

FERNANDA DE OLIVEIRA SERACHI

O papel de STMN1 e MELK em astrocitoma humano

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Programa de Neurologia

Orientadora: Profa. Dra. Sueli Mieko Oba
Shinjo

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2019

FERNANDA DE OLIVEIRA SERACHI

O papel de STMN1 e MELK em astrocitoma humano

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Programa de Neurologia

Orientadora: Profa. Dra. Sueli Mieko Oba
Shinjo

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Serachi, Fernanda de Oliveira
O papel de STMN1 e MELK em astrocitoma humano /
Fernanda de Oliveira Serachi. -- São Paulo, 2019.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Neurologia.
Orientadora: Sueli Mieko Oba Shinjo.

Descritores: 1.Proteína humana MELK 2.Proteína
humana STMN1 3.Proteína forkhead box M1
4.Astrocitoma 5.Glioblastoma

USP/FM/DBD-362/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

Aos meus pais, Gerson e Silvia, que sempre viveram dedicando cada pensamento e esforço para me ver feliz, que sonharam comigo esse e muitos outros sonhos. Que acreditaram em mim e me apoiam com seu amor incondicional. Essa conquista é para vocês e por vocês.

Muito obrigada por tudo!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me manter disposta e saudável, por me acompanhar em mais essa caminhada repleta de desafios e mudanças.

Agradeço imensamente minha orientadora Dra Sueli Oba, que me aceitou, confiou em mim e no meu trabalho e me deu essa oportunidade incrível.

Agradeço a Dra Suely Marie, que abriu as portas do seu laboratório para me receber, e me ajudou sempre que necessário e contribuiu de maneira imprescindível nesse trabalho.

Agradeço ao Dr. Flávio Miura, por me dar essa oportunidade, me apresentar ao laboratório e por toda ajuda.

Aos meus familiares que sempre torceram por mim, em especial: Gerson, Sílvia, Vicentina, Paulo, Sonia, Selma, Ivete, Lourdes (*in memoriam*), meus sobrinhos do coração: Felipe e Fernando, e minha segunda família: Rosângela e Valmir. Muito obrigada pelo incentivo, torcida e apoio! Ao meu noivo, Diógenes que enfrentou comigo essa jornada e esteve ao meu lado durante esses anos como um verdadeiro companheiro!

Agradeço as minhas amigas de laboratório: Isabele, Stella, Talita, Thais, Lais, Amanda, Yollanda, Adaliana, Paula, Tawany, Roseli, Eliene, Rosa, Daiane, Natalia, Camila e tantas outras colegas que se tornaram companheiras maravilhosas que fizeram meus dias mais felizes e coloridos! Fomos um time e amei aprender tanto com vocês!!! Vocês fizeram parte do meu desenvolvimento pessoal e profissional, muito obrigada pela amizade!

Agradeço minha ex-orientadora Dra Alison Colquhoun, hoje colaboradora, por toda ajuda ao longo desses anos, pela amizade e apoio de sempre. Agradeço a Janaina Silva pela colaboração com as células resistentes e todos os demais amigos do laboratório de metabolismo da célula tumoral, por toda ajuda e incentivo desde minha iniciação e mestrado, em especial Renata e Felipe.

Agradeço aos professores Prof. Dr. José Pinhata e a Profa. Dra Lisete Ribeiro, com os quais pude aprender muito no estágio PAE, obrigada pelos

ensinamentos, conversas e todo aprendizado. Agradeço ao CNPq (Projeto número: 140073/2016-7) e a Fundação Faculdade de Medicina pelo suporte financeiro.

RESUMO

Serachi FO. *O papel de STMN1 e MELK em astrocitoma humano* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

O glioblastoma (GBM) é o tumor cerebral maligno mais comum e agressivo em adultos e o tratamento padrão consiste em ressecção cirúrgica do tumor, seguida de radiação e quimioterapia com temozolomida. Nosso grupo realizou a análise de genes diferencialmente expressos entre GBM e astrocitoma pilocítico. Um dos genes com expressão aumentada em GBMs foi *MELK* (*maternal embryonic leucine zipper kinase*), que codifica uma proteína serina/treonina quinase que desempenha um papel importante na proliferação, ciclo celular, apoptose e oncogênese. Uma análise de células de GBM silenciadas para *MELK* por siRNA foi realizada para identificar possíveis genes associados à via de MELK. Um dos genes identificado foi *STMN1*, que codifica estatimina 1 (STMN1), uma proteína citosólica importante que desempenha um papel crítico na mitose regulando a dinâmica dos microtúbulos durante a progressão do ciclo celular e migração. Além disto, STMN1 está também envolvida em outros processos biológicos, como migração e diferenciação, através da fosforilação de quatro serinas. A fosforilação específica de quatro serinas (S16, S25, S38 e S63) provoca a ativação da proteína, enfraquecendo sua ligação às moléculas de tubulina, que se associam. FOXM1, importante fator de transcrição, apontado como regulador na expressão de diversos genes essenciais para a progressão do ciclo celular, inclusive *STMN1*, também foi alvo do presente estudo. Além disto, FOXM1 é fosforilado por MELK, regulando a mitose. MELK, STMN1 e FOXM1 ainda estão relacionados com resistência de células tumorais ao tratamento com quimioterapia. O objetivo deste estudo foi analisar os níveis de expressão e correlações de *MELK*, *STMN1* e *FOXM1* em nossa coorte astrocitomas de diferentes graus de malignidade. Além disso, esses dados foram validados *in silico* em coortes maiores do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA). Análises funcionais com silenciamento de *MELK* e *STMN1* foram realizadas com linhagens celulares de GBM. A expressão de *MELK* foi silenciada com siRNA e foi observada uma diminuição também da expressão de *STMN1* e de FOXM1. Os níveis de expressão dos três genes aumentaram conforme a malignidade dos astrocitomas em nossa casuística e na do TCGA. Os níveis de expressão de *MELK* e *STMN1*, *MELK* e *FOXM1* e *STMN1* e *FOXM1* estavam positivamente correlacionados em nossa série GBM, bem como na do TCGA. Além disto, os três genes apresentaram maior expressão no subtipo proneural de GBM do que nos subtipos mesenquimal e clássico na casuística do TCGA. Células U87MG e A172 silenciadas com siRNA de MELK apresentaram diminuição semelhante na expressão de MELK e de STMN1 (~90%), porém com menor nível de diminuição de FOXM1 (~50%). Foram analisadas também as serinas fosforiladas de STMN1 após o silenciamento de MELK, e houve diminuição da fosforilação em relação ao controle. Por outro lado, quando a expressão de *STMN1* foi silenciada com

siRNA, a expressão de *MELK* não se alterou e a de *FOXM1* diminuiu cerca de 40%. As células silenciadas apresentaram uma redução na viabilidade e migração celular. Adicionalmente, os casos de GBM foram divididos com base na expressão de *STMN1* alta e baixa. Dos casos com expressão de *STMN1* aumentado, 79% apresentaram expressão de *FOXM1* aumentado, contra 25% no grupo de expressão de *STMN1* baixo. Entretanto, estes grupos não apresentaram diferença de sobrevida dos pacientes. A relação entre os três genes e resistência a drogas foi analisada em linhagens U87MG e T98G resistentes a temozolamida e vincristina. Houve um aumento da expressão de *STMN1*, *FOXM1* e *MELK* nas ambas linhagens quando comparados com o controle das células não resistentes. Os dados sugerem que estes genes estão relacionados a tumorigênese e malignidade dos astrocitomas, bem como a aquisição de resistência a drogas. Outros estudos são necessários para um melhor entendimento destas relações.

Descritores: Proteína humana MELK; Proteína humana STMN1; Proteína forkhead box M1; Astrocitoma; Glioblastoma.

ABSTRACT

Serachi FO. *Role of STMN1 and MELK in human astrocytoma* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2019.

Glioblastoma (GBM) is the most common and aggressive malignant brain tumor in adults and standard treatment consists of surgical resection of the tumor, followed by radiation and chemotherapy with temozolomide. Our group performed the analysis of differently expressed genes between GBM and pilocytic astrocytoma. One of the genes with increased expression in GBMs was *MELK* (maternal embryonic leucine zipper kinase), which encodes a serine / threonine kinase protein that plays an important role in various cellular processes, such as proliferation, cell cycle, apoptosis, and oncogenesis. A siRNA silenced GBM cell analysis was performed to identify possible genes associated with the *MELK* pathway. One of the genes identified was *STMN1*, which encodes stathmin 1, an important cytosolic protein that plays a critical role in mitosis by regulating microtubule dynamics during cell cycle progression and migration. In addition, *STMN1* is also involved in other biological processes, such as migrating and differentiating, through the phosphorylation of four serines (S16, S25, S38 and S63) triggers protein activation, weakening its binding to tubulin molecules. *FOXM1*, an important transcription factor, identified as regulator in the expression of several genes essential for cell cycle progression, including *STMN1*, was also a target of this study. In addition, *FOXM1* is phosphorylated by *MELK*, regulating mitosis. *MELK*, *STMN1* and *FOXM1* are still related to tumor cell resistance to chemotherapy treatment. The aim of this study was to analyze expression levels of *MELK*, *STMN1* and *FOXM1* in our cohort astrocytomas of different degrees of malignancy. In addition, these data were validated *in silico* in larger cohorts of The Cancer Genome Atlas (TCGA). The expression of the three genes increased according to the malignancy of astrocytomas in our cases and in TCGA cases. *MELK* and *STMN1*, *MELK* and *FOXM1* and *STMN1* and *FOXM1* expression levels were positively correlated in our GBM series, as well as in the TCGA series. In addition, the three genes showed higher expression in the proneural GBM subtype than in the Mesenquimal and Clássico subtypes in the case series of TCGA. U87MG and A172 cells silenced with *MELK* siRNA showed a similar decrease in *MELK* and *STMN1* expression (~90%), but with a lower level of *FOXM1* decrease (~50%). Phosphorylated serines of *STMN1* were also analyzed after *MELK* silencing, and there was a decrease in phosphorylation compared to the control. On the other hand, when *STMN1* expression was silenced with siRNA, *MELK* expression did not change and *FOXM1* expression decreased by 40%. Silenced cells showed a reduction in cell viability and migration. Additionally, GBM cases were divided based on the expression of high and low *STMN1*. Of the cases with increased *STMN1* expression, 79% showed increased *FOXM1* expression, compared to 25% in the low *STMN1* expression group. However, these groups showed no difference in survival of patients. The relationship between the three genes and drug resistance was analyzed in temozolomide and vincristine resistant U87MG and T98G cells. There was an increase of *STMN1*, *FOXM1* and *MELK* expression in both strains when compared to the control of non-resistant cells. The data suggest that these genes are related to

astrocytoma tumorigenesis and malignancy, as well as the acquisition of drug resistance. Further studies are needed for a better understanding of these relationships.

Descriptors: MELK protein, human; STMN1 protein, human; Forkhead box protein M1; Astrocytoma; Glioblastoma.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGI - atrocioma pilocítico

AGII - astrocitoma grau II

AGIII - astrocitoma grau III

AKT - serina/treonina quinase

ATP – adenosina trifosfato

ATRX - alpha-thalassemia/mental retardation syndrome X-linked

CBTRUS – *Central Brain Tumor Registry of the United States*

CDK1 – quinase dependente de ciclina

cDNA - ácido desoxirribonucléico complementar

C –Celsius

CO₂ - dióxido de carbono

Ct - *cycle threshold*

CTGs – células tronco de gliomas

DMEM – meio de Eagle modificado por Dulbecco

DMSO – dimetilsulfóxido

EGFR - receptor de fator de crescimento epidermal

GBM - glioblastoma

INCA – Instituto Nacional do Câncer

LSCC – Laryngeal squamous cell carcinoma

µg – micrograma

µL – microlitro

µM – micromolar

M - molar

MAPK - proteíno-quinases ativadas por mitógenos

MAPK - proteína Quinase Ativado por Mitógeno

MELK - maternal Embryonic Leucine Zipper Kinase

min - minutos

mL – mililitro

mM - milimolar

mRNA– RNA mensageiro

mTOR - *mammalian target of rapamycin*

N₂ – nitrogênio

NF-κB - fator nuclear kappa B

ng – nanograma

nM - nanomolar

NTC - *Non-targeting control*

OMS - Organização Mundial de Saúde

pb – pares de bases

PBS – tampão fosfato salino

PCR – reação em cadeia da polimerase

PDGFRα - receptor α do fator de crescimento derivado de plaquetas

PLK1 – *polo like kinase*

qRT-PCR – PCR quantitativo em tempo real

RNA - ácido ribonucléico

s - segundo

SFB - soro fetal bovino

siRNA - RNA pequeno de interferência

SNC - sistema nervoso central

STMN1 - estatimina

TCGA – The Cancer Genome Atlas

TMZ – temozolomida

VCR - vincristina

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil, segundo INCA.....	09
Figura 02 - Representação do papel de STMN1 durante o ciclo celular	20
Figura 03 - Análise de expressão gênica de <i>MELK</i> , <i>STMN1</i> e <i>FOXM1</i> em astrocitomas de diferentes graus de malignidade e tecidos tumorais não neoplásicos	36
Figura 04 - Correlação entre os níveis de expressão de <i>MELK</i> , <i>STMN1</i> e <i>FOXM1</i> em astrocitomas de diferentes graus de malignidade dos dados do TCGA	37
Figura 05 - Correlação entre os níveis de expressão de <i>MELK</i> , <i>STMN1</i> e <i>FOXM1</i> em casos GBM da casuística do laboratório	39
Figura 06 - Correlação entre os níveis de expressão de <i>MELK</i> , <i>STMN1</i> e <i>FOXM1</i> em casos GBM dados do TCGA..	40
Figura 07 - Análise da expressão de <i>MELK</i> , <i>STMN1</i> e <i>FOXM1</i> nos subtipos moleculares de GBM da casuística de laboratório	41
Figura 08 - Análise da expressão de <i>MELK</i> , <i>STMN1</i> e <i>FOXM1</i> nos subtipos moleculares de GBM da casuística do TCGA	43
Figura 9 Análise do silenciamento de MELK em células U87MG e A172	44
Figura 10 - Expressão proteica de MELK e STMN1 em células U87MG e A172.....	45
Figura 11 - Análise dos sítios de fosforilação de STMN1 em células U87MG após silenciamento de MELK com siRNA	46
Figura 12 - Análise do silenciamento de STMN1 em células U87MG e A172.....	47
Figura 13 - Análise da duração do efeito do silenciamento transitório de STMN1 em células U87MG.....	48
Figura 14 - Análise da duração do efeito do silenciamento transitório de STMN1 em células A172.....	49
Figura 15 - Análise do efeito do silenciamento de STMN1 na viabilidade celular nas linhagens U87MG e A172	50
Figura 16 - Efeito do silenciamento de STMN1 na migração de células U87MG em ensaio de ferida	52
Figura 17 - Análise de expressão <i>STMN1</i> e <i>FOXM1</i> na casuística de GBM e correlação com sobrevida.....	54
Fig 18 – Análise da expressão de STMN1, FOXM1 e MELK em células de glioma resistentes a drogas	56
Figura 19 - Via de sinalização STMN1, MELK e FOXM1	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Taxa de sobrevivência em gliomas de acordo com a faixa etária	10
Tabela 02 - Tumores com aumento de expressão de MELK	17
Tabela 03 - Tumores com aumento significativo de STMN1	21
Tabela 04 – Sequências e concentração de <i>primers</i> usados para PCR em tempo real e tamanho dos produtos	31
Tabela 05 – Informações sobre anticorpos utilizados para Western Blot	32

Sumário

1	INTRODUÇÃO	8
1.1	Tumores do SNC	8
1.2	Astrocitomas	10
1.2.1	<i>Astrocitomas pilocíticos</i>	11
1.2.2	<i>Astrocitomas difusos e anaplásicos</i>	12
1.2.3	<i>Glioblastoma</i>	13
1.3	Análise de expressão gênica diferencial em astrocitomas	14
1.4	MELK	15
1.4.1	<i>Estrutura e função de MELK</i>	15
1.4.2	<i>MELK em tumores</i>	15
1.5	STMN1	18
1.5.1	<i>Estrutura e função de STMN1</i>	18
1.5.2	<i>STMN1 em tumores</i>	21
1.6	FOXM1	23
1.6.1	<i>Estrutura e função de FOXM1</i>	23
1.6.2	<i>FOXM1 em tumores</i>	23
1.5	Justificativa do estudo	25
2	OBJETIVOS	26
2.1	Objetivo geral	26
2.2	Objetivos específicos	26
3	MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1	Casuística	27
3.2	Linhagens celulares	28
3.2.1	<i>Linhagens resistentes</i>	28
3.3	Análise da expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real	28
3.3.1	<i>Extração do RNA total</i>	28
3.3.2	<i>Síntese do DNA complementar</i>	29
3.3.3	<i>PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)</i>	29
3.4	Silenciamento gênico por RNA de interferência	31
3.5	Expressão da proteína por Western blot	32
3.6	Ensaio de viabilidade celular	33
3.7	Ensaio de ferida em monocamada	33
3.8	Análise de expressão gênica	34
3.9	Análises estatísticas	34
4	Resultados	35

4.1	Análise de expressão de <i>MELK</i> , <i>STMN1</i> e <i>FOXM1</i> em astrocitomas de diferentes graus de malignidade	35
4.2	Correlações de expressão de <i>MELK</i> , <i>STMN1</i> e <i>FOXM1</i> em glioblastomas	38
4.3	Comparação de expressão <i>MELK</i> , <i>STMN1</i> e <i>FOXM1</i> nos subtipos moleculares GBM	41
4.4	Silenciamento de <i>MELK</i> por siRNA.....	43
4.4.1	Análise de expressão gênica e proteica em células silenciadas para expressão de <i>MELK</i>	44
4.4.2	Análise das serinas fosforiladas de <i>STMN1</i> em células silenciadas para expressão de <i>MELK</i>	45
4.5	Silenciamento de <i>STMN1</i>	46
4.5.1	Análise da expressão gênica e proteica em células silenciadas para expressão de <i>STMN1</i>	47
4.5.2	Análise da duração do efeito do silenciamento de <i>STMN1</i>	48
4.5.3	Análise do efeito do silenciamento de <i>STMN1</i> na proliferação	49
4.5.4	Análise do efeito do silenciamento de <i>STMN1</i> na migração celular	51
4.6	Análise do envolvimento de <i>MELK</i> , <i>STMN1</i> e <i>FOXM1</i> na resistência a drogas.....	53
4.6.1	Análise expressão gênica de <i>FOXM1</i> e <i>STMN1</i>	53
4.6.2	Células resistentes a drogas	55
5	DISCUSSÃO	57
6	Conclusões	65
	REFERÊNCIAS	66
	Abramoff MD. Image processing with imageJ. Biophotonics Internation:11(7):36-42.	66
	Hebbard LW, Maurer J, Miller A, Hassell J, Oshima RG, Terskikh AV. Maternal embryonic leucine zipper kinase is upregulated and required in mammary tumor-initiating cells in vivo. Cancer Res. 2010 Nov 1;70(21):8863-73.	70
7	ANEXO	78
7.1	Aprovação do projeto pela CAPPesq	78
7.2	Informações e dados clínicos dos pacientes incluídos nesse trabalho	79
7.3	Casuística TCGA.....	83

1 INTRODUÇÃO

1.1 Tumores do SNC

O sistema nervoso central (SNC) é composto basicamente por dois tipos celulares, os neurônios, que conduzem o impulso nervoso através da despolarização da membrana plasmática, e a neuroglia (glia) que representa 90% das células cerebrais em humanos (Fawcett et al.,1994).

A glia tem como principal função dar suporte nutricional, estrutural e de defesa aos neurônios e é formada por quatro tipos de células principais: astrócitos, oligodendrócitos, células endoteliais e microglia. Os astrócitos, além da função de sustentação, também participam do controle da composição iônica e molecular do ambiente extracelular dos neurônios. Quando o cérebro é lesionado, os astrócitos formam um tecido cicatricial que ajuda a reparar o dano. Os oligodendrócitos produzem as bainhas de mielina que servem de isolantes elétricos para os neurônios do SNC. Isso ajuda os neurônios a enviar sinais elétricos através dos axônios. Células endoteliais revestem os ventrículos dentro do cérebro e formam parte do caminho através do qual o líquido cefalorraquidiano flui. A microglia é a população de macrófagos residentes do SNC e, desta forma, participa da inflamação e do reparo do SNC, além de secretar várias citocinas reguladoras do processo imune e remover os restos celulares que surgem nas lesões do SNC (Junqueira, Carneiro., 2017).

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), as neoplasias do SNC representam de 2,4 a 2,7% de todos os tumores malignos, ocupando a 10ª posição no Brasil e 18ª no mundo em relação à frequência. Cerca de 88% dos tumores de SNC são no cérebro. No Brasil estima-se que para cada ano do biênio 2018/2019 sejam diagnosticados 11.320 novos casos de tumores cerebrais (5.810 em homens e 5.510 em mulheres) (Figura 1). Esses números correspondem a um risco estimado de 5,62 e 5,17 casos novos a cada 100 mil homens e mulheres, respectivamente. As causas das altas incidências de tumores no SNC ainda são desconhecidas, mas sabe-se que é uma doença multifatorial, causada pela soma de diversas alterações genéticas. Algumas dessas alterações são adquiridas durante a vida, por predisposição ou por exposição a fatores de risco (INCA,Brasil, 2018).


Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
			Homens	Mulheres	Mama Feminina	59.700	29,5%
Próstata	68.220	31,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Estômago	13.540	6,3%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Estômago	7.750	3,8%
Esôfago	8.240	3,8%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Bexiga	6.690	3,1%			Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.390	3,0%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Leucemias	5.940	2,8%			Leucemias	4.860	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%					

Figura 1 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil em homens e mulheres, número de casos estimados para 2018, segundo INCA.

Glioma é o termo utilizado para designar os tumores originários das células da glia e são divididos de acordo com os diferentes tipos celulares dos quais se originam: astrocitomas, oligodendrogliomas e ependimomas. São responsáveis por quase 80% dos tumores cerebrais malignos primários (Ostrom et al., 2016; Schwartzbaum, et al., 2014).

As taxas de sobrevida variam muito de acordo com a idade e tempo de diagnóstico, mas em geral indivíduos mais jovens apresentam um melhor prognóstico. Já indivíduos com mais de 65 anos apresentam taxas mais baixas de sobrevida (Lopez, 2017). A Tabela 1 apresenta as taxas de sobrevida de pacientes com glioma em 5 anos tratadas entre 2000 e 2014, e foram obtidas no registro central americano de tumores cerebrais (CBTRUS).

Tabela 1 – Taxa de sobrevida em gliomas de acordo com a faixa etária

Tipo de tumor	Taxa de sobrevida em 5 anos		
	Faixas etárias		
	20 a 44 anos	45 a 54 anos	55 a 64 anos
Astrocitoma de baixo grau	68%	44%	22%
Astrocitoma anaplásico	54%	32%	14%
Glioblastoma	19%	8%	5%
Oligodendroglioma	88%	81%	68%
Oligodendroglioma anaplásico	71%	61%	46%
Ependimoma e ependimoma anaplásico	92%	89%	86%

Dados obtidos da Sociedade Americana de Câncer (07/11/2017)

Os gliomas são tumores com sintomas incapacitantes e elevado número de óbitos. Os tratamentos são pouco efetivos e de alta complexidade e geralmente envolvem: ressecção cirúrgica, sessões de quimioterapia e radioterapia. Embora o tratamento possa prolongar a vida do paciente, a maioria destes tumores não é curável. Algumas drogas não conseguem atingir o tumor devido a barreira hematoencefálica, que impede que determinados medicamentos cheguem ao cérebro. Por esse motivo, os quimioterápicos são constantemente utilizados em conjunto com a radioterapia ou após o tratamento radioterápico (Wood et al., 2019).

Mesmo com os avanços tecnológicos e farmacológicos, as taxas de sobrevida são baixas, e a necessidade de maiores estudos e novas terapias se tornam imprescindíveis (Gasparini et al.2013).

1.2 Astrocitomas

Os astrocitomas desenvolvem-se a partir dos astrócitos e são classificados de acordo com sua malignidade. Os astrocitomas são os gliomas mais prevalentes, representando aproximadamente 60% dos tumores primários do SNC (Louis et al.,2007).

Segundo a classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) de 2006, os astrocitomas são divididos em quatro graus de acordo com a presença dos seguintes indicadores morfológicos: atipia nuclear, mitoses, proliferação endotelial e necrose

(Louis *et al.*, 2007). Desta forma, a graduação de malignidade tumoral era baseada principalmente na histologia, de acordo com a presença e número de indicadores:

- Astrocitoma grau I ou pilocítico: sem nenhum dos indicadores;
- Astrocitoma grau II ou difuso: um indicador de malignidade, geralmente atipia nuclear;
- Astrocitoma grau III ou anaplásico: dois indicadores, geralmente atipia nuclear e mitoses;
- Astrocitoma grau IV ou glioblastoma (GBM): três ou quatro indicadores, atipia nuclear, mitoses, proliferação endotelial e/ou necrose.

Adicionalmente, os astrocitomas de grau II a IV são denominados astrocitomas difusamente infiltrativos pela característica de invadir o tecido cerebral normal circunjacente (Louis *et al.*, 2007).

Em 2016 foi proposta uma nova classificação pela OMS, na qual foram incorporadas alterações moleculares para um diagnóstico integrado. Resultados de mutação nos genes *IDH1* e *IDH2* (ou simplesmente *IDH*), além de mutações em outros genes, como *ATRX* e *TP53*, além de perda de braços de cromossomos (1p e 19q) foram utilizados para esta nova subdivisão dos gliomas (astrocitomas e oligodendrogliomas) (Louis *et al.*, 2016).

1.2.1 *Astrocitomas pilocíticos*

Os astrocitomas pilocíticos são classificados como grau I, na escala de malignidade proposta pela OMS em 2006, e apresentam em geral crescimento lento e circunscrito, encapsulados, formando um cisto que não infiltra o tecido normal. Essa é a diferença principal em relação aos demais astrocitomas (graus II a IV), denominados difusos. Astrocitomas pilocíticos tem melhor prognóstico do que os outros astrocitomas, por serem lesões de baixo grau. A recorrência do tumor ou progressão para malignidade é incomum e metástases são raramente relatadas (Frave *et al.*, 1993; Aminoff *et al.*, 2010).

Os dados moleculares apontam para um papel importante do oncogene *BRAF* na patogênese dos astrocitomas pilocíticos. A ativação constitutiva desse gene, causada pela fusão com *KIAA1549*, leva à ativação da via de sinalização MAPK (proteína quinase induzida por mitógeno), importante para a regulação de vários

processos, como transformação e proliferação celular (Reis and Tihan., 2015, Marranci et al.,2017).

Outra característica molecular dos astrocitomas grau I é mutação somática de *NF1*, um gene supressor de tumor associado à síndrome familiar neurofibromatose tipo I. *NF1* codifica uma proteína denominada neurofibrimina, que regula negativamente o oncogene RAS. Quando RAS é ativado leva a via de sinalização de mTOR (mammalian target of rapamycin) e de diversos fatores de transcrição relacionados principalmente a proliferação (Gutmann *et al.*, 2013).

