 pacientes com amostras tumorais criopreservadas e armazenadas no Banco de Tumores do Sistema Nervoso Central. Os mesmos receberam diagnóstico e tratamento de glioma no Hospital das Clínicas de Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto (HCFMRP). Quanto ao diagnóstico histopatológico, a amostra se distribuiu da seguinte forma: 05 amostras de astrocitomas grau I; 04 de astrocitomas grau II; 05 de astrocitoma grau III; 12 de oligodendrogliomas grau II; 10 de oligodendrogliomas grau III e 29 amostras de GBM.

Foi realizado a avaliação da expressão de quatro microRNAs: miR-1275, miR-155, miR-124a, miR-138. A referida avaliação foi realizada em amostras teciduais do tumor primário e amostras de sangue periférico dos pacientes incluídos. A seleção dos microRNAs de interesse foi baseada em dados preliminares do projeto de doutorado intitulado “Expressão global de microRNAs em neuroesferas e células aderidas de culturas primárias de glioblastoma tratadas com temozolomida e radiação ionizante”, conduzido pela pós-graduanda Andressa Romualdo Rodrigues com orientação da Professora Doutora Daniela Pretti da Cunha Tirapelli.

Com o objetivo de correlacionar os dados da expressão do microRNAs com a evolução clínica dos pacientes incluídos, realizou-se revisão dos prontuários médicos dos mesmos com retirada das seguintes informações: idade ao diagnóstico, gênero, topografia e tamanho da lesão, desvio da linha média (sim *versus* não), linhagem astrocítica (sim *versus* não), presença de sintomas neurológicos ao diagnóstico (sim *versus* não), extensão cirúrgica (macroscópica total *versus* macroscópica subtotal *versus* biópsia), histopatológico 1 (primeira abordagem cirúrgica), realização de radioterapia (sim *versus* não), realização de quimioterapia (sim *versus* não), recidiva tumoral (sim *versus* não), histopatológico 2, data do óbito (para cálculo de sobrevida mediana).

Quanto à avaliação dos microRNAs, optou-se por avaliação dos mesmos em amostras tumorais primárias criopresevada e em amostras de sangue periférico, coletado e centrifugado no dia da abordagem neurocirúrgica, na tentativa de encontrar expressão concordante dos mesmos nas duas amostras e descrever a presença de biomarcadores prognósticos em sangue periférico. Entretanto, nenhum microRNA

estudado apresentou expressão concordante entre as amostras avaliadas (tumor primário e sangue). Os dados da literatura são escassos em relação à expressão dos microRNAs em sangue periférico de pacientes com diagnóstico de glioma e isso talvez seja decorrente da ação da barreira hematoencefálica.

Em contrapartida, a revisão dos prontuários médicos dos pacientes incluídos, permitiu a observação daqueles que apresentavam evolução atípica, ou seja, pacientes com diagnóstico de glioma de baixo grau com tempo curto para recidiva tumoral e comprometimento da sobrevida, assim como, pacientes com diagnóstico de glioma de alto grau com tempo de recidiva longo e sobrevida mediana superior ao descrito na literatura.

5.1. microRNA 1275

Os microRNAs vem sendo relacionados com a regulação do ciclo celular, proliferação celular, apoptose, migração celular, invasão, metástases, angiogênese, microambiente tumoral e imunologia tumoral assim como inúmeros aspectos da biologia das células tronco tumorais (POLTRONIERI *et al*, 2013). Acúmulo de evidências científicas sugerem que alterações na expressão dos miRNAs estão associados ao desenvolvimento do câncer e um grande número de miRNAs vem sendo identificados como importantes reguladores da tumorigênese (LU *et al*, 2014).

Cerca de 20% dos casos de GBM contém componente oligodendroglial. Alguns estudos demonstram que tal componente é preditor de maior sobrevida mediana (KATSUSHIMA *et al*, 2012). O miR-1275 pode ser um miR chave na mielinização e diferenciação da linhagem oligodendroglial. Em resumo, dados geram evidência que a repressão do miR-1275 via *PRC2-H3K27* resulta em hiperexpressão do *CLDN11*, que pode ser necessária para diferenciação tumoral e contribuir para estabelecer a heterogeneidade tecidual do GBM. Esses resultados elucidam as vias de regulação epigenéticas da diferenciação celular tumoral através do miR-1275 em GBM, e sua inibição, através de terapia alvo, pode gerar nova aplicação terapêutica na Oncologia (KATSUSHIMA *et al*, 2012).

