

ANTONIO CARLOS CAVALCANTE GODOY

Estudo de genes preditores de radiossensibilidade e sobrevida em pacientes com glioblastoma tratados com radioterapia e temozolamida

RIBEIRÃO PRETO - SP

2018

ANTONIO CARLOS CAVALCANTE GODOY

Estudo de genes preditores de radiossensibilidade e sobrevida em pacientes com glioblastoma tratados com radioterapia e temozolamida

Versão Original

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oncologia Clínica, Células Tronco e Terapia Celular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (FMRP-USP), para obtenção do título de doutor.

Área de concentração:

Orientadora: Prof^{a.} Dr^{a.} Fernanda Maris Peria

Coorientação: Prof. Dr. Carlos Gilberto Carlotti Junior

Coorientação: PhD Daniel Antunes Moreno

RIBEIRÃO PRETO – SP

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Godoy, Antonio Carlos Cavalcante.

Estudo de genes preditores de radiossensibilidade e sobrevida em pacientes com glioblastoma tratados com radioterapia e temozolamida. Ribeirão Preto, 2018.

68 f.

Tese (Doutorado) -- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Oncologia Clínica, Células Tronco e Terapia Celular.

Orientadora: Prof^{a.} Dr^{a.} Fernanda Maris Peria

1. GBM. Glioblastoma. Radiossensibilidade. Radioterapia. Temozolamida. RSI - Índice de Radiossensibilidade. Expressão gênica. Nome: GODOY, Antonio Carlos Cavalcante

Título: Estudo de genes preditores de radiossensibilidade e sobrevida em pacientes com glioblastoma tratados com radioterapia e temozolamida

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oncologia Clínica, Células Tronco e Terapia Celular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (FMRP-USP), para obtenção do título de doutor.

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

Aos meus pais, Carlos e Neuzete, e meus padrastos, Almiro e Nelci, pela confiança e apoio incondicionais. Vocês são meus eternos exemplos de humildade.

Às mulheres da minha vida, Tatiane e Ana Clara, pelo amor, equilíbrio e força em todos os momentos, principalmente nos de incerteza e cansaço. Sem vocês nenhuma conquista valeria a pena.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, acima de tudo, por sempre iluminar meus caminhos.

Aos meus irmãos e sobrinhos, pelo exemplo de retidão de caráter e pela compreensão do tempo de convívio sacrificado para realização do meu trabalho.

À minha orientadora, Prof.^a Dra. Fernanda Maris Peria, pela sabedoria, paciência, confiança e, principalmente, pelo acolhimento no momento em que eu mais precisava.

Ao Dr. Daniel Antunes Moreno, pelo incentivo e ajuda em todas as fases do meu doutorado.

À Prof.^a Dra. Julie Massayo Maeda Oda, pelo afeto, apoio e cooperação.

Ao Prof. Dr. Carlos Gilberto Carlotti Jr., pela colaboração e pelas importantes recomendações neste trabalho.

À toda a equipe de pesquisadores do Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Cirurgia e Anatomia da FMRP/USP, em especial à Prof.^a Dra. Daniela Pretti da Cunha Tirapelli e à Dra. Andressa Romualdo Rodrigues, pela serenidade em me apresentar este novo mundo.

Aos profissionais do Serviço de Oncologia Clínica do HC-FMRP/USP, por sempre confiarem em mim e no meu trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular, em especial à secretária Adriana Fuzaro, por todo o auxílio dispensado.

Aos meus amigos da residência médica em Oncologia Clínica, Leandro Colli, Bruno Filardi, José Márcio Figueiredo e Mariana Paiva, pela amizade, amparo e encorajamento incondicionais.

Aos queridos Caroline Anjos, Cláudia Leite, Evandro Santos e Victor Lisita, pela inspiração e entusiasmo diários. Apesar da distância geográfica, nossa amizade virtual é fundamental.

À FAPESP por conceder o apoio financeiro para realização deste trabalho.

Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana.

Carl Jung

RESUMO

GODOY, Antonio Carlos Cavalcante. **Estudo de genes preditores de radiossensibilidade e sobrevida em pacientes com glioblastoma tratados com radioterapia e temozolamida.** Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Oncologia Clínica, Células Tronco e Terapia Celular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (FMRP-USP). Departamento de Clínica Médica, Divisão de Oncologia Clínica. 2018.

O glioblastoma (GBM) é o tumor primário do sistema nervoso central mais frequente no adulto, com sobrevida média de aproximadamente 12 meses. Múltiplas alterações genéticas e epigenéticas presentes neste tumor determinam sua biologia e fenótipo bastante agressivos. Assim, o presente estudo objetivou estudar a expressão dos genes envolvidos no Índice de Radiossensibilidade (RSI) e do gene MGMT em amostras de tumor primário humano de GBM, buscando identificar a associação destes com radiossensibilidade e sobrevida. Foram analisadas as características epidemiológicas, de evolução e desfecho clínico de 28 pacientes com GBM que fizeram uso de temozolamida (TMZ), cujos prontuários físicos e eletrônicos foram revisados no Serviço de Arquivo Médico (SAM) e Sistema Athos. Foi observado que 64,29% dos pacientes possuíam mais de 50 anos de idade e eram do sexo masculino; 86,36% possuíam o Karnofsky Performance Status acima ou igual a 80%; 57,14% possuíam localização não eloquente; 78,57% apresentavam lesão residual; 89,29% não foram reexpostos à radioterapia; 64,29% não fizeram uso de temozolamida metronômica; 96,43% não foram submetidos a outra quimioterapia; 78,57% não realizaram reabordagem cirúrgica; 60,71% tiveram progressão tardia e/ou não tiveram progressão da doença. Também foi evidenciado que tanto a regressão bruta de cada gene separadamente, quanto a regressão ajustada para os fatores clínicos mais relevantes (idade ao diagnóstico, localização do tumor e presença de lesão residual) não evidenciaram significância estatística em relação à progressão tardia. A relação entre o tempo de sobrevida global e a expressão dos genes ajustada para os mesmos fatores clínicos evidenciou significância estatística para os genes RELA (HR 1,265 / p = 0.01); c-Jun (HR 1,237 / p = 0.03) e c-ABL (HR 0.33 / p = 0.04). A análise de sobrevida livre de progressão ajustada mostrou diferença significativa (p = 0.04) entre os grupos com tumor de localização eloquente e não eloquente, assim como para a expressão do gene *RELA* (HR 1,107 / p = 0,03). Em relação à expressão gênica e a sobrevida global ou sobrevida livre de progressão dos pacientes pelo teste de *Log-rank* não foi observada diferença estatística. Na análise da expressão gênica com as variáveis clínico-epidemiológicas, a expressão do gene SUMO1 foi significativamente aumentada (p = 0,009) no grupo com progressão tardia com relação ao grupo com progressão precoce da doença, a expressão do AR apresentou aumento significativo (p = 0.021) no grupo em que a TMZ metronômica não foi administrada e as expressões dos genes RELA (p = 0.03), *c-Jun* (p = 0,005), *STAT1* (p = 0.009) e *HDAC1* (p = 0.044) estava elevada nos pacientes que apresentaram o exame neurológico pré-operatório normal. Esses dados indicam que o conjunto dos genes do RSI e o *MGMT* não demonstraram ser preditores de radiossensibilidade. Podemos inferir que *RELA*, *c-Jun* e *c-ABL* são potenciais marcadores de pior prognóstico e que *SUMO1* pode ser um marcador de bom prognóstico.

Palavras-chave: GBM. Glioblastoma. Radiossensibilidade. Radioterapia. Temozolamida. RSI
- Índice de Radiossensibilidade. Expressão gênica.

ABSTRACT

GODOY, Antonio Carlos Cavalcante. **Study of genes predicting radiosensitivity and survival in patients with glioblastoma treated with radiotherapy and temozolamide.** Doctoral thesis - Post-graduation Program in Clinical Oncology, Stem Cells and Cell Therapy of the Medical School of Ribeirão Preto - University of São Paulo (FMRP-USP). Department of Clinical Medicine, Division of Clinical Oncology. 2018.

Glioblastoma (GBM) is the primary tumor of the central nervous system most common in adults, with a median survival of approximately 12 months. Multiple genetic and epigenetic alterations present in this tumor determine its biology and phenotype very aggressive. Thus, the present study aimed to study the expression of genes involved in radiosensitivity index (RSI) and the MGMT gene in GBM human primary tumor samples, seeking to identify the association of these with radiosensitivity and survival. The epidemiological evolution and clinical characteristics of 28 GBM patients who used temozolamide (TMZ), whose physical and electronic medical records were reviewed in the Medical File Service (SAM) and Athos System, were analyzed. It was observed that 64.29% of the patients were over 50 years of age and were male; 86.36% had Karnofsky Performance Status of 80 or more; 57.14% had no eloquent location; 78.57% had residual lesion; 89.29% did not have reexposure to radiotherapy; 64.29% did not use metronomic temozolamide; 96.43% did not undergo another chemotherapy; 78.57% did not undergo surgical reassessment; 60.71% had late progression and / or had no disease progression. It was also evidenced that both the gross regression of each gene separately and the regression adjusted for the most relevant clinical factors (age at diagnosis, tumor location and presence of residual lesion) did not show statistical significance in relation to the late progression. The relationship between overall survival time and gene expression adjusted for the same clinical factors showed statistical significance for *RELA* genes (HR 1.265 / p = 0.01), *c-Jun* (HR 1.237 / p = 0.03) and *c-ABL* (HR 0.33 / p = 0.04). Adjusted progression-free survival analysis showed a significant difference (p = 0.04) between the groups with eloquent and noneloquent localization, as well as *RELA* gene expression (HR 1,107 / p = 0.03). Regarding the gene expression and overall survival or progression-free survival of the patients by the Logrank test, no statistical difference was observed. In the analysis of the expression genes with the clinical-epidemiological variables the expression of the SUMO1 gene was significantly increased (p = 0.009) in the group with late progression in relation to the group with early disease progression, the expression of AR showed a significant increase (p = 0.021) in the group in which the metronomic TMZ was not administered and the RELA (p = 0.03), c-Jun (p =0.005), STAT1 (p = 0.009) and HDAC1 (p = 0.044) gene expressions were elevated in patients who had normal preoperative neurologic examination. These data indicate that the set of RSI genes and *MGMT* were not shown to be predictors of radiosensitivity. We can infer that *RELA*, *c-Jun* and *c-ABL* are potential markers of worse prognosis and that *SUMO1* may be a marker of good prognosis.

Key Word: GBM; Glioblastoma; Radiosensitivity; radiotherapy; Temozolamide; RSI; Radiosensitivity index; gene expression.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	- Fluxograma de seleção dos pacientes28
Figura 2 -	- Curvas de sobrevida global para os genes CDK1, RELA, AR, c-Jun, STAT1, PKC, MGMT, SUMO1, HDAC1, IRF1 e c-ABL41-42
Figura 3 -	- Curvas de sobrevida livre de progressão para os genes CDK1, RELA, AR, c-Jun, STAT1, PKC, MGMT, SUMO1, HDAC1, IRF1 e c-ABL433-44
Figura 4 -	- Expressão do gene SUMO1 em função do tipo de progressão44
Figura 5 -	- Expressão do gene AR em função do uso de Temozolamida metronômica na progressão da doença455
Figura 6 -	- Expressão dos genes RELA, c-Jun, STAT1 e HDAC1 em função do exame físico neurológico no período pré-operatório45
Figura 7 -	- Relação entre alterações dos genes do RSI e variáveis clínicas em pacientes com GBM499
Figura 8 -	- Curvas de sobrevida global e livre de progressão de paciente portadores de GBM com e sem alterações nos genes do RSI (método de Kaplan-Meier)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Frequências e percentuais das variáveis clínico-epidemiológicas	.35
Tabela 2 – Análise descritiva dos números de ciclos de TMZ e da expressão gênica	.36
Tabela 3 – Regressão logística bruta e ajustada dos genes preditores de progressão tardia	.37
Tabela 4 – Análise de sobrevida global através da Regressão de Cox bruta e ajustada	.38
Tabela 5 – Análise de sobrevida livre de progressão através da Regressão de Cox bruta e ajustada	.39
Tabela 6 – Coocorrência e exclusividade mútua dos genes do RSI	.50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANC DNA	Alteração no número de cópias do DNA
AIF	Fator indutor de apoptose
AK-DACi	Alquil-desacetilase
AP-1	Ativador da proteína 1
AR	Receptor de androgênio
ATP	Trifosfato de adenosina
BNIP3	Proteína de interação de 19 kDa de Bcl-2
BCNU	Carmustina
c-ABL	c-Abelson murine leukemia viral oncogene homolog
CDK1	Proteína quinase dependente da ciclina 1
cDNA	DNA complementar
c-Jun	Jun Proto-oncogene
DE	Doença estável
DEPC	Dietilpirocarbonato
DHMEQ	Dehidroximetilepoxiquinomicina
EGFR	Receptor de fator de crescimento epidérmico
FMRP-USP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
GASC	Células estromais associadas ao glioblastoma
GBM	Glioblastoma
HDAC	Histona desacetilase
HPRT	Hipoxantina fosforibosiltransferase
HR	Hazard ratio
IDH	Isocitrato desidrogenase
IFN-alfa	Interferon alfa
IRF1	Fator regulatório de Interferon 1
JAK	Janus kinase
LCM	Microdissecação de captura a laser
LOH	Perda de heterozigosidade
MGMT	O-6-Metilguanina-DNA Metiltransferase
MQ	Mesenquimal
NCI	National Cancer Institute