1.2.2 Astrocitomas difusos e anaplásicos

Os astrocitomas grau II (difusos) e III (anaplásicos) representam de 10 a 15% de todos os tumores astrocíticos, predominando em homens entre os 30 e 40 anos. Diferente dos astrocitomas pilocíticos, difundem-se pelo tecido cerebral normal, dificultando sua completa ressecção cirúrgica (Ichimura et al.,2015).

Os astrocitomas difusos são tumores heterogêneos, geralmente pouco delimitados e com crescimento lento, que acometem normalmente pacientes mais jovens, com melhor prognóstico de sobrevida que aqueles com astrocitoma grau III (Reuss et al., 2016). O astrocitoma anaplásico, por sua vez, é um tumor com altas taxas de atividade mitótica e núcleo atípico. (Grimm and Chamberlain., 2016). Ambos possuem a capacidade de evoluir para um tumor de maior grau de malignidade.

Os astrocitomas difusos e anaplásicos podem ser divididos em subgrupos com base em seu perfil molecular e genético, incluindo principalmente o status de mutação de *IDH*. Também são consideradas mutações de *ATRX* e *TP53* para diferenciar astrocitomas de oligodendrogliomas. Essas mutações são comuns em astrocitomas (70-80%) e conferem um melhor prognóstico nos pacientes com astrocitoma anaplásico. Embora mutações de *IDH* não sejam exclusivos de astrocitomas, podendo ser também encontrados em oligodendrogliomas, mutações de *TP53* e *ATRX* são característicos, sendo encontrados em cerca de 70% dos astrocitomas (Chai et al.,2019).

1.2.3 Glioblastoma

O GBM é o tumor de ocorrência frequente, constituindo cerca de 50 a 60% de todos os gliomas e de 12 a 15% dos tumores intracranianos em adultos, principalmente entre 45 e 70 anos (Lucena et al.2006).

O GBM é caracterizado por alta atividade mitótica, proliferação vascular e áreas de necrose. As células variam muito em seu formato (pleomórficas), e tamanho e são altamente invasivas, com capacidade de infiltrar o parênquima cerebral normal (Omuro and DeAngelis., 2013).

Existem dois tipos de GBMs, os primários e os secundários, que afetam pacientes de diferentes faixas etárias e se desenvolvem por diferentes mecanismos moleculares. Os GBMs primários representam quase 85% dos casos, acometem indivíduos geralmente acima dos 60 anos de idade e possuem o pior prognóstico devido ao seu rápido desenvolvimento sem evidências clínicas ou histológicas de um tumor anterior. Já os GBMs secundários originam-se da progressão de um glioma de menor grau, como astrocitoma difuso ou anaplásico, e geralmente acometem indivíduos mais jovens (Ichimura et al., 2015).

Atualmente o tratamento dos pacientes com GBM envolve cirurgia, radioterapia e quimioterapia, todas reconhecidas como medidas paliativas. Mesmo com ressecção cirúrgica completa do tumor, combinado com o melhor tratamento disponível, a sobrevida média continua ao redor de 12 a 15 meses (Galego,. 2015)

A nova classificação da OMS de 2016 separou os GBM em subgrupos de acordo com a presença ou não de mutações de *IDH*: GBM com *IDH* mutado e GBM com *IDH* selvagem (DeWitt et al.,2016 ; Louis et al., 2016).

Adicionalmente, o perfil de outras alterações moleculares, como perfil de expressão gênica, mutações de outros genes e alterações cromossômicas (deleções e ampliações), levou a outra classificação dos GBMs em subtipos moleculares: proneural, mesenquimal e clássico (Verhaak et al.,2010). GBMs do subtipo proneural são normalmente secundários e apresentam frequentemente mutações de *IDH* e *TP53* e amplificação de *PDGFRA*. Já o subtipo clássico é enriquecido com ampliações de *EFGR* e deleções de *CDKN2A*, enquanto que o mesenquimal apresenta alta frequência de mutações de *NF1*. Este último subtipo é o que apresenta pior prognóstico e resposta ao tratamento convencional (Verhaak et al.,2010).

Uma melhor compreensão da biologia dos GBMs é ainda necessária para um melhor entendimento do seu mecanismo molecular e o desenvolvimento de novas terapias. Este conhecimento auxiliará ainda a elucidar os mecanismos que estão direta ou indiretamente envolvidos em suas características malignas, como invasão, proliferação e angiogênese (Sattiraju and Mintz., 2019).

1.3 Análise de expressão gênica diferencial em astrocitomas

Com o objetivo de esclarecer e descobrir novos alvos terapêuticos, nosso grupo analisou amostras de GBM, astrocitoma pilocítico e tecido cerebral não-tumoral pela técnica de *microarray* e selecionou para estudo alguns dos genes hiperexpressos em GBMs em relação aos astrocitomas pilocíticos. Entre os 63 genes com expressão maior que duas vezes em GBMs em relação aos astrocitomas pilocíticos, foram encontrados genes relacionados com aumento da malignidade, invasão, proliferação celular e controle do ciclo celular. Entre estes estavam *MELK* (*maternal embryonic leucine zipper kinase*), com expressão 16,36 vezes maior em GBMs do que em astrocitomas pilocíticos (Marie et al., 2008). A inibição da expressão de *MELK* em células de GBM com siRNA levou a uma diminuição do crescimento independente de ancoragem (Marie et al., 2008). Além disto, a diminuição da expressão de *MELK* levou a uma concomitante diminuição da expressão de *STMN1*, gene que codifica estatimina 1, indicando uma possível via de sinalização comum das proteínas codificadas por estes dois genes (Marie et al., 2016).

Recentemente, *FOXM1*, que codifica um fator de transcrição, tem emergido como uma importante molécula envolvida na iniciação, desenvolvimento e progressão do câncer (Nandi et al., 2018). *FOXM1* e *STMN1* foram descritos em câncer de pulmão conferindo resistência ao tratamento com fármacos (Li et al, 2017). Além disto, *FOXM1* forma um complexo com *MELK* em células tronco de GBM, levando a regulação da proliferação (Joshi et al., 2013). Os níveis de expressão de *FOXM1* aumentaram conforme o aumento de malignidade dos astrocitomas, além de apresentar correlação positiva na expressão com *STMN1* e *MELK* em casuística do nosso laboratório e validada *in silico* com dados do TCGA (Serachi et al., 2017).

1.4 MELK

1.4.1 *Estrutura e função de MELK*

MELK codifica uma proteína membro da família de proteínas quinases AMP (AMPK) de serina/treonina quinases. A adição de grupos fosfatos por estas quinases resulta em diversas modificações funcionais das proteínas alvo, levando a alterações de sua atividade e localização ou associações com diversas outras proteínas (Novak., 2004).

Originalmente a alta expressão gênica e proteica de MELK foi descrita em tecidos embrionários, como córion, abdômen, cauda, olhos, nariz e em regiões de interações do tecido epitelial mesenquimal, sugerindo um papel fundamental de MELK na determinação do padrão desses tecidos e organogênese. MELK também está fortemente associado ao ciclo celular, pois fosforila proteínas fundamentais para a progressão do ciclo celular, como: CDC25B, CDK1, ciclina A, entre outras (Ganguly et al., 2014).

1.4.2 *MELK em tumores*

MELK é expressa em diversos tipos de câncer e populações de células tronco, podendo ser considerada um marcador de células progenitoras. Apresenta funções em vários outros processos celulares importantes em tumor, como: proliferação e ciclo celular, apoptose, migração, auto-renovação, recorrência e resistência ao tratamento (Jiang and Zhang., 2013).

A expressão de MELK é muito elevada em alguns tipos de tumores cerebrais, como GBMs, sendo associada às células tronco de gliomas (CTGs) (Liu et al., 2006) e associadas com a proliferação e malignidade (Marie et al., 2008; Nakano et al., 2008). MELK forma um complexo com FOXM1 nas CTGs, promovendo sua fosforilação e ativando FOXM1 e subsequentemente, aumentando expressão de genes que regulam a mitose (Joshi et al., 2013). FGFR1 é o receptor que ativa esta via, levando as CTGs a radiorresistência (Gouazé-Andersson et al., 2018). MELK ainda pode fosforilar EZH2 (*Enhancer of zeste homolog 2*) e c-JUN, que por sua vez promove a resistência das CTGs a quimio e radioterapia e recidiva (Joshi et al., 2015; Gu et al., 2013; Kim et al., 2015). Recentemente, Liu e colaboradores descreveram

que a fosforilação de EZH2 por MELK leva à interação com e metilação de NF- κ B, aumentando a capacidade de auto-renovação das CTGs (Liu et al., 2019). Desta forma, MELK ou as proteínas com quem fazem complexos ou fosforila são potenciais alvos terapêuticos para os GBMs.

Outros tumores do SNC também apresentam expressão alta de MELK, como os medulloblastomas e está também associada a células tronco tumorais (Marie et al., 2008; Nakano et al., 2008). MELK interage e fosforila EZH2 nestas células tronco de medulloblastomas, levando a uma auto-renovação, representando também potenciais candidatos a terapia (Liu et al, 2017).

Em neuroblastoma, a alta expressão de MELK é um fator de pior prognóstico, com menor sobrevida e maior (Guan et al., 2017; Chlenski et al., 2019). MELK é um alvo de MYCN e MYC, e tem como alvo de fosforilação a proteína RB (retinoblastoma) e EZH2 levando a uma maior proliferação e modulação do dano de DNA de células de neuroblastoma (Guan et al., 2017; Chlenski et al., 2019). MELK, portanto, é um bom candidato a inibição para terapia, por inibir o crescimento e sensibilizar as células a terapias adjuvantes de quimio e radioterapia.

Em câncer de mama, MELK também está hiperexpresso e se correlaciona com menor sobrevida das pacientes (Pickard et al., 2009) e do tipo triplo negativo (Komatsu et al., 2013; Speers et al., 2016). MELK fosforila Bcl-GL, um membro pró-apoptótico da família Bcl-2, inibindo a cascada apoptótica (Li et al., 2007). O aumento de expressão de MELK está principalmente nas células tronco tumorais que conferem radorresistência e recidiva local nas pacientes com câncer de mama triplo negativos (Speers et al., 2016; Simon et al., 2017). MELK está associado com a atividade mitótica de câncer de mama, explicando sua associação com um pior prognóstico (Giuliano et al, 2018). Recentemente, estudos de bioinformática independentes identificaram MELK como um dos genes chaves para o desenvolvimento e prognóstico de câncer de mama (Deng et al., 2019; Yang et al., 2019; Qiu et al., 2019).

A expressão de MELK também foi descrita em diversos outros tecidos tumorais, apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Tumores com aumento de expressão de MELK

Tipos de Tumores	Referências
Próstata	Jurmeister <i>et al.</i> , 2018 ; Kuner <i>et al.</i> , 2013
Cabeça e pescoço	Ren <i>et al.</i> , 2019
Colon	Gray <i>et al.</i> , 2005
Gástrico	Du <i>et al.</i> , 2013; Li <i>et al.</i> , 2016
Ovário	Kohler <i>et al.</i> 2017 ; Gray <i>et al.</i> , 2005
Fígado	Hiwatashi <i>et al.</i> , 2016
Adrenocortical	Kiseljak-Vassiliades <i>et al.</i> , 2018
Melanoma	Janostiak <i>et al.</i> , 2017
Pulmão	Inoue <i>et al.</i> , 2016
Leucemia	Alachkar <i>et al.</i> , 2014; Zhang <i>et al.</i> , 2018;
Mieloma	Bolomsky <i>et al.</i> , 2018
Útero - cérvix	Rajkumar <i>et al.</i> , 2011; Wang <i>et al.</i> , 2018

Com base nas várias evidências do papel relevante de MELK em diversos tipos de tumores e associação com o prognóstico dos pacientes, tem-se buscado drogas que possuam ação inibitória. Chung e colaboradores descreveram pela primeira vez o potente inibidor seletivo de MELK OTSSP167, que foi capaz de inibir o crescimento de células tumorais *in vitro* e *in vivo* (Chun *et al.*, 2012). Posteriormente outras drogas inibidoras de MELK foram descritas: a Siomycin A (Nakano *et al.*, 2011), o inibidor multi-quinase C1 (Minata *et al.*, 2014), MELK-T1 (Beke *et al.*, 2015), 5-keto-3-cyano-2,4-diaminothiophene (Boutard *et al.*, 2019) e IN17 (Harger *et al.*, 2019). Entretanto, o inibidor OTSSP167, ou OTS167, é o que apresenta estudos mais avançados de sua ação sobre MELK e vários estudos *in vitro*, pré-clínicos já publicados e clínicos em andamento.

Estudos *in vitro* mostraram que OTS167 levou a uma diminuição da fosforilação de FOXM1, com inibição da proliferação de células de câncer de pulmão de pequenas células (Inoue *et al.*, 2016), câncer renal (Kato *et al.* 2016), leucemia linfocítica crônica (Zhang *et al.*, 2018), mieloma (Bolomsku *et al.*, 2018), carcinoma adrenocortical (Kiseljak-Vassiliades *et al.* 2018), câncer de útero (Wang *et al.*, 2018), câncer de cabeça e pescoço (Ren *et al.*, 2019) e glioma de ponte (Meel *et al.*, 2018).

Particularmente em câncer de próstata, altos níveis de expressão de MELK estão associados com a progressão e agressividade tumoral. A inibição de MELK com siRNA ou o uso de OTS167 induziram células tumorais a apoptose, rearranjo do citoesqueleto e reparo de dano de DNA. Além disto, foi descrito que a inibição de MELK reduz a fosforilação de STMN1 através da diminuição de fosforilação, interferindo com a formação do fuso mitótico (Jurmeister *et al.*, 2018).

Um estudo pré-clínico em leucemia mieloide aguda mostrou que o tratamento com OTS167 levou à diminuição de crescimento tumoral, inibição da atividade de FOXM1 e indução da diferenciação celular e apoptose (Alachkar *et al.*, 2014). Em outro estudo pré-clínico de câncer de mama e pulmão, a inibição de MELK induziu a expressão de marcadores de diferenciação e reduziu a expressão de marcadores de células tronco (Chung *et al.*, 2016). OTS167 foi também utilizado em doença óssea de mieloma múltiplo, que teve efeito na diminuição da atividade de osteoclasto *in vitro*, e prevenção de lesões líticas e perda óssea *in vivo* (Muller *et al.*, 2018). Outro estudo em neuroblastoma mostrou que o tratamento com OTS167 levou a diminuição de expressão de EZH2 e sensibilização das células a agentes que causam dano de DNA. (Chlenski *et al.*, 2019).

1.5 STMN1

1.5.1 Estrutura e função de STMN1

STMN1, também conhecida como oncoproteína 18, é uma importante fosfoproteína citosólica que desempenha um papel crítico no processo de mitose através da regulação de dinâmica dos microtúbulos, além de participar de outros processos biológicos, como progressão do ciclo e migração celular (Rubin *et al.*, 2005).

STMN1 pertence a uma família de quatro membros com domínios altamente conservados de ligação às tubulinas. Os outros membros são STMN2 (SCG10), STMN3 (SCLIP) e STMN4 (RB3 e variantes RB3' e RB3''). A região N-terminal é onde se localizam os quatro resíduos de serina e sítios de fosforilação, designados como: S16, S25, S38 e S63, comuns a todos os membros da família (Yip *et al.*, 2014).

A regulação de STMN1 ocorre por esses sítios de fosforilação por diversas quinases. Com a fosforilação de suas quatro serinas, perde-se a afinidade com as moléculas de tubulinas, deixando-as livres para associação e formação dos microtúbulos (Biaoxue et al., 2016).

Tão importante quanto inativação de STMN1 pela fosforilação, é a desfosforilação (ativação), que ocorre pela ação de diferentes fosfatases incluindo: PP1, PP2A e PP2B. Após a desfosforilação, STMN1 retorna à sua forma ativa e recupera sua afinidade por tubulinas, retendo-as e desestabilizando os microtúbulos (desmontagem). Portanto, as quinases e as fosfatases desempenham um papel crucial na regulação da dinâmica dos microtúbulos durante diferentes processos celulares, como célula progressão do ciclo, polarização celular, migração e apoptose (Tournebize, 1997; Mistry et al.1998).

Desta forma, STMN1 desempenha um papel crucial na regulação do ciclo celular, pois a dinâmica dos microtúbulos é essencial durante a progressão das fases mitóticas (Brattsand et al.,1994). Quando as células entram na mitose, STMN1 é inicialmente inativado por fosforilação de S25 e S38, durante o estágio G1/S. A inativação total de STMN1 ocorre pela fosforilação sequencial de resíduos S16 e S63. Quando STMN1 é fosforilado em todos os quatro resíduos de serina, ocorre a polimerização de microtúbulos e montagem correta do fuso mitótico durante a transição G2/M (Brattsand *et al.*, 1994; Hayashi et al.,2006).

Quando a segregação cromossômica é completada, o fuso deve ser desmontado para permitir a saída adequada da mitose, e entrar em anáfase e telófase. A atividade de despolimerização de microtúbulos de STMN1 é restaurada por desfosforilação para desmontar o fuso mitótico (Tournebize et al., 1997; Mistry et al., 1998). Conseqüentemente, a regulação de STMN1 para cima ou para baixo resulta em anormalidades do fuso mitótico e acúmulo de células nas fases G2/M do ciclo celular (Lu et al.,2014).

A Figura 2 mostra como o ciclo celular depende da dinâmica e flexibilidade de montagem e desmontagem dos microtúbulos. STMN1 participa dessa dinâmica através de sua ativação (desfosforilação) e inativação (fosforilação).

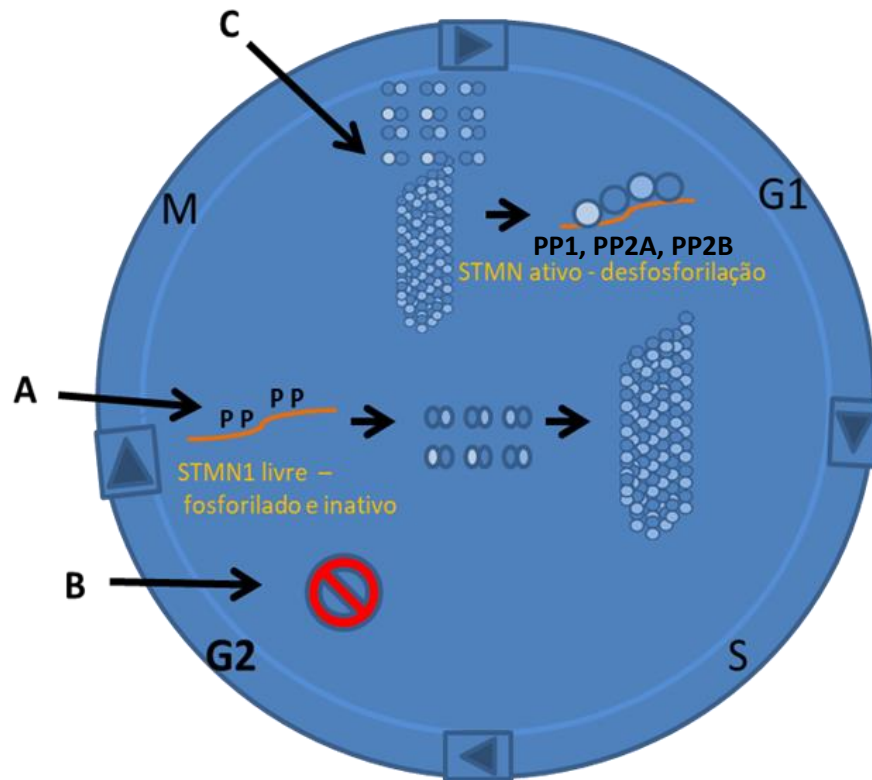


Figura 2 – Representação do papel de STMN1 durante o ciclo celular, mostrando sua importância na regulação de eventos-chave para a proliferação celular. (A) Quando a célula entra em mitose, ocorre a inativação de STMN1 com sua fosforilação, permitindo a associação de dímeros de tubulina e formação do fuso mitótico. (B) Se STMN1 não regula a dinâmica dos microtúbulos ou está ausente ao final da fase G2, ocorre a progressão do ciclo, levando à apoptose. (C) STMN1 é desfosforilado nos últimos estágios da mitose por diferentes fosfatases, incluindo PP1, PP2A e PP2B. STMN1 desfosforilado sequestra a tubulina, levando à dissociação dos microtúbulos. A despolimerização dos microtúbulos permite a montagem e desmontagem do fuso mitótico.

1.5.2 *STMN1* em tumores

Aumento da expressão de *STMN1* tem sido frequentemente relatado em câncer. Em 2010, Jeon e colaboradores demonstraram a correlação positiva entre a superexpressão de *STMN1* e ocorrência de metástase linfonodal, focos de migração e invasão vascular, com impacto negativo na sobrevida do tipo difuso de carcinoma gástrico (Jeon et al.,2010). O mesmo grupo demonstrou o papel oncogênico da *STMN1* pela diminuição da taxa de proliferação, migração e invasão de células do câncer gástrico *in vitro* pela inibição da *STMN1*. Desse modo, a *STMN1* tem sido considerada uma oncoproteína reguladora mitótica que modula a estabilidade dos microtúbulos.

A expressão de *STMN1* está aumentada em várias neoplasias humanas (Tabela 3).

Tabela 3 – Tumores com aumento de expressão de *STMN1*

Tipos de Tumores	Referências
Câncer de ovários	Wei et al., 2008
Hepatocelulares	Yuan et al., 2006; Chen et al., 2013
Gástricos	Jeon et al.,2016; Ke et al., 2003
Próstata	Kuner et al., 2013
Mama	Bieche et al., 1998 ; Curmi et al., 2000
Útero - cervix	Xi et al., 2009 Wang et al., 2018
Cabeça e pescoço	Koike et al, 2005; Kouza et al., 2006; Hsu et al., 2014
Esôfago	Akhtar et al., 2014; Wang et al., 2014
Pulmão	Rong et al., 2017; Sun et al.,2015; Nie et al., 2015
Bexiga	Hemdan et al., 2014
Colorretal	Tan et al., 2012; Ogino et al., 2009
Pâncreas	Watanabe et al., 2017
Câncer de endométrio	Reyes et al.,2017; He et al., 2016
Glioblastomas	Marie et al.,2016
Meduloblastoma	Neben et al.,2014; Kuo et al., 2009
Leucemia aguda	Roos et al., 1993

O aumento da expressão e / ou da atividade de STMN1 (estado de fosforilação) foi correlacionado com invasão e metástase, estágio de progressão tumoral, grau de tumor, e resistência a medicamentos em vários tipos de malignidades, como colorretal, pulmão e pâncreas (Belletti and Baldassarre., 2011). STMN1 também vem sendo correlacionado ao aumento de resistência a diversos fármacos, em especial drogas da família dos taxanos e alcaloides da vinca, devido seu envolvimento direto na inibição da polimerização dos microtúbulos. Em pacientes com câncer de próstata metastático, STMN1 desempenha um importante papel através da ativação da via PI3K / AKT na metástase e resistência ao tratamento com taxano (Aksoy et al.,2017). Alta expressão de STMN1 também está correlacionada a uma baixa resposta e à resistência ao paclitaxel em câncer de pulmão (Sun et al., 2015; Bao et al., 2017), gástrico (Bai et al.,2017) e de cólon retal (Zhao et al.,2019). Em carcinoma de esôfago, a alta expressão de STMN1 foi associada a uma baixa resposta ao tratamento com docetaxel (Suzuki et al., 2017).

Recentemente dois estudos independentes analisaram a sobrevida de 5335 e 4625 pacientes e demonstraram a associação entre a alta expressão de STMN1 com uma pior sobrevida e mau prognóstico em câncer de ovário, pulmão, nasofaringe, fígado, esôfago, colorretal e de mama. A expressão desta proteína pode ser um fator prognóstico de utilidade clínica, usado como biomarcador em tumores sólidos (Mao et al.,2018; Zhang et al.,2019). O aumento da expressão de STMN1 é um potencial biomarcador para prognóstico de câncer gástrico e pode ser usado como parâmetro na escolha do tratamento quimioterápico, principalmente o uso de taxanos, como docetaxel (Cao et al., 2017).

Células de câncer de próstata tratadas com o inibidor de MELK, OTS167, ou transfectadas com siRNA de MELK, apresentaram diminuição da fosforilação dos resíduos S16 e S38, com formação anormal do fuso mitótico e, conseqüentemente, morte celular por apoptose. Entretanto, não se sabe ainda se STMN1 é um substrato direto de MELK (Jurmeister *et al.*, 2018).

Em um modelo de GBM em camundongos, STMN1 foi regulado pelo receptor α do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR α). A ativação do PDGFR α levou a uma redução na atividade de Cdk1, importante quinase conhecida por fosforilar STMN1. (Jun et al.,2018).

1.6 FOXM1

1.6.1 Estrutura e função de FOXM1

FOXM1 é um fator de transcrição da superfamília de proteínas Forkhead box (Fox) e regula a atividade de genes necessários para uma divisão celular eficiente. Os fatores de transcrição “em garfos” (devido ao seu aspecto físico) constituem uma família de fatores de transcrição evolutivamente conservados que compartilham uma sequência preservada de aminoácidos, conhecida como domínio de ligação ao DNA de hélice alada ou domínio *fork head* (FKH). FOXM1 foi identificada inicialmente em células de câncer cervical HeLa (Westendorf et al., 1994)

FOXM1 apresenta um pico no aumento de expressão nas fases G1/S e G2/M após a ativação pela *Polo like kinase-1* (PLK1), que o sinaliza para a fosforilação subsequente pela ciclina dependente de quinase 1 (CDK1), ciclina E-CDK e Raf MEK-ERK, promovendo a entrada na fase S e M pela ativação de ciclina A / CDK2, ciclina B1, ciclina A, aurora quinase B, survivina, PLK1, CDC25B e dificultando os inibidores de CDK, p21 e p27 (Laoukili et al., 2007).

FOXM1 também desempenha um papel crucial na segregação cromossômica e montagem do fuso mitótico durante a mitose pela modulação da expressão de proteínas centroméricas, como CENPA, CENPB e CENPF, como é evidente a partir de defeitos nestas funções em resposta à deficiência de FOXM1 (Yoshida et al., 2007).

FOXM1, por ser um fator de transcrição associado à proliferação, está expresso em células progenitoras e tecidos em regeneração, bem como em tumores (Nadi et al., 2018).

1.6.2 FOXM1 em tumores

FOXM1 é superexpresso em vários tipos de câncer, sendo considerado um regulador chave da tumorigênese e metástase, pois tem sido relacionado a proliferação, metástase e mau prognóstico, além de aumento de resistência a drogas (Bach et al., 2018). Por esse motivo é considerado um oncogene, por ser capaz de transcrever genes-alvos específicos relacionados às diferentes fases do desenvolvimento tumoral (Joshi et al., 2013; Chandran et al., 2007; Xie et al., 2017; Gartel, 2017).