Em nosso estudo, em amostras tumorais primárias, observamos hiperexpressão do miR-1275 em pacientes com diagnóstico de astrocitoma pilocítico, astrocitoma grau II, astrocitoma grau III, oligodendroglioma grau II e III. Portanto, o

único diagnóstico histopatológico que não apresentou hiperexpressão do mesmo foi o GBM.

5.2. microRNA-155

A expressão elevada do miR-155 já foi demonstrada em câncer de cólon, mama, pulmão e pâncreas atuando como oncogene. Em contrapartida, baixa expressão do mesmo já foi descrita em câncer gástrico, melanoma e ovário, atuando como gene supressor tumoral. Na literatura, o miR-155 é significativamente hiperexpresso em tecidos gliais. Tanto em gliomas de baixo quanto nas amostras de alto grau, a expressão do miR-155 é significativamente aumentada quando comparado ao tecido cerebral normal (SUN *et al*, 2014).

Pacientes com diagnóstico de glioma com elevada expressão de miR-155 apresentam menor sobrevida global e sobrevida livre de progressão quando comparados a pacientes com menores expressão do mesmo. Estudos sugerem que o miR-155 atua no aumento da habilidade de proliferação celular através da inibição da apoptose das células gliais, podendo ainda promover a migração e a invasão celular das células gliais (LING *et al*, 2013).

Pesquisas demonstram que a redução da expressão do miR-155 induz acúmulo de células gliais em fase G0/G1 do ciclo celular, implicando na redução da velocidade do mesmo. Esses dados sugerem que a inibição do miR-155 promove supressão do crescimento intracraniano do glioma, podendo atuar como possível *target* terapêutico (SUN *et al*, 2014).

Em nosso estudo, observamos hiperexpressão do miR-155 apenas em tecido tumoral primário de pacientes com diagnóstico de oligodendroglioma grau II. Possivelmente, sendo um miR atuante como oncogene, sua hiperexpressão pode estar associada com a evolução maligna observada nas amostras (Oligodendroglioma grau II → recidiva tumoral → Oligodendroglioma grau III).

Dentre os pacientes que evoluíram de forma atípica, observou-se hipoexpressão do miR-155 nas amostras tumorais primárias em paciente portador de oligodendroglioma grau II, o que poderia estar relacionado, de forma geral, ao melhor prognóstico dos pacientes com esse diagnóstico histopatológico.

5.3. microRNA-124a

Estudos prévios demonstram que o miR-124a apresenta altos níveis de expressão em tecido cerebral normal e é relacionado com a diferenciação neuronal embrionária normal, além de ser um importante regulador da neurogênese no adulto. Entretanto, poucos estudos avaliaram o impacto biológico do miR-124a nas células do glioma. O miR-124a tem sido classificado como supressor tumoral em inúmeros tipos de tumores humanos (LU *et al*, 2014).

Estudo conduzido por Lu *et al* (2014) demonstrou que o miR-124a é hipoexpresso em tecidos de gliomas humanos e sua expressão é negativamente correlacionada com o grau tumoral, ou seja, tumores de alto grau tem menores níveis quando comparados a tumores de baixo grau.

Portanto, o miR-124a possui expressão abundante em tecido cerebral normal e é extremamente necessário para diferenciação neuronal. Precusores celulares neuronais embrionários possuem níveis indetectáveis do miR-124a a medida que migram para posições no córtex e medula espinhal. Com o término da migração, os níveis do miR-124a aumentam durante a diferenciação celular. Diante disso, achados sugerem que o miR-124a pode atuar como biomarcador prognóstico em pacientes com diagnóstico de GBM e sua restauração pode ser um alvo terapêutico possível (FOWLER *et al*, 2011).

Como resultado do aumento da expressão do miR-124a é observado um significativo declínio na proliferação, migração e invasão celular tumoral. O miR-124a com hipoexpressão em GBM é relacionado com menor sobrevida (TIVNAN *et al*, 2014).

Em nosso estudo, observamos significativa hiperexpressão ($p < 0,0001$) do miR-124a em astrocitoma grau II, oligodendroglioma grau II e oligodendroglioma grau III.

5.4. microRNA-138

O miR-138 tem sido associado à indução do crescimento e sobrevida das células tronco gliais, entretanto, parece ter um papel supressor em outros tumores (STOJCHEVA *et al*, 2016).