NCCN	National Comprehensive Cancer Network
NCOQ	Ambulatório de neuro-oncologia
NF1	Neurofibromatose Tipo 1
NF2	Neurofibromatose Tipo 2
NF-kB	Fator nuclear kappa B
NHGRI	National Human Genome Research Institute
NIH	National Institutes of Health
NR	Não respondedores
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PD	Progressão da doença
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PEG	Perfil de expressão gênica
PF	Proliferativo
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
РКС	Proteína quinase C
PN	Proneural
PSF	Fator de splicing associado ao PTB
PTEN	Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome Ten
qRT-PCR	PCR quantitativa em tempo real
QT	Quimioterapia
R	Respondedores
RB	Retinoblastoma
RC	Resposta completa
RELA	Fator nuclear Kb
RM	Ressonância magnética
RP	Resposta parcial
RSI	Índice de radiossensibilidade
RT	Radioterapia
SAM	Serviço de arquivo médico
SG	Sobrevida global
siRNAs	RNAs de interferência
SLP	Sobrevida livre de progressão

SNC	Sistema nervoso central
STAT1	Proteínas transdutoras de sinal e ativadoras de transcrição1
SUMO1	Small ubiquitin-like modifier 1
TBP	TATA box binding protein
TCGA	The Cancer Genome Atlas Research Network
TGFβ	Receptor do fator de crescimento β
TKR	Receptor do fator de crescimento tirosina quinase
TMZ	Temozolamida
TP53	Proteína supressora tumoral 53
TTF	Tumor treating fields
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	26
2.1 Objetivo Geral	26
2.2 Objetivos Específicos	26
3 MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 Aspectos éticos	27
3.2 Seleção e caracterização da amostra	27
3.3 Microdissecção das amostras selecionadas	31
3.4 Extração do RNA	32
3.5 Síntese de DNA complementar (cDNA)	32
3.6 PCR em tempo real (qRT-PCR)	32
3.7 Análise Estatística	33
4 RESULTADOS	35
5 DISCUSSÃO	46
6 CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS	57
ANEXOS	63
ANEXO A	63
ANEXO B	64
ANEXO C	65

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO

O glioblastoma (GBM) é o astrocitoma de maior grau histológico, demonstrando indiferenciação celular, celularidade densa, altos índices mitóticos, proliferação microvascular e necrose focal. A natureza altamente proliferativa e invasiva desse tumor é resultado de múltiplos e sucessivos eventos genéticos que conduzem a uma célula de biologia e fenótipo bastante agressivos.

Os gliomas correspondem a 28% de todas as neoplasias primárias do Sistema Nervoso Central (SNC). Destes, o GBM é o subtipo histológico mais comum em adultos, correspondendo a 54% de todos os casos. O GBM é também a neoplasia mais agressiva e de menor sobrevida do SNC, com apenas um terço dos pacientes vivos em um ano e menos de 5% de sobrevida em cinco anos após diagnóstico (NABORS et al., 2013).

A estimativa americana no ano de 2010 foi de 22.020 novos casos de neoplasias primárias do SNC, com mortalidade câncer-específica de 13.140 indivíduos. Isso corresponde a uma incidência de aproximadamente 6,5 casos para cada 100.000 habitantes. Essa incidência aumenta para 50 casos por 100.000 na população com faixa etária acima dos 75 anos (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2013).

No Brasil, no ano de 2016, foram estimados 5.440 casos novos de câncer no SNC em homens e 4.830 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 5,50 casos novos a cada 100 mil homens e 4,68 para cada 100 mil mulheres. Apesar da raridade desse tipo de neoplasia, a sua incidência tem aumentado ultimamente, e parte desse aumento se deve aos avanços da tecnologia, principalmente com relação aos exames de imagem (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

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

Alguns casos de GBM estão associados a síndromes genéticas hereditárias, como a Neurofibromatose tipo 1 (NF1), Neurofibromatose tipo 2 (NF2), Síndrome de Li-Fraumeni e Síndrome de Turcot. A grande maioria dos GBM ocorre de forma esporádica, envolvendo mutações, deleções, amplificações em genes relacionados a essas síndromes sem, entretanto, caracterizarem um gene específico determinante para o aparecimento do tumor e dos quadros sindrômicos (LOUIS; OHGAKI; WIESTLER, 2007).

Aproximadamente 90% dos casos de GBM são primários, também chamados de "*de novo*", surgindo inicialmente já como uma lesão de grau histológico IV, caracterizada por necrose e neovascularização (LOUIS; OHGAKI; WIESTLER, 2007). Eles apresentam um pico de incidência predominante em pacientes idosos e progridem rapidamente após uma história clínica curta, geralmente sem uma lesão precursora inicial identificável passível de rastreamento ou diagnóstico precoce. Em aproximadamente 36% dessas neoplasias é possível identificar amplificação ou superexpressão do *receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR)*; 25% apresentam mutação na *Phosphatase and Tensin homologue deleted on chromosome Ten (PTEN)*; 31% apresentam deleção do *P16*; 70% têm perda de heterozigosidade (LOH) do cromossomo 10q e, mais raramente, amplificação no *MDM2* (OHGAKI; KLEIHUES, 2007).

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) e evoluem de maneira mais lenta, sendo mais comuns em pacientes mais jovens e tendo 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 nessas neoplasias. Durante a progressão para GBM, mutações adicionais se acumulam, incluindo a perda de heterozigosidade no 10q25 em aproximadamente 70% dos casos, que inclui o supressor tumoral *PTEN*, sendo essa a alteração mais frequente em ambos os tipos de GBM (OHGAKI; KLEIHUES, 2007).

De acordo com a nova classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS), os GBMs são classificados de acordo com sua característica genética de apresentar ou não a mutação no gene *isocitrato desidrogenase (IDH)*: glioblastoma *IDH* selvagem (cerca de 90% dos casos), que corresponde ao GBM primário; e glioblastoma *IDH* mutante (cerca de 10% dos casos), que se relaciona ao GBM secundário (LOUIS et al., 2016).

Nos últimos anos, foram realizados esforços para melhor definir o impacto das alterações genéticas e moleculares do GBM no nível genômico. A recente disponibilidade de ensaios baseados em "*microarray*" de alta qualidade permitiu a análise quantitativa do genoma de milhares de genes ao mesmo tempo, fornecendo novos *insights* sobre padrões de genes hiper e hipoexpressos potencialmente envolvidos na transformação maligna e na progressão da doença (CRESPO et al., 2015).

Phillips e colaboradores dividiram os GBMs em três grupos – mesenquimal (MQ), proliferativo (PF) e proneural (PN) – de acordo com as semelhanças entre os diferentes perfis

de expressão gênica (PEG) tumorais, os principais estágios da neurogênese e os tipos celulares conhecidos. As assinaturas MQ, PF e PN foram associadas às células-tronco neurais, células amplificadoras de trânsito e neurônios imaturos, respectivamente. A assinatura PN está geralmente representada nas formas menos agressivas de gliomas de alto grau, enquanto os subtipos MQ e PF são encontrados em tumores de alto grau mais agressivos (PHILLIPS et al., 2006).

O GBM foi o primeiro tipo de câncer a ser sistematicamente estudado pelo *The Cancer Genome Atlas Research Network* (TCGA) em 2008. O TCGA é um esforço colaborativo cofinanciado e administrado pelo National Cancer Institute (NCI) e pelo National Human Genome Research Institute (NHGRI). Nesse relatório, foram identificados vários genes significativamente mutados no GBM, incluindo *LZTR1, ATRX, KEL* e *QKI*, além de um padrão de mutações, não atribuíveis ao acaso, entre os genes implicados na regulação da modificação da cromatina (BRENNAN et al., 2013).

Inicialmente, o consórcio TCGA publicou dados de expressão de mRNA e de alteração no número de cópias do DNA (ANC DNA) em aproximadamente 206 GBMs. Além disso, 600 genes foram sequenciados em um subgrupo de 91 GBMs (MCLENDON et al., 2008). De uma maneira geral, três vias de sinalização foram consistentemente afetadas em muitos GBMs: a via de sinalização do *TKR* (88%), a via da *TP53* (87%) e a via do *RB* (78%). Os genes envolvidos nessas vias incluíram o gene supressor tumoral *NF1* e o gene *PIK3R1* (PARSONS et al., 2008). Em um estudo mais recente incluindo dados de TCGAs anteriores, padrões de mutações somáticas, ANC DNA e o PEG associado ao tumor uma classificação molecular integrada do GBM foi proposta. Essa classificação incluiu quatro subtipos de GBM definidos pelos padrões de alteração dos genes *EGFR*, *NF1*, *PDGFRA* e *IDH1* e o PEG: clássico, MQ, PN e neural. Esses subtipos também eram diferentes na resposta ao tratamento e na sobrevida global (SG) (VERHAAK et al., 2010).

O gene *PTEN* é um supressor tumoral capaz de inibir a proliferação tumoral e a sobrevida celular através da inativação da via da *Fosfatidilinositol-3-quinase (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 radioterapia (RT), resultando em radiossensibilização 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* mostrou aumento da radiossensibilidade das células de GBM (LI; KIM; WALDMAN, 2009).

Outra via gênica alterada bastante comum ao 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 patência da atividade dessa enzima permite que a célula tumoral consiga ser recuperada do dano causado pela quimioterapia (QT), levando à resistência aos quimioterápicos alquilantes, como a temozolamida (TMZ). Estima-se que o gene *MGMT* esteja metilado em aproximadamente 35% dos casos de GBM (HEGI et al., 2005).

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 TMZ 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.

Pacientes portadores de GBM com hipermetilação do gene *MGMT* submetidos a RT pós-operatória exclusiva apresentaram melhor resposta ao tratamento, menor chance de progressão durante a RT e maior sobrevida global quando comparados aos pacientes sem a hipermetilação, sugerindo que o *MGMT* seja também um biomarcador preditivo de resposta à RT (RIVERA et al., 2010).

Outra consideração clínico-radiológica importante da metilação do gene *MGMT* é a possibilidade de ocorrência, em 20 a 30% dos pacientes com GBM submetidos à RT, do fenômeno radiológico de "pseudoprogressão tumoral". Esse fenômeno caracteriza-se por um aumento do realce pós-contraste da região cerebral irradiada, visto em exame de ressonância magnética (RM) realizado até 12 semanas após o término da RT. Esse achado radiológico, sem correlação a uma piora clínica, provavelmente decorre de um aumento transitório da permeabilidade vascular do tumor após a irradiação (BRANDES et al., 2008). Essa informação e seu diagnóstico diferencial com progressão tumoral objetiva são de grande importância para confirmar ou não a resistência ao tratamento radioterápico, não havendo, entretanto, nenhum critério claro, objetivo e incontestável para esse diagnóstico diferencial importante para o prognóstico e decisões terapêuticas futuras em caso de progressão confirmada (HEGI et al., 2005; STUPP et al., 2005).

O tratamento padrão do GBM é uma abordagem multidisciplinar, envolvendo neurocirurgia, RT e QT. A ressecção cirúrgica é o tratamento inicial, com intuito de citorredução tumoral máxima, considerando-se também as possíveis sequelas motoras, cognitivas e funcionais decorrentes da ressecção. A ressecabilidade completa da lesão tumoral é um fator determinante e independente para o correto diagnóstico histológico, com impacto prognóstico para o paciente, devendo ser, dentro das possibilidades de realização, o procedimento primário de escolha (PICHLMEIER et al., 2008). A ressecção cirúrgica, mesmo quando incompleta, considerando-se a proximidade com áreas eloquentes, pode proporcionar a melhora do quadro clínico, permitir o correto diagnóstico histopatológico e possibilitar melhores taxas de resposta ao tratamento com RT associada ou não à QT.

Com o objetivo de evitar a recorrência, a RT se consolidou como uma importante ferramenta no tratamento. A RT é a terapia baseada na emissão de radiação ionizante sobre o leito tumoral. O principal efeito celular das radiações ionizantes consiste em danos à molécula de DNA tumoral, seja direto ou indireto, provocados por elétrons e radicais livres. Após exposto à radiação, o DNA intracelular apresenta danos em bases nitrogenadas e quebras em filamentos da dupla-hélice (BERNSTEIN; GUTIN, 1981).

A temozolamida (TMZ), um derivado 3-metil da mitozolomide, é um quimioterápico alquilante que atravessa facilmente a barreira hematoencefálica, demonstrando atividade antitumoral e baixa toxicidade em estudos clínicos de pacientes diagnosticados com glioma de alto grau (STUPP et al., 2005).

O melhor entendimento dessas três ferramentas terapêuticas consolidou o tratamento combinado de cirurgia (com máxima ressecção possível), seguida de RT na dose de 60 Gy em 30 frações associada à TMZ em caráter radiossensibilizante e, após término da RT, a continuidade da TMZ por cinco dias a cada 28 dias, durante seis meses como tratamento padrão para GBM. Os resultados desse estudo pioneiro conduzido por Stupp e colaboradores (2005) foram considerados de grande relevância clínica por provirem do primeiro estudo a demonstrar ganho de sobrevida global para o GBM, aumentando de 12,1 para 14,6 meses respectivamente, quando comparados cirurgia seguida de RT e cirurgia seguida de radioquimioterapia com TMZ. Apesar de discreto, esse ganho em SG foi estatisticamente significativo e mudou o paradigma no tratamento dos GBM, de modo que, em atualizações das curvas de sobrevida nos intervalos de 12 e 24 meses, houve a duplicação do número de pacientes vivos (STUPP et al., 2005). Na atualização de cinco anos, esse benefício foi mantido: a SG foi de 16,0% em três anos, 12,1% em quatro anos e 9,8% em cinco anos com TMZ associado, contra 4,4%, 3,0% e 1,9% com RT isolada (STUPP et al., 2009).