O aumento de expressão de FOXM1 foi descrito em neoplasias da mama, cabeça e pescoço, pâncreas, pulmão, gástrico, tireoide, rim, fígado, esôfago, entre outros (Laoukili et al., 2007; Liao et al., 2018). Altas expressões em glioblastomas (Liu et al., 2006), leucemia mieloide aguda (Nakamura et al., 2010) e carcinoma de células basais (Teh et al., 2002) se correlacionaram com pior prognóstico e menor sobrevida dos pacientes. Dados do TCGA mostraram que esta relação de expressão de FOXM1 com sobrevida é válida para outros tipos de tumores, como gliomas de baixo grau, adenocarcinoma de pulmão e de colon, carcinoma adrenocortical e renal, melanoma, entre outros (Li et al., Liao et al., 2018).

A inibição de FOXM1 em células tumorais levou a uma diminuição da proliferação, migração, metástase, angiogênese, transição epitélio-mesênquima e resistência à droga (Zhong et al., 2017; Zhang et al., 2017; Wang et al., 2016; Yu et al., 2015; Jiang et al., 2014). Estes dados confirmam o importante e fundamental papel que FOXM1, sendo, portanto, um potencial alvo terapêutico para o tratamento de diversos tipos de tumores.

Em GSCs, MELK aumenta a atividade de FOXM1 através de interação com sua extremidade N-terminal e promovendo sua fosforilação por PLK1 (Joshi et al., 2013; Gouazé-Andersson et al., 2018). FOXM1, então, promove a progressão do processo mitótico, aumentando a proliferação. Em carcinoma de mama do tipo basal, os altos níveis de expressão de MELK estão diretamente correlacionados com o de FOXM1 (Wang et al., 2014). Nos estudos do efeito de inibidores de MELK em diversas linhagens celulares de tumores, FOXM1 é uma das proteínas analisadas cuja atividade ou fosforilação estão diminuídas (Alachkar et al., 2014; Zhang et al., 2018).

FOXM1 pode ainda regular diretamente a expressão de *STMN1*. Em câncer gástrico e células resistentes a docetaxel, os níveis de expressão de FOXM1 e *STMN1* estão correlacionados (Li et al., 2014). Em câncer de pulmão, inibidores de tirosina quinases induziram o enriquecimento de células tronco tumorais, promoveram a transição epitélio-mesênquima e conferiram resistência a drogas através da ativação da via AKT / FOXM1 / *STMN1* (Li et al., 2017).

1.5 Justificativa do estudo

MELK, STMN1 e FOXM1 estão envolvidos em diversos tipos de tumores, além de estarem relacionados com o prognóstico dos pacientes e resistência a radio e quimioterapia. Embora haja trabalhos mostrando relação entre FOXM1 e MELK e FOXM1 e STMN1, o trabalho do nosso grupo foi o único a mostrar uma correlação entre a expressão de MELK e STMN1. Além disto, não foi ainda abordado o papel destes três genes juntos em câncer e na resistência a drogas. Desta forma, o presente trabalho visa estudar estes potenciais alvos terapêuticos em astrocitomas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar a expressão de *MELK*, *STMN1* e *FOXM1* em astrocitomas.

2.2 Objetivos específicos

1. Analisar os níveis de expressão dos genes *MELK*, *STMN1* e *FOXM1* em astrocitomas de diferentes graus de malignidade e nos subtipos moleculares de GBM.
2. Correlacionar dos níveis de expressão *MELK*, *STMN1* e *FOXM1* em casos de GBM.
3. Realizar o silenciamento da expressão de *MELK* e *STMN1* em linhagens celulares de GBM humano U87MG e A172 e avaliar o efeito na expressão de *MELK*, *STMN1* e *FOXM1*;
4. Observar as alterações nas fosforilações das serinas de *STMN1* quando *MELK* é silenciado.
5. Analisar as expressões de *STMN1* e *FOXM1* em GBMs e a influência na sobrevida dos pacientes.
6. Analisar a expressão de *MELK*, *STMN1* e *FOXM1* em células de GBM resistentes a drogas (temozolamida e vincristina).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Casuística

As amostras de astrocitomas de diferentes graus e de tecido cerebral não neoplásico foram coletadas durante o procedimento cirúrgico e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido após ressecção pelo grupo de Tumores Encefálicos e Metástases da Divisão de Clínica Neurocirúrgica do Departamento de Neurologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP). A casuística deste projeto consiste de: 22 tecidos controles não neoplásicos, 23 astrocitomas pilocíticos (grau I), 26 astrocitomas de baixo grau (grau II), 18 astrocitomas anaplásico (grau III) e 100 GBMs (grau IV).

As amostras de tecido não neoplásico foram coletadas do lobo temporal de paciente com epilepsia durante procedimento cirúrgico realizado pelo grupo de Epilepsia. Todos os tecidos a serem utilizados no presente estudo possuem confirmação histopatológica da Divisão de Anatomia Patológica do HC-FMUSP, de acordo com a classificação da OMS, e fazem parte do biorrepositório de amostras coletadas durante o Projeto Genoma Clínico, aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do HC-FMUSP, sob o número de protocolo 830/01. Os consentimentos pós-informados foram obtidos de todos os pacientes com tumor e epilepsia ou seus responsáveis legais. Todos os tecidos a serem utilizados no presente estudo possuem confirmação histopatológica da Divisão de Anatomia Patológica do HC-FMUSP, de acordo com a classificação da OMS, e fazem parte do biorrepositório de amostras coletadas durante o Projeto Genoma Clínico, aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP 3317, parecer 373/2002) e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) sob o número de protocolo 830/01, com financiamento da FAPESP e do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer (processos FAPESP #01/12898-4, 04/12133-6, 13/06315-3 e 13/07704-3), durante o período de 2000 a 2008.

3.2 Linhagens celulares

As linhagens comerciais estabelecidas de GBM humano, U87MG e A172, foram escolhidas por apresentarem diferentes expressões dos genes alvos. As linhagens foram adquiridas da ATCC (*American Type Culture Collection*) cultivadas na forma de monocamada e mantidas em meio DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos (100 unidades/mL de penicilina, 100 μ /mL de estreptomicina) (Thermo Fisher Scientific). As células foram mantidas em incubadora a 37°C com 5% de CO₂. Quando necessário, foram desagregadas com tripsina/EDTA, centrifugadas e ressuspensas em meio DMEM. O contador automático Countess (Thermo Fisher Scientific) foi utilizado para quantificar e determinar a viabilidade celular pelo método de exclusão por azul de Tripán.

3.2.1 Linhagens resistentes

As células foram produzidas pela aluna Janaina Silva, sob orientação da Profa. Dra. Alison Colquhoun, responsável pelo laboratório de metabolismo da célula tumoral, localizado no Instituto de Ciências Biomédicas, e cedida para análise de expressão gênica. As células foram submetidas a concentrações crescentes de vincristina (VCR) e temozolomida (TMZ), foram cedidas para análise de expressão gênica. Ao final dos tratamentos foram obtidas linhagens resistentes de U87MG a 0,4nM para VCR e 25 μ M para TMZ, após 10 e 14 semanas respectivamente. Para a linhagem T98G foram estabelecidas as células resistentes a 5nM para VCR e 112,5 μ M para TMZ, após 10 semanas para ambos os quimioterápicos. As células foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂, sendo o meio de cultura trocado a cada dois dias contendo as diferentes concentrações de quimioterápicos estabelecidas para manutenção do perfil de resistência.

3.3 Análise da expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real

3.3.1 Extração do RNA total

Para extração do RNA total de culturas de células, as células foram lisadas em tampão do RNeasy Mini Kit (Qiagen). A qualidade dos RNAs extraídos foi avaliada

através de eletroforese em gel desnaturante de agarose, e as concentrações e pureza das mesmas foram determinadas através de leitura em espectrofotômetro por leitura a 260 e 280 nm. Razões A260/A280 maiores que 1,8 foram consideradas de pureza satisfatória. As amostras foram estocadas a -80°C até sua utilização para a síntese de DNA complementar (cDNA).

3.3.2 Síntese do DNA complementar

A síntese de cDNA foi realizada utilizando-se 1µg de RNA total por transcrição reversa com Superscript III (Thermo Fisher Scientific) utilizando oligodT e/ou *random primers*, seguindo-se o protocolo recomendado pelo fabricante (Thermo Fisher Scientific). Foi realizada, inicialmente, uma digestão com Dnase, para eliminar qualquer contaminação com DNA genômico, e, no final, uma digestão com RNase H, para degradar as fitas simples de RNA. O cDNA foi diluído em TE (Tris/EDTA) e utilizado para as reações de análise de expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real.

3.3.3 PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

Todos os ensaios foram feitos em duplicata em uma mistura de volume final 12µL, contendo 3µL de fita molde (cDNA), 6µL de Power SYBR Green I Master Mix (Thermo Fisher Scientific) e 3µL de par de primers em uma concentração otimizada. As concentrações mínimas de *primers* foram determinadas pelo *cycle threshold* (Ct) mais baixo e eficiência de amplificação máxima, minimizando amplificação não específica. A amplificação de produto único foi confirmada através da análise de curvas de dissociação.

Para todos os genes foram feitas curvas padrão com uma amostra de cDNA de *pool* de linhagens de GBM, com diluição seriada em cinco concentrações variando de 1/10 a 1/150. O cálculo de eficiência de amplificação foi baseado no *slope* obtido, pela fórmula $E = (10^{-1/\text{slope}}) - 1$. As reações de PCR foram incubadas inicialmente a 50°C por 2 minutos, para ativação da uracil N-glicosilase, seguida de denaturação a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos. Para todas as reações foi realizada uma etapa final de curva de dissociação.

Os primers de MELK, STMN1, HPRT, GUSB e TBP já foram previamente otimizados e utilizados pelo nosso grupo (Marie et al.,2016). Já o primer de FOXM1 foi desenhado e otimizado neste projeto, seguindo o mesmo padrão de otimização. A Tabela 1 mostra a informações dos *primers*, como sequências, concentrações e tamanho dos produtos de PCR.

A seleção dos genes controles ou de referência endógena foi realizada segundo os critérios que incluem: níveis de expressão semelhantes em diferentes tipos celulares, ausência de comprometimento do gene com ciclo celular ou ativação celular e estabilidade comparável aos demais genes do estudo. Os dados quantitativos referentes à análise de expressão na casuística foram normalizados relativamente à média geométrica de três genes endógenos: *HPRT* (*hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase*), *TBP* (*TATA-box binding protein*) e *GUSB* (beta glucuronidase), conforme descritos por Valente *et al.* As reações foram realizadas no aparelho *ABI Prism 7500 Real-Time PCR System* (Thermo Fisher Scientific) pelo método de incorporação de *Sybr Green* (Thermo Fisher Scientific).

As condições da reação foram: 2min a 50°C para ativação da uracil N-glicosilase, 10min de ativação da DNA polimerase a 95°C, seguido de 40 ciclos de 15s de desnaturação a 95°C e 1min de pareamento e extensão a 60°C, realizado em um aparelho ABI Prism 7500 (Thermo Fisher Scientific).

As eficiências de amplificação (E) foram calculadas [$E = 10^{(-1/\text{slope}) - 1}$] utilizando-se diluições seriadas de cDNA. A equação $2^{-\Delta Ct}$ foi aplicada no cálculo da expressão relativa gênica para $E = 100 \pm 10\%$, onde $\Delta Ct = [\text{média Ct gene}] - [\text{média geométrica do Ct dos três genes normalizadores (HPRT, GUSB e TBP)}]$. As expressões gênicas das linhagens celulares foi utilizada $2^{-\Delta\Delta Ct}$, sendo que $\Delta\Delta Ct = [(\Delta Ct \text{ da célula silenciada}) - (\Delta Ct \text{ da célula controle})]$. (Livak and Schmittgen, 2001).

Tabela 4 – Sequências e concentração de *primers* usados para PCR em tempo real e tamanho dos produtos.

<i>Primers</i>	Sequências (5´- 3´)	Concentração (nM)	Tamanho (pb)
<i>MELK sense</i>	AAACCCAAGGGTAACAAGGA	400	130
<i>MELK antisense</i>	ACAGTATGCCCATGCTCCAA		
<i>STMN1 sense</i>	TGTCGCTTGTCTTCTATTACCCAT	200	110
<i>STMN1 antisense</i>	CTTTTGACCGAGGGCTGAGA		
<i>FOXM1 sense</i>	TTCCAGGATCACACCAAGCTC	200	113
<i>FOXM1 antisense</i>	TGCAGCAGCCGTACTIONCA		
<i>HPRT sense</i>	TGAGGATTTGGAAAGGGTGT	400	118
<i>HPRT anti sense</i>	GAGCACACAGAGGGCTACAA		
<i>GUSB sense</i>	GAAAATACGTGGTTGGAGAGCTCATT	400	101
<i>GUSB anti sense</i>	CCGAGTGAAGATCCCCTTTTTA		
<i>TBP sense</i>	AGGATAAGAGAGCCACGAACCA	200	98
<i>TBP anti sense</i>	CTTGCTGCCAGTCTGGACTGT		

3.4 Silenciamento gênico por RNA de interferência

A análise de função de MELK e STMN1 foi realizada através de silenciamento de sua expressão RNA pequeno de interferência (siRNA) nas linhagens GBM humano U87MG e A172. A transfecção para silenciamento gênico transitório foi realizada com Lipofectamina RNAiMax (Thermo Fisher Scientific), diluída em meio de cultura Optimen (Thermo Fisher Scientific). As sequências utilizadas para siRNA MELK (GUAUAAAGCCAUUACAUAUCAUCAUC) e siRNA STMN1 (UACUAAGUGCUGUCCACUAAUAUGCAC) foram sintetizadas pela IDT (Integrated DNA Technologies). Após 24h, o meio foi trocado por DMEM com 10% SFB. Como controle experimental, foi realizada transfecção com um oligonucleotídeo sem homologia com genes humanos (*non-targeting control* – NTC). A concentração final de oligonucleotídeos utilizada foi de 10nM para MELK e 1nM para STMN1. Uma vez concluído cada experimento, foi realizada extração de RNA. O silenciamento por siRNA foi realizado no trabalho anterior do laboratório (Marie et al, 2016). A eficiência do silenciamento foi determinada pelo nível de redução da expressão gênica e

proteica de STMN1 e MELK nas linhagens silenciadas em comparação ao controle NTC por qRT-PCR por 2, 4 e 7 dias após transfecção.

3.5 Expressão da proteína por Western blot

A lise das células foi realizada com tampão ureia/Chaps e coquetel de inibidores de proteases (Sigma-Aldrich), além de inibidores de fosfatases (Sigma-Aldrich) para análises de MELK e STMN1. A concentração de proteína celular foi determinada em duplicata pelo método de Bradford (Bio Rad Protein Assay), utilizando uma curva padrão de albumina bovina.

Amostras contendo 20µg de proteínas foram submetidas à eletroforese em gel de poli-acrilamida com gradiente 4-12% (Thermo Fisher Scientific) em tampão de eletroforese 1x NuPAGE MOPS SDS 20x (Thermo Fisher Scientific). As bandas proteicas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose através do sistema iBLOT (iBlot® Dry Blotting System, Thermo Fisher Scientific). Foi então realizada incubação com os anticorpos primários contra as proteínas alvos e anti-β-actina (clone AC-74, Sigma-Aldrich) monoclonal de camundongo na diluição 1:20.000 como controle de quantidade de proteína total aplicada no gel. O anticorpo secundário utilizado foi anti-IgG de camundongo e/ou de coelho conjugados com peroxidase na diluição de 1:1000 (Sigma-Aldrich). As informações dos anticorpos primários e os controles positivos estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Informações sobre os anticorpos utilizados para Western blot

Proteína	Especificidade	Fabricante	Controle positivo	Diluição
STMN1	Policlonal de coelho	Abcam	Carcinoma de mama	1:5000
STMN1-S16	Policlonal de coelho	Abcam	Carcinoma de mama	1:1000
STMN1- S25	Policlonal de coelho	Abcam	Carcinoma de mama	1:1000
STMN1-S38	Policlonal de coelho	Abcam	Carcinoma de mama	1:1000
STMN1-S63	Monoclonal de coelho	Abcam	Cérebro	1:1000
MELK	Policlonal de coelho	Sigma-Aldrich	Carcinoma de mama	1:2000
β-actina	Monoclonal de camundongo	Sigma-Aldrich	Carcinoma de mama	1:20.000

A revelação da membrana foi realizada através de um sistema de detecção de quimioluminescência utilizando reagente ECL (Western Lightning Chemiluminescence

Reagent Plus, Perkin Elmer) no aparelho ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare). Para quantificação das bandas de western blotting foi utilizado o programa ImageJ Fiji, com a equação: densidade integrada/área. (Abramoff 2004).

3.6 Ensaio de viabilidade celular

O ensaio de proliferação foi realizado com o reagente Prestoblue (Thermo Fisher Scientific). A linhagem U87MG com seu respectivo controle, foram semeadas na quantidade de $1,5 \times 10^4$ células/poço em 200 μ L de DMEM com 10% de SFB em uma placa de 96 poços em sextuplicatas. As células foram incubadas em estufa a 37°C nos tempos 0 (2 horas – tempo mínimo para as células aderirem), 2, 4 e 7 dias. Nos tempos determinados o meio foi substituído por uma mistura de DMEM contendo 10% do PrestoBlue, em volume final de 100 μ L em cada poço e a placa incubada na estufa por 2 horas. Em seguida a leitura foi realizada no equipamento GloMax (Promega) a 535 nm de excitação e 560 nm de emissão. Os valores da fluorescência são diretamente proporcionais à quantidade de células viáveis que estão viáveis no poço.

3.7 Ensaio de ferida em monocamada

A influência de STMN1 na migração na linhagem U87MG silenciada por RNAi foi investigada *in vitro* por meio de um ensaio de ferida em monocamada. Um total de 2×10^5 células/poço das células silenciadas e seus respectivos controles (NTC) foram cultivados em placas de 24 poços com meio DMEM suplementado com 10% de SFB, até atingirem a confluência de monocamada. O meio de cultura foi removido e com auxílio de uma ponteira de micropipeta de 200 μ L foi realizada uma descontinuidade na monocamada, criando uma área livre de células (“ferida”). Os poços foram lavados com PBS para a remoção das células não aderidas. Em seguida, foi adicionado meio de cultura com 1% de SFB, para diminuir a proliferação celular. O fechamento das “feridas” foi registrado em diferentes tempos (0, 24, 48 e 72 horas), em dois ensaios independentes. Pontos de referência foram demarcados no fundo de cada poço da placa para localizar os campos correspondentes às áreas livres de células analisadas para aquisição de imagens nos diferentes intervalos de tempo. Cada ensaio foi realizado em duplicatas e foram fotografados 3 campos diferentes de cada poço.

As áreas livres de células foram inicialmente calculadas como porcentagem da área livre de células no tempo 0 e arbitrariamente marcada como 100%. Em seguida a porcentagem de área livre foi calculada pelo Image J. A porcentagem de área invadida nos diferentes tempos foi determinada pela diferença da área no tempo zero (100%) menos a área livre.

3.8 Análise de expressão gênica

Para as análises estatísticas, foram utilizados os dados do laboratório e para validação utilizamos o banco de dados de RNAseq do TCGA obtidos do Genomics Data Commons (<https://gdc.cancer.gov/>), casuística de 63 casos de astrocitoma grau II, 129 de astrocitoma grau III e 165 de GBMs. A expressão gênica foi também analisada nos subtipos moleculares de GBM. Os dados brutos foram baixados e normalizados pelo DESeq (Anders and Huber, 2010).

3.9 Análises estatísticas

Os testes de Mann Whitney foram realizados para comparar os níveis de expressão de *MELK*, *STMN1* e *FOXM1* entre amostras de diferentes graus de astrocitomas e NN. As diferenças de expressão gênica entre diferentes grupos (astrocitomas de diferentes graus de malignidade e subtipos moleculares de GBM) foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn. As correlações de coexpressão foram feitas através do teste não paramétrica de *Spearman*, determinadas previamente pelo teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e pela distribuição de *Kurtosis*. Teste de Bonferroni foi utilizado para avaliar as diferenças entre a expressão gênica de células resistentes em relação ao controle. No ensaio de ferida em monocamada e no ensaio de viabilidade celular os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significantes das células silenciadas em relação ao controle. Foi realizada análise de variância ANOVA, seguida de teste Bonferoni. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Os programas *SPSS 20* (IBM) e *GraphPad Prism* foram utilizados para as análises e elaboração dos gráficos.

Para o cálculo de sobrevida foi utilizado o método de Kaplan-Meier que permite estimar a probabilidade de sobrevida em vários intervalos de tempo e para ilustrar graficamente a sobrevida ao longo de determinado período. O teste de log-rank é um

teste não paramétrico utilizado na comparação de curvas de sobrevida entre dois ou mais grupos (Glantz., 2011).

4 Resultados

4.1 Análise de expressão de *MELK*, *STMN1* e *FOXM1* em astrocitomas de diferentes graus de malignidade

A avaliação dos níveis expressão de RNA mensageiro de *MELK*, *STMN1* e *FOXM1* foi realizada por qRT-PCR em astrocitomas de diferentes graus de malignidade e tecidos cerebral não tumoral (Figura 3). É possível observar o aumento da expressão gênica conforme o aumento da malignidade dos astrocitomas. A diferença entre os grupos é significativa em todos os genes, segundo análise de Kruskal-Wallis: $p < 0,001$ para *MELK* e *FOXM1* e $p < 0,0001$ para *STMN1*.

Estes dados de expressão foram validados *in silico* com dados de transcriptoma de amostras de astrocitomas grau II, III e GBM do TCGA (Figura 4). Os três grupos apresentaram diferenças significativas para *MELK* e *FOXM1* ($p < 0,0001$) segundo análise de Kruskal-Wallis. Os níveis de expressão de *STMN1* não é diferente para *STMN1*, porém é importante ressaltar que não há diferença entre estes três grupos na casuística do nosso grupo (Figura 3B).

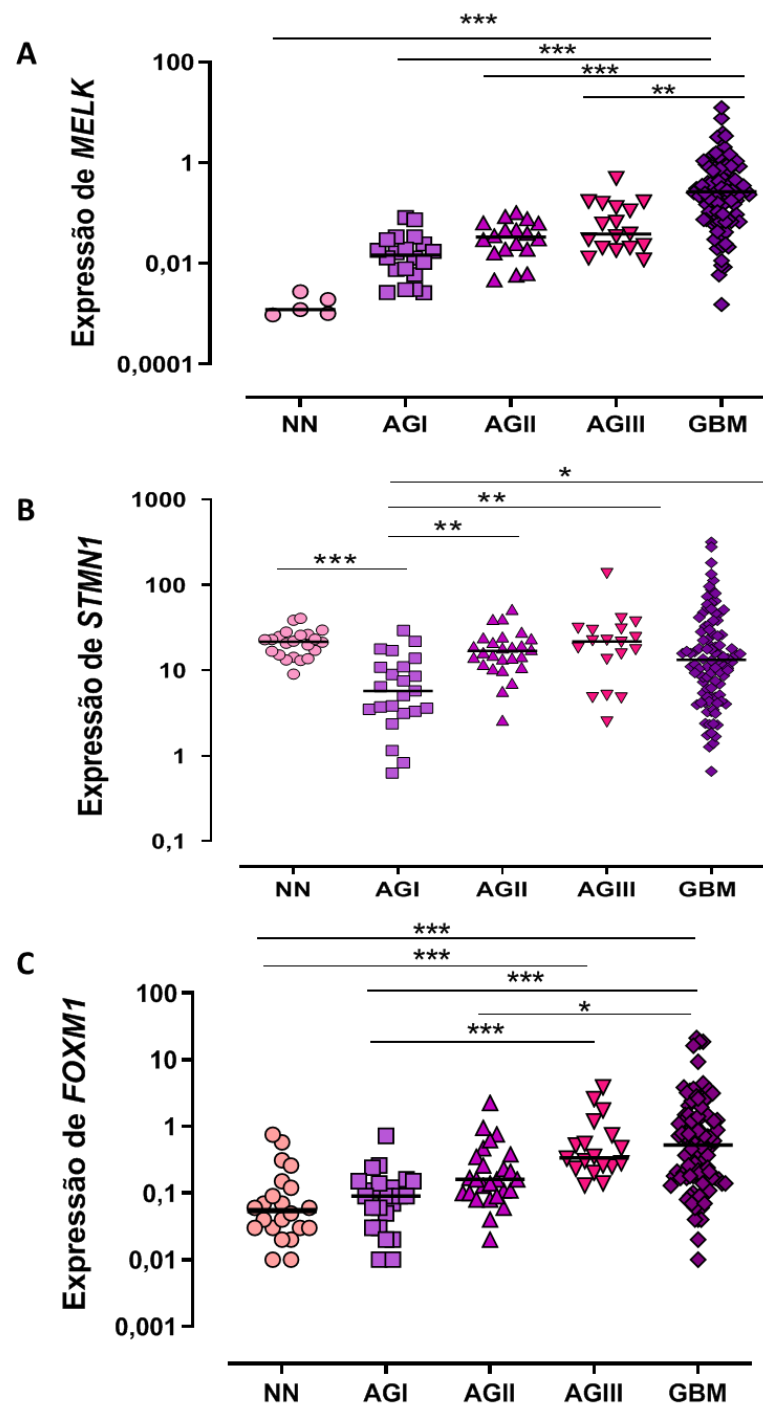


Figura 3 – Análise de expressão gênica de *MELK* (A), *STMN1* (B) e *FOXM1* (C) em astrocitomas de diferentes graus de malignidade e tecidos tumorais não neoplásicos. As barras horizontais mostram a mediana de cada grupo. NN: não neoplásico; AGI: astrocitoma pilocítico; AGII: astrocitoma difuso; AGIII: astrocitoma anaplásico; GBM: glioblastomas. Foi realizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn para calcular a diferença entre os grupos: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

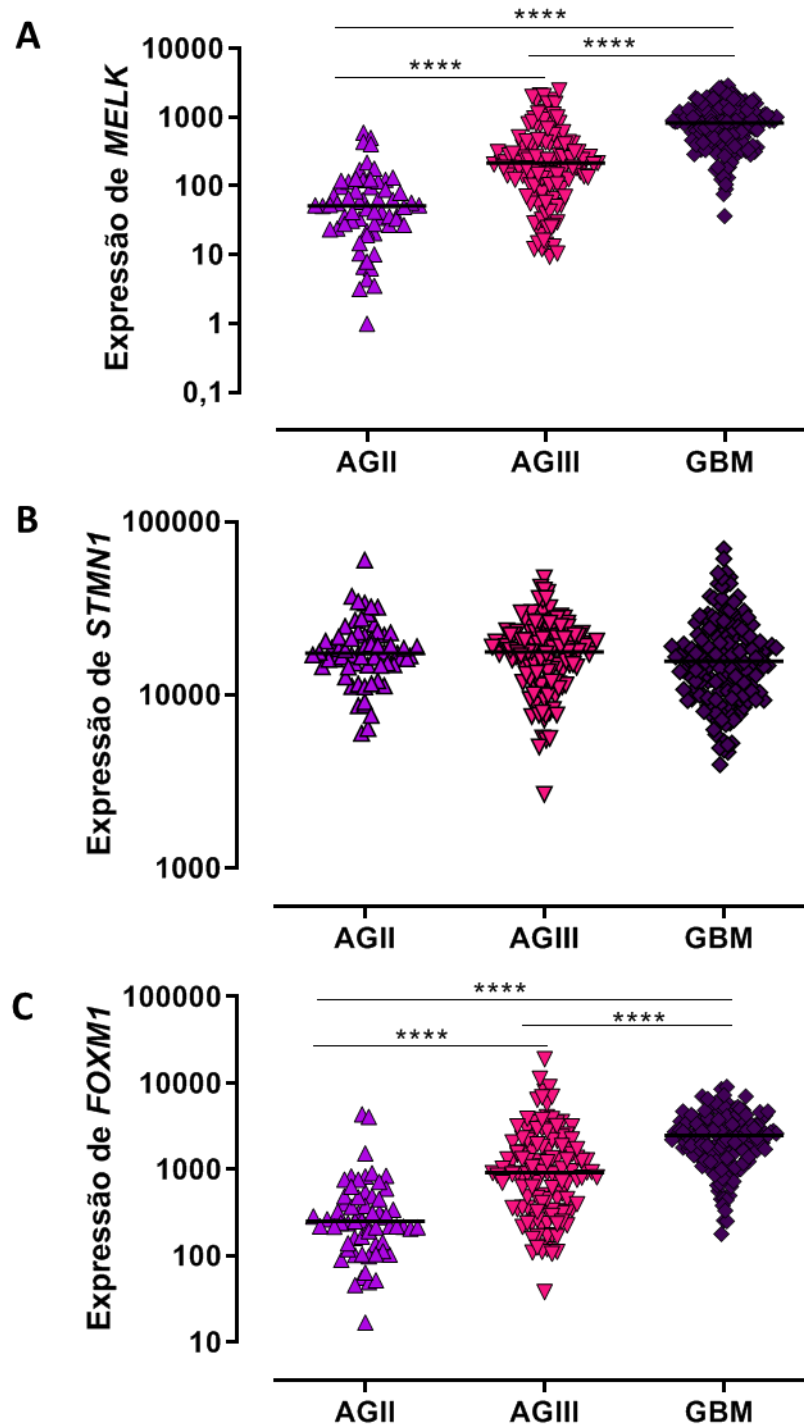


Figura 4 – Análise de expressão gênica de *MELK* (A), *STMN1* (B) e *FOXM1* (C) em astrocitomas de diferentes graus de malignidade dos dados do TCGA. As barras horizontais mostram a mediana de cada grupo. AGII: astrocitoma difuso; AGIII: astrocitoma anaplásico; GBM: glioblastomas. Foi realizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn para calcular a diferença entre os grupos: **** $p < 0,0001$.