A literatura demonstra o papel do miR-138 como um oncomiR pró-sobrevivência para células tronco gliais e como regulador do crescimento e sobrevida das mesmas. Há evidências que sugerem que o miR-138 apresenta expressão reduzida em amostras de GBM (CHAN *et al*, 2012).

Qui *et al* (2013), demonstrou que o miR-138 encontrava-se hipoexpresso em linhagens celulares e amostras tumorais de GBM. A hiperexpressão do miR-138 efetivamente suprime a proliferação celular do GBM *in vivo* e *in vitro*. As análises por PCR em tempo real confirmaram que a expressão dos níveis do miR-138 encontrava-se significativamente reduzida em todas as linhagens celulares de GBM quando comparadas com tecido cerebral normal (CHAN *et al*, 2012).

Assim como, análise estratificada da sobrevida dos pacientes em dois anos, demonstra que elevados níveis do miR-138 aumentam significativamente a sobrevida livre de progressão de pacientes com GBM quando comparados com amostras com hipoexpressão do mesmo (QIU *et al*, 2013).

Resultados sugerem que o miR-138 suprime a proliferação celular através do bloqueio da transição G1/S do ciclo celular (QIU *et al*, 2013).

Em nosso estudo, observamos hiperexpressão do miR-138 ($p = 0,0061$) em amostras de tecido tumoral primário de astrocitoma grau II e oligodendroglioma grau III. De acordo com o exposto acima, nossos dados foram concordantes com a literatura, uma vez que, demonstramos hipoexpressão do miR-138 em glioblastoma.

Dentre os pacientes que apresentaram evolução atípica, observamos hipoexpressão do miR-138 em amostras teciduais primárias de pacientes portadores de glioblastoma.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Os microRNAs miR-124a, miR-138, miR-155 e miR-1275 não apresentaram hiperexpressão em tecido tumoral de pacientes diagnosticados com GBM. O miR-1275 apresentou expressão aumentada em pacientes com diagnóstico de astrocitoma pilocítico e o miR-155 foi hiperexpresso apenas em amostras de oligodendroglioma grau II. Além disso, tumores de linhagem oligodendroglial, de baixo e alto graus, demonstraram hiperexpressão do miR-1275 e miR-124a. Em sangue periférico, observou-se significativa hipoexpressão dos miR-1275, miR-124 e miR-138 em amostra de GBM assim como acentuada hipoexpressão do miR-138 em amostras de oligodendroglioma grau III.

- Ao observarmos expressão diferencial nos casos com desfecho clínico favorável *versus* desfavorável foi constatado que no tecido tumoral, os pacientes com oligodendroglioma grau II apresentaram hipoexpressão, em relação ao controle utilizado, do miR-155. Já na amostra de sangue periférico, observou-se hipoexpressão do miR-124a e hiperexpressão do miR-1275.

- Foi constatado que há de fato impacto do KPS em sobrevida dos pacientes recém-diagnosticados, onde pacientes diagnosticados com a funcionalidade clínica preservada (KPS $\geq 90\%$) apresentam maior sobrevida quando comparados aos pacientes diagnosticados com prejuízo funcional. Também foi observado que os pacientes com diagnóstico de glioma de baixo grau apresentaram maior sobrevida quando comparado aos pacientes diagnosticados com glioma de alto grau.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- ANDRONESI OC; KIM GS; GERSTNER E; et al. Detection of 2-hydroxyglutarate in IDH-mutated glioma patients by in vivo spectral-editing and correlation magnetic resonance spectroscopy. *Sci Transl Med.* v. (4), 2012.
- 2- BAUMERT BG; STUPP R. European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Radiation Oncology Group; European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Brain Tumor Group. Low-grade glioma: A challenge in therapeutic options: The role of radiotherapy. *Ann Oncol.* v. (19), p.217- 222, 2008.
- 3- BAUMERT BG; et al. Temozolomide chemotherapy versus radiotherapy in high-risk low-grade glioma (EORTC 22033-26033): a randomized, open-label, phase 3 intergroup study. *The Lancet.* v. 16. p. 30313-8, 2016.
- 4- BARKER, FG; CHANG, SM; GUTIN, PH; et al. Survival and functional status after resection of recurrent glioblastoma multiforme. *Neurosurgery.* v. 42: p.709-720, 1998.
- 5- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Instituto Nacional de Câncer (INCA). Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/> acesso em 29/09/2015.
- 6- BART, DJ; et al. Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of diffuse lower-grade gliomas. *NEJM* 372: p. 2481- 2498, 2015.
- 7- BUCKNER JC; et al. Radiation plus Procarbazine, CCNU and Vincristine in low-grade glioma. *The New England Journal of Medicine.* p. 1344- 1355, 2016.
- 8- CHAICHANA, KL; et al. Recurrence and malignant degeneration after resection of adult hemispheric low-grade gliomas. *J Neurosurg* 112: p.10- 17, 2010.