A única opção terapêutica recentemente incorporada pela National Comprehensive Cancer Network (NCCN) (BOWER; WAXMAN, 2016), que define os protocolos de tratamento da Sociedade Americana de Oncologia Clínica, foi o "Tumor treating fields" (TTF), equipamento portátil que gera campos elétricos de baixa intensidade. Sua aprovação foi resultante de um estudo fase III que randomizou 223 pacientes para uso do TTF ou quimioterapia. Apesar de sobrevidas similares terem sido vistas em ambos os grupos, o uso do TTF foi associado com menor toxidade e maior qualidade de vida (STUPP et al., 2012).

Apesar dos avanços terapêuticos, a maioria dos casos de GBM recidiva após dois anos de diagnóstico, principalmente no leito ou adjacências do tumor inicial. Mesmo as células de GBM *in situ* são consideradas radiorresistentes (JAMAL et al., 2010), e o aumento progressivo das doses de radioterapia não está diretamente associado a maiores taxas de resposta (CHAN et al., 2002). Nesse contexto, estudo das vias e moléculas associadas à radiorresistência pode fornecer uma base racional para novas estratégias capazes de aumentar a radiossensibilidade e a sobrevida desses pacientes.

Muitos estudos têm avaliado assinaturas de expressão gênica que predizem o comportamento tumoral de diversos tipos de neoplasias. Algumas dessas assinaturas já foram validadas em estudos experimentais com culturas de células. Além disso, alguns pesquisadores têm tentado utilizar tecnologias de expressão gênica em larga escala para identificar previamente a radiossensibilidade de um tumor. Uma assinatura de expressão gênica, chamada de índice de radiossensibilidade (RSI), composta por 10 genes (*AR, c-Jun, STAT1, PKC, RELA, c-ABL, SUMO1, CDK1, HDAC1* e *IRF1*) que se associam à radiossensibilidade, foi estudada em linhagens de células tumorais e foi clinicamente validada para as neoplasias de reto, esôfago, cabeça e pescoço e mama tratadas com RT, associada ou não à QT (ESCHRICH et al., 2009a; LIAUW, 2013).

O RSI foi aplicado em três coortes independentes de pacientes portadores de neoplasia de cabeça e pescoço, esôfago e retos tratados com RT associada à QT. Os pacientes respondedores (R) *versus* os não respondedores (NR) ao tratamento apresentaram RSIs significativamente diferentes nos coortes dos portadores de doença retal (RSI R *vs* NR 0,32 *vs* 0,46, p = 0,03), esofágica (RSI R *vs* NR 0,37 *vs* 0,50, p = 0,05) e combinação retal / esofágica (RSI NR R *vs* 0,34 *vs* 0,48, p = 0,001511). Usando-se um limiar de RSI de 0,46, o modelo tem uma sensibilidade de 80%, especificidade de 82% e valor preditivo positivo de 86%. Houve também melhora do controle locorregional em dois anos no grupo radiossensível (86% *vs* 61%, p = 0,05) (ESCHRICH et al., 2009b).

Recentemente, o RSI foi também avaliado em pacientes com GBM: 270 pacientes do TCGA foram analisados (214 foram submetidos a RT e QT com TMZ e 56 não foram submetidos a RT) com um seguimento médio de 9,1 meses. Os pacientes que receberam RT e TMZ foram categorizados como radiossensíveis (n = 48; 22%) e radiorresistentes (n = 166; 78%). Os pacientes categorizados como radiossensíveis tiveram maior probabilidade de apresentar alta expressão de *MGMT* (p = 0,02). Na análise multivariada, o RSI demonstrou ser um preditor independente de SG (HR = 1,64, IC 95% 1,08-2,5; p = 0,02), o que reforçou o seu valor como biomarcador independentemente do local da doença (AHMED et al., 2015).

A taxa de incidência de GBM é muito maior nos homens adultos do que nas mulheres (KABAT; ETGEN; ROHAN, 2010), no entanto não se sabe o exato mecanismo subjacente a essa pronunciada epidemiologia. Yu e colaboradores mostraram que a expressão do *receptor de androgênio (AR)* é significativamente maior no tecido cerebral de pacientes portadores de GBM em comparação com o tecido cerebral periférico normal. A sinalização do *AR* pode promover a tumorigênese de GBM em homens adultos através da inibição da sinalização do *receptor do fator de crescimento* β (*TGF* β) (YU et al., 2015).

O proto-oncogene *c-Jun* é um fator de transcrição que forma uma grande variedade de complexos diméricos, coletivamente denominados como ativador da proteína 1 (AP-1), e regula positivamente proliferação celular, invasão e metástase. O acúmulo da proteína *c-Jun* no GBM contribui para suas propriedades malignas (BLAU et al., 2012).

As proteínas transdutoras de sinal e ativadoras de transcrição (STAT) são ativadas pela fosforilação da tirosina, geralmente pela Janus quinase (JAK). A STAT1, a primeira a ser descoberta, é um componente essencial da sinalização do IFN e necessária para a imunidade inata. Foi demonstrado que a STAT1 é ativada pelo IFN-gama e pelo IFN-alfa (DARNELL; KERR; STARK, 1994). A expressão imuno-histoquímica da STAT1 em GBM pode ser um biomarcador útil para orientação de decisões terapêuticas. São necessários novos estudos que avaliem a associação da expressão da STAT1 com resposta à terapia e, assim, analisem a possibilidade do uso da STAT1 como um marcador preditivo para GBM (HAYBAECK et al., 2007).

A família da proteína quinase C (PKC) tem sido repetidamente implicada nos processos que controlam o crescimento, a sobrevivência e a progressão das células tumorais. Para avaliar a contribuição da ativação da PKC para a transdução de sinal do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), conduzindo a neovascularização e permeabilidade vascular aumentada, foram estudados os efeitos de um inibidor seletivo de PKC β , que interrompe a atividade de fosfotransferase de isoformas de PKC através de uma interação no local de ligação de trifosfato de adenosina (ATP). Esse inibidor da PKC β , o 317615 x 2HCl, não foi altamente citotóxico na linhagem celular de GBM humano T98G, porém apresentou citotoxidade aditiva com a Carmustina (BCNU) (TEICHER et al., 2001).

Estudos recentes indicam que o proto-oncogene *RELA* ou *fator nuclear kB (NF-kB)* é consistentemente ativado no GBM humano. Recentemente, viu-se, na *dehidroximetilepoxiquinomicina (DHMEQ)*, uma pequena molécula inibidora do *NF-kB*, um alvo terapêutico para tratamento do GBM. A adição da *DHMEQ* nas células de GBM humano inibiu a translocação nuclear do *RELA*. Além disso, essa adição reduziu a taxa de crescimento de células de GBM significativamente em seis e modestamente em três de um total de 10 linhas celulares avaliadas (FUKUSHIMA et al., 2012).

As Abelson murine leukemia viral oncogene homolog (Abl) quinases (c-ABL e ARG) são ativadas a jusante do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e promovem a proliferação e migração de fibroblastos. Em uma coorte de 101 doentes com GBM, realizou-se imuno-histoquímica anti-PDGFR-alfa, beta, c-kit, c-abl e arg. A expressão dessas proteínas foi avaliada semiquantitativamente e correlacionada com a sobrevida do doente. Detectou-se a imunomarcação focal de PDGFR c-abl em 7/101 casos, e a análise estatística não revelou nenhuma correlação entre a sua expressão e a sobrevida dos pacientes (HABERLER et al., 2006). Srinivasan e colaboradores demonstraram que as Abl quinases também estão ativadas em células de GBM, indicando que a sinalização PDGFR-Abl também pode ser importante no desenvolvimento e/ou progressão do GBM (SRINIVASAN; KAETZEL; PLATTNER, 2009).

Small ubiquitin-like modifier (*SUMO1*, 2 e 3) formam um grupo de proteínas que se conjugam a resíduos de lisina das proteínas-alvo, modificando, assim, sua atividade, estabilidade e localização subcelular. Fatores de transcrição e outras proteínas nucleares envolvidas na expressão gênica são alvo da ação da *SUMO*. Além disso, a conjugação da *SUMO* desempenha um papel primordial na estabilidade do genoma, controle de proteínas recémsintetizadas, degradação proteossomal de proteínas e reparação de danos ao DNA. Os níveis das proteínas *SUMO1* e *SUMO2/3*-conjugadas são marcadamente elevados em tumores astrocíticos humanos. O bloqueio da conjugação da *SUMO 1-3* através do seu silenciamento suprimiu a síntese de DNA, o crescimento celular e a sobrevivência clonogênica de células de GBM (YANG et al., 2013).

A proteína quinase dependente da ciclina 1 (CDK1) pertence à família CDK, que controla o ciclo celular catalisando a transferência de ATP para substratos específicos de proteínas. Através da bioinformática, um estudo evidenciou que células estromais associadas ao glioblastoma (GASCs) apresentavam regulação positiva da CDK1, principalmente em vias envolvidas no ciclo celular, ciclo celular mitótico, replicação do DNA e inibição da sinalização da proteína p53, todas intimamente associadas aos mecanismos de crescimento tumoral (CHEN et al., 2016). Cheng e colaboradores mostraram que inibidores de CDK 1 / 2, RNAs de

interferência (siRNAs) contra *CDK 1 / 2* e o inibidor CDK 1 / 2 clínico roscovitina foram sinérgicos ao inibidor de PI3K PIK-90, bloqueando a proteína anti-apoptótica survivina e conduzindo à morte celular (CHENG et al., 2012).

A proteína de interação de 19 kDa de Bcl-2 (BNIP3) está localizada no núcleo da maioria dos GBMs e não consegue induzir morte celular. Essa proteína liga-se ao promotor do *gene do fator indutor de apoptose (AIF)* e reprime a sua expressão. A BNIP3 associa-se ao fator de splicing associado ao PTB (PSF) e à HDAC1 (histona desacetilase 1), que contribuem para a repressão transcricional do gene *AIF*. Essa redução mediada pela BNIP3 na expressão de *AIF* leva à diminuição da apoptose induzida pela TMZ em células de glioma. Isto poderia explicar por que a expressão de BNIP3 nuclear está aumentada em tumores sólidos de mau prognóstico, como o GBM (BURTON; EISENSTAT; GIBSON, 2009).

A análise do perfil de expressão gênica realizada em modelos de xenoenxerto de murino de GBM mostrou níveis aumentados de transcrição da sinalização *STAT1/fator regulatório de Interferon 1 (IRF1)* em tumores resistentes ao *bevacizumab*, anticorpo monoclonal que inibe a ação do VEGF, em comparação com tumores de controle. Experiências *in vitro* mostraram que o tratamento com *bevacizumab* aumentou a expressão de *IRF1* de uma forma dependente da dose e do tempo, o que coincidiu com a autofagia mediada pelo bevacizumab. A depleção de *IRF1* aumentou a eficácia da terapia anti-VEGF num modelo de xenoenxerto de glioma (LIANG et al., 2015).

Por se tratar de doença agressiva, com tratamento baseado em RT associada à QT, a busca de preditores moleculares de radiossensibilidade do GBM teria grande aplicabilidade clínica. Dessa forma, a investigação da expressão de genes associados ao RSI em GBM pode identificar subgrupos de pacientes que teriam maior ou menor benefício com o tratamento radioterapêutico. A caracterização dessa assinatura de expressão gênica e sua correlação com desfechos clínicos após a exposição ao agente ionizante podem identificar e agrupar padrões fenotípicos distintos do GBM.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho é estudar a expressão dos genes envolvidos no Índice de Radiossensibilidade (*AR, c-Jun, STAT1, PKC, RELA, c-ABL, SUMO1, CDK1, HDAC1, IRF1*) e o gene *MGMT* em amostras de tumor primário humano de glioblastoma, buscando identificar a associação destes com radiossensibilidade e sobrevida.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a sobrevida livre de progressão e a sobrevida global nos grupos respondedores QT/RT (radiossensíveis) e não respondedores QT/RT (radiorresistentes);
- Avaliar a correlação da sobrevida livre de progressão e da sobrevida global com a expressão gênica quantitativa;
- Avaliar a expressão diferencial dos genes do RSI e do MGMT nos grupos respondedores QT/RT e não respondedores QT/RT;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (FMRP-USP) (Processo HCRP nº 9913/2014) (ANEXO A), o qual está de acordo com a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa. Esta pesquisa não acarretará exposição dos pacientes a quaisquer riscos, pois se trata de estudo envolvendo coleta retrospectiva de informações clínicas existentes em prontuários e análises moleculares a partir de amostras tumorais congeladas, armazenadas no banco de tumores do Sistema Nervoso Central (atualização nº 11006/2005 do processo nº 7645/1999 do Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP) (ANEXO B). Ressalta-se que não haverá intervenção direta ao paciente, assim como benefícios extras como remuneração para os sujeitos participantes. Os resultados poderão contribuir para o entendimento da evolução e desenvolvimento do GBM, sendo estes divulgados apenas em revistas científicas, respeitando-se o sigilo da identidade dos pacientes envolvidos.