4.2 Correlações de expressão de *MELK*, *STMN1* e *FOXM1* em glioblastomas

Os níveis de expressão de *MELK*, *STMN1* e *FOXM1* foram correlacionados entre os casos de GBM da nossa casuística de 100 GBMs e os resultados estão apresentados na Figura 5. Os coeficientes de correlações dos níveis de expressão foram positivos e significativas para todas as análises em pares: *MELK* e *STMN1* ($r=0,678$ e $p<0,0001$), *STMN1* e *FOXM1* ($r=0,378$ e $p=0,0001$) e *MELK* e *FOXM1* ($r=0,478$ e $p=0,0001$)

A análise *in silico* foi novamente realizada com os dados de expressão de 165 casos de GBM do TCGA e os resultados corroboraram os encontrados, ou seja, os coeficientes de correlações foram positivos e significativos ($p<0,0001$ para todas as análises) entre os pares de genes (Figua 6): $r=0,498$ para *MELK* e *STMN1*, $r=0,374$ para *STMN1* e *FOXM1* e $r=0,741$ para *MELK* e *FOXM1*.

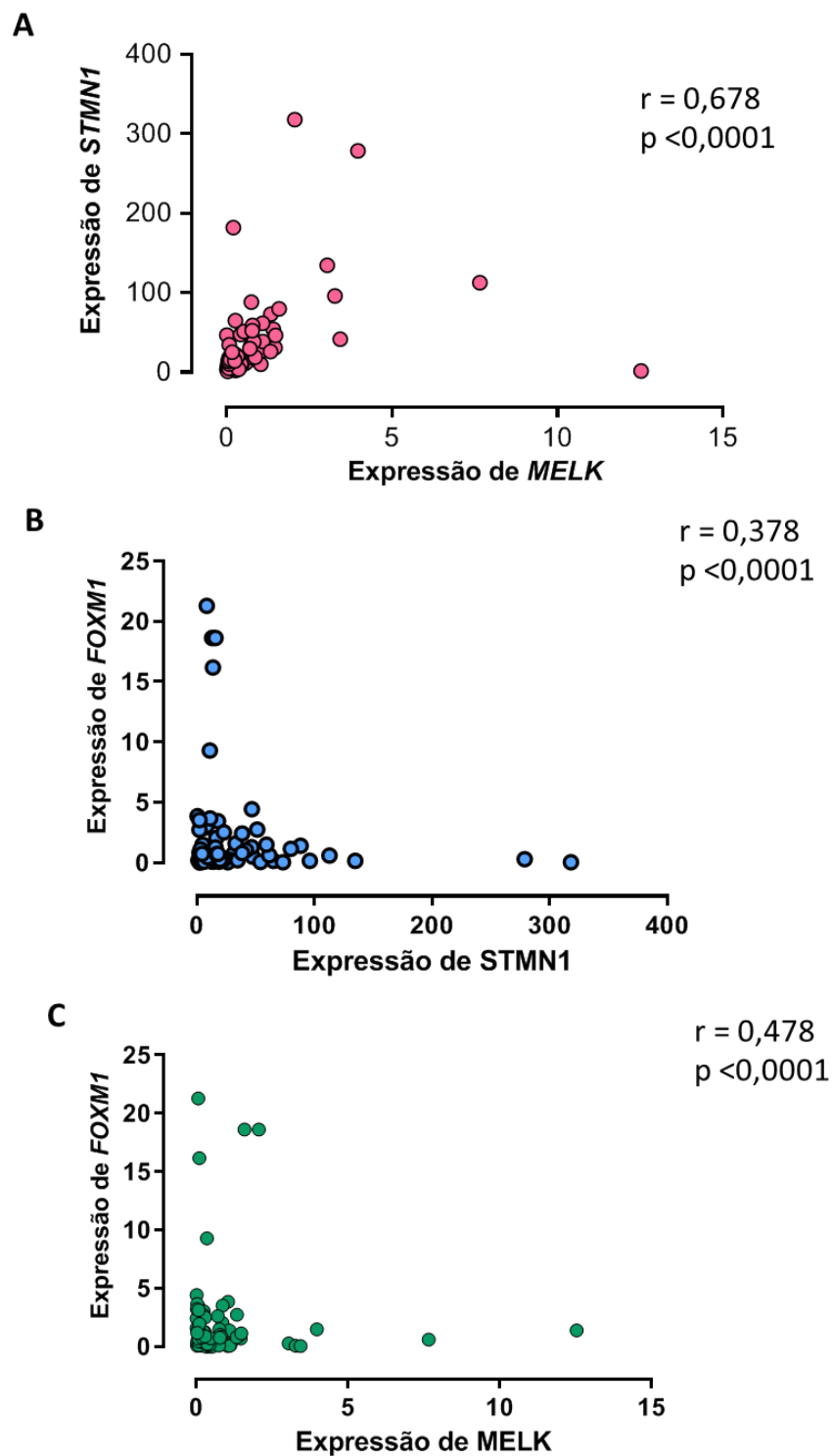


Figura 5 – Correlação entre os níveis de expressão de *MELK*, *STMN1* e *FOXM1* em casos de GBM da casuística do laboratório. Houve correlações positivas dos níveis de expressões de *MELK* e *STMN1* (A), *FOXM1* e *STMN1* (B) e também *MELK* e *FOXM1* (C) (teste Spearman-rho).

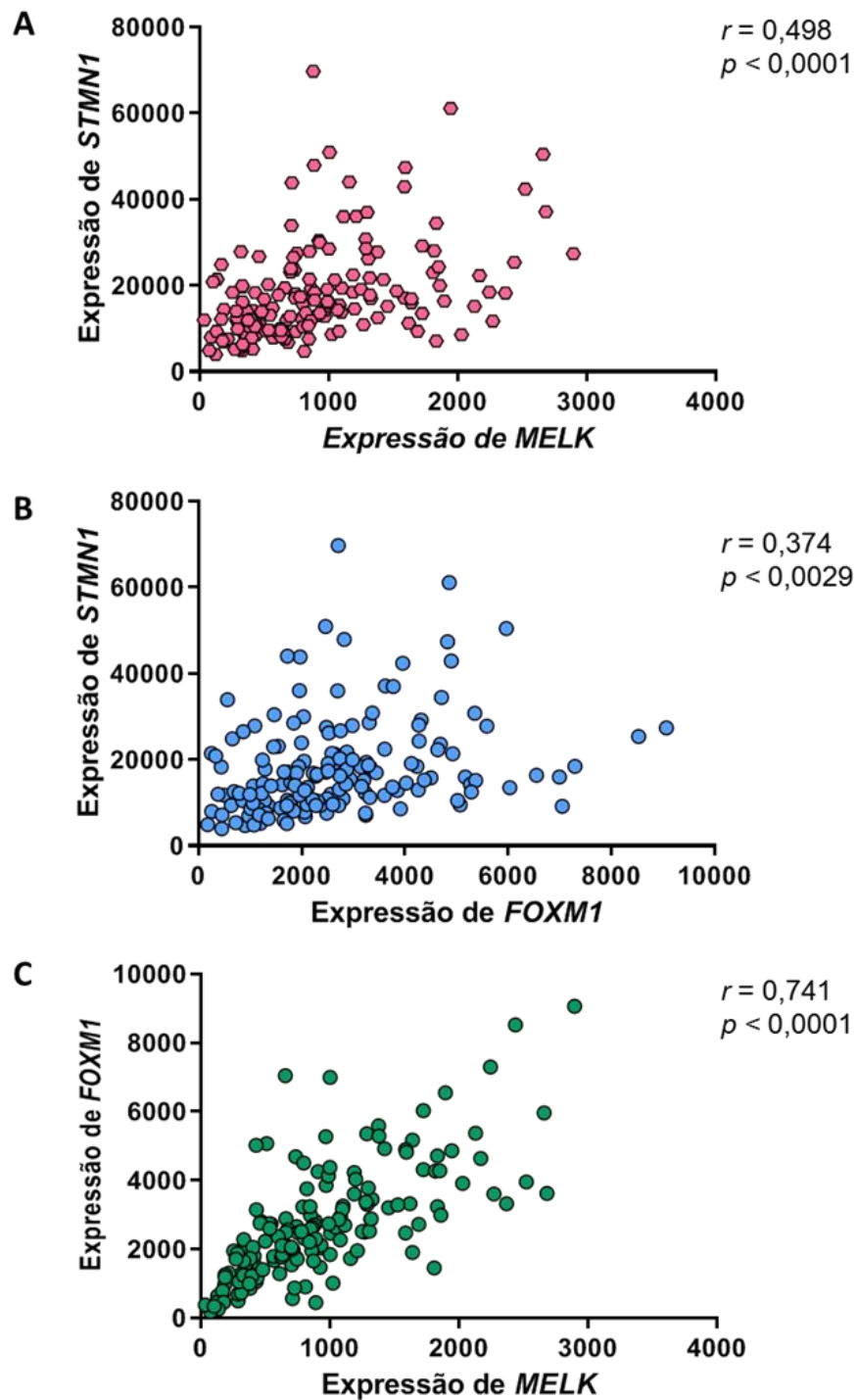


Figura 6 – Correlação entre os níveis de expressão de *MELK*, *STMN1* e *FOXM1* em casos de GBM da casuística do TCGA. Houve correlações positivas dos níveis de expressões de *MELK* e *STMN1* (A), *FOXM1* e *STMN1* (B), e também *MELK* e *FOXM1* (C) (teste Spearman-rho).

4.3 Comparação de expressão *MELK*, *STMN1* e *FOXM1* nos subtipos moleculares GBM

Os níveis de expressão de *MELK*, *STMN1* e *FOXM1* foram também analisados nos casos de GBM da casuística do laboratório de acordo com os subtipos moleculares (Galatro et al, 2017). Os resultados estão apresentados na Figura 7. Não foi possível observar diferenças estatísticas entre os subtipos para os três genes.

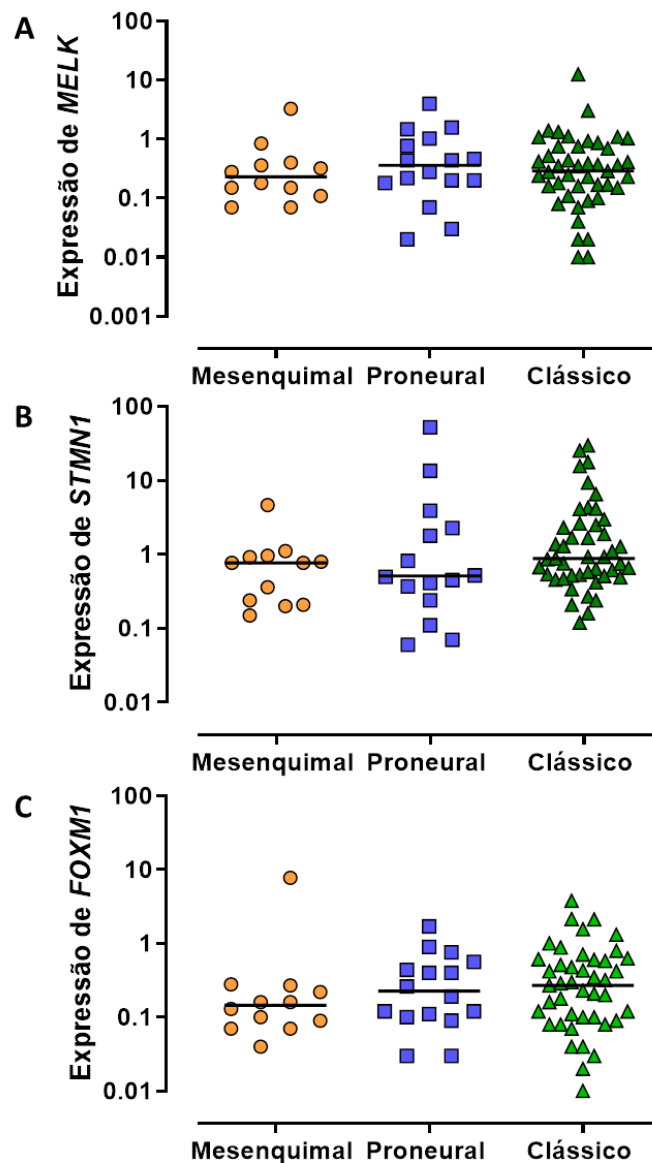


Figura 7 – Análise da expressão de *MELK*, *STMN1* e *FOXM1* nos subtipos moleculares de GBM da casuística de laboratório. No total, 73 casos foram divididos de acordo com o subtipo molecular. Foi realizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn para múltiplas comparações. Não houve diferenças significativas nas análises.

Os níveis de expressão *MELK*, *STMN1* e *FOXM1* foram também analisados nos subtipos moleculares GBM do TCGA e foram significativamente diferentes entre os grupos para todos os genes analisados: $p=0,002$ para *MELK* e $p<0,001$ para *STMN1* e *FOXM1* (teste de Kruskal-Wallis). A expressão foi maior no subtipo proneural quando comparado com os subtipos mesenquimal e proneural para os três genes (Figura 8). As diferenças entre estes dois últimos grupos foram significativas em relação ao proneural para *MELK* e *STMN1*, enquanto que para *FOXM1*, só houve diferença entre o grupo de GBMs do subtipo mesenquimal e proneural.

Os dados de expressão gênica mostraram que GBMs apresentam uma alta expressão de *MELK*, *STMN1* e *FOXM1* em relação ao tecido cerebral normal e a astrocitomas de menor grau de malignidade, com maior expressão no subtipo proneural. Além disto, há uma forte coexpressão destes três genes nos casos de GBMs, indicando que podem estar envolvidos em uma via ou processo comum. Por esta razão, foram realizados experimentos funcionais para um melhor entendimento destes dados.

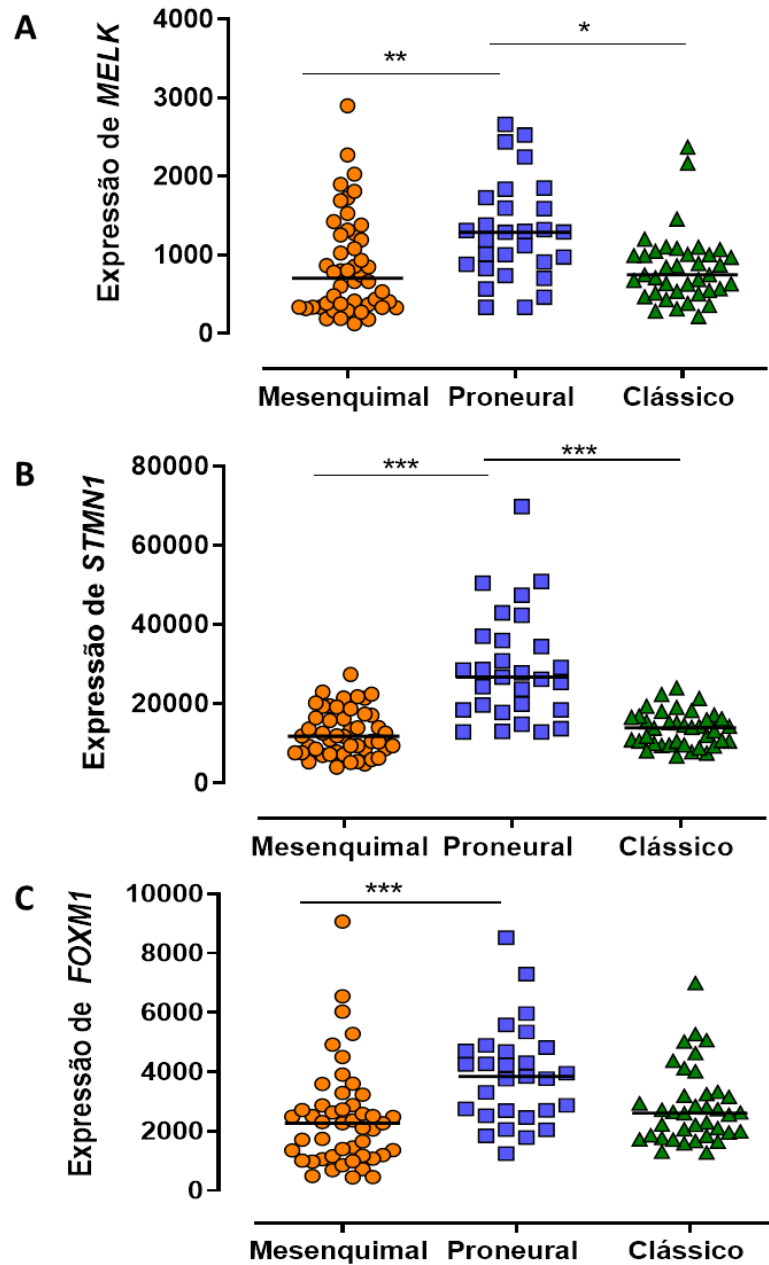


Figura 8 – Análise da expressão de *MELK*, *STMN1* e *FOXM1* nos subtipos moleculares de GBM da casuística do TCGA. A casuística foi de 115 casos, divididos de acordo com o subtipo molecular. Foi realizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn para múltiplas comparações: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.4 Silenciamento de *MELK* por siRNA

Linhagens celulares de GBM humano, U87MG e A172, foram silenciadas inicialmente com siRNA de *MELK* para análises da influência da diminuição de expressão de *MELK* na expressão de *STMN1* e *FOXM1*.

4.4.1 Análise de expressão gênica e proteica em células silenciadas para expressão de MELK

A eficiência do silenciamento de *MELK* foi realizada por qRT-PCR (Figura 9) e foi de aproximadamente 90% para ambas as linhagens. Com o silenciamento de *MELK*, houve também uma diminuição da expressão de *STMN1* de aproximadamente 80% na linhagem U87MG, conforme já foi descrito anteriormente por nosso grupo (Marie et al., 2016). A expressão de *FOXM1* também diminuiu com o silenciamento de *MELK*, em torno de 50% em relação ao controle. A diminuição de expressão *STMN1* e *FOXM1* foi semelhante na linhagem A172 silenciada para *MELK*, conforme apresentado na Figura 9. Estes dados indicam que há uma influência de MELK na expressão de *STMN1* e de *FOXM1*, que pode explicar os dados de coexpressão destes genes nos casos de GBM.

O silenciamento de MELK foi também confirmando a nível de expressão proteica em ambas as linhagens U87MG e A172, conforme demonstrado na Figura 10. Além disto, houve também diminuição da expressão de *STMN1*, confirmada nas células U87MG e A172 (Figura 10). O anticorpo contra *STMN1* identifica a proteína total, sem discriminar o estado de fosforilação de serinas.

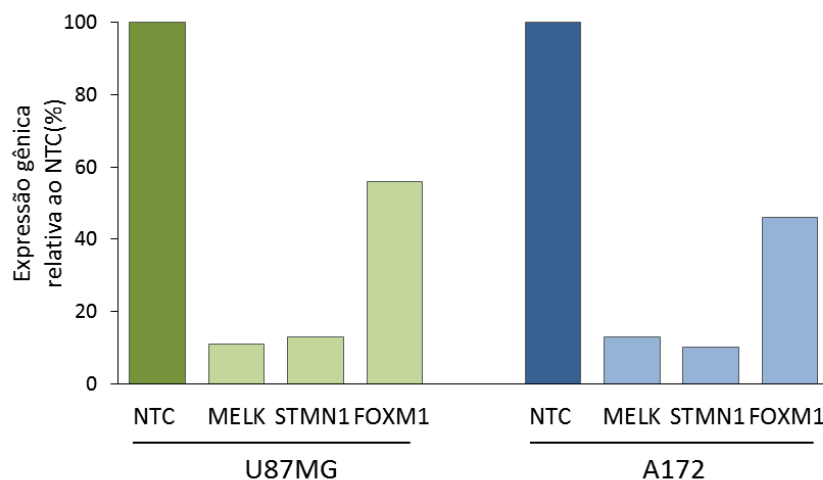


Figura 9 – Análise do silenciamento de MELK em células U87MG e A172. Expressão de *MELK*, *STMN1* e *FOXM1* após silenciamento de *MELK* nas linhagens U87MG e A172. As células foram transfectadas com siRNA e a expressão dos genes foi calculada em relação ao controle (NTC).

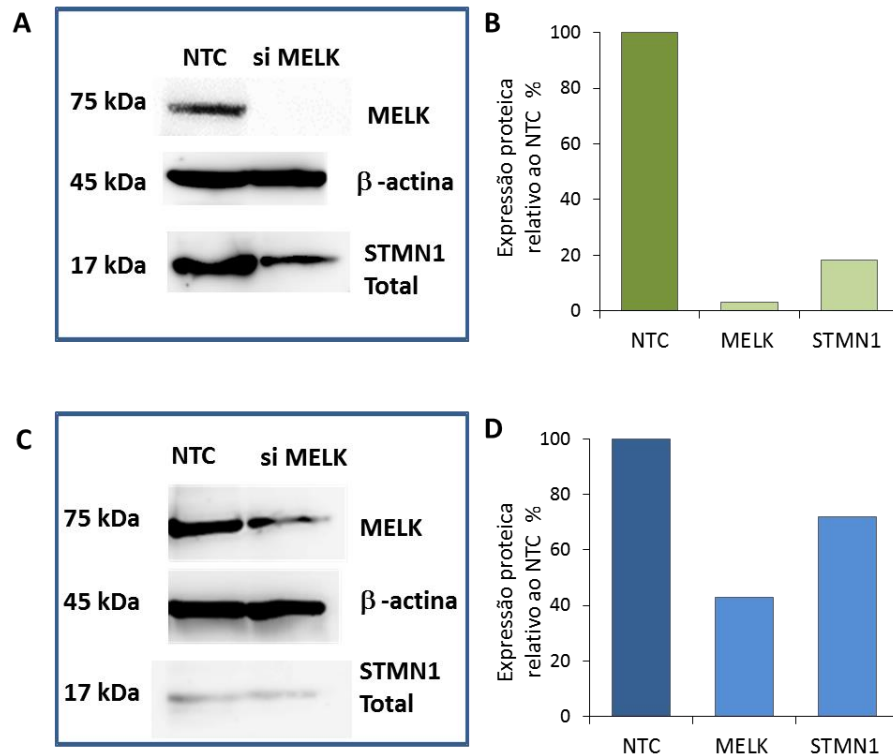


Figura 10 – Expressão proteica de MELK e STMN1 em células U87MG e A172. (A) Western blot de MELK e STMN1 da linhagem U87MG silenciada com siRNA de MELK, usando β-actina como controle da quantidade de proteína total. (B) Quantificação da expressão proteica de MELK e STMN1 na linhagem U87MG silenciada para expressão de MELK em relação ao controle NTC. (C) Western blot de MELK e STMN1 da linhagem A172 silenciada com siRNA de MELK. (D) Quantificação da expressão proteica de MELK e STMN1 na linhagem A172 silenciada para expressão de MELK em relação ao controle NTC.

4.4.2 Análise das serinas fosforiladas de STMN1 em células silenciadas para expressão de MELK

Como houve uma diminuição da expressão de STMN1 a nível gênico e proteico, foi também analisada a fosforilação dos quatro resíduos de serina (S16, S25, S38 e S63) que são os sítios de fosforilação e indicam a ativação ou não da proteína. Foi analisada a linhagem U87MG silenciada com siRNA de MELK utilizando anticorpos específicos de cada serina. Houve uma diminuição significativa da fosforilação de todas as serinas em relação ao controle NTC (Figura 11).