- 9- CAIRNCROSS G; WANG M; SHAW E; et al. Phase III trial of chemoradiotherapy for anaplastic oligodendroglioma: Long-term results of RTOG 9402. *J Clin Oncol.* v. 31, p. 337-343, 2013.

- 10-CAIRNCROSS G; BERKEY B; SHAW E; et al: Phase III trial of chemotherapy plus radiotherapy versus radiotherapy alone for pure and mixed anaplastic oligodendroglioma (RTOG 9402): Intergroup Radiation Therapy Oncology Group Trial 9402. *J Clin Oncol.* v. 24: p. 2707-2714, 2006.

- 11-CHAO, T; XIONG, H; LIU, W; CHEN, Y; ZHANG,J. MiR-21 mediates the radiation resistance of glioblastoma cells by regulation PDCD4 and hMSH2. *J Huazhong Sci Technol.* 33 (4): p. 535- 529, 2013.

- 12-CHENG, T; WANG,X; LI, C; XU, S. Downregulation of microRNA- 124 predicts poor prognosis in glioma patients. *Neurol Sci* 36: p. 131- 135, 2015.

- 13-CURRAN, WT; SCOTT, CB; HORTON, J; et al. Recursive partitioning analysis of prognostic factors in three radiation therapy Oncology group malignant glioma trials. *J Natl Cancer Inst,* 1993.

- 14-DE ANGELIS LM; MELLINGHOFF IK. Virchow 2011 or how ID(H) Human Glioblastoma. *Journal of Clinical Oncology,* v. (29), p. 4473- 4477, 2011.

- 15-DI STEFANO AL; et al. Association between glioma susceptibility loci and tumor pathology defines specific molecular etiologies. *Neuro- oncology* 15 (5): p. 542-547, 2013.

- 16-ECKEL- PASSOW, J; et al. Glioma groups based on 1p/19q, IDH and TERT promoter mutations in tumors. *NEJM* 372: p. 2499- 2508, 2015.

- 17-EVERHARD S; KALOSHI G; CRINIÈRE E; et al. MGMT methylation:A marker of response to temozolomide in low-grade gliomas. *AnnNeurol.* v. (60), p.740-743, 2006.

- 18-FORST DA; NAHED BV; LOEFFLER JS; BATCHELOR, TT. Low- grade gliomas. *The Oncologist*. v. (19), p.403- 413, 2014.
- 19-GUAN, Y; et al. Identification of low miR- 105 expression as a novel poor prognostic predictor for human glioma. *Int J Clin Exp Med* 8(7): p. 10855-10864, 2015.
- 20-HAYES, J. et al. Prediction of clinical outcome in glioblastoma using a biologically relevant nine- microRNA signature. *Molecular Oncology*. p. 1- 11, 2014.
- 21-HEGL, ME; et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *The New England journal of medicine*, v. 352, n. 10, p. 997–1003, 2005.
- 22-HOUILIER C; WANG X; KALOSHI G et al. IDH1 or IDH2 mutations predict longer survival and response to temozolomide in low-grade gliomas. *Neurology*. v.(75), p.1560 – 1566, 2010.
- 23-JAMAL, M. et al. Microenvironmental regulation of glioblastoma radioresponse. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, v. 16, n. 24, p. 6049–59, 2010.
- 24-JAKOLA AS; MYRMEL KS; KLOSTER R et al. Comparison of a strategy favoring early surgical resection vs a strategy favoring watchful waiting in low-grade gliomas. *JAMA*. v. (308), p.1881 -1888, 2012.
- 25- JONES, TA; et.al. Molecular analysis of pediatric brain tumors identifies microRNAs in pilocytic astrocytomas that target the MAPK and NF- κ B pathways. *Acta Neuropathologica communications*. v. 86, 2015.