3.2 Seleção e caracterização da amostra

O estudo conduzido foi do tipo caso-controle. Inicialmente, foram selecionados junto ao banco de dados da farmácia de quimioterapia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP) 173 registros de pacientes que fizeram uso de TMZ no período de janeiro de 1998 a dezembro de 2015. Posteriormente, foram separados junto ao banco de dados do Ambulatório de Neuro-oncologia (NCOQ) os registros de 151 pacientes com diagnóstico histopatológico de GBM no mesmo período. O cruzamento das informações desses dois grupos resultou em 62 pacientes, cujos prontuários físicos e eletrônicos foram revisados no Serviço de Arquivo Médico (SAM) e Sistema Athos, respectivamente. Destes, 32 pacientes apresentavam todos os critérios de inclusão e nenhum critério de exclusão do estudo. Entretanto, quatro pacientes foram excluídos por não terem amostras teciduais suficientes para a pesquisa dos genes, resultando em 28 pacientes selecionados (Figura 1). As informações retrospectivas contidas no prontuário médico dos pacientes relacionam-se às características clínicas, epidemiológicas, evolução clínica, toxidades, resposta tumoral e desfecho clínico (sobrevida global e sobrevida livre de progressão). O fechamento do estudo ocorreu no dia 30 de setembro de 2016.



As características clínicas avaliadas foram: sexo (masculino, feminino), idade ao diagnóstico (< ou = 50 anos, > 50 anos) (CHAICHANA et al., 2011; JOHNSON; O'NEILL, 2012; PAN; FERGUSON; LAM, 2015), *performance status* pelo índice de Karnofsky Performance Status (KPS) (> ou = 80%, < 80%) (CHAICHANA et al., 2011; OKEN et al., 1982), localização do tumor (não eloquente, eloquente) (LACROIX et al., 2001; PAN; FERGUSON; LAM, 2015), lesão residual na ressonância nuclear magnética (RNM) pósoperatória (ausente, presente), exame neurológico pré-operatório (normal, alterado), reexposição à radioterapia (sim, não), número de ciclos de TMZ adjuvante, uso de TMZ metronômica (sim, não), reexposição à TMZ (sim, não), uso de outra quimioterapia que não seja a TMZ (sim, não) e reabordagem cirúrgica na recidiva (sim, não).

As toxidades foram graduadas em grau 1 (leve), 2 (moderada), 3 (severa) e 4 (limitante da vida), segundo os critérios estabelecidos pelo National Cancer Institute Common Toxicity Criteria e traduzidos para o português (SAAD et al., 2002).

Para a interpretação da resposta tumoral ao tratamento com a RT, foram utilizados os critérios objetivos de Macdonald, atualizados em 2010 por Wen e colaboradores. Considerando os critérios radiológicos e clínicos, a resposta tumoral pode ser classificada em:

- <u>Resposta Completa (RC)</u>: desaparecimento completo das lesões mensuráveis e não mensuráveis por, pelo menos, quatro semanas; não surgimento de novas lesões; T2/FLAIR mantidos; avaliação neurológica estável e ausência da necessidade de uso de corticosteroides;
- <u>Resposta Parcial (RP)</u>: redução maior ou igual a 50% da soma dos diâmetros perpendiculares das lesões mensuráveis mantidas por pelo menos quatro semanas; ausência de progressão das lesões não mensuráveis; T2/FLAIR mantidos; doses de corticoides mantidas ou reduzidas quando comparadas ao momento do diagnóstico; avaliação neurológica estável;
- <u>Doença Estável (DE)</u>: não enquadra nos critérios radiológicos de RP ou PD.
 Situações de aumento das doses de corticosteroides para novos sintomas sem, entretanto, apresentar progressão radiológica nos exames de imagem;

<u>Progressão de Doença (PD)</u>: aumento superior ou igual a 25% na soma dos diâmetros perpendiculares das lesões captantes; surgimento de lesões novas ou deterioração clínica não atribuível à outra causa (WEN et al., 2010).

Quanto ao desfecho clínico, foram analisadas as variáveis:

- <u>Sobrevida Global Específica (SG</u>), definida como o tempo decorrido da data do diagnóstico do tumor por biópsia até a data de óbito decorrente da evolução/progressão do GBM;
- <u>Sobrevida Livre de Progressão (SLP</u>), definida como o tempo decorrido da data do diagnóstico do tumor até a data da progressão da doença ou óbito;

Foram considerados casos os pacientes com SLP superior a seis meses, classificados como "bons respondedores" (radiossensíveis), e controles os pacientes com SLP inferior ou igual a seis meses, classificados como "não respondedores" (radiorresistentes) (MALLICK et al., 2016; WELLER et al., 2013).

Ao fim, 32 pacientes respeitavam todos os critérios estabelecidos, os quais incluem:

Critérios de inclusão dos pacientes na pesquisa:

- a) Pacientes adultos (idade maior ou igual a 18 anos) com diagnóstico histopatológico confirmado de GBM, segundo os critérios da OMS, submetido à ressecção macroscópica total ou subtotal do tumor;
- b) Possuir material biológico tumoral criopreservado armazenado junto ao Banco de Tumores do Sistema Nervoso Central do HCFMRP-USP;
- c) Ter sido submetido a tratamento complementar com RT, associada à TMZ, segundo o protocolo proposto por Stupp (2005).

Critérios de exclusão dos pacientes na pesquisa:

- a) Casos que não contenham informações clínicas detalhadas a respeito das características epidemiológicas, dados de evolução clínica e radiológica e de sobrevida livre de progressão e global destes pacientes;
- b) Pacientes que não tenham os exames de imagem (tomografia computadorizada ou ressonância nuclear magnética) realizados pré-cirurgia e pós-tratamento imediato com RT;
- c) Amostras com RNA degradado.

Após exclusão de quatro pacientes por material insuficiente para pesquisa dos genes, foram estudadas 28 amostras criopreservadas de pacientes com diagnóstico histopatológico confirmado de GBM submetidos à ressecção completa da neoplasia no HCFMRP-USP, tratados em sequência com TMZ associada a RT, seguida de TMZ adjuvante. Essas amostras estão armazenadas no Banco de Tumores do Sistema Nervoso Central.

Todos os pacientes que ainda estavam vivos foram abordados em consulta médica com a equipe de Oncologia Clínica para a apresentação, explicação do estudo e, em havendo concordância, assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO C).

3.3 Microdissecção das amostras selecionadas

A microdissecação a laser, também conhecida como LCM (Microdissecação de Captura a Laser), é um método livre de contato e contaminação para isolamento de células individuais específicas ou áreas inteiras de tecido a partir de uma grande variedade de amostras de tecido.

A LCM foi realizada com o sistema computadorizado Pix Cell II Laser Capture Microdissection (Arcturus, Inc., Califórnia, EUA), que consiste em um emissor de feixes de raio *laser* e um microscópio óptico invertido acoplados a um sistema de vídeo. O procedimento foi realizado de acordo com o protocolo do Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Cirurgia do HCFMRP-USP.

Foram microdissecadas amostras dos 28 pacientes selecionados para o estudo.

3.4 Extração do RNA

Os procedimentos para extração do RNA foram realizados de acordo com o protocolo do Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Cirurgia do HCFMRP-USP. Para cada $50 - 100 \ \mu g$ de tecido tumoral, foram acrescentados $1000 \ \mu l$ de TRIZOL Reagent®; em seguida, esse material foi homogeneizado e deixado à temperatura ambiente por cinco minutos.

Posteriormente, foram acrescentados 200 ml de clorofórmio, o material foi agitado lentamente por 15 segundos e centrifugado a 13.200 RMP por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa superior foi coletada e transferida para novos tubos devidamente identificados. O RNA foi precipitado com 500 µl de álcool isopropílico 100% mantido à –20° C por pelo menos 12 horas.

Após essa etapa, as amostras foram centrifugadas a 13.200 RPM por 20 minutos a 4°C, desprezando-se em seguida o sobrenadante. Acrescentou-se 1.000 µl de etanol 75% seguido novamente de centrifugação refrigerada a 4°C por cinco minutos a 13.200 RPM. Desprezou-se a fase superior, e o *pellet* foi dissolvido em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) por pelo menos 15 minutos. Em seguida, ele foi aliquotado, identificado e armazenado a -80° C.

3.5 Síntese de DNA complementar (cDNA)

O RNA extraído das amostras foi quantificado em um espectrofotômetro (*NanoDrop* 2000 – *Thermo Scientific*), e 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 25 μ l, foram utilizados 2,5 μ l de *buffer*, 1 μ l de dNTP, 2,5 μ l de *Random Primers*, 1,25 μ l de *multiscribe*, 0,63 μ l de *RNAse OUT* e 17,12 μ l de solução contendo 1 μ g de RNA diluído em água tratada com DEPC. Os reagentes e o RNA foram submetidos ao termociclador onde foram realizados os ciclos de PCR a 25°C por 10 minutos e 37°C por 120 minutos, e, finalmente, as amostras de cDNA foram armazenadas a -20°C.

3.6 PCR em tempo real (qRT-PCR)

As análises da expressão relativa dos genes *AR*, *c-Jun*, *STAT1*, *PKC*, *RELA*, *c-ABL*, *SUMO1*, *CDK1*, *HDAC1*, *IRF1* e *MGMT* foram realizadas utilizando-se a técnica de PCR em tempo real (método *TaqMan*) no aparelho 7500 Real-Time PCR System® (Applied Biosystems) disponível no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Cirurgia do HCFMRP-USP.

Os genes de referência utilizados neste estudo foram o *TBP* (*TATA box binding protein*) e o *HPRT* (*Hypoxanthine phosphoribosyltransferase*), os quais foram selecionados por apresentam baixa variabilidade de expressão em GBM (VALENTE et al., 2009).

Todos os ensaios foram realizados em duplicata, sendo desconsiderados os experimentos que apresentaram desvio padrão maior do que 0,5 mesmo após repetição.

Em todas as placas foram realizados controles negativos das reações para todos os genes estudados e foram desconsideradas as reações que apresentaram qualquer sinal de amplificação para esses controles.

Todos os procedimentos relativos às análises de expressão gênica foram realizados de acordo com as instruções do fabricante, excetuando-se o volume final de cada reação que foi otimizado em 12 µl. Para cada reação foram utilizados 6,0 µl de TaqMan PCR Master Mix, 0,6 µl de sonda TaqMan e 5,4 µl de cDNA (diluído 1:50) por poço em placas de polipropileno para 96 reações (ultraAmp 96-well Semi-Skirt PCR plates, Sorenson BioScience, EUA) cobertas com adesivos ópticos (Adhesive PCR film, ABgene). Esses procedimentos descritos foram realizados com as amostras imersas em gelo e com pouca exposição à luz.

Os valores da expressão relativa dos genes foram calculados pelo método 2^{-DDCT} (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), e a análise estatística dos dados foi realizada com o programa IBM SPSS statistics version 22. Para todos os dados o nível de significância adotado foi de 5%.

3.7 Análise Estatística

Os 28 pacientes analisados foram divididos, após análise da sobrevida, em radiossensíveis / progressão tardia (SLP > ou = 6 meses) e radiorresistentes / progressão precoce (SLP < 6 meses). Foram avaliadas variáveis contínuas em média, mediana e desvio padrão para análise dos valores numéricos. A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa IBM SPSS statistics version 22.

Para verificar a associação das variáveis categóricas clínicas e biológicas dos pacientes portadores de GBM e a expressão gênica, foi utilizado o teste de Mann-Whitney.

Para a análise de sobrevida foi utilizado o método não paramétrico de Kaplan-Meier e usado teste Log-rank para comparar as curvas de sobrevida entre os grupos. A perda de seguimento ou a ausência da informação foi considerada como dado censurado. O tipo de censura usado neste estudo foi a censura tipo I, na qual os pacientes foram incluídos em tempos diferentes durante o período de acompanhamento.

Para verificar se os genes são preditores de radiossensibilidade/progressão tardia foram calculados *odds ratio* através da regressão logística (HOSMER; LEMESHOW, 2000).

Inicialmente, fez-se uma modelagem com cada gene separadamente (regressão bruta) e em seguida com todos os genes em conjunto, além de variáveis de controle como idade, localização e lesão residual (regressão ajustada).

Para relacionar o tempo de sobrevida (global e livre de progressão) com os genes, foi proposto o modelo de riscos proporcionais de Cox (LEE; WANG, 2003), controlando por idade, localização e lesão residual. Esse modelo calcula o *Hazard Ratio* (HR), que fornece o quanto uma categoria tem de risco de vir a óbito (no caso de sobrevida global, por exemplo) em relação à outra.

O menor valor de α (nível de significância) escolhido para rejeitar a hipótese nula foi de 0,05.

4 RESULTADOS

As principais características clínicas e epidemiológicas dos 28 pacientes analisados estão resumidas na Tabela 1.

Variável	Frequência	Percentual
Faixa etária		
\leq 50 anos	10	35,71
> 50 anos	18	64,29
Sexo		
Feminino	10	35,71
Masculino	18	64,29
KPS*		
< 80	3	13,64
≥ 80	19	86,36
Localização		
Eloquente	12	42,86
Não eloquente	16	57,14
Lesão residual		
Ausente	6	21,43
Presente	22	78,57
Reexposição RxT**		
Não	25	89,29
Sim	3	10,71
TMZ metron.***		
Não	18	64,29
Sim	10	35,71
Reexposiçao IMZ	27	06.42
Nao	27	96,43
SIM	1	3,57
Outra OT#		
	27	06 42
Sim	∠ / 1	30,43
51111	1	5,57
Reabord. Cx ^{##}		

Tabela 1 - Frequências e percentuais das variáveis clínico-epidemiológicas

Variável	Frequência	Percentual
Não	22	78,57
Sim	6	21,43
Progressão tardia/Não progressão		
Não	11	39,29
Sim	17	60,71
*KPS: Karnofsky Performance Status	5	
** RxT: Radioterapia		
****TMZ metron: Temozolamida metr	ônica	
[#] OT: Ouimioterania		

Reabord. Cx: Reabordagem cirúrgica

A Tabela 2 reúne as médias, medianas e desvios-padrão dos números de ciclos de TMZ adjuvante realizados e das expressões relativas dos genes analisados. Para melhorar a distribuição das amostras, os três *outliers* extremos da expressão relativa do gene *CDK1* e o *outlier* extremo da expressão relativa do gene *AR* foram eliminados.