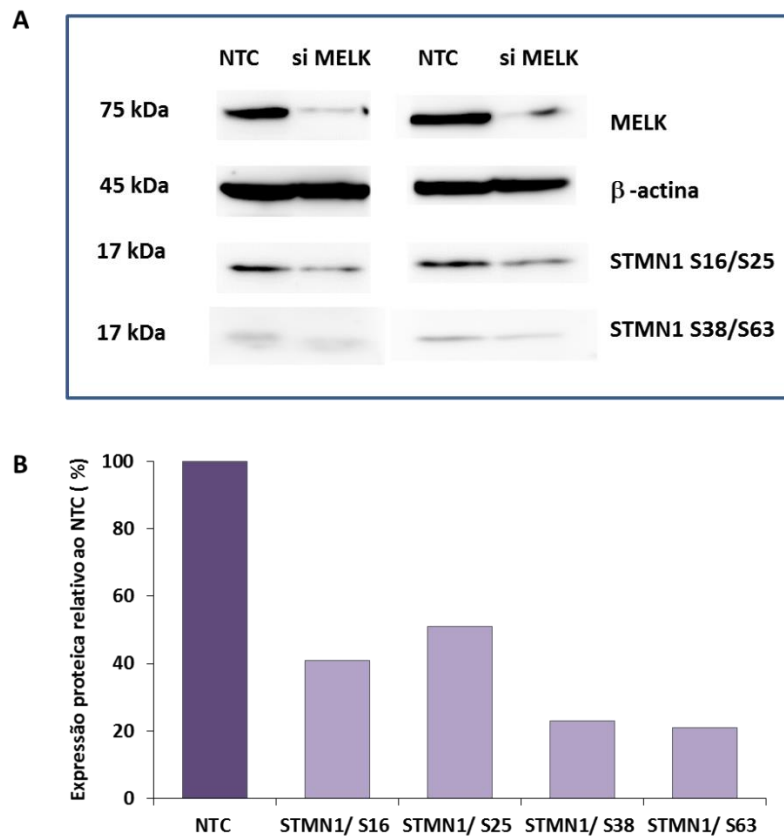


Figura 11 – Análise dos sítios de fosforilação de STMN1 em células U87MG após silenciamento de MELK com siRNA. (A) Western blot de MELK e sítios de fosforilação de STMN1 (S16, S25, S38 e S63) da linhagem U87MG silenciada com siRNA de MELK, usando β-actina como controle da quantidade de proteína total. (B) Quantificação da expressão proteica de MELK e serinas de STMN1 na linhagem U87MG silenciada para expressão de MELK em relação ao controle NTC.

4.5 Silenciamento de STMN1

Foi demonstrado que após silenciamento de *STMN1* com siRNA na linhagem U87MG, não alterou a expressão de *MELK*, indicando que *STMN1* estava *downstream* na via de *MELK* (Marie et al., 2016). Foi realizado o silenciamento de STMN1 a fim de analisar as variações nos níveis de expressão de MELK e FOXM1 nas linhagens U87MG e A172.

4.5.1 Análise da expressão gênica e proteica em células silenciadas para expressão de *STMN1*

As células transfectadas com siRNA de *STMN1* foram analisadas para a expressão gênica de *STMN1*, confirmando que o silenciamento foi bastante eficiente, de 98% para ambas as linhagens (Figura 12). Foi confirmado que *MELK* não altera sua expressão. Entretanto, *FOXM1* apresentou diminuição de 42% em ambas as linhagens (Figura 12A).

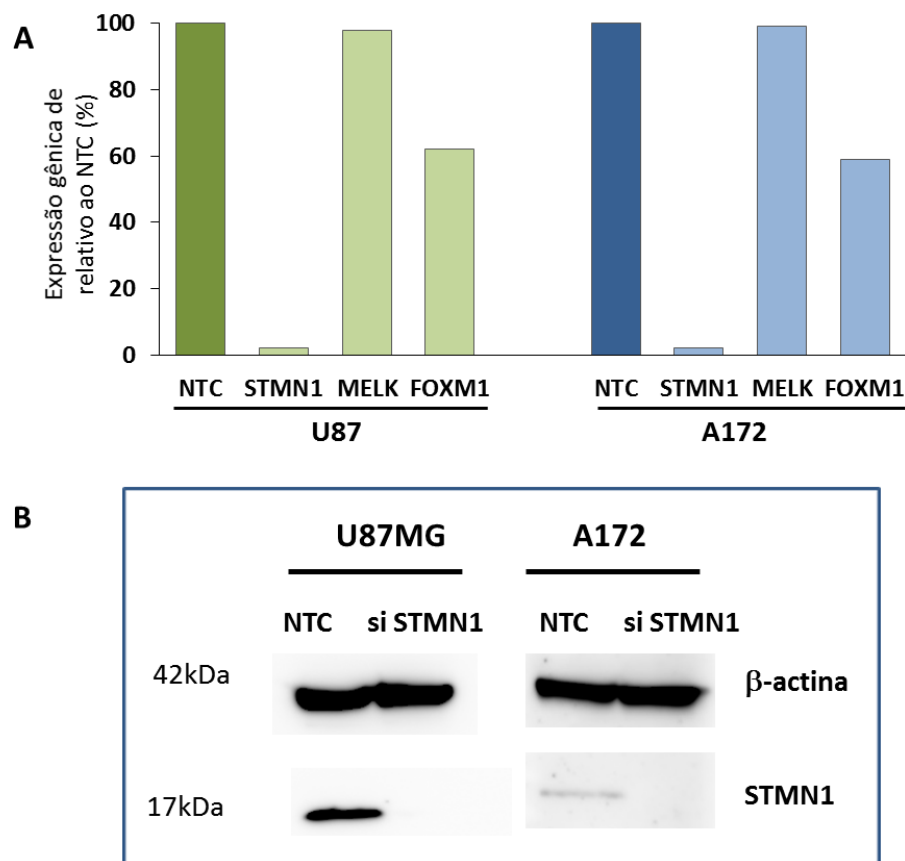


Figura 12 – Análise do silenciamento de *STMN1* em células U87MG e A172. (A) Expressão de *STMN1*, *MELK* e *FOXM1* após silenciamento de *STMN1* nas linhagens U87MG e A172. As células foram transfectadas com siRNA e a expressão dos genes foi calculada em relação ao controle (NTC). (B) Western blot representando o silenciamento da proteína e *STMN1*. β -actina foi utilizada como controle da quantidade de proteína total.

4.5.2 Análise da duração do efeito do silenciamento de STMN1

Foi realizada uma análise do nível de silenciamento de STMN1 ao longo de 7 dias, para determinarmos o tempo de duração do efeito da transfecção com siRNA de STMN1. As Figuras 13 e 14 mostram as análises a nível gênico e proteico para a linhagem U87MG e A172, respectivamente. Pode-se observar que o efeito do silenciamento de STMN1 foi bastante eficiente com duração de mais de 7 dias. Sendo assim, foram feitos ensaios funcionais com até 7 dias.

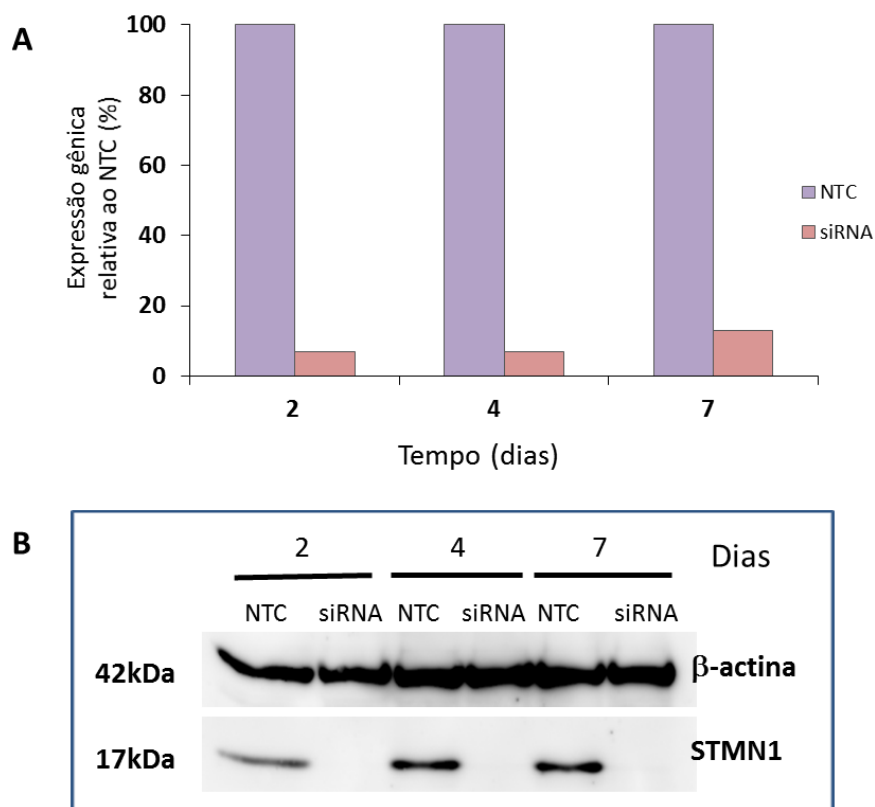


Figura 13 - Análise da duração do efeito do silenciamento transitório de STMN1 em células U87MG. (A) Expressão gênica da linhagem U87MG silenciada em relação ao controle NTC após 2, 4 e 7 dias de transfecção com siRNA de STMN1. (B) Western blot das células representando o silenciamento da proteína STMN1. β-actina foi utilizada como controle da quantidade de proteína total.

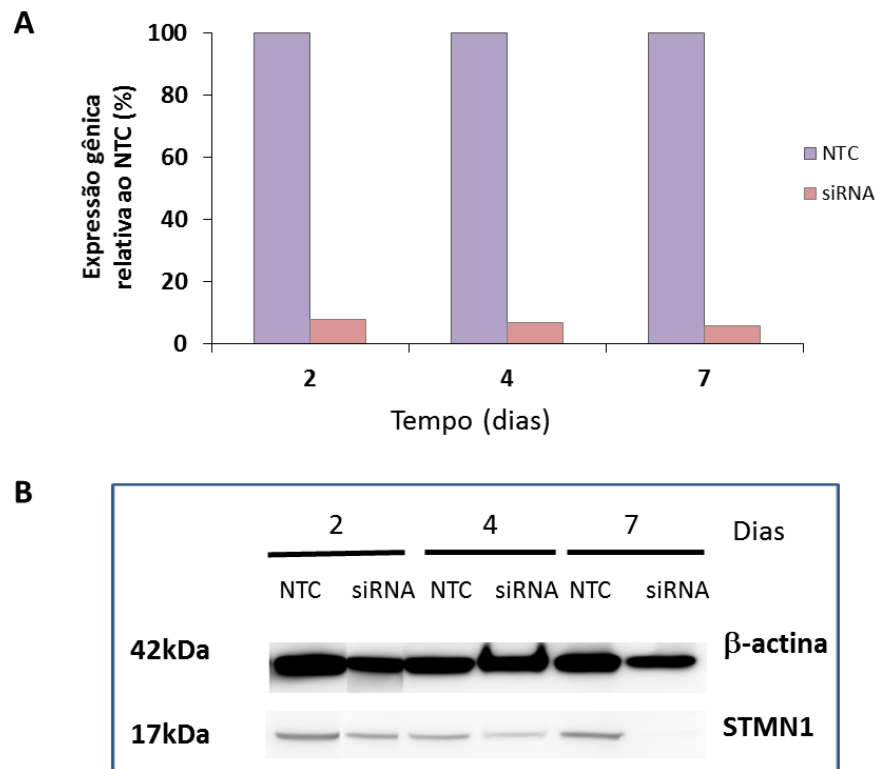


Figura 14 - Análise da duração do efeito do silenciamento transitório de STMN1 em células A172. (A) Expressão gênica da linhagem A172 silenciada em relação ao controle NTC após 2, 4 e 7 dias de transfecção com siRNA de STMN1. (B) Western blot das células representando o silenciamento da proteína STMN1. β -actina foi utilizada como controle da quantidade de proteína total.

4.5.3 Análise do efeito do silenciamento de STMN1 na proliferação

Foi realizado um ensaio do efeito do silenciamento de STMN1 na viabilidade de células U87MG e A172 no tempo 0 e após 2, 4 e 7 dias de transfecção com siRNA (Figura 15). Pode-se observar uma redução da viabilidade a partir do 4^o dia. STMN1 é importante para proliferação celular e as diferenças em relação controle tornam-se significativas nos dias 4 ($p < 0,001$) e 7 ($p < 0,001$).

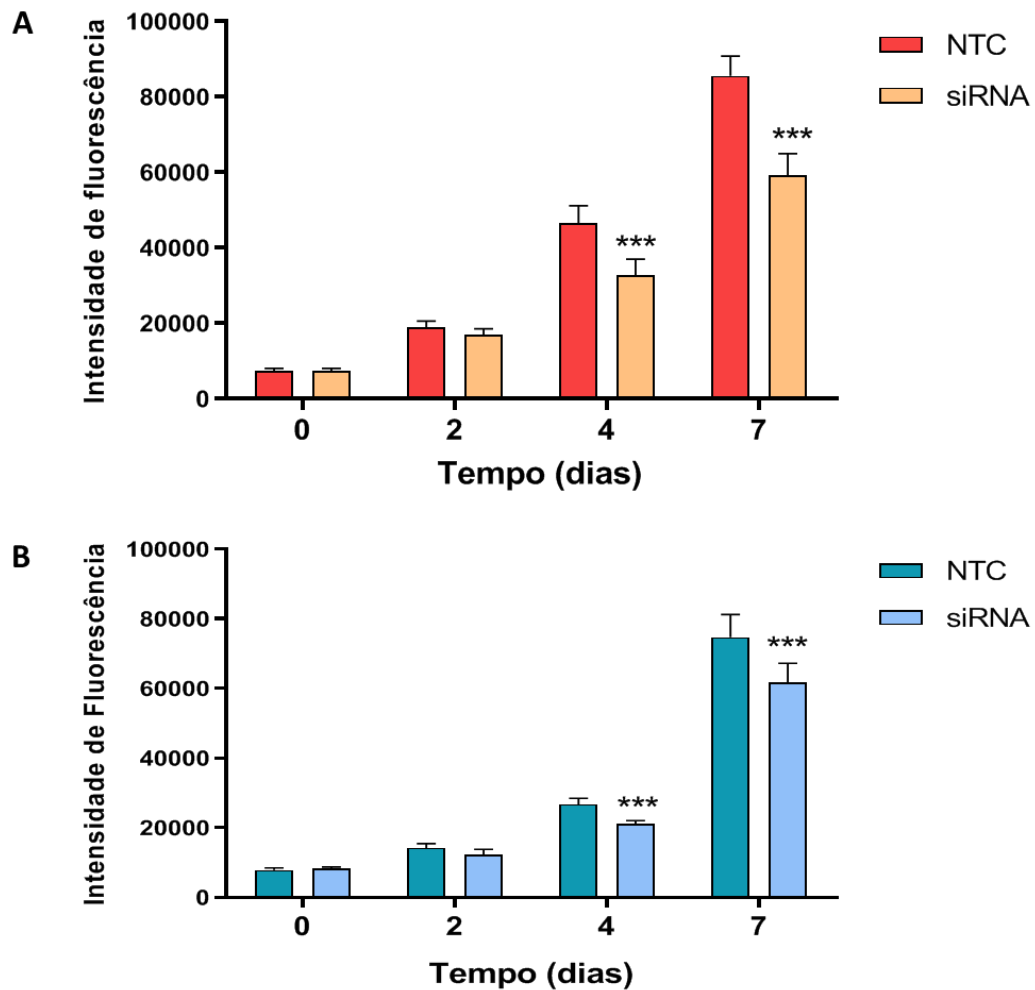


Figura 15 – Análise do efeito do silenciamento de STMN1 na viabilidade celular nas linhagens U87MG e A172. As células U87MG (A) e A172 (B) foram analisadas no tempo 0 e após 2, 4 e 7 dias de transfecção com siRNA de STMN1. As células silenciadas com siRNA apresentaram uma redução viabilidade quando comparadas aos controles ($p < 0,05$). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão (triplicata). Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significantes das células silenciadas em relação ao controle. Análise de variância ANOVA, seguida de teste Bonferoni: *** $p < 0,0001$.

4.5.4 *Análise do efeito do silenciamento de STMN1 na migração celular*

O papel da expressão de STMN1 na migração das linhagem celular U87MG foi analisado pelo ensaio de ferida em monocamada. As células silenciadas com siRNA apresentaram uma redução da atividade migratória quando comparadas aos controles ($p < 0,05$). As diferenças são significativas nos tempos maiores, após 48 ($p < 0,001$) e 72 ($p < 0,001$) horas (Figura 16).

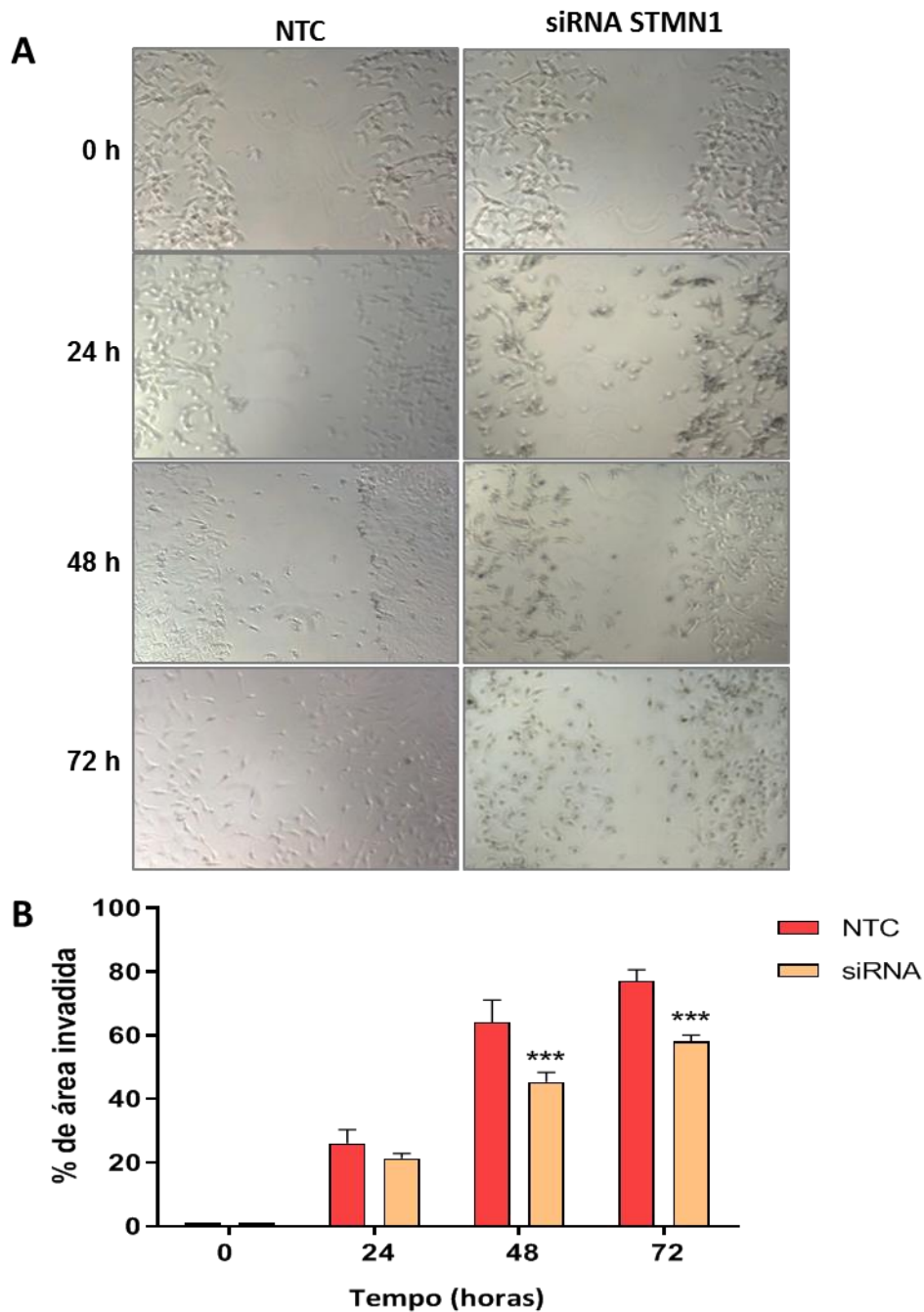


Figura 16 – Efeito do silenciamento de STMN1 na migração de células U87MG em ensaio de ferida (A) Fotos representativas das células U87MG controle NTC e silenciada com siRNA de STMN1 em diferentes tempos. O foi realizado em triplicatas. (B) O gráfico representa a área livre ocupada apenas pelas células nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas após a realização da ferida. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (triplicata). Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significantes da área invadida pelas células silenciadas em relação ao controle. Análise de variância ANOVA, seguida de teste Bonferoni: *** $p < 0,0001$.

4.6 Análise do envolvimento de MELK, STMN1 e FOXM1 na resistência a drogas

4.6.1 Análise expressão gênica de FOXM1 e STMN1

FOXM1 e STMN1 foram descritos em uma mesma via de AKT como levando a resistência a inibidores de tirosina quinases (Li et al., 2017). Por esta razão, foi realizada uma análise da expressão de *STMN1* e *FOXM1* na casuística de GBM do laboratório. As 100 amostras foram divididas de acordo com a expressão de *STMN1* (baixa e alta, com base na mediana de expressão). Em cada grupo, os casos de *FOXM1* com alta expressão (baseado na mediana de expressão) foram localizados (Figura 17A). As barras horizontais representam a expressão mediana de cada grupo. No primeiro grupo de *STMN1* com baixa expressão, há 12 casos (25%) de 49 que apresentaram alta expressão de *FOXM1*. Por outro lado, o outro grupo com alta expressão de *STMN1* apresentou 40 casos (79%) com alta expressão de *FOXM1*. Estes dados indicam que a hiperexpressão de *STMN1* se correlacionou com uma alta expressão de *FOXM1*.

Em seguida, os casos de GBM foram divididos em dois grupos: um com níveis de expressão alta de *STMN1* e *FOXM1* e outro com baixa expressão de ambos os genes. Para o cálculo da curva de sobrevida, usamos o método Kaplan-Meier que é utilizado para estimar a probabilidade de sobrevida em vários intervalos de tempo e para ilustrar graficamente a sobrevida ao longo do tempo. Os grupos foram comparados quanto à sobrevida total, porém não apresentaram diferenças (Goel et al., 2010) (Figura 17B).

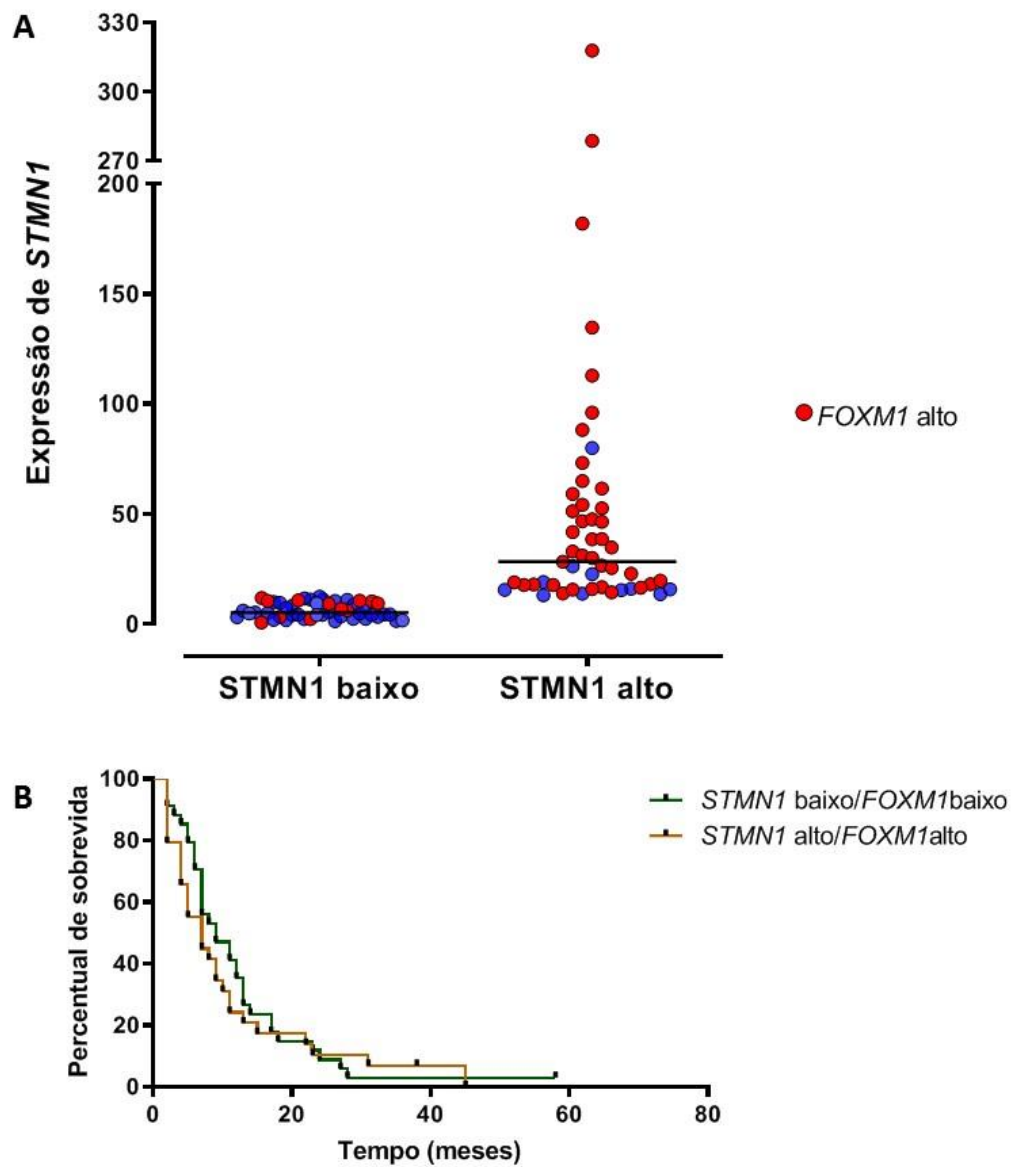


Figura 17 – Análise de expressão *STMN1* e *FOXM1* na casuística de GBM e correlação com sobrevivência. (A) Gráfico de dispersão dos casos separados de acordo com o nível de expressão de *STMN1* (alto e baixo de acordo com a mediana de expressão de todos os casos). As barras horizontais representam a expressão mediana de cada grupo. Os círculos vermelhos representam casos com altos níveis de expressão *FOXM1* (casos acima da mediana de nível de expressão *FOXM1*). (B) Cruvas de sobrevivência total separados em dois grupos: alta e baixa expressão de *STMN1* e *FOXM1*.

4.6.2 Células resistentes a drogas

A expressão de *STMN1* e *FOXM1* foi analisada em modelo de células de GBM resistentes a quimioterápicos. As linhagens U87MG e T98G foram expostas a VCR e a TMZ até que se tornassem resistentes a ambas as drogas. Para validar a resistência nas células expostas ao tratamento, alguns marcadores de resistência, como *MDR1* e *MGMT*, foram analisados por qRT-PCR. Após checar a alta expressão dos genes de resistência, as células foram consideradas resistentes à VCR e TMZ. Estas células foram gentilmente cedidas como colaboração pela Profa. Dra. Alison Colquhoun.