- 26-KARIM, ABMF; et al. A randomized Trial on dose- response in radiation therapy of low- grade cerebral glioma: European Organization for research and treatment of cancer (EORTC) study 22844. *Int J. Radiation Oncology Bod. Phys.* v. (36), p.549 – 556, 1996.
- 27- KATSUSHIMA, K; et al. Contribution of microRNAs-1275 to Claudin11 protein suppression via polycomb-mediated silencing mechanism in human glioma stem-like cells. *The journal of biological chemistry.* V. 287. P. 27396-27406, 2012.
- 28-KESARI, S; et al. Phase II study of protracted daily temozolomide for low- grade gliomas in adults. *Clin Cancer Res.* v. (1), 2009.
- 29-KRISTIANSEN, K; HAGEN, S; KOLLEVOLD, T; et al. Combined modality therapy of operated astrocytomas grade III and IV. Confirmation of the value of postoperative irradiation and lack of potentiation of bleomycin on survival time: a prospective multicenter trial of the Scandinavian Glioblastoma Study Group. *Cancer.* v. 47: p. 649: 652, 1981.
- 30-LI, HF; KIM, JS; WALDMAN, T. Radiation-induced Akt activation modulates radioresistance in human glioblastoma cells. *Radiation oncology (London, England),* v. 4, p. 43, 2009.
- 31-LACROIX, M; et al. A multivariate analysis of 416 patients wuth glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J Neurosurg* 95(2): p. 190- 198, 2001.
- 32-LOUIS, DN; et al. International society of neuropathology—Harlem consensus guidelines for nervous system tumor classification and grading. *Brain Pathol* 24(5): P.429-435, 2014.

- 33-LOUIS, DN; OHGAKI, H; WIESTLER OD; et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* v. 114: p. 97- 109, 2007.
- 34-LOUIS, DN.; POMEROY, SL.; CAIRNCROSS, JG. Focus on central nervous system neoplasia. *Cancer cell*, v. 1, n. 2, p. 125–8, 2002.
- 35- LOUIS DN; et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* v.131: p. 803-820, 2016.
- 36-LV, S. et al. The Downregulation of MicroRNA-146a Modulates TGF- β signaling pathways activity in Glioblastoma. *Mol Neurobiol.* 2014.
- 37- LU,S-H; JIANG, X-J; XIAO,G-L; LIU, D-Y; YUAN, X-R. MiR- 124a restoration inhibits glioma cell proliferation and invasion by suppressing IQGAP1 and β -catenin. *Oncology reports.* v. 32. P. 2104- 2110, 2014.
- 38-MARKO, NF; WEIL, RJ. The molecular biology of WHO grade II gliomas. *Neurosurg Focus.* v. (34), p. 1- 15, 2013.
- 39-MOHAMMAD, A.A; et al. Detection of circulating hcmv- miR- UL112- 3p in patients with glioblastoma, rheumatoid arthritis, diabetes mellitus and healthy controls. *Plos One.* v. 12, 2014.
- 40-OHGAKI, H.; KLEIHUES, P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *The American journal of pathology*, v. 170, p. 1445–53, 2007.
- 41-OHGAKI H, DESSEN P, JOURDE B, HORSTMANN S, NISHIKAWA T, DIPATRE PL, et al: Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res* v. 64: p.6892–6899, 2004.

- 42-OHGAKI H, KLEIHUES P: Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer Sci* v. 100: p.2235–2241, 2009.
- 43-OSTROM QT, GITTLEMAN H, FARAH P, et al. CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. *Neuro Oncol*, v. 15, 2013.
- 44-POURATIAN N; ASTHAGIRI A; JAGANNATHAN J et al. Surgery insight: The role of surgery in the management of low-grade gliomas. *Nat Clin Pract Neurol*. v. (3), p.628 – 639, 2007.
- 45-PIRZKALL A; NELSON SJ; MCKNIGHT TR et al. Metabolic imaging of low-grade gliomas with three- dimensional magnetic resonance spectroscopy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. v. (53), p.1254 – 1264, 2002.
- 46-POKHRELLKP; VOVORAS D; TSOKOS CP. Histological and Demographic Characteristics of the distribution of brain and central nervous system tumor's sizes: Results from SEER registries using statistical methods. *International journal of Biomedical science* v.(8), p.152- 162, 2012.
- 47-PICHLMEIER, U. et al. Resection and survival in glioblastoma multiforme: an RTOG recursive partitioning analysis of ALA study patients. *Neuro-oncology*, v. 10, n. 6, p. 1025–34, 2008.
- 48-QUINN JÁ; REARDON DA; FRIEDMAN AH et al. Phase II trial of temozolomide in patients with progressive low-grade glioma. *J Clin Oncol*. v. (21), p.646- 651, 2003.
- 49-REYA, T. et al. Stem cells cancer, cancer and stem cells. *Nature*, v. (414), p.105-111, 2001.