Variáveis	n	Média (±DP*)	Mediana
N° ciclos TMZ	28	5,43 (±3,82)	4
CDK1	24	81,26 (±83,74)	59,48
RELA	28	6,83 (±1,02)	3,94
AR	27	31,48 (±36,34)	17,45
CJUN	28	13,05 (±14,21)	4,61
STAT1	28	5,48 (±11,80)	2,73
РКС	28	0,23 (±0,33)	0,13
MGMT	28	1,42 (±2,13)	0,41
SUMO	28	3,21 (±4,92)	0,9
HDAC1	28	2,40 (±2,86)	1,45
IRF1	28	5,50 (±6,81)	2,74
CABL	28	1,14 (±0,66)	0,97
STATI PKC MGMT SUMO HDACI IRF1 CABL	28 28 28 28 28 28 28 28 28	$5,48 (\pm 11,80)$ $0,23 (\pm 0,33)$ $1,42 (\pm 2,13)$ $3,21 (\pm 4,92)$ $2,40 (\pm 2,86)$ $5,50 (\pm 6,81)$ $1,14 (\pm 0,66)$	2,73 0,13 0,41 0,9 1,45 2,74 0,97

Tabela 2 – Análise descritiva dos números de ciclos de TMZ e da expressão gênica

*DP = Desvio Padrão

A incidência de toxidade grave foi similar à encontrada no estudo original de Stupp e colaboradores, publicado em 2005. Durante o período de radioterapia e quimioterapia concomitantes, somente um paciente (4%) apresentou neutropenia grau 3 e outro evoluiu com quadro de neutropenia febril (4%). No período de utilização de TMZ adjuvante, três pacientes (11%) apresentaram neutropenia grau 3 ou 4, dois (7%) cursaram com plaquetopenia grau 3,

um (4%) teve fadiga grau 3 e um (4%) evoluiu com neutropenia febril. Somente um paciente (4%) teve que descontinuar a TMZ adjuvante em função da toxidade hematológica.

A regressão logística foi utilizada para avaliar se os genes eram preditores de progressão tardia/não progressão (radiossensibilidade). Como pode ser observado na Tabela 3, tanto a regressão bruta de cada gene separadamente quanto a regressão ajustada para os fatores clínicos mais relevantes (idade ao diagnóstico, localização do tumor e presença de lesão residual) não evidenciaram significância estatística, com OR = 0,05 (IC 95% 0,002; 1,757) (p = 0,10); OR = 33,54 (IC 95% 0,97; > 999,999) (p = 0,05) e OR = 16,07 (IC 95% 0,227; > 999,999) (p = 0,20), respectivamente.

	Progressão tardia/Não progressão		Regressão logística bruta		Regressão logística ajustada	
Variável	Não	Sim	Odds Ratio [*] (IC 95%)	Valor- p ^{**}	Odds Ratio [*] (IC 95%)	Valor-p**
Faixa etária						
\leq 50 anos	3 (30,00%)	7 (70,00%)			1,00	0.10
> 50 anos	8 (44,44%)	10 (55,56%)			0,05 (0,002; 1,76)	0,10
Localização						
Eloquente	6 (50,00%)	6 (50,00%)			1,00	0.05
Não eloquente	5 (31,25%)	11 (68,75%)			33,54 (0,97; >999,99)	0,03
Lesão residual						
Ausente	2 (33,33%)	4 (66,67%)			1,00	0.20
Presente	9 (40,91%)	13 (59,09%)			16,07 (0,227; >999,99)	0,20
CDK1			1,00 (0,996; 1,00)	0,86	1,00 (0,995; 1,01)	0,45
RELA			1,05 (0,935; 1,19)	0,39	0,96 (0,396; 2,31)	0,92
AR			1,00 (0,99; 1,03)	0,39	0,98 (0,918; 1,05)	0,62
CJUN			1,01 (0,959; 1,08)	0,60	0,97 (0,788; 1,20)	0,79
STATI			1,04 (0,921; 1,17)	0,55	0,62 (0,237; 1,61)	0,32
РКС			44,59 (0,038; >999,99)	0,29	0,98 (<0,001; >999,99)	0,99
MGMT			1,10 (0,743; 1,64)	0,63	1,20 (0,387; 3,74)	0,75
SUMO			1,12 (0,902; 1,39)	0,31	1,11 (0,436; 2,83)	0,83

Tabela 3 – Regressão logística bruta e ajustada dos genes preditores de progressão tardia

X 7 1 7 1	Progressão tardia/Não progressão		Regressão logística bruta		Regressão logística ajustada	
variavei	Não	Sim	Odds Ratio [*] (IC 95%)	Valor- p ^{**}	Odds Ratio [*] (IC 95%)	Valor-p**
HDAC1			1,02 (0,775; 1,34)	0,89	0,53 (0,184; 1,55)	0,25
IRF1			1,13 (0,939; 1,35)	0,20	1,97 (0,774; 5,01)	0,15
CABL			2,23 (0,558; 8,93)	0,26	6,85 (0,361; 130,01)	0,20

* Odds ratio, intervalo de confiança e valor de p.

**Valores de p<0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

A relação entre o tempo de sobrevida (global e livre de progressão) e a expressão dos genes foi realizada através do modelo de riscos proporcionais de Cox, tanto bruto quanto controlado por idade, localização e lesão residual. A análise bruta não apresentou nenhuma diferença entre os grupos para nenhum dos genes estudados. Na análise de sobrevida global ajustada (Tabela 4), houve significância estatística para os genes *RELA* (HR 1,265 / p = 0,01), *c-Jun* (HR 1,237 / p = 0,03) e *c-ABL* (HR 0,33 / p = 0,04). Na análise de sobrevida livre de progressão ajustada (Tabela 5), observou-se diferença estatisticamente significante (p = 0,04) entre os grupos com tumor de localização eloquente e não eloquente. A expressão do gene *RELA* também apresentou significância estatística para SLP (HR 1,107 / p =0,03).

	Regressão de Cox	x bruta	Regressão de Cox aju	istada	
Variável	Hazard Ratio (IC 95%)	Valor-p	Hazard Ratio (IC 95%)	Valor-p	
Faixa etária					
\leq 50 anos			1,00	0.00	
> 50 anos			10,526 (0,737; 150,284)	0,08	
Localização					
Eloquente			1,00	0.10	
Não eloquente			0,045 (0,001; 1,778)	0,10	
Lesão					
residual					
Ausente			1,00	0.31	
Presente			4,018 (0,279; 57,872)	0,51	
CDK1	1,000 (0,997; 1,002)	0,79	1,006 (1,000; 1,012)	0,07	
RELA	1,018 (0,974; 1,064)	0,42	1,265 (1,051; 1,522)	0,01*	
AR	0,999 (0,992; 1,006)	0,76	0,961 (0,894; 1,034)	0,29	

Tabela 4 – Análise de sobrevida global através da Regressão de Cox bruta e ajustada

	Regressão de Cox bruta		Regressão de Cox ajustada	
Variável	Hazard Ratio (IC 95%)	Valor-p	Hazard Ratio (IC 95%)	Valor-p
CJUN	0,995 (0,963; 1,029)	0,79	1,237 (1,019; 1,500)	0,03*
STAT1	1,004 (0,972; 1,037)	0,82	1,609 (0,812; 3,190)	0,17
РКС	1,412 (0,416; 4,791)	0,58	1,402 (0,051; 38,440)	0,84
MGMT	0,989 (0,804; 1,218)	0,92	1,007 (0,640; 1,584)	0,98
SUMO	0,932 (0,832; 1,043)	0,22	1,098 (0,544; 2,217)	0,79
HDAC1	0,943 (0,811; 1,097)	0,45	0,851 (0,594; 1,218)	0,38
IRF1	0,998 (0,938; 1,063)	0,96	0,772 (0,402; 1,483)	0,44
CABL	0,670 (0,265; 1,690)	0,40	0,033 (0,001; 0,828)	0,04*

*Valores de p<0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

	Regressão de Cox bruta		Regressão de Cox ajustada	
Variável	Hazard Ratio (IC 95%)	Valor-p	Hazard Ratio (IC 95%)	Valor-p
<i>Faixa etária</i> < 50 anos			1.00	
> 50 anos			5,291 (0,746; 37,516)	0,10
<i>Localização</i> Eloquente Não eloquente			1,00 0,193 (0,041; 0,915)	0,04*
<i>Lesão residual</i> Ausente Presente			1,00 1,441 (0,155; 13,432)	0,75
CDK1	0,999 (0,997; 1,001)	0,40	1,001 (0,996; 1,006)	0,72
RELA	0,987 (0,944; 1,031)	0,55	1,107 (1,008; 1,216)	0,03*
AR	0,993 (0,982; 1,004)	0,19	0,999 (0,971; 1,027)	0,92
CJUN	0,979 (0,946; 1,014)	0,24	1,060 (0,968; 1,160)	0,21

Tabela 5 – Análise de sobrevida livre de progressão através da Regressão de Cox bruta e ajustada

	Regressão de Cox bruta		Regressão de Cox ajustada	
Variável	Hazard Ratio (IC 95%)	Valor-p	Hazard Ratio (IC 95%)	Valor-p
STAT1	0,952 (0,853; 1,062)	0,37	1,111 (0,727; 1,699)	0,63
РКС	0,409 (0,083; 2,027)	0,27	0,335 (0,018; 6,185)	0,46
MGMT	0,955 (0,735; 1,242)	0,73	1,056 (0,689; 1,618)	0,80
SUMO	0,917 (0,810; 1,037)	0,17	0,735 (0,468; 1,155)	0,18
HDAC1	0,984 (0,830; 1,167)	0,85	1,290 (0,910; 1,829)	0,15
IRF1	0,941 (0,865; 1,023)	0,15	0,968 (0,610; 1,538)	0,89
CABL	0,712 (0,342; 1,482)	0,36	0,448 (0,127; 1,580)	0,21

*Valores de p<0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

Para avaliar o impacto da expressão dos genes na sobrevida global e na sobrevida livre de progressão dos pacientes portadores de GBM tratados com esquema de radioquimioterapia proposto por Stupp e colaboradores, os dados foram divididos em dois grupos para análise. Os pacientes que apresentavam valores de expressão abaixo da mediana foram classificados como de baixa expressão para aquele gene de estudo; por consequência, pacientes cujo valor de expressão do gene encontrava-se acima da mediana foram considerados com expressão gênica aumentada. As curvas de Kaplan-Meier e o teste de *Log-rank* foram utilizados para a análise de sobrevida.

A Figura 2 (A-K) mostra as curvas de sobrevida global, e a Figura 3 (A-K) mostra as curvas de sobrevida livre de progressão dos pacientes para os genes *CDK1*, *RELA*, *AR*, *c-Jun*, *STAT1*, *PKC*, *MGMT*, *SUMO1*, *HDAC1*, *IRF1* e *c-ABL*, respectivamente. Não foi observada diferença estatística quanto à sobrevida global ou sobrevida livre de progressão para o grupo de pacientes que expressaram níveis acima ou abaixo da mediana para nenhum dos genes analisados.

O teste de Mann-Whitney foi utilizado para correlacionar a expressão dos diversos genes com as variáveis clínico-epidemiológicas dos pacientes portadores de GBM – sexo (masculino, feminino), idade (< ou = 50 anos, > 50 anos), KPS (> ou = 80%, < 80%), localização do tumor (não eloquente, eloquente), lesão residual na RNM (ausente, presente), exame neurológico pré-operatório (normal, alterado), reexposição à radioterapia (sim, não), número de ciclos de TMZ adjuvante (> ou = 6, < 6), uso de TMZ metronômica (sim, não),

reexposição à TMZ (sim, não), uso de outra quimioterapia (sim, não), reabordagem cirúrgica (sim, não), tipo de progressão (tardia, precoce).

A expressão do gene *SUMO1* foi significativamente aumentada (p=0,009) no grupo com progressão tardia com relação ao grupo com progressão precoce da doença (Figura 4).

Com relação ao uso de TMZ metronômica na recidiva do GBM, a expressão relativa do gene *AR* apresentou-se aumentada com significância estatística (p=0,021) no grupo em que esta terapia de segunda linha não havia sido utilizada (Figura 5).

Foi observada expressão aumentada dos genes *RELA* (p=0,03), *c-Jun* (p=0,005), *STAT1* (p=0.009) e *HDAC1* (p=0.044) nos pacientes que apresentaram o exame neurológico préoperatório normal (Figura 6).