A expressão de *MELK* foi também incluída nestas análises, uma vez que houve correlação da expressão com os *STMN1* e *FOXM1* em GBMs. Os resultados apresentados na Figura 18 mostram a expressão dos três genes nas duas linhagens celulares resistentes a VCR e TMZ. É possível observar o aumento na expressão de *STMN1* e *FOXM1* em ambas as linhagens.

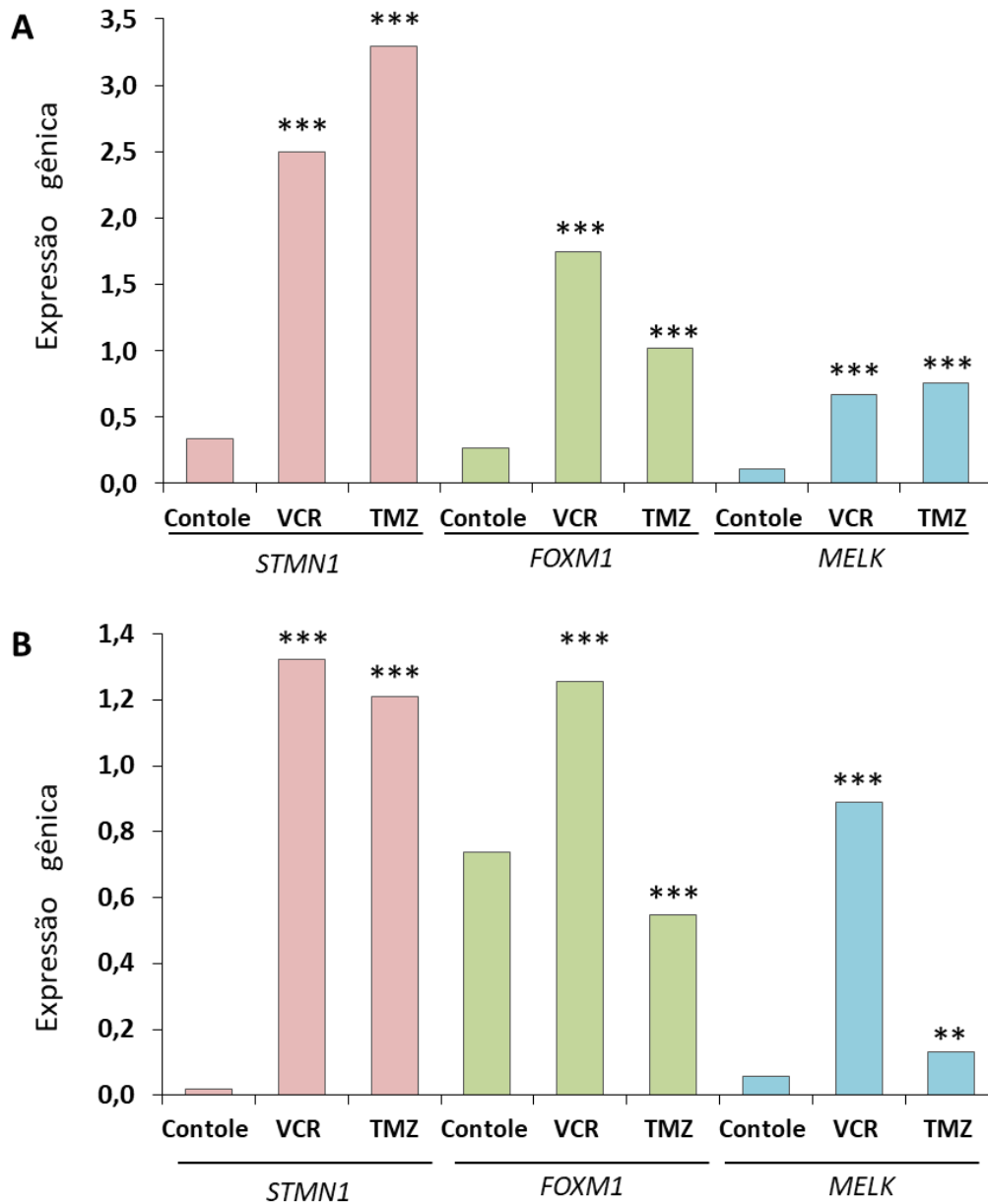


Figura 18 - Análise da expressão de *STMN1*, *FOXM1* e *MELK* em células de glioma resistentes a drogas. Células U87MG (A) e T98G (B) resistentes a vincristina (VCR) e temozolamida (TMZ) foram analisadas e comparadas com células controles. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente entre controle e tratados Análise de variância ANOVA, seguida de teste Bonferroni: *** $p < 0,0001$; ** $p < 0,001$.

5 DISCUSSÃO

Glioblastomas são tumores mais comuns entre os astrocitomas, são resistentes às terapias convencionais e a sobrevida dos pacientes é em média menor do que 15 meses. Apesar do avanço no conhecimento de várias alterações genéticas e de vias de sinalizações, os tratamentos com drogas têm se mostrado pouco eficientes, pois estes tumores são muito heterogêneos, além de apresentarem CTGs. Desta forma, muitos estudos buscam ainda novos alvos terapêuticos que melhorem a sobrevida dos pacientes.

O presente trabalho teve como objetivo analisar a expressão de três genes importantes para diversos tipos de tumores, *MELK*, *STMN1* e *FOXM1*, em astrocitomas e as possíveis correlações entre eles e envolvimento em vias comuns e resistência às drogas. Os três genes apresentam um aumento de expressão com o aumento de malignidade dos astrocitomas. Estes dados foram corroborados com a análise de expressão nos astrocitomas graus II a IV dos casos do TCGA.

A expressão de *MELK* é muito elevada diversos tipos de tumores. Em GBMs, particularmente, está expresso principalmente em CTGs e está associada a proliferação e malignidade (Nakano et al., 2008; Marie et al., 2008). Acredita-se que o nível aumentado de *MELK* acarreta uma vantagem proliferativa de CTGs, pois *MELK* possui a capacidade de inibir a apoptose ou regular a proteína p53, além de estar envolvido vias de resposta ao dano no DNA (Gu et al., 2013). Além disto, *MELK* fosforila *EZH2* e *c-JUN*, promovendo resistência da CTGs a tratamentos adjuvantes de quimio e radioterapia e recidiva do tumor (Gu et al., 2013; Joshi et al., 2015; Kim et al., 2015). A fosforilação de *EZH2* por *MELK* promove ainda a metilação de *NF-κB* com consequente aumento da proliferação das CTGs (Liu et al., 2019). Desta forma, *MELK* exerce um papel fundamental na tumorigênese, resistência ao tratamento e recidiva dos GBMs.

O aumento da expressão e/ou atividade de *STMN1* também foram relacionadas com grau tumoral, progressão tumoral, invasão / metástase, baixa sobrevida e resistência a drogas em vários tipos de neoplasias. *STMN1* está fortemente envolvido com a regulação do ciclo celular, pois controla a dinâmica dos microtúbulos, por esta razão é um alvo nas terapias de tratamento a tumores (Hayashi et al., 2006). A inibição de sua expressão e/ou atividade de *STMN1* levou à redução de características importantes do tumor, tais como proliferação celular, motilidade e metástase (Belletti

and Baldassarre, 2011; Biaoxue, et al., 2016). Além disto, o aumento da expressão de STMN1 pode ser utilizado como biomarcador em vários tumores sólidos (Mao et al., 2018; Zhang et al., 2019).

Nosso grupo descreveu o aumento da expressão de STMN1 em astrocitomas de diversos graus de malignidade, porém sem correlação com sobrevida dos pacientes com GBM (Marie et al, 2016).

FOXM1 também apresenta altos níveis de expressão em muitos tipos de câncer e está relacionado com proliferação, metástase, diminuição da sobrevida dos pacientes, bem como resistênica a drogas (Gartel, 2017). Em CTGs, MELK leva à ativação de FOXM1 através de fosforilação, com conseqüente aumento de genes relacionados à proliferação (Gouazé-Andersson et al., 2018). Porém este mecanismo não é particular de CTGs, mas também de outros tumores. A eficiência do uso de inibidor de MELK OTS167 foi avaliada pela diminuição da fosforilação de FOXM1 em diversos estudos *in vitro* de células de glioma de ponte, câncer de pulmão, rim, adrenocortical, útero, cabeça e pescoço, mieloma e leucemia (Meel et al., 2018; Inoue et al., 2016; Kato et al. 2016; Kiseljak-Vassiliades et al. 2018; Wang et al., 2018; Ren et al., 2019; Bolomsku et al., 2018; Zhang et al., 2018),

MELK, STMN1 e FOXM1 estão com alta expressão em GBM e também coexpressos. Todos apresentam uma correlação significativa de coexpressão em GBMs, tanto na casuística do laboratório, quanto na do TCGA. O maior coeficiente de correlação foi entre MELK e FOXM1 na casuística do TCGA de 165 casos, MELK aumenta diretamente a atividade de FOXM1 interagindo com sua porção N-terminal e promovendo sua fosforilação e progressão da ciclo celular (Joshi et al., 2013; Gouazé-Andersson et al., 2018). Isto pode então explicar as correlações de coexpressão entre STMN1 e FOXM1 e entre STMN1 e FOXM1. Além disto, os níveis de expressão de FOXM1 e STMN1 estavam correlacionados em câncer de pulmão, através de ativação da via AKT induzida por inibidores de tirosina quinase (Li et al., 2017).

Além disto, os três genes apresentaram maior expressão nos casos de GBM do subtipo proneural quando comparados com os subtipos mesenquimal e clássico. O subtipo GBM proneural apresenta mutações frequentes nos genes *IDH1* e *TP53*. Em CTGs a inibição de p53 com inibidor ou siRNA levou a um aumento de expressão de MELK. Porém, inibindo a expressão de MELK, p53 aumentou sua expressão, indicando que há uma regulação inibitória mútua entre MELK e p53 em células de

glioma (Gu et al., 2013). Em um modelo carcinoma escamoso oral, células com mutação de p53 induzirem uma maior expressão de *STMN1* (Ma et al., 2017).

Em um trabalho anterior do nosso grupo, a inibição de MELK com siRNA levou à diminuição da expressão de *MELK* e *STMN1* a nível gênico e de proteína na linhagem celular U87MG. O silenciamento de *STMN1*, porém não diminuiu a expressão de *MELK* (Marie et al., 2016). No presente trabalho, foi utilizada nos ensaios de silenciamento gênico com siRNA mais uma linhagem celular de GBM, a A172, e também analisada a expressão de *FOXM1*. As células A172 apresentaram resultados semelhantes aos da U87MG, reforçando os achados anteriores.

Quando as células são transfectadas com siRNA de MELK, os níveis de expressão de *MELK* e *STMN1* diminuíram bastante (cerca de 90%) em relação aos controles. *FOXM1* também apresentou diminuição da expressão, porém em torno de 50% em relação ao controle. MELK fosforila e ativa *FOXM1*, regulando a proliferação celular (Joshi et al., 2013). Por esta razão, talvez a expressão de *FOXM1* diminui, mas não em níveis tão altos quanto os observados para *STMN1*. A diminuição de expressão de *STMN1*, por sua vez, pode ser explicada em parte por causa da expressão de *FOXM1*, que controla a expressão de *STMN1* e também porque MELK controla o ciclo celular (Liu et al., 2017). A inibição da expressão de MELK com siRNA ou o uso de inibidores levou à diminuição da proliferação e indução da apoptose (Ganguly et al., 2014).

Além disto, foi observada diminuição dos resíduos de serina fosforilados específicos que controlam a ativação / inativação de *STMN1*. Este dado pode refletir a diminuição da expressão da proteína em si com o silenciamento de MELK, ou se MELK é capaz de afetar a atividade de *STMN1* através da fosforilação dos seus sítios de serina direta ou indiretamente. Porém, há somente um trabalho na literatura que mostrou que a inibição de MELK com OTS167 ou o silenciamento com siRNA em células de câncer de próstata levou à diminuição da fosforilação das serinas 16 e 38 de *STMN1*. Consequentemente, *STMN1* é inativado, o fuso mitótico não é formado corretamente e as células entram em apoptose (Jurmeister *et al.*, 2018). Porém não há evidências se *STMN1* pode ser fosforilado diretamente por MELK.

Quando as linhagens celulares foram silenciadas com siRNA de *STMN1*, a expressão de *MELK* não diminuiu, como já demonstrado anteriormente na linhagem U87MG (Marie et al., 2008). Os mesmos resultados foram confirmados para a

linhagem A172, reforçando a hipótese de que MELK está *upstream* em uma possível via comum.

A expressão de *FOXM1*, porém, diminuiu ao redor de 40% em relação ao controle em ambas as linhagens celulares silenciadas com siRNA de *STMN1*. *FOXM1* também desempenha papel importante na montagem do fuso mitótico. A atividade do *FOXM1* é de grande importância para o ciclo celular como um todo, e sua fosforilação desempenha um papel fundamental na atividade transcricional de diversos genes envolvidos no progresso do ciclo celular. A proteína *FOXM1* mantém um status relativo de hipofosforilação na fase G1 / S, exibe aumento da fosforilação da fase S para a transição G2 / M, atinge o status de hiperfosforilação na fase M e é subsequentemente desfosforilada na fase M tardia. Durante a formação do fuso, *FOXM1* é fosforilada por diferentes quinases, entre elas MELK (Liao et al., 2018). Por esta razão os níveis de expressão de *FOXM1* diminuem quando *STMN1* e MELK são silenciados. Além disto, estas relações dos três genes com o ciclo celular podem explicar a diminuição na viabilidade celular das células U87MG e A172 quando *STMN1* é silenciado.

Foi observado que o silenciamento de *STMN1* diminuiu a migração das células U87MG. A migração é outro comportamento celular complexo em que *STMN1* desempenha um papel fundamental, pois regula a dinâmica dos microtúbulos e, portanto, os rearranjos do citoesqueleto para a formação e dispersão de locais de adesão entre células e matriz extracelular. Intrinsecamente, o *STMN1* está envolvido na extensão e retração das extremidades que dependem da polimerização de microfilamentos de actina e montagem de microtúbulos (estabilidade) e desmontagem (instabilidade). Na célula tumoral essa atividade migratória tende a estar aumentado, o que explicaria altos níveis de expressão de *STMN1* em tumores malignos (P. Rakic., 1996 ; Schimmack et al.,2015).

Resultados semelhantes do efeito do silenciamento de *STMN1* na diminuição da migração já foi demonstrada em células de câncer gástrico (Jeon et al., 2010; Akhtar et al., 2013), de esôfago (Wang et al., 2011; Liu et al., 2013), melanoma (Chen et al.; 2013), CTGs (Song et al., 2014), pulmão (Yurong et al., 2017) e oral (Ma et al., 2017).

Os casos de GBM com alta expressão de *STMN1* apresentaram uma alta proporção de casos com expressão de *FOXM1* alta (79%), quando comparados com os de baixa expressão de *STMN1* (25% de casos com alta expressão de *FOXM1*). Os dados indicam uma correlação entre a expressão de ambos os genes, como já

observado para a casuística total de GBMs. *FOXM1* e *STMN1* estão muito relacionados com características de resistência a drogas. Os níveis de expressão de *FOXM1* e *STMN1* estão aumentados também em células de câncer gástrico resistentes a docetaxel (Li et al, 2014). Em células de câncer de pulmão resistentes a inibidores de tirosina quinases ocorre ativação da via de sinalização AKT / *FOXM1* / *STMN1*. *FOXM1* regula diretamente a expressão de *STMN1*, sugerindo o envolvimento destes dois genes na aquisição de resistência a drogas, por seleção e enriquecimento de células tronco tumorais, promoção da transição epitélio-mesênquima (Li et al., 2017).

A análise de expressão de células de GBM resistentes a drogas mostrou que ocorreu aumento da expressão de *STMN1* e *FOXM1*, além de *MELK*. Células U87MG e T98G resistentes a TMZ e VCR foram analisadas. Em GBM a droga de eleição para o tratamento dos pacientes é a TMZ e é comum que as células adquiram resistência, seja por mecanismos genéticos ou epigenéticos. TMZ é um agente alquilante de DNA, cuja ação a nível molecular é a indução de lesões no DNA das células tumorais, o que promoveria a morte dessas células. Porém em uma célula que se torna resistente após um longo período de exposição à droga, ocorre aumento de genes de reparo de DNA, o que geralmente impede a morte celular (Santivasi and Xia., 2013). Muitos genes apresentam aumento em sua expressão durante o processo de resistência a TMZ, como *MGMT*, *IDH1 / 2*, *YB1*, *MELK*, *MVP / LRP*, *MDR1 (ABCB1)* entre outros (Stavrovskaya et al., 2016).

A expressão de *STMN1* foi observada em CTGs isoladas de linhagens celulares de GBM, U87MG e U251. Quando *STMN1* foi silenciado, ocorreu uma maior suscetibilidade das CTGs ao tratamento com TMZ (Song et al., 2014).

Altos níveis de expressão de *FOXM1* foram observados em GBMs recorrentes que apresentaram resistência a TMZ. *FOXM1* induziu o aumento de expressão de *RAD51*, um gene de reparo de dano de DNA (Zhang et al., 2012). Além disto, *FOXM1* regula a expressão de *RFC5 (DNA repair gene replication factor C5)* e promove a resistência a TMZ de células de glioma, independentemente da ativação de *MGMT* (Peng et al., 2017). Em CTGs o tratamento com TMZ aumentou células que expressavam *FOXM1* e *MELK*, pois *MELK* é capaz de fosforilar *FOXM1* regulando, assim genes importantes da mitose (Joshi et al., 2013).

O envolvimento de STMN1 na quimiorresistência a várias drogas e em vários cânceres sólidos têm sido descrita, incluindo: câncer de pulmão de não pequenas células, esôfago, mama, estômago, endométrio, bexiga, retinoblastoma, glioma, osteossarcoma, ovário e colorretal. Esta associação foi descrita especialmente para drogas desestabilizadoras de microtúbulos, como o taxol, paclitaxel e docetaxel, mas também para TMZ, platina, doxorrubicina, ácido arsênico, gefitinib e ácido zoledrônico (Bai et al., 2017; Biaoxue et al., 2016; McGrogan et al., 2008; Sun et al., 2017; Watanabe, et al., 2014; Hassan et al., 2015.; Wu et al., 2014).).

VCR pertence à família dos alcaloides da vinca, que são quimioterápicos que desestabilizam a dinâmica dos microtúbulos por interferir na formação dos heterodímeros de tubulina (Coderch et al, 2012). Era utilizada como padrão em combinação com outras drogas (procarbazina e lomustina) no tratamento quimioterápico de pacientes com gliomas malignos, antes da introdução de TMZ para pacientes com GBM (Burton & Prados, 2000).

Alterações ne proteínas do citoesqueleto estão envolvidas na resistência de células tumorais à VCR. Em um modelo *in vivo* de leucemia mieloide aguda, células resistentes à VCR apresentaram aumento de várias proteínas que se ligam a tubulina, entre elas STMN1 (Verrills et al., 2006).

Em diversos modelos *in vitro*, o silenciamento da expressão de STMN1 com siRNA ou shRNA de células de retinoblastoma, carcinoma de esôfago, pulmão, gástrico levou a morte celular por apoptose e diminuição da resistência a VCR e paclitaxel, indicando o papel de STMN1 na resistência a drogas (Mittra et al 2011, Wang et al., 2015; Zhu et al., 2015; Long et al., 2018; Bao et al., 2017; Bai et al., 2017).

FOXO3a também desempenha um papel importante na resistência a drogas em células tumorais, através da sinalização da via PI3K / AKT com envolvimento de FOXO3a, um supressor tumoral (Gomes et al., 2013). FOXO3a reprime a expressão de FOXM1, bem como os genes regulados por este fator de transcrição. (Nestal de Moraes et al., 2016). Este eixo FOXO3a-FOXM1 desempenha uma função essencial na resistência a drogas (Lam et al., 2013).

FOXM1 está envolvido na resistência a platina em câncer de ovário, a gefitinib em adenocarcinoma de pulmão, a 5-fluorouracil em câncer colorretal, a paclitaxel em carcinoma nasofaríngeo, a epirubicina em câncer de mama, a docetaxel em câncer gástrico (Bach et al., 2018).

Adicionalmente, FOXM1 regula o aumento da expressão de STMN1 em células de câncer gástrico resistentes a docetaxel e em células de câncer de pulmão resistentes a inibidores de tirosina quinases (Li et al., 2014; Li et al., 2017). Neste último modelo, as drogas induziram o enriquecimento de células tronco tumorais, promoveram a transição epitélio-mesênquima e conferiram resistência pela ativação da via PI3K/AKT. O bloqueio da via com um inibidor específico levou à diminuição de STMN1 e FOXM1, revertendo a resistência aos medicamentos (Li et al., 2017).

Com base nestes dados do presente trabalho e da literatura, propomos um esquema de via de sinalização na qual estariam envolvidos MELK, FOXM1 e STMN1, importante para eventos cruciais como: progressão do ciclo celular, proliferação, transição epitélio-mesênquima e resistência a fármacos (Figura 19).

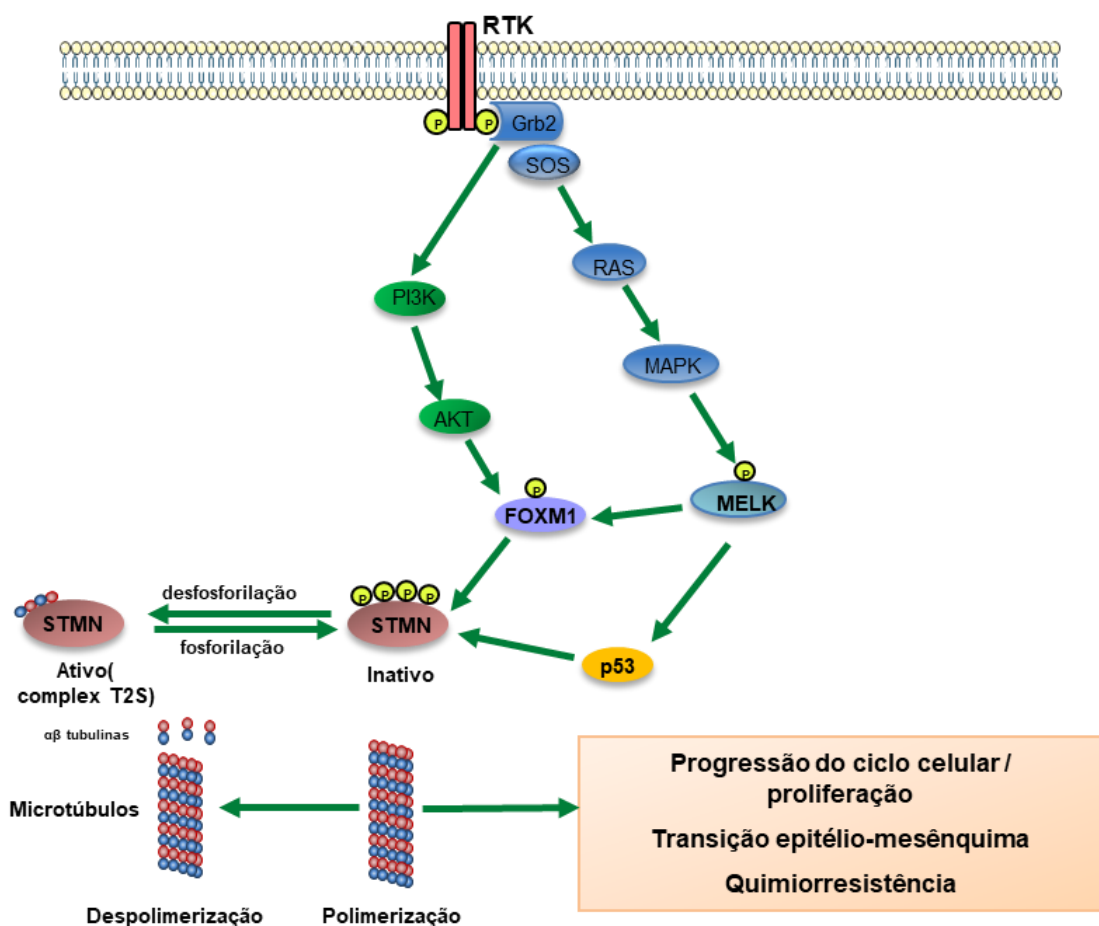


Figura 19 – Via de sinalização MELK, FOXM1 e STMN1. A ativação de um receptor de tirosina quinase (RTK) ativa as vias de sinalização PI3K / AKT e RAS / MAPK. Ambos os caminhos são ativados através da formação do complexo GRB / SOS (*Growth Factor Receptor Bound Protein 2 / Son of Sevenless*), que se liga ao RTK fosforilado. Ambos os PI3K e RAS / MAPK conduzem a fosforilação de STMN1, via MELK e FOXM1. A fosforilação inativa STMN1 e permite

a associação de dímeros de tubulina e polimerização de microtúbulos. A desfosforilação STMN1 ativa a proteína, causando no sequestro de tubulina. Esta dinâmica de ativação / inativação de STMN1 resulta em despolimerização / polimerização de microtúbulos e, conseqüentemente, da progressão do ciclo celular / proliferação, transição epitélio-mesênquima e quimiorresistência (Serachi et al., 2017).

MELK, STMN1 e FOXM1, portanto, são importantes alvos terapêuticos. A inibição pode ser efetiva para aumentar a eficiência no tratamento de pacientes com câncer, incluindo GBM, além e diminuir os efeitos colaterais ou a resistência às drogas quimioterápicas.

6 Conclusões

- Os níveis de expressão de *MELK*, *STMN1* e *FOXM1* estavam aumentados em astrocitomas com o aumento do grau de malignidade na casuística do laboratório e na do TCGA.
- A expressão de *MELK*, *STMN1* e *FOXM1* estava maior no subtipo proneural do que nos subtipos mesenquimal e clássico de GBMs do TCGA.
- *MELK* e *STMN1*, *MELK* e *FOXM1*, e *STMN1* e *FOXM1* apresentaram correlações positivas nos níveis de expressão nos casos de GBMs na casuística do laboratório e na do TCGA.
- O silenciamento de *MELK* nas linhagens celulares U87MG e A172 diminuiu a expressão de *MELK*, *STMN1* e *FOXM1*, bem como a fosforilação das serinas da proteína *STMN1*.
- O silenciamento de *STMN1* nas linhagens celulares U87MG e A172 diminuiu a expressão de *STMN1* e *FOXM1*, mas não afetou a de *MELK*.
- quando silenciado diminuiu significativamente a migração na linhagem U87MG. (ensaio de monocamada)
- O silenciamento de *STMN1* diminuiu a viabilidade celular das linhagens U87MG e A172 e a migração da linhagem U87MG.
- Caso de GBM com alta expressão de *STMN1* apresentam alta proporção de expressão de *FOXM1*, porém sem influência na sobrevida dos pacientes.
- Linhagens U87MG e T98G resistentes à vincristina (VCR) e temozolamida (TMZ) apresentaram aumento da expressão de *STMN1* e *FOXM1* em relação ao controle. *MELK* também aumentou, mas em menores níveis.