- 50-ROA, W; et al. Abbreviated course of radiation therapy in older patients with glioblastoma multiforme: a prospective randomized clinical Trial. *J CLin Oncol* 22(9): p.1583- 1588, 2004.
- 51-SANA, J; et al. Risk score based on microRNA expression signature is independent prognostic classifier of glioblastoma patients. *Carcinogenesis* vol 35: p. 2756- 2762, 2014.
- 52-SHAW EG; WANG M; COONS SW et al. Randomized trial of radiation therapy plus procarbazine, lomustine, and vincristine chemotherapy for supratentorial adult low-grade glioma: Initial results of RTOG 9802. *J Clin Oncol.* v.(30), p.3065 -3070, 2012.
- 53-SCHIFF D; BROWNP; GIANNINI C. Outcome in adult low-grade glioma: The impact of prognostic factors and treatment. *Neurology.* v. (69), p. 1366 – 1373, 2007.
- 54-SIEGEL, R; MA, J; ZOU Z; JEMAL, A. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* p. 64:9-29, 2014.
- 55-SINGH, SK; CLARKE, ID.; HIDE, T; DIRKS, PB. Cancer stem cells in nervous system tumours. *Oncogene*, v. (23), p. 7267- 7273, 2004.
- 56-SUN, J; et al. Serum microRNA- 128 as a biomarker for diagnosis of glioma. *Int J Clin Exp Med* 8(1): p. 456-463, 2015.
- 57-SUN,J; et al. Overexpression of microRNAs-155 predicts poor prognosis in glioma patients. *Med Oncol.* v. 31, 2014.
- 58-SONG, Y; et al. MiR- 18a regulates de proliferation, migration and invasion of human glioblastoma cell by targeting neogenin. *Experimental cell research*.324: p. 54- 64, 2014.

- 59-STUPP, R. et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England journal of medicine*, v. 352, n. 10, p. 987–96, 2005.
- 60-SMITH JS; ALDERETE B; MINN Y et al. Localization of common deletion regions on 1p and 19q in human gliomas and their association with histological subtype. *Oncogene*. v. (18), p. 4144- 4152, 1999.
- 61-STEWART LA: Chemotherapy in adult highgrade glioma: A systematic review and metaanalysis of individual patient data from 12 randomised trials. *Lancet* 359:p. 1011-1018, 2002.
- 62- STOJCHEVA, N; et al. MicroRNA-138 promotes acquired alkylator resistance in glioblastoma by targeting the Bcl-2-interacting mediator BIM. *Oncotarget*. v. 7, 2016.
- 63- TIVNAM A; et al. The supressor microRNA, miR- 124a, is regulated by epigenetic silencing and by the transcriptional factor, REST in glioblastoma. *Tumor Biol*. v. 35. P.1459- 1465, 2014.
- 64-VAN MEIER EG; et al. Exciting new advances in neuro- oncology: The avenue to a cure for malignant glioma. *CA Cancer J Clin*. v. (3), p.166- 193, 2010.
- 65-VAN DEN BENT MJ; AFRA D; de WITEE O; et al. EORTC Radiotherapy and Brain Tumor Groups and the UK Medical Research Council. Long-term efficacy of early versus delayed radiotherapy for low-grade astrocytoma and oligodendroglioma in adults: The EORTC 22845 randomised trial. *Lancet*. v. (366), p. 985 – 990, 2005.
- 66-VAN DEN BENT, MJ; et al. Adjuvant Procarbazine, Lomustine and Vincristine Chemotherapy in newly diagnosed anaplastic Oligodendroglioma: long- term flollow- upo f EORTC Brain Tumor Group Study 26951. *J Clin Oncol*. v. 31: p.344- 350, 2013.