Figura 2 – Curvas de sobrevida global para os genes CDK1, RELA, AR, c-Jun, STAT1, PKC, MGMT, SUMO1, HDAC1, IRF1 e c-ABL





1 – Expressão gênica acima da mediana; 2 – Expressão gênica abaixo da mediana

A-CDK; B-RELA; C-AR; D-c-Jun; E-STAT1; F-PKC; G-MGMT; H-SUMO1; I-HDAC1; J-IRF1; K-c-ABL, C-ABL, C-



Figura 3 – Curvas de sobrevida livre de progressão para os genes CDK1, RELA, AR, c-Jun, STAT1, PKC, MGMT, SUMO1, HDAC1, IRF1 e c-ABL



1 – Expressão gênica acima da mediana; 2 – Expressão gênica abaixo da mediana A – *CDK*; B – *RELA*; C – *AR*; D – *c*-*Jun*; E – *STAT1*; F – *PKC*; G – *MGMT*; H – *SUMO1*; I – *HDAC1*; J – *IRF1*; K – *c*-*ABL*

Figura 4 – Expressão do gene SUMO1 em função do tipo de progressão



Teste de *Mann-Whitney* (p = 0,009)

Figura 5 – Expressão do gene AR em função do uso de Temozolamida metronômica na progressão da doença



Teste de Mann-Whitney (p = 0,021)

Figura 6 – Expressão dos genes *RELA*, *c-Jun*, *STAT1 e HDAC1* em função do exame físico neurológico no período pré-operatório



Teste de Mann-Whitney. A - RELA (p=0,03); B - c-Jun (p=0,005); C - STATI (p=0,009); D - HDACI (p=0,044)

5 DISCUSSÃO

O perfil gênico dos gliomas já vem sendo utilizado para diagnóstico, tratamento e prognóstico há alguns anos (NIKIFOROVA; HAMILTON, 2011). Nos oligodendrogliomas, por exemplo, a deleção cromossômica dos braços 1p e 19q, além de ser considerada sua identidade, está associada com melhor resposta à quimioterapia e com maior sobrevida livre de progressão (REIFENBERGER; LOUIS, 2003).

A mutação dos genes *IDH 1* e 2 é comum em gliomas grau II e III, porém rara em glioblastomas (YAN et al., 2009). A maioria dos glioblastomas com essa mutação tem uma história clínica curta. Alguns glioblastomas mutantes de *IDH 1* e 2 e que apresentam codeleções 1p/19q têm comportamento de tumores oligodendrogliais, com um prognóstico mais favorável (OHNO et al., 2016).

O GBM tem diversas características biológicas, tais como rápida proliferação, angiogênese, hipóxia e necrose, que o torna uma das formas mais letais de neoplasias do SNC. Seu grande potencial de invadir tecidos adjacentes torna a ressecção cirúrgica completa pouco factível. Além disso, sua complexidade genômica e heterogeneidade entre as células tumorais dificultam outras formas de tratamento, como quimioterapia ou radioterapia.

A terapia padrão para o GBM consiste na ressecção cirúrgica completa, radioterapia pós-operatória, quimioterapia radiossensibilizante e adjuvante com TMZ e, mais recentemente, uso do TTF (BOWER; WAXMAN, 2016). Todavia, apesar dos avanços no tratamento, a sobrevida dos pacientes continua extremamente baixa, demandando novos estudos relativos à patologia, etiologia e tratamento do GBM.

A radioterapia tem o potencial de gerar vários efeitos biológicos nas células e nos tecidos, entre os quais se destacam: danos ao DNA, mutações, alteração da expressão de genes, instabilidade genômica, indução de carcinogênese e morte. O conhecimento desses processos motiva o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

A correlação entre radioterapia, GBM e expressão gênica vem sendo estudada há tempos. No ano de 1999, Haas-Kogan e colaboradores mostraram que o efeito da RT fracionada no GBM pode depender da função do gene supressor tumoral *p53* (HAAS-KOGAN et al., 1999). Em 2008, evidenciou-se que a pseudoprogressão tumoral após o tratamento com RT está significativamente correlacionada com o estado do gene *MGMT* (BRANDES et al., 2008).

O índice de radiossensibilidade (RSI), uma assinatura de expressão gênica composta pelos genes *AR*, *c-Jun*, *STAT1*, *PKC*, *RELA*, *c-ABL*, *SUMO1*, *CDK1*, *HDAC1* e *IRF1*, já foi clinicamente validado para as neoplasias de reto, esôfago, cabeça e pescoço e mama tratadas

com RT, associada ou não à QT (ESCHRICH et al., 2009a; LIAUW, 2013). Quando avaliado em paciente portadores de GBM, o RSI demonstrou ser um preditor independente de SG (HR = 1,64, IC 95% 1,08-2,5; p = 0,02), substanciando o seu valor como biomarcador independentemente da localização da doença (AHMED et al., 2015).

Esse índice não havia sido avaliado em pacientes portadores de GBM em uma população sul-americana, logo optamos por realizar a análise da expressão de todos os genes envolvidos no RSI e do *MGMT* em amostras de tumor primário humano de glioblastoma tratados com RT e QT no HCFMRP – USP entre os anos de 1998 e 2015, buscando identificar a associação deles com radiossensibilidade e sobrevida.

A presença da hipermetilação do gene *MGMT* é sabidamente fator prognóstico favorável para maior sobrevida global e livre de progressão, em função de maior probabilidade de resposta tumoral ao tratamento com QT e RT. A baixa expressão de *MGMT* também é marcador preditivo para uma progressão mais lenta do tumor em pacientes portadores de GBM (SONODA et al., 2010; UNO et al., 2011). Desse modo, associamos o estudo da expressão do *MGMT* em nossa pesquisa. Porém, contrariando a literatura vigente, não observamos correlação da expressão desse gene com SLP, SG nem com radiossensibilidade.

A distribuição dos pacientes pelas variáveis clínico-epidemiológicas ocorreu de acordo com os valores normalmente encontrados na literatura (AHMADLOO et al., 2013; DAREFSKY; KING; DUBROW, 2012; PAN; FERGUSON; LAM, 2015), com exceção do KPS ao diagnóstico, que em nosso trabalho está muito mais alto do que em outros estudos. Isso provavelmente se deve ao fato de que só foram analisados pacientes submetidos ao tratamento com cirurgia, radioterapia e quimioterapia, os quais necessitam ter um grau mínimo de *performance* para tolerar todas as etapas do tratamento. O *performance status* apresenta impacto significativo na sobrevida de pacientes com GBM após a terapia com RT e QT (MICHAELSEN et al., 2013). Contudo, provavelmente em função da grande heterogeneidade numérica entre os dois grupos, não conseguimos a comprovação estatística desse fato.

Com relação ao número de ciclos de TMZ adjuvante administrados, observamos mediana de quatro ciclos (com o mínimo de um e o máximo de 12 ciclos), um ciclo a mais do que no estudo original que embasou a terapêutica usada (STUPP et al., 2005). Sabemos que nesse estudo administrava-se até seis ciclos de quimioterapia adjuvante, entretanto, nos últimos anos, tende-se a estender o tratamento com TMZ adjuvante para até 12 ciclos, salvo toxidade limitante ou recidiva da doença (BARBAGALLO et al., 2014; ROLDÁN URGOITI; SINGH; EASAW, 2012). O protocolo adotado pelo HCFMRP – USP preconizava o uso de até 12 ciclos de TMZ adjuvante, o que justifica essa mediana de ciclos discretamente maior.

O cBioPortal for Cancer Genomics¹ é um recurso da internet para explorar, visualizar e analisar dados multidimensionais sobre genomas de câncer. Baseados em dados do TCGA, o cBioPortal mostrou alteração dos genes do RSI em 65 (11%) de um total de 591 pacientes portadores de GBM sequenciados, além de sua correlação com dados clínicos relevantes (Figura 7) (CERAMI et al., 2012).

Ainda fazendo uso de informações colhidas no "cBioPortal", ao analisar a coocorrência e a exclusividade mútua dos genes do RSI, foram evidenciados 19 pares de genes com alterações mutuamente exclusivas, sendo nenhuma delas significativa, e 26 pares de genes com alterações coocorrentes, sendo que seis eram significativas (Tabela 6) (CERAMI et al., 2012).

¹ Para mais informações, acessar: <http://cbioportal.org>.





Fonte: http://www.cbioportal.org/

Gene A	Gene B	Valor do p	Odds Ratio	Associação
STAT1	IRF1	< 0.001	>3	1*
RELA	SUMO1	< 0.001	>3	1*
ABL1	SUMO1	< 0.001	>3	1*
PRKCA	ABL1	0.010	2.923	1*
RELA	ABL1	0.015	2.669	1*
RELA	HDAC1	0.021	2.464	1*
AR	PRKCA	0.073	2.916	1
AR	RELA	0.088	2.690	1
PRKCA	IRF1	0.100	2.507	1
SUMO1	HDAC1	0.142	2.095	1
HDAC1	IRF1	0.142	2.095	1
PRKCA	RELA	0.153	1.990	1
STAT1	PRKCA	0.166	1.893	1
PRKCA	HDAC1	0.179	1.804	1
STAT1	ABL1	0.200	1.666	1
ABL1	HDAC1	0.214	1.577	1
JUN	HDAC1	0.232	1.480	1
STAT1	HDAC1	0.768	<-3	2
JUN	STAT1	0.784	<-3	2
JUN	RELA	0.800	<-3	2
JUN	ABL1	0.800	<-3	2
STAT1	RELA	0.800	<-3	2
JUN	PRKCA	0.834	<-3	2
JUN	SUMO1	0.868	<-3	2
JUN	IRF1	0.868	<-3	2
STAT1	SUMO1	0.868	<-3	2
RELA	IRF1	0.879	<-3	2
ABL1	IRF1	0.879	<-3	2
AR	HDAC1	0.897	<-3	2
PRKCA	SUMO1	0.900	<-3	2

Tabela 6 - Coocorrência e exclusividade mútua dos genes do RSI

1 - Tendência para coocorrência; 2 - Tendência à exclusividade mútua

*Valores de p<0,05 foram considerados estatisticamente significativos

Fonte: <http://www.cbioportal.org/>.

Os genes do RSI não demonstraram ser preditores de progressão tardia/não progressão (radiossensibilidade), tanto pela análise de cada gene separadamente quanto pela análise ajustada para fatores clínicos relevantes. Apesar do *status* da hipermetilação do promotor do *MGMT* ser o preditor mais confiável de susceptibilidade à terapia adjuvante e de prognóstico do GBM, a hipoexpressão do gene *MGMT* é diretamente correlacionada com a metilação positiva do promotor *MGMT* (UNO et al., 2011). Entretanto, em nosso estudo, não houve diferença na expressão do *MGMT* entre os grupos com progressão tardia (radiossensíveis) e precoce (radiorresistentes). Esse diferente padrão pode ser explicado pela limitação estatística

decorrente do baixo número de pacientes selecionados ou pelo perfil gênico diferente dos GBMs de uma população sul-americana. Estudos futuros podem ser realizados para esclarecer essa lacuna.

A análise de sobrevida global ajustada por fatores clínicos importantes (idade, localização e lesão residual) pelo modelo de Cox mostrou significância estatística para os genes *RELA* (HR 1,265 / p = 0,01), *c-Jun* (HR 1,237 / p = 0,03) e c-*ABL* (HR 0,33 / p = 0,04).

Na análise de sobrevida livre de progressão utilizando-se o mesmo modelo, observouse diferença estatisticamente significante (p = 0,04) entre os grupos com tumor de localização eloquente *versus* não eloquente. Somente a expressão do gene *RELA* apresentou diferença significativa entre os dois grupos (HR 1,107 / p = 0,03).

Fukushima e colaboradores (2012) mostraram que a inibição da translocação nuclear do *RELA* através da *DHMEQ*, pequena molécula inibidora do *NF-kB*, reduziu a taxa de crescimento de células de GBM. Trabalho mais recente também evidenciou que a inibição seletiva da atividade de *RELA* através do *PDCD4*, um supressor tumoral induzido por estímulos apoptóticos, conduz à diminuição do crescimento tumoral num modelo de xenoenxerto de GBM (HWANG et al., 2014). Nosso trabalho mostrou que o aumento da expressão do gene *RELA* elevou em 26,5% e 10,7% o risco de óbito e de recidiva de GBM, respectivamente. Além de alvo terapêutico incipiente, esse gene pode também ser futuramente estudado como um marcador prognóstico, já que o aumento de sua expressão se correlacionou com piora da SG e da SLP.

O proto-oncogene *c-Jun* está muito elevado no GBM e esse aumento contribui para as propriedades malignas dessas células. Contudo, o aumento da proteína *c-Jun* não está relacionado à elevação correspondente no mRNA de *c-Jun* (BLAU et al., 2012). A ativação da cascata MAPK precede a apoptose através da fosforilação da *Jun quinase (JNK)* e do *c-Jun*, um componente principal da *AP-1*. A ativação de *JNK/c-Jun* foi identificada como uma resposta pró-apoptótica tardia em células de glioma tratadas com fármacos anticancerosos alquilantes (como a TMZ) (TOMICIC et al., 2015). Evidenciamos que o aumento da expressão do *c-Jun* eleva em 23,7% o risco de óbito do paciente portador de GBM. Baseado nisso e em informações preliminarmente divulgadas, este achado levanta a possibilidade de estudos futuros para avaliação do *c-Jun* como preditor de pior prognóstico e também como potencial alvo terapêutico.

As *Abl quinases* estão comprovadamente ativadas em células de GBM (SRINIVASAN; KAETZEL; PLATTNER, 2009), no entanto não existem estudos que definam a expressão da *c-ABL* como marcador diagnóstico, prognóstico ou preditivo no GBM. Observamos que os pacientes com aumento da expressão da *c-ABL* apresentaram melhora estatisticamente significativa da SG em 66%, ou seja, tratamos aqui de possível fator de proteção. De todos os 11 genes estudados, esse é o único que apresentou tal comportamento, nem o *MGMT*, conhecido fator preditivo e terapêutico (CABRINI et al., 2015), assim se comportou. Naturalmente, necessitamos de estudos complementares para a confirmação dessa hipótese.