REFERÊNCIAS

- Abramoff MD. Image processing with imageJ. *Biophotonics International*:11(7):36-42.
- Ahang et al. Inhibition of maternal embryonic leucine zipper kinase with OTSSP167 displays potent anti-leukemic effects in chronic lymphocytic leukemia. *Oncogene*. 2018 Oct;37(41):5520-5533.
- Simon Anders, Wolfgang Huber: Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biology* 11 (2010) R106.
- Akhtar et al. Stathmin overexpression identifies high risk for lymphatic metastatic recurrence in pN0 esophageal squamous cell carcinoma patients. *J Gastroenterol Hepatol*. 2014 May;29(5):944-50.
- Alachkar et al. Preclinical efficacy of maternal embryonic leucine-zipper kinase (MELK) inhibition in acute myeloid leukemia. *Oncotarget*. 2014 Dec 15;5(23):12371-82.
- Ahmadi, Rezvan, et al. No Prognostic Value of IDH1 Mutations in a Series of 100 WHO Grade II Astrocytomas. *Journal of Neuro-Oncology*, vol. 109, no. 1, 2012, pp. 15–22.
- Aksoy, Asude, et al. Predictive Value of Stathmin-1 and Osteopontin Expression for Taxan Resistance in Metastatic Castrate-Resistant Prostate Cancer. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, vol. 33, no. 3, 2017, pp. 560–65.
- Aminoff, Michael J., et al. *Handbook of Clinical Neurology - Bacterial Infections*. New York, 2010.
- Andersen, S. S., et al. Mitotic Chromatin Regulates Phosphorylation of Stathmin/Op18. *Nature*, vol. 389, no. 6651, Oct. 1997, pp. 640–43.
- Bai, Tuya, et al. “High STMN1 Level Is Associated with Chemo-Resistance and Poor Prognosis in Gastric Cancer Patients.” *British Journal of Cancer*, vol. 116, no. 9, Nature Publishing Group, 2017, pp. 1177–85.
- Bao P et al. High STMN1 expression is associated with cancer progression and chemo-resistance in lung squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2017 Dec;24(13):4017-4024.
- Bach et al. The Dominant Role of Forkhead Box Proteins in Cancer. *Int J Mol Sci*. 2018 Oct 22;19(10).
- Beke et al. MELK-T1, a small-molecule inhibitor of protein kinase MELK, decreases DNA-damage tolerance in proliferating cancer cells. *Biosci Rep*. 2015 Oct 2;35(6).
- Beke, L., et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: A Summary. *Cancer Research*, vol. 131, no. 6, Springer Berlin Heidelberg, 2015, pp. 803–20.
- Belletti, Barbara, and Gustavo Baldassarre. Stathmin: A Protein with Many Tasks. New Biomarker and Potential Target in Cancer. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, vol. 15, no. 11, 2011, pp. 1249–66.
- Belletti B, Baldassarre G. Stathmin: a protein with many tasks. New biomarker and potential target in cancer. *Expert Opin Ther Targets*. 2011 Nov;15(11):1249-66.
- Belmont, L. D., and T. J. Mitchison. Identification of a Protein That Interacts with Tubulin Dimers and Increases the Catastrophe Rate of Microtubules. *Cell*, vol. 84, no. 4, Feb. 1996, pp. 623–31.

- Beretta, L., et al. Multiple Phosphorylation of Stathmin. Identification of Four Sites Phosphorylated in Intact Cells and in Vitro by Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase and P34cdc2. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 268, no. 27, Sept. 1993, pp. 20076–84.
- Biaoxue, Rong, Liu Hua, et al. Overexpression of Stathmin Promotes Metastasis and Growth of Malignant Solid Tumors: A Systemic Review and Meta-Analysis. *Oncotarget*, vol. 7, no. 48, 2016.
- Biaoxue, Rong, Cai Xiguang, et al. Stathmin-Dependent Molecular Targeting Therapy for Malignant Tumor: The Latest 5 Years' Discoveries and Developments. *Journal of Translational Medicine*, vol. 14, BioMed Central, 2016, pp. 1–18.
- Bièche et al. Overexpression of the stathmin gene in a subset of human breast cancer. *Br J Cancer*. 1998 Sep;78(6):701-9.
- Brasil. “Instituto Nacional de Câncer-INCA, Estimativas Da Incidência e Mortalidade Por Câncer.” Ministério Da Saúde., 2018, <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>.
- Brattsand et al. Cell-cycle-regulated phosphorylation of oncoprotein 18 on Ser16, Ser25 and Ser38. *European Journal of Biochemistry*, vol. 220, no. 2, 1994, pp. 359–68.
- Bolomsky et al. Maternal embryonic leucine zipper kinase is a novel target for proliferation-associated high-risk myeloma. *Haematologica*. 2018 Feb;103(2):325-335.
- Boutard et al. 5-Keto-3-cyano-2,4-diaminothiophenes as selective maternal embryonic leucine zipper kinase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. 2019 Feb 15;29(4):607-613.
- Brunden, Kurt R., et al. Altered Microtubule Dynamics in Neurodegenerative Disease: Therapeutic Potential of Microtubule-Stabilizing Drugs.” *Neurobiology of Disease*, vol. 105, 2017, pp. 328–35.
- Burton EC, Prados MD. Malignant gliomas. *Curr Treat Options Oncol*. 20001(5):459-68.
- Budczies, Jan, et al. Chromosome 9p Copy Number Gains Involving PD-L1 Are Associated with a Specific Proliferation and Immune-Modulating Gene Expression Program Active across Major Cancer Types. *BMC Medical Genomics*, vol. 10, no. 1, Dec. 2017, p. 74.
- Cao, Yongkuan, et al. Clinical Significance of UGT1A1 Polymorphism and Expression of ERCC1, BRCA1, TYMS, RRM1, TUBB3, STMN1 and TOP2A in Gastric Cancer. *BMC Gastroenterology*, vol. 17, no. 1, BMC Gastroenterology, 2017, pp. 1–13.
- Chai, Rui-Chao, et al. Systematically Characterize the Clinical and Biological Significances of 1p19q Genes in 1p/19q Non-Codeletion Glioma. *Carcinogenesis*, June 2019.
- Chandran, Uma R., et al. Gene Expression Profiles of Prostate Cancer Reveal Involvement of Multiple Molecular Pathways in the Metastatic Process. *BMC Cancer*, vol. 7, no. 1, Dec. 2007, p. 64.
- Chen et al. Stathmin 1 is a potential novel oncogene in melanoma. *Oncogene*. 2013 Mar 7;32(10):1330-7.
- Chlenski et al. Maternal Embryonic Leucine Zipper Kinase (MELK), a Potential Therapeutic Target for Neuroblastoma. *Mol Cancer Ther*. 2019 Mar;18(3):507-516.
- Chung et al. Preclinical evaluation of biomarkers associated with antitumor activity of MELK inhibitor. *Oncotarget*. 2016 Apr 5;7(14):18171-82.
- Chung et al. Development of an orally-administrative MELK-targeting inhibitor that suppresses the growth of various types of human cancer. *Oncotarget*. 2012 Dec;3(12):1629-40.
- Chung, Cheng Ho, et al. “Maternal Embryonic Leucine Zipper Kinase Regulates Pancreatic

- Ductal, but Not β -Cell, Regeneration.” *Physiological Reports*, vol. 2, no. 9, 2014, pp. 1–11.
- Collins, V. Peter, et al. Pilocytic Astrocytoma: Pathology, Molecular Mechanisms and Markers. *Acta Neuropathologica*, vol. 129, no. 6, June 2015, pp. 775–88.
- Coderch et al. Tubulin-based structure-affinity relationships for antimitotic Vinca alkaloids. *Anticancer Agents Med Chem*. 2012 Mar;12(3):219-25
- Curmi, P. A., et al. Stathmin and Its Phosphoprotein Family: General Properties, Biochemical and Functional Interaction with Tubulin. *Cell Structure and Function*, vol. 24, no. 5, Oct. 1999, pp. 345–57,
- Curmi et al. Overexpression of stathmin in breast carcinomas points out to highly proliferative tumours. *Br J Cancer*. 2000 Jan;82(1):142-50.
- Dean, Michael. The Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily Introduction to ABC Protein and Gene Organization. no. Md, 2002, pp. 1–50.
- Delgado-López, P. D., et al. Diffuse Low-Grade Glioma: A Review on the New Molecular Classification, Natural History and Current Management Strategies. *Clinical & Translational Oncology: Official Publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, vol. 19, no. 8, Aug. 2017, pp. 931–44.
- Deng et al. Pathways in Breast Cancer Using Bioinformatic Analysis. *Front Genet*. 2019 Aug. *Front Genet*. 2019 Aug 2;10:695.
- DeWitt, John C., et al. The 2016 WHO Classification of Central Nervous System Tumors. *Current Opinion in Neurology*, vol. 30, no. 6, 2017, pp. 643–49.
- Dong, Baijing, et al. Stathmin Expression in Glioma-Derived Microvascular Endothelial Cells: A Novel Therapeutic Target. *Oncology Reports*, vol. 27, no. 3, 2012, pp. 714–18.
- Fabris, Linda, et al. P27 Kip1 Controls H-Ras/MAPK Activation and Cell Cycle Entry via Modulation of MT Stability . *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 112, no. 45, 2015, pp. 13916–21.
- Fawcett, Don Wayne, et al. Bloom and Fawcett : A Textbook of Histology. Chapman & Hall, 1994, <https://www.worldcat.org/title/bloom-and-fawcett-a-textbook-of-histology/oclc/863275856>.
- Galatro TF, Sola P, Moretti IF, Miura FK, Oba-Shinjo SM, Mariel SKN, Lerario AM. Correlation between molecular features and genetic subtypes of Glioblastoma: critical analysis in 109 cases. *MedicalExpress*. 2017 Oct; 4(5):M170505
- Gallego O. Nonsurgical treatment of recurrent glioblastoma. *Curr Oncol*. 2015 Aug;22(4):e273-e281.
- Ganguly, R., et al. “Maternal Embryonic Leucine Zipper Kinase: Key Kinase for Stem Cell Phenotype in Glioma and Other Cancers. *Molecular Cancer Therapeutics*, vol. 13, no. 6, 2014, pp. 1393–98.
- Ganguly, Ranjit, et al. MELK—a Conserved Kinase: Functions, Signaling, Cancer, and Controversy. *Clinical and Translational Medicine*, vol. 4, no. 1, 2015.
- Gartel, Andrei L. FOXM1 in Cancer: Interactions and Vulnerabilities. *Cancer Research*, vol. 77, no. 12, June 2017, pp. 3135–39.
- Gasparini, Brenda, et al. Artigo Original Mortality from Central Nervous System Tumors in Children and Adolescents in the City Of. Vol. 21, no. 3, 2013, pp. 272–80.

- Giuliano et al. MELK expression correlates with tumor mitotic activity but is not required for cancer growth. *Elife*. 2018 Feb 8;7.
- Glantz SA. How to analyse survival data. In: Glantz SA. *Primer in Biostatistics*. 7th ed. New York: McGraw-Hill Medical; 2011. p.229-44
- Gong, Xianling, et al. Sanguinarine Triggers Intrinsic Apoptosis to Suppress Colorectal Cancer Growth through Disassociation between STRAP and MELK. *BMC Cancer*, vol. 18, no. 1, BMC Cancer, 2018, pp. 1–15.
- Gouazé-Andersson, Valérie, et al. FGFR1/FOXM1 Pathway: A Key Regulator of Glioblastoma Stem Cells Radioresistance and a Prognosis Biomarker. *Oncotarget*, vol. 9, no. 60, 2018, pp. 31637–49.
- Gray, Daniel, et al. Maternal Embryonic Leucine Zipper Kinase/Murine Protein Serine-Threonine Kinase 38 Is a Promising Therapeutic Target for Multiple Cancers. *Cancer Research*, vol. 65, no. 21, 2005, pp. 9751–61.
- Grimm, Sean A., and Marc C. Chamberlain. CNS Oncology Anaplastic Astrocytoma. *CNS Oncology*, vol. 5, 2016, pp. 145–57.
- Goel Manish, et al., Understanding survival analysis: Kaplan-Meier estimate. *Int J Ayurveda Res*. 2010 Oct-Dec; 1(4): 274–278.
- Gomes et al. Role and regulation of the forkhead transcription factors FOXO3a and FOXM1 in carcinogenesis and drug resistance. *Chin J Cancer*. 2013 Jul;32(7):365-70.
- Gu, Chunyu, et al. Tumor-Specific Activation of the C-JUN/MELK Pathway Regulates Glioma Stem Cell Growth in a P53-Dependent Manner. *STEM CELLS*, vol. 31, no. 5, May 2013, pp. 870–81.
- Gu et. Tumor-specific activation of the C-JUN/MELK pathway regulates glioma stem cell growth in a p53-dependent manner. *Stem Cells*. 2013 May;31(5):870-81.
- Guan et al. MELK is a novel therapeutic target in high-risk neuroblastoma. *Oncotarget*. 2017 Dec 20;9(2):2591-2602.
- Guo-Bin Liao, et al. Regulation of the master regulator FOXM1 in cancer *Cell Communication and Signaling* volume 16, Article number: 57 (2018)
- Gutmann DH, et al. Somatic neurofibromatosis type (NF1) inactivation characterizes NF1-associated pilocytic astrocytoma. *Genome Res*. 2013 Mar;23(3):431-9.
- Hanash, S. M., et al. Identification of a Polypeptide Associated with the Malignant Phenotype in Acute Leukemia. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 263, no. 26, 1988, pp. 12813–15.
- Hassan, Mohamed Kamel, et al. P18 / Stathmin1 Is Regulated by MiR-31 in Ovarian Cancer in Response to Taxane. *Oncoscience*, vol. 2, no. 3, 2015, pp. 294–308.
- Hayashi, Kanehiro, et al. Phosphorylation of the Tubulin-Binding Protein, Stathmin, by Cdk5 and MAP Kinases in the Brain. *Journal of Neurochemistry*, vol. 99, no. 1, 2006, pp. 237–50.
- Harger et al. Computational insights into the binding of IN17 inhibitors to MELK. *J Mol Model*. 2019 May 8;25(6):151
- He et al. Elevated STMN1 promotes tumor growth and invasion in endometrial carcinoma. *Tumour Biol*. 2016 Jul;37(7):9951-8.

- Hebbard LW, Maurer J, Miller A, Hassell J, Oshima RG, Terskikh AV. Maternal embryonic leucine zipper kinase is upregulated and required in mammary tumor-initiating cells in vivo. *Cancer Res.* 2010 Nov 1;70(21):8863-73.
- Hemdan, T., et al. The Prognostic Value and Therapeutic Target Role of Stathmin-1 in Urinary Bladder Cancer. *British Journal of Cancer*, vol. 111, no. 6, Sept. 2014, pp. 1180–87.
- Hiwatashi et al., Expression of Maternal Embryonic Leucine Zipper Kinase (MELK) Correlates to Malignant Potentials in Hepatocellular Carcinoma. *Anticancer Res.* 2016 Oct;36(10):5183-5188.
- Holmfeldt, P., et al. The Catastrophe-Promoting Activity of Ectopic Op18/Stathmin Is Required for Disruption of Mitotic Spindles but Not Interphase Microtubules. *Molecular Biology of the Cell*, edited by J. Richard McIntosh, vol. 12, no. 1, Jan. 2001, pp. 73–83.
- Hsu et al. Overexpression of stathmin 1 confers an independent prognostic indicator in nasopharyngeal carcinoma. *Tumour Biol.* 2014 Mar;35(3):2619-29.
- Ichimura, Koichi, et al. Diffusely Infiltrating Astrocytomas: Pathology, Molecular Mechanisms and Markers. *Acta Neuropathologica*, vol. 129, no. 6, Springer Berlin Heidelberg, 2015, pp. 789–808.
- Imura, Satoru, et al. MiR-223 and Stathmin-1 Expression in Non-Tumor Liver Tissue of Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Anticancer Research*, vol. 37, no. 10, Oct. 2017, pp. 5877–83.
- Inoue, Hiroyuki, et al. Effective Growth-Suppressive Activity of Maternal Embryonic Leucine-Zipper Kinase (MELK) Inhibitor against Small Cell Lung Cancer. *Oncotarget*, vol. 7, no. 12, 2016.
- Favre J, Deruaz JP, de Tribolet N. Pilocytic Cerebellar Astrocytoma in Adults: Case Report. *Surgical Neurology*, vol. 39, no. 5, 1993, pp. 360–64,
- Janostiak et al. Promotes Melanoma Growth by Stimulating the NF- κ B Pathway. *Cell Rep.* 2017 Dec 5;21(10):2829-2841.
- Jeon, T. Y., et al. Overexpression of Stathmin1 in the Diffuse Type of Gastric Cancer and Its Roles in Proliferation and Migration of Gastric Cancer Cells. *British Journal of Cancer*, vol. 102, no. 4, 2010, pp. 710–18.
- Jiang, Pengfei, and Deli Zhang. Maternal Embryonic Leucine Zipper Kinase (MELK): A Novel Regulator in Cell Cycle Control, Embryonic Development, and Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 14, no. 11, 2013, pp. 21551–60.
- Jiang et al. Down-regulation of FoxM1 by thiostrepton or small interfering RNA inhibits proliferation, transformation ability and angiogenesis, and induces apoptosis of nasopharyngeal carcinoma cells. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;7:5450–60.
- Joshi et al. MELK-dependent FOXM1 phosphorylation is essential for proliferation of glioma stem cells. *Stem Cells.* 2013 Jun;31(6):1051-63.
- Jurmeister et al. Identification of potential therapeutic targets in prostate cancer through a cross-species approach. *EMBO Mol Med.* 2018 Mar;10(3). pii: e8274.
- Jun, Hyun Jung, et al. “A PDGFR α -Driven Mouse Model of Glioblastoma Reveals a Stathmin1-Mediated Mechanism of Sensitivity to Vinblastine.” *Nature Communications*, vol. 9, no. 1, Springer US, 2018.
- Junqueira, L.C.; CARNEIRO, J. *SciELO Brasil - Guanabara Koogan*, 2017, 13^o. edição, pp. 222–26,

- Kappadakunnel et al. Stem cell associated gene expression in glioblastoma multiforme: relationship to survival and the subventricular zone. *J Neurooncol.* 2010 Feb;96(3):359-67.
- Kato et al. Oncogenic roles of TOPK and MELK, and effective growth suppression by small molecular inhibitors in kidney cancer cells. *Oncotarget.* 2016 Apr 5;7(14):17652-64.
- Ke et al. Overexpression of stathmin 1 is associated with poor prognosis of patients with gastric cancer. *Tumour Biol.* 2013 Oct;34(5):3137-45.
- Kendirlinan, Reşat, et al. Rapid Drug Desensitization with Chemotherapeutics (Platins, Taxanes, and Others): A Single-Center Retrospective Study. *International Archives of Allergy and Immunology*, 2019.
- Kievit, Forrest M., et al. Doxorubicin Loaded Iron Oxide Nanoparticles Overcome Multidrug Resistance in Cancer in Vitro. *Journal of Controlled Release*, vol. 152, no. 1, Elsevier, May 2011, pp. 76–83.
- Kim et al. EZH2 protects glioma stem cells from radiation-induced cell death in a MELK/FOXO1-dependent manner. *Stem Cell Reports.* 2015 Feb 10;4(2):226-38.
- Kiseljak-Vassiliades et al. Elucidating the Role of the Maternal Embryonic Leucine Zipper Kinase in Adrenocortical Carcinoma. *Endocrinology.* 2018 Jul 1;159(7):2532-2544.
- Koike et al. Identification of differentially expressed proteins in oral squamous cell carcinoma using a global proteomic approach. *Int J Oncol.* 2005 Jul;27(1):59-67.
- Komatsu et al., Molecular features of triple negative breast cancer cells by genome-wide gene expression profiling analysis. *Int J Oncol.* 2013 Feb;42(2):478-506.
- Kouzu et al. Overexpression of stathmin in oral squamous-cell carcinoma: correlation with tumour progression and poor prognosis. *Br J Cancer.* 2006 Mar 13;94(5):717-23.
- Kohler, Reto S., et al. MELK Expression in Ovarian Cancer Correlates with Poor Outcome and Its Inhibition by OTSP167 Abrogates Proliferation and Viability of Ovarian Cancer Cells. *Gynecologic Oncology*, vol. 145, no. 1, The Authors, 2017, pp. 159–66.
- Kuner R, Fälth M, Pressinotti NC, Brase JC, Puig SB, Metzger J, Gade S, Schäfer G, Bartsch G, Steiner E, Klocker H, Sültmann H. The maternal embryonic leucine zipper kinase (MELK) is upregulated in high-grade prostate cancer. *J Mol Med (Berl).* 2013 Feb;91(2):237-48.
- Kuo et al. High expression of stathmin protein predicts a fulminant course in medulloblastoma. *J Neurosurg Pediatr.* 2009 Jul;4(1):74-80.
- Kuang, Xia-Ying, et al. Stathmin and Phospho-Stathmin Protein Signature Is Associated with Survival Outcomes of Breast Cancer Patients. *Oncotarget*, vol. 6, no. 26, 2015, pp. 22227–38.
- Kuner, Ruprecht, et al. The Maternal Embryonic Leucine Zipper Kinase (MELK) Is Upregulated in High-Grade Prostate Cancer. *Journal of Molecular Medicine*, vol. 91, no. 2, 2013, pp. 237–48.
- Laoukili, Jamila, et al. FoxM1: At the Crossroads of Ageing and Cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, vol. 1775, no. 1, Elsevier, Jan. 2007, pp. 92–102.
- Lam et al. Forkhead box proteins: Tuning forks for transcriptional harmony. *Nat. Rev. Cancer.* 2013;13:482
- Larsson, N., et al. "Control of Microtubule Dynamics by Oncoprotein 18: Dissection of the Regulatory Role of Multisite Phosphorylation during Mitosis." *Molecular and Cellular Biology*, vol. 17, no. 9, Sept. 1997, pp. 5530–39.

- Li et al. FOXM1 mediates resistance to docetaxel in gastric cancer via up-regulating Stathmin. *J Cell Mol Med.* 2014 May;18(5):811-23.
- Li et al. Maternal embryonic leucine zipper kinase serves as a poor prognosis marker and therapeutic target in gastric cancer. *Oncotarget.* 2016 Feb 2;7(5):6266-80.
- Li et al. Prognostic value of FOXM1 in solid tumors: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget.* 2017 May 9;8(19):32298-32308.
- Li, Gang, et al. MELK as a Potential Target to Control Cell Proliferation in Triple-negative Breast Cancer MDA-MB-231 Cells. *Oncology Letters*, vol. 15, no. 6, Apr. 2018, pp. 9934–40.
- Li X, Yao R, Yue L, Qiu W, Qi W, Liu S, Yao Y and Liang J: FOXM1 mediates resistance to docetaxel in gastric cancer via up-regulating Stathmin. *J Cell Mol Med* 18: 811-823, 2014.
- Li, Meng, et al. Activation of an AKT/FOXM1/STMN1 Pathway Drives Resistance to Tyrosine Kinase Inhibitors in Lung Cancer. *British Journal of Cancer*, vol. 117, no. 7, Nature Publishing Group, 2017, pp. 974–83.
- Liao et al. Regulation of the master regulator FOXM1 in cancer. *Cell Commun Signal.* 2018 Sep 12;16(1):57.
- Lin et al. Involvement of maternal embryonic leucine zipper kinase (MELK) in mammary carcinogenesis through interaction with Bcl-G, a pro-apoptotic member of the Bcl-2 family. *Breast Cancer. Breast Cancer Res.* 2007;9(1):R17.
- Liu et al. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer.* 2006 Dec 2;5:67.
- Liu et al. EZH2 Phosphorylation Promotes Self-Renewal of Glioma Stem-Like Cells Through NF- κ B Methylation. *Front Oncol.* 2019 Jul 16;9:641.
- Liu et al. FoxM1B is overexpressed in human glioblastomas and critically regulates the tumorigenicity of glioma cells. *Cancer Res.* 2006;66(7):3593-602.
- Liu et al. MELK and EZH2 Cooperate to Regulate Medulloblastoma Cancer Stem-like Cell Proliferation and Differentiation. *Mol Cancer Res.* 2017 Sep;15(9):1275-1286.
- Livak KJ1, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods.* 2001 Dec;25(4):402-8.
- Long, Dan, et al. RNAi Targeting STMN Alleviates the Resistance to Taxol and Collectively Contributes to down Regulate the Malignancy of NSCLC Cells in Vitro and in Vivo. *Cell Biology and Toxicology*, vol. 34, no. 1, 2018, pp. 7–21.
- Louis, David N., et al. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathologica*, vol. 114, no. 2, 2007, pp. 97–109.
- Lu, Yu, et al. Stathmin Destabilizing Microtubule Dynamics Promotes Malignant Potential in Cancer Cells by Epithelial-Mesenchymal Transition. *Hepatobiliary and Pancreatic Diseases International*, vol. 13, no. 4, 2014.
- Lucena, Rita De Cássia G., et al. Correlação Clínico-Topográfica Em Glioblastomas Multiformes Nas Síndromes Motoras: Significados Fisiopatológicos. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, vol. 64, no. 2 B, 2006, pp. 441–45.
- Ma et al. Stathmin is overexpressed and regulated by mutant p53 in oral squamous cell carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res.* 2017 Aug 14;36(1):109.
- Maachani UB, Shankavaram U, Kramp T, Tofilon PJ, Camphausen K, Tandle AT. FOXM1 and STAT3 Interaction Confers Radioresistance in Glioblastoma Cells. - *Oncotarget.* 2016 Nov 22;7(47):77365-77377.