- 67-VISANI, M; et al. Expression of microRNAs in glioblastoma and comparison with other brain neoplasia of grades I e III. *Molecular oncology* 8: p. 417-430, 2014.
- 68-WALKER, MD; et al. Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical Trial. *J Neurosurg* 49 (3): p.333-343, 1978.
- 69- WALH M; et al. Chemotherapy for adult low-grade gliomas: clinical outcomes by molecular subtype in a phase II study of adjuvante temozolomide. *Neuro-Oncology*. p. 1-9, 2016.
- 70-WATANABE K, TACHIBANA O, SATA 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* 6: p. 217–223, 1996.
- 71-WEI, J; et al. MiR-138 exerts anti- glioma efficacy by targeting immune checkpoints. *Neuro- Oncology*. v. 18. p. 639-648, 2015.
- 72-WICK W; HARTMANN C; ENGEL C; et al: NOA-04 randomized phase III trial of sequential radiochemotherapy of anaplastic glioma with procarbazine, lomustine, and vincristine or temozolomide. *J Clin Oncol*. v. 27: p. 5874-5880, 2009.
- 73-WRENSCH, M; MINN Y; CHEW T; BONDY M; BERGER MS. Epidemiology of primary brain tumors: Current concepts and review of the literature. *Neuro-oncology* 4, p.278- 299, 2002.
- 74-YAN, W; et al. MicroRNA expression patterns in the malignant progression of gliomas and a 5- microRNA sugnature for prognosis. *Oncotarget* 5: p.12908-12915, 2014.

75- YAN, Z. et al. MiR- 155 contributes to the progression of glioma by enhancing Wnt/b- catenin pathway. Tumor Biol. V. 36. P. 5323- 5331, 2015.

76-YAO Y. et al. MiR- 449a exerts tumor- suppressive functions in human glioblastoma by targeting Myc- associated zinc- finger protein. Molecular Oncology, p. 1- 17, 2014.

ANEXOS

ANEXOS

Anexo A

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ribeirão Preto, 13 de maio de 2015.

Ofício nº 1738/2015
CEP/MGV

PROCESSO HCRP nº 4957/2015

Prezadas Pesquisadoras,

O trabalho intitulado **"ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DO MGMT E microRNAs COM TAXA DE RESPOSTA E DESFECHO CLÍNICO EM PACIENTES COM GLIOBLASTOMA TRATADOS COM RADIOTERAPIA E TEMOZOLAMIDA"**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 407ª Reunião Ordinária realizada em 11/05/2015, e enquadrado na categoria: **APROVADO**, bem como o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**.

Atenciosamente.

DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimas Senhoras
PROFª DRª FERNANDA MARIS PERIA
Deppto. de Clínica Médica - Oncologia

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus Universitário - Monte Alegre
14048-900 Ribeirão Preto SP

Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP
FWA-00002733; IRB-00002186 e
Registro Plataforma Brasil (CONEP nº 5440
(016) 3602-2228
cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br

Anexo B

Aprovação da emenda do projeto após inclusão dos gliomas de baixo grau.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ribeirão Preto, 08 de outubro de 2015

Ofício nº 3565/2015
CEP/MGV

**“ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DO MGMT E microRNAs
COM TAXA DE RESPOSTA E DESFECHO CLÍNICO EM PACIENTES COM
GLIOBLASTOMA TRATADOS COM RADIOTERAPIA E TEMOZOLAMIDA”**

Prezadas Senhoras,

O Comitê de Ética em Pesquisa analisou e aprovou “AD REFERENDUM”, o Projeto de Pesquisa – versão 1.1, de 10/08/2015 e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Versão 1.1, de 10/08/2015, de acordo com o Processo HCRP nº 4957/2015.

Atenciosamente,

DR^a. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimas Senhoras

PROF^a. DR^a. FERNANDA MARIS PERIA
CAROLINE SOUZA DOS ANJOS (Orientanda)

Depto. de Clínica Médica – Divisão de Oncologia Clínica

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus Universitário – Monte Alegre
14048-500 Ribeirão Preto SP

Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP
FWA-00002733; IRB-00002186 e Registro PB/CONEP nº 5440
(15) 3802-2228
cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br

APÊNDICES

Apêndices

Apêndice A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto: **AVALIAÇÃO DE microRNAs COMO BIOMARCADORES DE EVOLUÇÃO MALIGNA EM PACIENTES COM DIAGNÓSTICO DE GLIOMA**

Pesquisador responsável: Profa. Dr^a Daniela Pretti Cunha Tirapelli

Pós-Graduando: Caroline Souza dos Anjos

Contato: Avenida Bandeirante, nº 3900; Campus Universitário; Bairro Monte Alegre; HCFMRP-USP; Divisão de Oncologia Clínica; *Ribeirão* Preto – SP; Tel.: (16) 3602-2304.

O Sr. (a) está sendo convidado para participar como voluntário da pesquisa. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável.