Lacroix e colaboradores (2001) mostraram que glioblastomas que acometem áreas eloquentes do encéfalo (córtex motor ou sensorial, centro da visão, centro da fala, cápsula interna, gânglios da base, hipotálamo, tronco cerebral ou núcleo dentado) são associados a menor sobrevida na análise univariada, porém esse efeito fora perdido quando fizeram o ajuste para outros preditores independentes. Mesmo com ajuste para fatores clínicos importantes, nosso estudo revelou que a localização da neoplasia em áreas não eloquentes do cérebro aumenta em 80,7% a SLP, sem alteração na SG. Podemos inferir que a localização do tumor em área não eloquente diminui a incidência de sintomatologia limitante, facilitando o acesso e a tolerância do paciente à terapêutica mais completa, refletindo em iminente benefício de sobrevida.

Ao analisar as curvas de sobrevida pelo método de Kaplan-Meier dos pacientes portadores de GBM com alterações no conjunto de genes do RSI no cBioPortal, não houve diferença estatisticamente significativa nem na SG nem na SLP (Figura 8) (CERAMI et al., 2012).





Fonte: <http://www.cbioportal.org/>.
A – Sobrevida Global; B – Sobrevida Livre de Progressão
Pacientes com alterações nos genes do RSI; Pacientes sem alterações nos genes do RSI

Corroborando esses dados, em nosso estudo não foi observada diferença estatística quanto à sobrevida global ou sobrevida livre de progressão para o grupo de pacientes que expressaram níveis acima ou abaixo da mediana para nenhum dos genes analisados, inclusive o *MGMT*.

O silenciamento dos genes *SUMO 1-3* inibiu a síntese de DNA, o crescimento celular e a sobrevivência clonogênica de células de GBM (YANG et al., 2013). A conjugação SUMO1-CDK6 constitui um mecanismo de controle do ciclo celular e a inibição dessa via de "SUMOlização" pode fornecer uma estratégia de tratamento para o GBM (BELLAIL; OLSON; HAO, 2014). No entanto, diferentemente do que se evidencia na literatura, em que o silenciamento desse gene e a inibição de sua conjugação estão relacionados com a morte de células neoplásicas e, por conseguinte, com possível benefício de sobrevida, notamos que, nos pacientes analisados em nosso estudo, a expressão do gene *SUMO1* foi significativamente maior no grupo com progressão tardia (radiossensíveis) do GBM. Ou seja, os pacientes com melhor prognóstico apresentavam expressão aumentada do *SUMO1*. Esse fato pode ser explicado de diversas maneiras: ausência de correlação entre a expressão gênica e a tradução proteica, perfil gênico diferente na nossa população de GBM ou até mesmo interação da expressão do gene com os tratamentos posteriormente realizados.

Em função das poucas opções de tratamento para recidiva do GBM, o uso contínuo da TMZ metronômica foi testado neste cenário em um estudo fase II. Os pacientes receberam a dose diária e contínua de TMZ 50 mg por m² de massa corpórea durante um ano ou até a progressão da doença. Os grupos que apresentaram recidiva precoce (antes de completar os seis primeiros ciclos de TMZ dose convencional) ou tardia (dois meses ou mais após completar os seis primeiros ciclos de TMZ dose convencional) obtiveram o benefício máximo da terapia. Baseado neste estudo, o uso da TMZ metronômica passou a fazer parte do arsenal terapêutico contra o GBM (PERRY et al., 2010).

Sabe-se que a expressão do *AR* é significativamente maior no tecido cerebral de pacientes portadores de GBM do que em tecido cerebral periférico normal (YU et al., 2015), entretanto nenhum estudo estabeleceu a relação entre este dado, a sobrevida, o diagnóstico ou o tratamento do GBM.

Em nosso estudo, a expressão relativa do gene AR foi aumentada no grupo em que a TMZ metronômica não foi utilizada. Analisando melhor esse grupo, notamos as seguintes características: 38,9% ainda não haviam apresentado progressão da doença na data do fechamento do estudo; SLP mediana de 209 dias, bastante similar à apresentada no estudo pivotal descrito por Stupp e colaboradores (2005); SG mediana de 567 dias, quase quatro meses maior do que a demonstrada no mesmo trabalho. Levando-se em conta todas as limitações desse tipo de análise, podemos inferir que o gene AR poderia ser estudado como um potencial marcador prognóstico e terapêutico em pacientes com GBM.

A molécula *STAT-1* é hiperexpressa em tecidos de GBM e foi identificada como um marcador de pior prognóstico em pacientes portadores dessa neoplasia. Entretanto, seu papel biológico ainda é compreendido de maneira incompleta, o que a torna uma molécula de interesse para exploração posterior (THOTA et al., 2014).

Os genes do grupo *HDAC* ainda foram muito pouco estudados nos GBMs. Todavia, a acetilação das histonas tem relevância na expressão do *MGMT* (testes *in vitro* mostraram que um inibidor da *HDAC* aumentou a sua expressão) (KITANGE et al., 2012). Recentemente, a Tinostamustina, uma molécula inibidora da alquil-desacetilase (AK-DACi) que funde o efeito de dano ao DNA da *Bendamustina* com a inibição funcional da pan-*HDAC*, foi testada em modelos celulares de GBM e demonstrou efeitos antiproliferativos, pró-apoptóticos e aumento da radiossensibilização (FESTUCCIA et al., 2018).

Não existem estudos relevantes que estabeleçam a correlação entre alterações no exame físico de pacientes com GBM e sua sobrevida. Inclusive, foi evidenciado que o escore do mini exame do estado mental de Folstein normal *versus* anormal é um fator prognóstico significativo em pacientes mais jovens (idade </=42 anos), sugerindo que o estado mental pode ser um determinante mais importante de desfecho clínico do que o funcionamento físico em pacientes com glioma de alto grau (BUCKNER, 2003).

Evidenciamos expressão aumentada dos genes *RELA* (p=0,03), *c-Jun* (p=0,005), *STAT1* (p=0.009) e *HDAC1* (p=0.044) nos pacientes que apresentaram o exame neurológico préoperatório normal. Apesar de não ter havido diferença estatisticamente significativa na sobrevida dos pacientes com exame neurológico normal ou alterado, podemos deduzir que um paciente com exame neurológico inalterado apresenta melhor *performance* e tende a ter melhor tolerância ao tratamento. Entretanto, em nosso trabalho, já havíamos evidenciado que os genes *RELA* e *c-Jun* estão relacionados à piora da sobrevida. Portanto, a expressão dos genes *RELA*, *c-Jun*, *STAT1* e *HDAC1* pode estar relacionada ao tamanho e/ou localização da neoplasia, sem correlação direta com a sobrevida.

6 CONCLUSÃO

O conjunto dos genes do RSI e o MGMT não demonstraram ser preditores de radiossensibilidade.

O aumento da expressão do gene *RELA* está relacionado com a piora da sobrevida global e da sobrevida livre de progressão ajustada por fatores clínicos.

O aumento da expressão do gene *c-Jun* está relacionado com a piora da sobrevida global ajustada por fatores clínicos.

O aumento da expressão do gene *c-ABL* está relacionado com melhora da sobrevida global ajustada por fatores clínicos.

A localização do tumor em área eloquente está relacionada com diminuição da sobrevida livre de progressão ajustada.

A expressão do gene SUMO1 foi aumentada nos pacientes com progressão tardia da doença.

A expressão do gene *AR* mostrou-se aumentada no grupo em que a TMZ metronômica não havia sido administrada.

As expressões dos genes *RELA*, *c-Jun*, *STAT1* e *HDAC1* foram elevadas nos pacientes que apresentaram o exame neurológico pré-operatório normal.

Apesar da necessidade de estudos complementares, podemos inferir que os genes *RELA* e *c-Jun* são potenciais marcadores de pior prognóstico, e que os genes *c-ABL*, *SUMO1 e AR* podem ser considerados marcadores de bom prognóstico.

REFERÊNCIAS

AHMADLOO, N. et al. Treatment outcome and prognostic factors of adult glioblastoma multiforme. **J Egypt Natl Canc Inst**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 21–30, 2013.

AHMED, Kamran A. et al. The radiosensitivity index predicts for overall survival in glioblastoma. **Oncotarget**, [s. l.], v. 6, n. 33, p. 34414–34422, 2015.

BARBAGALLO, Giuseppe M. V et al. Long-term therapy with temozolomide is a feasible option for newly diagnosed glioblastoma: a single-institution experience with as many as 101 temozolomide cycles. **Neurosurgical Focus**, [s. 1.], v. 37, n. 6, p. E4, 2014.

BELLAIL, Anita C.; OLSON, Jeffrey J.; HAO, Chunhai. SUMO1 modification stabilizes CDK6 protein and drives the cell cycle and glioblastoma progression. **Nature communications**, [s. 1.], v. 5, n. May, p. 4234, 2014.

BERNSTEIN, M.; GUTIN, P. H. Interstitial irradiation of brain tumors: a review. **Neurosurgery**, [s. l.], v. 9, n. 6, p. 741–50, 1981.

BLAU, Lior et al. Aberrant expression of c-Jun in glioblastoma by internal ribosome entry site (IRES)-mediated translational activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. 1.], v. 109, n. 42, p. E2875-84, 2012.

BOWER, Mark; WAXMAN, Jonathan. **Central Nervous System Cancers**. 2016. Disponível em: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/cns_blocks.pdf.

BRANDES, Alba A. et al. MGMT promoter methylation status can predict the incidence and outcome of pseudoprogression after concomitant radiochemotherapy in newly diagnosed glioblastoma patients. **Journal of Clinical Oncology**, [s. 1.], v. 26, n. 13, p. 2192–7, 2008.

BRENNAN, Cameron W. et al. The somatic genomic landscape of glioblastoma. **Cell**, [s. l.], v. 155, n. 2, p. 462–477, 2013.

BUCKNER, Jan C. Factors influencing survival in high-grade gliomas. **Seminars in oncology**, [s. l.], v. 30, n. 6 Suppl 19, p. 10–14, 2003.

BURTON, Teralee R.; EISENSTAT, David D.; GIBSON, Spencer B. BNIP3 (Bcl-2 19 kDa interacting protein) acts as transcriptional repressor of apoptosis-inducing factor expression preventing cell death in human malignant gliomas. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, [s. 1.], v. 29, n. 13, p. 4189–4199, 2009.

CABRINI, Giulio et al. Regulation of expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase and the treatment of glioblastoma (Review). **International Journal of Oncology**, [s. 1.], p. 1–12, 2015.

CERAMI, Ethan et al. The cBio Cancer Genomics Portal: An open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. **Cancer Discovery**, [s. l.], v. 2, n. 5, p. 401–404, 2012.

CHAICHANA, Kaisorn L. et al. Factors involved in maintaining prolonged functional independence following supratentorial glioblastoma resection. Clinical article. **Journal of Neurosurgery**, [s. 1.], v. 114, n. 3, p. 604–612, 2011.

CHAN, June L. et al. Survival and Failure Patterns of High-Grade Gliomas Adter Three-Dimensional Conformal Radiotherapy. **Journal of Cinical Oncology**, [s. 1.], v. 20, n. 6, p. 1635–1642, 2002.

CHENG, Christine K. et al. Dual blockade of lipid and cyclin-dependent kinases induces synthetic lethality in malignant glioma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 109, n. 31, p. 12722–7, 2012.

CRESPO, Ines et al. Molecular and Genomic Alterations in Glioblastoma Multiforme. **American Journal of Pathology**, [s. l.], v. 185, n. 7, p. 1820–1833, 2015.

DAREFSKY, Amy S.; KING, Joseph T.; DUBROW, Robert. Adult glioblastoma multiforme survival in the temozolomide era: A population-based analysis of Surveillance, Epidemiology, and End Results registries. **Cancer**, [s. 1.], v. 118, n. 8, p. 2163–2172, 2012.

DARNELL, James E.; KERR, Ian M.; STARK, George R. Jak-STAT Pathways and Transcriptional Activation in Response to IFNs and Other Extracellular Signaling Proteins. **Science, New Series**, [s. l.], v. 264, p. 1415–1421, 1994.

ESCHRICH, Steven et al. Systems biology modeling of the radiation sensitivity network: a biomarker discovery platform. **International journal of radiation oncology, biology, physics**, [s. 1.], v. 75, n. 2, p. 497–505, 2009. a.

ESCHRICH, Steven a et al. A gene expression model of intrinsic tumor radiosensitivity: prediction of response and prognosis after chemoradiation. **International journal of radiation oncology, biology, physics**, [s. 1.], v. 75, n. 2, p. 489–96, 2009. b.

FESTUCCIA, Claudio et al. The first-in-class alkylating deacetylase inhibitor molecule tinostamustine shows antitumor effects and is synergistic with radiotherapy in preclinical models of glioblastoma. **Journal of Hematology and Oncology**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 1–19, 2018.

FUKUSHIMA, Tsuyoshi et al. Antitumor effect of dehydroxymethylepoxyquinomicin, a small molecule inhibitor of nuclear factor-kB, on glioblastoma. **Neuro-oncology**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 19–28, 2012.

HAAS-KOGAN, Daphne A. et al. P53 function influences the effect of fractionated radiotherapy on glioblastoma tumors. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, [s. 1.], v. 43, n. 2, p. 399–403, 1999.