Se o Sr. (a) tiver dúvidas ou se sentir de alguma forma prejudicado (a) sobre os aspectos éticos dessa pesquisa, poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas de *Ribeirão* Preto da USP, pelo telefone (16) 3602-2228, que funciona de segunda à sexta-feira das 8:00 às 17:00 h. O Comitê de Ética em Pesquisa é formado por um grupo de pessoas que avalia projetos para ver se apresenta algum prejuízo para quem participa da pesquisa.

O Sr. (a) está sendo acompanhado no Serviço de Oncologia Clínica deste hospital para tratamento e seguimento de uma neoplasia (tumor) localizada no cérebro. Quando o Sr. (a) fez a biópsia ou cirurgia da lesão no cérebro para confirmar o diagnóstico de tumor, uma pequena parte deste material foi armazenada no Banco de Tumores do Sistema Nervoso Central.

Neste momento, gostaríamos de convidar o Sr. (a) a participar deste estudo onde não modificaremos em nada seu tratamento ou seguimento. Trata-se de um estudo onde utilizaremos parte deste tecido tumoral armazenado para realizar estudos envolvendo moléculas capazes de ajudar a identificar a agressividade do tumor e a possível chance de uma boa resposta ao tratamento com radioterapia e quimioterapia. Também faz parte deste estudo analisar informações clínicas anotadas em seu prontuário médico e laudos dos exames que o Sr. (a) realizou antes, durante e após o término do seu tratamento.

Como benefício geral, gostaríamos de informar que estes resultados podem vir a ajudar outros pacientes e a própria equipe médica a entender de forma mais precisa qual paciente realmente terá uma boa resposta com redução do tumor usando este tipo de tratamento.

Informamos também que não será realizada nenhuma outra coleta de material biológico (sangue ou tecido tumoral), que não será administrado nenhuma outra medicação, ou seja, que não haverá qualquer intervenção com o Sr. (a) ou alteração em seu tratamento.

A sua participação em nosso estudo é voluntária, portanto não será dada nenhuma ajuda financeira e também não será cobrada nenhuma taxa. Informamos que esta pesquisa não promoverá nenhum risco adicional ao Sr. (a) ou ao seu tratamento.

É importante lembrar que este é apenas um convite e, caso o Sr. (a) aceite participar deste estudo, informamos que o Sr. (a) poderá desistir a qualquer momento, sem que isto interfira no atendimento ou no tratamento que o Sr. (a) esteja recebendo.

Destacamos que manteremos o sigilo de todas as informações e resultados obtidos no sentido de preservar sua identidade. Asseguramos que o Sr. (a) não será identificado, pois utilizaremos códigos para a sua identificação. Os resultados e conclusões científicas obtidas através deste estudo serão divulgadas exclusivamente nos meios científicos e acadêmicos.

Garantimos responder a qualquer dúvida ou esclarecimentos antes ou durante a pesquisa. Garantimos a assistência e acompanhamento neste hospital em casos de danos relacionados a este estudo. Caso o Sr. (a) se sinta prejudicado devido a sua participação nesta pesquisa, você tem o direito a indenização conforme as leis vigentes no país.

Caso concorde em participar do estudo, o Sr. (a) juntamente com o pesquisador assinarão este documento que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável.

Desde já, agradecemos sua participação em nosso estudo.

Eu, _____, Reg. HC nº _____, aceito participar de forma livre e esclarecida do estudo: **AVALIAÇÃO DE microRNAs COMO BIOMARCADORES DE EVOLUÇÃO MALIGNA EM PACIENTES COM DIAGNÓSTICO DE GLIOMA**, estando de acordo com as condições do mesmo.

Nome do participante: _____

Assinatura do participante

Nome do Pesquisador: _____

Assinatura do pesquisador

Testemunha 1: _____

Testemunha 2: _____

Ribeirão Preto, _____ de _____ de 2016.

Apêndice B

Tabela 1: Coleta de dados clínicos.

Idade	
Gênero	
Topografia da lesão	
Tamanho da lesão	
Desvio de linha média (sim <i>versus</i> não)	
Sintomas neurológicos (sim <i>versus</i> não)	
Abordagem cirúrgica	
Histopatológico (1)	
Quimioterapia (sim <i>versus</i> não)	
Radioterapia (sim <i>versus</i> não)	
Recidiva	
Abordagem cirúrgica	
Histopatológico (2)	
Quimioterapia (sim <i>versus</i> não)	
Radioterapia (sim <i>versus</i> não)	
Óbito	
Sobrevida (data do diagnóstico-óbito ou última avaliação do seguimento)	