HABERLER, C. et al. Immunohistochemical analysis of platelet-derived growth factor receptor- a, - b, c-kit, c-abl, and arg proteins in glioblastoma : possible implications for patient selection for imatinib mesylate therapy. **Journal of Neuro-Oncology**, [s. l.], v. 76, p. 105–109, 2006.

HAYBAECK, J. et al. STAT-1 Expression in Human Glioblastoma and Peritumoral Tissue. Anticancer Research, [s. 1.], v. 27, p. 3829–3836, 2007.

HEGI, Monika E. et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. **The New England journal of medicine**, [s. l.], v. 352, n. 10, p. 997–1003, 2005.

HOSMER, David W.; LEMESHOW, Stanley. Applied Logistic Regression (2nd Ed.), 2000.

HWANG, Soon-Kyung et al. Tumor suppressor PDCD4 inhibits NF- κ B-dependent transcription in human glioblastoma cells by direct interaction with p65. **Carcinogenesis**, [s. 1.], v. 35, n. 7, p. 1469–1480, 2014.

JAMAL, Muhammad et al. Microenvironmental regulation of glioblastoma radioresponse. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, [s. 1.], v. 16, n. 24, p. 6049–59, 2010.

JOHNSON, Derek R.; O'NEILL, Brian Patrick. Glioblastoma survival in the United States before and during the temozolomide era. **Journal of Neuro-Oncology**, [s. l.], v. 107, n. 2, p. 359–364, 2012.

KABAT, Geoffrey C.; ETGEN, Anne M.; ROHAN, Thomas E. Do steroid hormones play a role in the etiology of glioma? **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, [s. 1.], v. 19, n. 10, p. 2421–2427, 2010.

KITANGE, Gaspar J. et al. Inhibition of histone deacetylation potentiates the evolution of acquired temozolomide resistance linked to MGMT upregulation in glioblastoma xenografts. **Clinical Cancer Research**, [s. 1.], v. 18, n. 15, p. 4070–4079, 2012.

LACROIX, M. et al. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. **Journal of Neurosurgery**, [s. l.], v. 95, n. 2, p. 190–198, 2001.

LEE, Elisa T.; WANG, John Wenyu. Statistical Methods for Survival Data Analysis. [s.l: s.n.]. v. 53

LI, Hui-Fang; KIM, Jung-Sik; WALDMAN, Todd. Radiation-induced Akt activation modulates radioresistance in human glioblastoma cells. **Radiation oncology (London, England)**, [s. l.], v. 4, p. 43, 2009.

LIANG, Ji et al. Interferon-regulatory factor-1 (IRF1) regulates bevacizumab induced autophagy. **Oncotarget**, [s. l.], v. 6, n. 31, p. 31479–92, 2015.

LIAUW, Stanley L. New paradigms and future challenges in Radiation Oncology: An Update of Biological Targets and Technology. **NIH Public Access**, [s. l.], v. 5, n. 173, p. 1–32, 2013.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 402–8, 2001.

LOUIS, David N. et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. Acta Neuropathologica, [s. l.], v. 131, n. 6, p. 803–820, 2016.

LOUIS, David N.; OHGAKI, Hiroko; WIESTLER, Otmar D. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System (IARC WHO Classification of Tumours) (v. 1). [s.l.] : World Health Organization, 2007.

LOUIS, David N.; POMEROY, Scott L.; CAIRNCROSS, J. Gregory. Focus on central nervous system neoplasia. **Cancer cell**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 125–8, 2002.

MALLICK, Supriya et al. Management of glioblastoma after recurrence: A changing paradigm. **Journal of the Egyptian National Cancer Institute**, [s. 1.], v. 28, n. 4, p. 199–210, 2016.

MCLENDON, Roger et al. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. **Nature**, [s. l.], v. 455, n. 7216, p. 1061–1068, 2008.

MICHAELSEN, Signe Regner et al. Clinical variables serve as prognostic factors in a model for survival from glioblastoma multiforme: an observational study of a cohort of consecutive non-selected patients from a single institution. **BMC cancer**, [s. 1.], v. 13, n. 1, p. 402, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. 11. ed. Rio de Janeiro.

NABORS, Louis Burt et al. Central nervous system cancers. Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN, [s. l.], v. 11, n. 9, p. 1114–51, 2013.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. **SEER Cancer Statistics Review 1975-2010**. Washington, D.C.

NIKIFOROVA, Marina N.; HAMILTON, Ronald L. Molecular diagnostics of gliomas. Archives of Pathology and Laboratory Medicine, [s. l.], v. 135, n. 5, p. 558–568, 2011.

OHGAKI, Hiroko; KLEIHUES, Paul. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. **The American journal of pathology**, [s. l.], v. 170, n. 5, p. 1445–53, 2007.

OHNO, Makoto et al. Glioblastomas with IDH1/2 mutations have a short clinical history and have a favorable clinical outcome. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 46, n. 1, p. 31–39, 2016.

OKEN, M. M. et al. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. **American journal of clinical oncology**, [s. l.], v. 5, n. 6, p. 649–55, 1982.

PAN, I. W.; FERGUSON, S. D.; LAM, S. Patient and treatment factors associated with survival among adult glioblastoma patients: A USA population-based study from 2000-2010. J Clin Neurosci, [s. l.], v. 22, n. 10, p. 1575–1581, 2015.

PARSONS, D. Williams et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma Multiforme. **Science**, [s. l.], v. 321, n. 5897, p. 1807–1812, 2008.

PERRY, James R. et al. Phase II trial of continuous dose-intense temozolomide in recurrent malignant glioma: RESCUE study. **Journal of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 28, n. 12, p. 2051–2057, 2010.

PHILLIPS, Heidi S. et al. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. **Cancer Cell**, [s. 1.], v. 9, n. 3, p. 157–173, 2006.

PICHLMEIER, Uwe et al. Resection and survival in glioblastoma multiforme: an RTOG recursive partitioning analysis of ALA study patients. **Neuro-oncology**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. 1025–34, 2008.

REIFENBERGER, G.; LOUIS, D. N. Oligodendroglioma: toward molecular definitions in diagnostic neuro-oncology. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, [s. l.], v. 62, n. 2, p. 111–126, 2003.

RIVERA, Andreana L. et al. MGMT promoter methylation is predictive of response to radiotherapy and prognostic in the absence of adjuvant alkylating chemotherapy for glioblastoma. **Neuro-oncology**, [s. 1.], v. 12, n. 2, p. 116–121, 2010.

ROLDÁN URGOITI, Gloria B.; SINGH, Amitabh D.; EASAW, Jacob C. Extended adjuvant temozolomide for treatment of newly diagnosed glioblastoma multiforme. **Journal of Neuro-Oncology**, [s. l.], v. 108, n. 1, p. 173–177, 2012.

SAAD, Everardo D. et al. Critérios Comuns de Toxicidade do Instituto Nacional de Câncer dos Estados Unidos Common toxicity criteria of the National Cancer Institute. **Revista Brasileira de Cancerologia**, [s. l.], v. 48, n. 1, p. 63–96, 2002.

SONODA, Yukihiko et al. O6-Methylguanine DNA methyltransferase determined by promoter hypermethylation and immunohistochemical expression is correlated with progression-free survival in patients with glioblastoma. **International Journal of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. 352–358, 2010.

SRINIVASAN, Divyamani; KAETZEL, David M.; PLATTNER, Rina. Reciprocal regulation of Abl and receptor tyrosine kinases. **Cellular Signalling**, [s. l.], v. 21, n. 7, p. 1143–1150, 2009.

STUPP, Roger et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. **The New England journal of medicine**, [s. l.], v. 352, n. 10, p. 987–96, 2005.

STUPP, Roger et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. **The lancet oncology**, [s. 1.], v. 10, n. 5, p. 459–66, 2009.

STUPP, Roger et al. NovoTTF-100A versus physician's choice chemotherapy in recurrent glioblastoma: A randomised phase III trial of a novel treatment modality. **European Journal of Cancer**, [s. 1.], v. 48, n. 14, p. 2192–2202, 2012.

TEICHER, B. A. et al. Antiangiogenic and Antitumor Effects of a Protein Kinase CB Inhibitor in Human T98G Glioblastoma Multiforme Xenografts. **Clinical Cancer Research**, [s. l.], v. 7,

n. 1, p. 634–40., 2001.

THOTA, Balaram et al. STAT-1 expression is regulated by IGFBP-3 in malignant glioma cells and is a strong predictor of poor survival in patients with glioblastoma. **Journal of neurosurgery**, [s. l.], v. 121, n. August, p. 1–10, 2014.

TOMICIC, Maja T. et al. Apoptosis induced by temozolomide and nimustine in glioblastoma cells is supported by JNK/c-Jun-mediated induction of the BH3-only protein BIM. **Oncotarget**, [s. 1.], v. 6, n. 32, p. 33755–68, 2015.

UNO, Miyuki et al. Correlation of MGMT promoter methylation status with gene and protein expression levels in glioblastoma. **Clinics**, [s. l.], v. 66, n. 10, p. 1747–1755, 2011.

VALENTE, Valeria et al. Selection of suitable housekeeping genes for expression analysis in glioblastoma using quantitative RT-PCR. **BMC molecular biology**, [s. l.], v. 10, p. 17, 2009.

VERHAAK, Roel G. W. et al. Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. **Cancer Cell**, [s. 1.], v. 17, n. 1, p. 98–110, 2010.

WELLER, Michael et al. Standards of care for treatment of recurrent glioblastoma-are we there yet? **Neuro-Oncology**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 4–27, 2013.

WEN, Patrick Y. et al. Updated response assessment criteria for high-grade gliomas: response assessment in neuro-oncology working group. **Journal of clinical oncology :** official journal of the American Society of Clinical Oncology, [s. l.], v. 28, n. 11, p. 1963–72, 2010.

YAN, Hai et al. IDH 1 and IDH2 Mutations in Gliomas. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 360, n. 8, p. 765–773, 2009.

YANG, Wei et al. Small ubiquitin-like modifier 1-3 is activated in human astrocytic brain tumors and is required for glioblastoma cell survival. **Cancer Sci**, [s. l.], v. 104, n. 1, p. 70–77, 2013.

YU, Xiaoming et al. Androgen receptor signaling regulates growth of glioblastoma multiforme in men. **Tumor Biology**, [s. l.], v. 36, n. 2, p. 967–972, 2015.

ANEXOS

ANEXO A – Processo HCRP nº 9913/2014 Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da FMRP-USP



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



Ribeirão Preto, 15 de outubro de 2014

Ofício nº 3840/2014 CEP/MGV

PROCESSO HCRP nº 9913/2014

Prezados Pesquisadores,

O trabalho intitulado **"ESTUDO DE GENES PREDITORES DE RADIOSSENSIBILIDADE E SOBREVIDA EM PACIENTES COM GLIOBLASTOMA TRATADOS COM RADIOTERAPIA E TEMOZOLAMIDA" – Versão 2 de 07/10/2014,** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 396^a Reunião Ordinária realizada em 13/10/2014, e enquadrado na categoria: <u>APROVADO, bem como o Termo</u> de Consentimento Livre e Esclarecido Versão 2 de 07/10/2014.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 466/2012 CNS/MS.

<u>Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório</u> <u>Parcial e o Relatório Final da pesquisa.</u> De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do remo de consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Atenciosamente.

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

Ilustríssimos Senhores **PROF^a DR^a FERNANDA MARIS PERIA PROF. DR. CARLOS G. CARLOTTI JUNIOR/PhD DANIEL MORENO** Depto. de Clínica Médica – Divisão de Oncologia Clínica

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 PB/CONEP nº 5440 (016) 3602-2228 cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br

ANEXO B – Processo nº 7645/1999 do Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP



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

> CAMPUS UNIVERSITÁRIO - MONTE ALEGRE FONE: 602-1000 - FAX (016) 633-1144

Ribeirão Preto, 12 de abril de 2000

Oficio nº 856/2000 CEP/CDGC

Senhor Professor:

O trabalho intitulado "FORMAÇÃO DE UM BANCO DE AMOSTRAS DE TUMOR DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL", foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 80ª Reunião Ordinária realizada em 21/02/2000, e enquadrado na categoria: APROVADO, com recomendação do parecer em anexo, de acordo com o Processo HCRP n° 7645/99.

No aguardo das providências solicitadas, aproveito a oportunidade para apresentar a Vossa Senhoria protestos de estima e consideração.

PROFA.DRA. CLARISSE DULCE G. CARVALHEIRO Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP

Ilustríssimo Senhor **PROF. DR. CARLOS GILBERTO CARLOTTI JUNIOR** Depto. de Cirurgia, Ortopedia e Traumatologia Em mãos

ANEXO C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto: ESTUDO DE GENES PREDITORES DE RADIOSSENSIBILIDADE E SOBREVIDA EM PACIENTES COM GLIOBLASTOMA TRATADOS COM RADIOTERAPIA E TEMOZOLAMIDA.

Pesquisador responsável: Profa. Dra. Fernanda Maris Peria

Pós-Graduando: Dr. Antonio Carlos Cavalcante Godoy

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 Clinicas 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, _____, ____, anos, Reg. HC n° ______ aceito participar de forma livre e esclarecida do estudo: ASSOCIAÇÃO ENTRE PREDITORES MOLECULARES GENÉTICOS DE RADIOSSENSIBILIDADE, SOBREVIDA E RESPOSTA EM GLIOBLASTOMA TRATADO COM RADIOTERAPIA, 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 2018.