- Malheiros, Suzana Fleury, et al. Astrocitomas Difusos de Baixo Grau de Malignidade. *Revista Neurociências*, vol. 6, no. 2, 1998, pp. 75–80.
- Manning, G., et al. The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science (New York, N.Y.)*, vol. 298, no. 5600, Dec. 2002, pp. 1912–34.
- Mao, Qingyan, et al. “Prognostic Role of High Stathmin 1 Expression in Patients with Solid Tumors: Evidence from a Meta-Analysis. *Cellular Physiology and Biochemistry*, vol. 50, no. 1, 2018, pp. 79–91.
- Marie, Suely K.N., et al. Maternal Embryonic Leucine Zipper Kinase Transcript Abundance Correlates with Malignancy Grade in Human Astrocytomas.” *International Journal of Cancer*, vol. 122, no. 4, 2008, pp. 807–15.
- Marie, Suely Kazue Nagahashi, et al. Stathmin Involvement in the Maternal Embryonic Leucine Zipper Kinase Pathway in Glioblastoma. *Proteome Science*, vol. 14, no. 1, 2016, p. 6.
- Marie et al. Maternal embryonic leucine zipper kinase transcript abundance correlates with malignancy grade in human astrocytomas. *Int J Cancer*. 2008 Feb 15;122(4):807-15.
- Marranci, Andrea, et al. The Landscape of BRAF Transcript and Protein Variants in Human Cancer. *Molecular Cancer*, vol. 16, no. 1, Dec. 2017, p. 85.
- Meel et al. Inhibition in Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Clin Cancer Res*. 2018 Nov 15;24(22):5645-5657.
- Melhem et al. Quantitative analysis of Op18 phosphorylation in childhood acute leukemia. *Leukemia*. 1997 Oct;11(10):1690-5.
- McGrogan, Barbara T., et al. Taxanes, Microtubules and Chemoresistant Breast Cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, vol. 1785, no. 2, 2008, pp. 96–132.
- Minata et al Multi-kinase inhibitor C1 triggers mitotic catastrophe of glioma stem cells mainly through MELK kinase inhibition. *PLoS One*. 2014 Apr 16;9(4):e92546.
- Mistry, S J, et al. Role for Protein Phosphatases in the Cell-Cycle-Regulated Phosphorylation of Stathmin. *The Biochemical Journal*, vol. 334 (Pt 1), no. 1, Aug. 1998, pp. 23–29.
- Mitra et al. Reversal of stathmin-mediated microtubule destabilization sensitizes retinoblastoma cells to a low dose of antimicrotubule agents: a novel synergistic therapeutic intervention. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011 Jul 23;52(8):5441-8.
- Mistry, Sucharita J, et al. Role for Protein Phosphatases in the Cell-Cycle-Regulated Phosphorylation of Stathmin. *Biochem. J*, vol. 334, 1998, pp. 23–29.
- Nandi, Deeptashree, et al. FoxM1: Repurposing an Oncogene as a Biomarker. *Seminars in Cancer Biology*, vol. 52, no. August 2017, Elsevier, 2018, pp. 74–84.
- Nakamura et al. Development and pharmacologic characterization of deoxybromophospha sugar derivatives with antileukemic activity. *Invest New Drugs*. 2010 Aug;28(4):381-91.
- Nakano et al. Maternal embryonic leucine zipper kinase is a key regulator of the proliferation of malignant brain tumors, including brain tumor stem cells. *J Neurosci Res*. 2008 Jan;86(1):48-60.
- Nakano et al. Siomycin A targets brain tumor stem cells partially through a MELK-mediated pathway. *Neuro Oncol*. 2011 Jun;13(6):622-34.
- Nie et al. Overexpression of stathmin 1 is a poor prognostic biomarker in non-small cell lung cancer. *Lab Invest*. 2015.
- Neben, Kai, et al. Microarray-Based Screening for Molecular Markers in Medulloblastoma Revealed STK15 as Independent Predictor for Survival. *Cancer research*. vol. 64, 2004, pp. 3103–11.

- Nestal de Moraes et al. Insights into a Critical Role of the FOXO3a-FOXM1 Axis in DNA Damage Response and Genotoxic Drug Resistance. *Curr Drug Targets*. 2016;17(2):164-77.
- Novak, Kris. Conference Report--Protein Kinase Inhibitors in Cancer Treatment: Mixing and Matching? Highlights of the Keystone Symposium on Protein Kinases and Cancer; *MedGenMed : Medscape General Medicine*, vol. 6, no. 2, Apr. 2004, p. 25,
- Ogino et al. A cohort study of STMN1 expression in colorectal cancer: body mass index and prognosis. *Am J Gastroenterol*. 2009 Aug;104(8):2047-56.
- 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*, vol. 46, no. 1, 2016, pp. 31–39.
- Omuro, Antonio, and Lisa M. DeAngelis. Glioblastoma and Other Malignant Gliomas. *JAMA*, vol. 310, no. 17, Nov. 2013, p. 1842.
- Ostrom, Quinn T., et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2009-2013. *Neuro-Oncology*, vol. 18, no. suppl_5, Oct. 2016, pp. v1–75..
- Patil, Shruti, et al. “Combination of Clotam and Vincristine Enhances Anti-Proliferative Effect in Medulloblastoma Cells.” *Gene*, vol. 705, no. February, 2019, pp. 67–76.
- Peng et al. oxM1-mediated RFC5 expression promotes temozolomide resistance. *Cell Biol Toxicol*. 2017 Dec;33(6):527-537.
- Petrovic V, Costa RH, Lester FL, Pradip R, Tyner AL. FoxM1 Regulates Growth Factor-induced Expression of Kinase-interacting Stathmin (KIS) to Promote Cell Cycle Progression. *The Journal of Biological Chemistry* 283, 453-460.
- Pickard et al., dysregulated expression of Fau and MELK is associated with poor prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2009;11(4):R60.
- Rakic P, E. Knyihar-Csillik and B. Csillik. Polarity of Microtubule Assemblies during Neuronal Cell Migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 93, no. 2, 1996, pp. 9218–22.
- Rajkumar et al. Identification and validation of genes involved in cervical tumorigenesis. *BMC Cancer*. 2011 Feb 22;11:80.
- Qiu et al. Weighted gene co-expression network analysis reveals modules and hub genes associated with the development of breast cancer. *Medicine (Baltimore)*. 2019 Feb;98(6):e14345.
- Reis, Gerald F., and Tarik Tihan. Therapeutic Targets in Pilocytic Astrocytoma Based on Genetic Analysis. *Seminars in Pediatric Neurology*, vol. 22, no. 1, Elsevier, 2015, pp. 23–27.
- Ren et al. MELK inhibition targets cancer stem cells through downregulation of SOX2 expression in head and neck cancer cells. *Oncol Rep*. 2019 Apr;41(4):2540-2548. *Res*. 2007;9(1):R17.
- Reuss, David E., et al. IDH mutant diffuse and anaplastic astrocytomas have similar age at presentation and little difference in survival: a grading problem for WHO. *Vol. 129, no. 6, 2016, pp. 867–73.*
- Reyes, Henry D., et al. High Stathmin Expression Is a Marker for Poor Clinical Outcome in Endometrial Cancer: An NRG Oncology Group/Gynecologic Oncology Group Study. *Gynecologic Oncology*, vol. 146, no. 2, Aug. 2017, pp. 247–53.
- Rong et al. Increased stathmin correlates with advanced stage and poor survival of non-small cell lung cancer. *Cancer Biomark*. 2017;19(1):35-43.

- Roos et al. Expression of oncoprotein 18 in human leukemias and lymphomas. *Leukemia*. 1993 Oct;7(10):1538-46.
- Rubin, H. The Membrane, Magnesium, Mitosis (MMM) Model of Cell Proliferation Control. *Magnesium Research*, vol. 18, no. 4, 2005, pp. 268–74.
- Sabherwal, Yamini, et al. PDEF Downregulates Stathmin Expression in Prostate Cancer. *International Journal of Oncology*, vol. 40, no. 6, 2012, pp. 1889–99.
- Santivasi, Wil L., and Fen Xia. The Role and Clinical Significance of DNA Damage Response and Repair Pathways in Primary Brain Tumors. *Cell & Bioscience*, vol. 3, no. 1, 2013, p. 10.
- Sattiraju, Anirudh, and Akiva Mintz. Pericytes in Glioblastomas: Multifaceted Role Within Tumor Microenvironments and Potential for Therapeutic Interventions. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 1147, 2019, pp. 65–91.
- Stavrovskaya AA, Shushanov SS, Rybalkina EY. Problems of Glioblastoma Multiforme Drug Resistance. *Biochemistry (Mosc)*. 2016 Feb;81(2):91-100.
- Schimmack, Simon, et al. Stathmin in Pancreatic Neuroendocrine Neoplasms: A Marker of Proliferation and PI3K Signaling. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, vol. 36, no. 1, Jan. 2015, pp. 399–408.
- Schwartzbaum, Judith A., et al. Epidemiology and Molecular Pathology of Glioma. *Nature Clinical Practice Neurology*, vol. 2, no. 9, 2006, pp. 494–503, doi:10.1038/ncpneuro0289.
- Serachi, Fernanda de Oliveira, et al. Relevant Coexpression of STMN1, MELK and FOXM1 in Glioblastoma and Review of the Impact of STMN1 in Cancer Biology. *Medical Express*, vol. 4, no. 5, 2017, pp. 1–10.
- Simon et al., 2017. MELK-inhibitor in triple-negative breast cancer cells indicate context-dependent response with p53 as a key determinant. *PLoS One*. 2017 Feb 24;12(2):e0172832.
- Singer, Stephan, et al. Coordinated Expression of Stathmin Family Members by Far Upstream Sequence Element-Binding Protein-1 Increases Motility in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Research*, vol. 69, no. 6, 2009, pp. 2234–43.
- Shu, Feng, et al. Stathmin Gene Silencing Suppresses Proliferation, Migration and Invasion of Gastric Cancer Cells via AKT/SCLU and STAT3 Signaling. *International Journal of Oncology*, vol. 54, no. 3, 2019, pp. 1086–98.
- Song et al. siRNA targeting stathmin inhibits invasion and enhances chemotherapy sensitivity of stem cells derived from glioma cell lines. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2014 Dec;46(12):1034-40.
- Sousa, Juliana Ferreira De, et al. A Resistência Das Células T98G e U87MG à Temozolamida Está Correlacionada Com a Expressão de Genes de Reparo de DNA. *Rev Ciênc Farm Básica Apl*. 2015;36(2):213-218.
- Sun et al. Overexpression of stathmin is resistant to paclitaxel treatment in patients with non-small cell lung cancer. *Tumour Biol*. 2015 Sep;36(9):7195-204.
- Suzuki, Shigemasa, et al. High Stathmin 1 Expression Is Associated with Poor Prognosis and Chemoradiation Resistance in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *International Journal of Oncology*, vol. 50, no. 4, Mar. 2017, pp. 1184–90.
- Tan, Hwee Tong, et al. Proteomic Analysis of Colorectal Cancer Metastasis: Stathmin-1 Revealed as a Player in Cancer Cell Migration and Prognostic Marker. *Journal of Proteome Research*, vol. 11, no. 2, 2012, pp. 1433–45.

- Tao Du, Ying Qu, Jianfang Li, Hao Li, Liping Su, Quan Zhou, Min Yan, Chen Li, Zhenggang Zhu and Bingya Liu*, et al. Maternal Embryonic Leucine Zipper Kinase Enhances Gastric Cancer Progression via the FAK/Paxillin Pathway. *Molecular Cancer*, vol. 13, 2014, pp. 1–14.
- Teh et al. FOXM1 is a downstream target of Gli1 in basal cell carcinomas. *Cancer Res.* 2002 Aug 15;62(16):4773-80.
- Tournebize R, Andersen SS, Verde F, Dorée M, Karsenti E, Hyman AA. Distinct roles of PP1 and PP2A-like phosphatases in control of microtubule dynamics during mitosis. *EMBO J.* 1997 Sep 15;16(18):5537-49.
- . Valente V, Teixeira SA, Neder L, Okamoto OK, Oba-Shinjo SM, Marie SKN, et al. Selection of suitable housekeeping genes for expression analysis in glioblastoma using quantitative RT-PCR. *BMC Mol Biol.* 2009;10:17.
- Vemu, Annapurna, et al. Tubulin Isoform Composition Tunes Microtubule Dynamics. *Molecular Biology of the Cell*, vol. 28, no. 25, 2017, pp. 3564–72.
- 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*, vol. 17, no. 1, Jan. 2010, pp. 98–110.
- Wadayama B, Toguchida J, Shimizu T, Ishizaki K, Sasaki MS, Kotoura Y and Yamamuro T. Mutation spectrum of the retinoblastoma gene in osteosarcomas. *Cancer research.* 1994; 54:3042-3048.
- Wang K et al. FoxM1 inhibition enhances chemosensitivity of docetaxel-resistant A549 cells to docetaxel via activation of JNK/mitochondrial pathway. *Acta Biochim Biophys Sin Shanghai.* 2016;48: 804–9.
- Wang S, Chen X. Identification of potential biomarkers in cervical cancer with combined public mRNA and miRNA expression microarray data analysis. *Oncol Lett.* 2018 Oct;16(4):5200-5208.
- Wang, Juan, et al. Maternal Embryonic Leucine Zipper Kinase: A Novel Biomarker and a Potential Therapeutic Target of Cervical Cancer. *Cancer Medicine*, vol. 7, no. 11, Nov. 2018, pp. 5665–78.
- Wang, Yubao, et al. MELK Is an Oncogenic Kinase Essential for Mitotic Progression in Basal-like Breast Cancer Cells. *ELife*, vol. 2014, no. 3, 2014, pp. 1–27.
- Wang et al. Downregulation of stathmin is involved in malignant phenotype reversion and cell apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma. *J Surg Oncol.* 2011 Jun 1;103(7):704-15.
- Wang J, Wang Y, Shen F, Xu Y, Zhang Y, Zou X, Zhou J, Chen Y. Maternal embryonic leucine zipper kinase: A novel biomarker and potential therapeutic target of cervical cancer. *Cancer Med.* 2018 Nov;7(11):5665-5678.
- Watanabe, Akira, Kenichiro Araki, et al. Stathmin 1 Promotes the Proliferation and Malignant Transformation of Pancreatic Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms. *Oncology Letters*, vol. 13, no. 3, Mar. 2017, pp. 1783–88.
- Watanabe, Akira, Hideki Suzuki, et al. Stathmin1 Regulates P27 Expression, Proliferation and Drug Resistance, Resulting in Poor Clinical Prognosis in Cholangiocarcinoma. *Cancer Science*, vol. 105, no. 6, 2014, pp. 690–96.
- Wei, San Hua, et al. Prognostic Significance of Stathmin Expression in Correlation with Metastasis and Clinicopathological Characteristics in Human Ovarian Carcinoma. *Acta Histochemica*, vol. 110, no. 1, 2008, pp. 59–65.

- Westendorf JM, Rao PN, Gerace L. Cloning of cDNAs for M-phase phosphoproteins recognized by the MPM2 monoclonal antibody and determination of the phosphorylated epitope. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Jan 18;91(2):714-8.
- Wittmann, Torsten, et al. Regulation of Microtubule Destabilizing Activity of Op18/Stathmin Downstream of Rac1. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 7, Feb. 2004, pp. 6196–203.
- Wood MD, Halfpenny AM, Moore SR. Applications of molecular neuro-oncology - a review of diffuse glioma integrated diagnosis and emerging molecular entities. *Diagn Pathol*. 2019;[1];14(1):29.
- Wu, W., et al. Knockdown of Stmn1 Enhances Osteosarcoma Cell Chemosensitivity through Inhibition of Autophagy. *PLoS ONE*, vol. 9, no. 1, Cell Communication and Signaling, 2014, pp. 1139–51.
- Xi, Wang, et al. Expression of Stathmin/Op18 as a Significant Prognostic Factor for Cervical Carcinoma Patients. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, vol. 135, no. 6, 2009, pp. 837–46.
- Xie, Tao, et al. FOXM1 Evokes 5-Fluorouracil Resistance in Colorectal Cancer Depending on ABCC10. *Oncotarget*, vol. 8, no. 5, Jan. 2017, pp. 8574–89.
- Yip YY, Yeap YY, Bogoyevitch MA, Ng DC. Differences in c-Jun N-terminal kinase recognition and phosphorylation of closely related stathmin-family members. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Mar 28;446(1):248-54.
- Yoshida Y, Wang IC, Yoder HM, Davidson NO, Costa RH. The forkhead box M1 transcription factor contributes to the development and growth of mouse colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2007 Apr;132(4):1420-31
- Yu et al. Targeting FoxM1 inhibits proliferation, invasion and migration of nasopharyngeal carcinoma through the epithelial-to-Mesenchymal transition pathway. *Oncol Rep*. 2015;33:2402–10.
- Yurong et al. Stathmin overexpression is associated with growth, invasion and metastasis of lung adenocarcinoma. *Oncotarget*. 2017 Apr 18;8(16):26000-26012.
- Zhang, Dan, et al. Association of STMN1 with Survival in Solid Tumors: A Systematic Review and Meta-Analysis. *The International Journal of Biological Markers*, 2019.
- Zhang, Ya, et al. Inhibition of Maternal Embryonic Leucine Zipper Kinase with OTSSP167 Displays Potent Anti-Leukemic Effects in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Oncogene*, vol. 37, no. 41, Oct. 2018, pp. 5520–33.
- Zhang et al. Role of FoxM1 in the progression and epithelial to Mesenchymal transition of gastrointestinal Cancer. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*. 2017;12:247–59.
- Zhao, Lei, et al. KIAA1199 Promotes Metastasis of Colorectal Cancer Cells via Microtubule Destabilization Regulated by a PP2A/Stathmin Pathway. *Oncogene*, vol. 38, no. 7, Springer US, 2019, pp. 935–49.
- Zhong et al. S, Zhou A, Qi F, Li Z, Yu Z, Lu Y, Liu X. Downregulating forkhead box M1 inhibits proliferation by inhibiting autophagy in the sw480 cell line. *Biomed Rep*. 2017 Jul; 7(1): 47–50.
- Zhu et al. Effects of stathmin 1 silencing by siRNA on sensitivity of esophageal cancer cells Eca-109 to paclitaxel. *Genet Mol Res*. 2015 Dec 29;14(4):18695-702.

7 ANEXO

7.1 Aprovação do projeto pela CAPPesq



Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

PROJETO DE PESQUISA

Título: O PAPEL DE LOX E STMN1 EM ASTROCITOMAS HUMANOS
Pesquisador Responsável: Suelli Mieko Oba Shinjo **Versão:** 01
Pesquisador Executante: fernanda de oliveira serachi **CAAE:** 47136215.2.0000.0068
Co-autores: Flávio K. Miura/Suely K. N. Marie
Finalidade Acadêmica: Doutorado
Orientador: Suelli Mieko Oba Shinjo
Instituição: HCFMUSP
Departamento: NEUROLOGIA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 13605

Número do Parecer: 1.177.249

Data da Relatoria: 05/08/2015

Apresentação do Projeto: Estudo experimental, retrospectivo, que visa a avaliação da expressão de genes envolvidos nos processos de angiogênese, proliferação, migração, invasão e apoptose de astrocitomas em diferentes estágios de evolução. Trata-se de projeto de doutorado da aluna Fernanda O. Serachi, sob orientação da Dra. Suelli Oba-Shinjo.

Objetivo da Pesquisa: Avaliar a expressão e regulação de vias dos genes LOX e STMN1 em astrocitomas e glioblastomas humanos e a influência do silenciamento gênico em linhagens celulares humanas sobre a funcionalidade celular (angiogênese, proliferação, migração, invasão e apoptose).

Avaliação dos Riscos e Benefícios: não há riscos ou benefícios diretos

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: O estudo será importante para compreensão do papel dos genes LOX e STMN1 sobre a evolução de astrocitomas humanos, quanto ao seu potencial de diferenciação, invasão, proliferação e angiogênese. Serão utilizadas amostras de tecidos de biorrepositório coletadas no projeto Genoma Clínico, sob responsabilidade da Dra. Suely Marie (Depto de Neurologia do HCFMUSP), aprovado pelo CNEP e CAPPesq HCFMUSP #830/01. Os tecidos foram colhidos durante procedimentos cirúrgicos (22 tecidos não neoplásicos controles), 23 astrocitomas pilocíticos grau I, 26 astrocitomas de baixo grau - grau II, 18 astrocitomas anaplásicos grau III e 86 glioblastomas grau IV.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: não é necessário TCLE.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Sem pendências

Situação do Parecer: Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP: Não

Considerações Finais a critério do CEP: Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: **a)** desenvolver o projeto conforme delineado; **b)** elaborar e apresentar

7.2 Informações de expressão gênica e dados clínicos dos casos do laboratório

Diagnóstico	Número	Iniciais do nome	Sexo	Idade ao diagnóstico (anos)	Sobrevida (meses)
NN	108	MMP	M	31	
NN	132	EOA	M	51	
NN	167	EA	M	39	
NN	173	MIM	F	44	
NN	179	ED	F	39	
NN	189	RLG	F	35	
NN	196	IG	F	44	
NN	226	PST	M	38	
NN	232	FPB	M	28	
NN	237	AML	F	47	
NN	245	GVA	M	25	
NN	263	MML	M	27	
NN	312	MCL	F	41	
NN	330	JMR	M	32	
NN	332	MSM	F	32	
NN	349	AGCC	M	40	
NN	714	VLPM	F	56	
NN	714	VLPM	F	56	
NN	755	SVSB	F	39	
NN	805	SAD	F	37	
NN	861	RM	M	35	
AGI	969	GC	F	34	
AGI	185	APF	M	24	
AGI	335	MI	F	34	
AGI	352	JRS	M	35	
AGI	363	RFCO	M	13	
AGI	421	IAPV	F	16	
AGI	436	WGG	M	18	
AGI	463	SEM	F	16	
AGI	495	ASJM	F	8	
AGI	501	RJB	M	32	
AGI	570	KBRP	F	8	
AGI	594	JCFS	M	18	
AGI	601	JJS	M	21	
AGI	828	WHO	M	16	
AGI	878	JBS	F	18	
AGI	889	WAD	F	43	
AGI	892	RAR	M	14	
AGI	932	JSO	M	17	
AGI	946	PRTS	M	9	
AGI	995	JTAN	M	22	
AGI	1000	DSS	M	4	
AGI	1044	LRR	M	8	
AGI	1049	AOS	F	14	
AGI	1058	RLS	M	22	
AGII	55	MAP	F	36	114
AGII	76	ML	M	27	56
AGII	101	JNO	F	23	82
AGII	118	AMC	F	45	24
AGII	239	JRA	M	56	91
AGII	250	MBC	F	30	7
AGII	254	MGSJ	F	24	27

AGII	267	AMM	M	43	96
AGII	328	CHR	M	39	91
AGII	341	ML	M	28	
AGII	346	RTP	M	23	51
AGII	392	ARVA	F	38	80
AGII	412	AMM	M	44	
AGII	452	MRS	M	41	84
AGII	453	JOJ	M	28	44
AGII	467	MAM	F	41	41
AGII	490	NNS	M	35	38
AGII	577	RNN	F	35	50
AGII	715	AOE	F	27	9
AGII	806	ESM	M	39	44
AGII	999	JWMS	M	25	60
AGII	1016	ES	M	35	23
AGII	1095	JPS	M	32	110
AGII	1099	MGSA	F	32	52
AGII	1113	MRS	M	44	
AGII	1155	JSA	F	25	43
AGIII	28	GAB	M	54	99
AGIII	34	MGCJ	M	18	115
AGIII	73	MCV	F	25	77
AGIII	233	OAA	F	58	13
AGIII	249	AC	M	32	7
AGIII	338	LKH	F	37	14
AGIII	347	WCS	M	15	82
AGIII	360	ICVK	F	32	90
AGIII	366	GPJ	M	37	93
AGIII	410	AAS	M	30	77
AGIII	428	FCRN	M	58	74
AGIII	478	ASM	M	39	21
AGIII	514	LFF	M	37	24
AGIII	734	JRS	M	31	1
AGIII	905	MGSJ	F	27	1
AGIII	981	VGCJ	M	21	
AGIII	1033	ANS	F	29	2
AGIII	1036	MDDT	F	46	3
GBM	35	MPS	M	53	45
GBM	74	UC	M	74	17
GBM	175	MTC	F	56	5
GBM	194	OB	M	71	22
GBM	204	BL	F	70	7
GBM	208	EFC	M	62	6
GBM	256	CDS	M	41	2
GBM	269	ELAD	F	65	0
GBM	274	BCJ	F	47	17
GBM	297	MCE	F	78	11
GBM	317	MJO	F	71	2
GBM	356	JS	M	74	11
GBM	370	WAS	M	45	13
GBM	384	CSS	M	45	14
GBM	391	IPP	F	54	12
GBM	397	MCS	F	58	5
GBM	405	JS	M	74	
GBM	427	AJS	F	51	5
GBM	442	MSS	M	68	4
GBM	450	CMT	F	61	14

GBM	458	MAA	M	62	3
GBM	485	ASS	M	67	6
GBM	496	SASC	F	57	8
GBM	498	GP	F	17	4
GBM	503	JRF	M	63	2
GBM	510	VRS	M	56	23
GBM	522	MFC	M	48	24
GBM	524	ZFR	F	59	8
GBM	547	AA	M	71	13
GBM	555	ADM	M	57	18
GBM	573	EM	M	50	9
GBM	592	MRKM	F	40	
GBM	629	JLS	M	64	14
GBM	632	VAP	F	41	28
GBM	638	VFC	M	55	2
GBM	640	LPS	F	58	5
GBM	642	NDT	M	42	17
GBM	663	AFP	M	66	7
GBM	684	ADM	F	56	1
GBM	687	LZ	M	45	9
GBM	698	ERL	M	58	7
GBM	724	ACF	F	62	
GBM	743	JPP	M	52	2
GBM	750	NR	M	51	6
GBM	792	IS	M	35	5
GBM	795	JCN	M	28	11
GBM	852	AG	M	60	13
GBM	854	GFS	M	46	
GBM	875	IS	M	35	
GBM	879	AM	M	61	3
GBM	881	JBF	M	49	4
GBM	884	ILR	F	52	27
GBM	885	MCG	F	86	2
GBM	891	FD	M	57	7
GBM	901	GMS	M	16	2
GBM	903	GSS	M	55	22
GBM	925	PMO	M	40	12
GBM	930	ASA	M	26	31
GBM	1002	MMC	M	40	2
GBM	1003	DGS	F	68	4
GBM	1007	MGSJ	F	28	3
GBM	1009	MAPL	F	38	21
GBM	1070	MR	M	72	8
GBM	1074	ILO	M	32	
GBM	1077	VAP	F	41	
GBM	1084	AJ	M	54	5
GBM	1091	WJGS	M	55	21
GBM	1103	AJ	M	54	
GBM	1118	APS	F	61	2
GBM	1122	AF	M	68	5
GBM	1123	EFS	M	53	11
GBM	1124	AE	M	63	4
GBM	1133	FCC	M	52	9
GBM	1144	SRS	M	76	2
GBM	1161	GFS	M	39	13
GBM	1162	MES	F	68	15
GBM	1169	VMSB	F	56	2

GBM	1190	ESB	F	58	9
GBM	1194	ASA	M	26	
GBM	1199	FRN	M	30	11
GBM	1205	OLAN	M	69	
GBM	1212	FRN	M	31	
GBM	1232	FBS	M	58	12
GBM	1237	APN	M	59	7
GBM	1243	VCT	M	47	10
GBM	1250	MFL	M	63	7
GBM	1272	CJMD	M	63	6
GBM	1274	RBP	M	58	13
GBM	1282	JMS	M	56	9
GBM	1299	JC	M	76	4
GBM	1310	WJB	M	48	16
GBM	1315	SJ	M	68	11
GBM	1318	JABS	M	57	21
GBM	1331	OB	M	66	0
GBM	1335	ICS	F	53	23
GBM	1346	ALA	M	57	9
GBM	1368	DAS	F	29	8
GBM	1386	SRC	F	66	2
GBM	1398	JAS	M	78	7

7.3 Informações de expressão gênica e dados clínicos dos casos do TCGA

SEXO	IDADE (anos)	STATUS	Sobrevida (meses)	Diagnóstico	GRAU	STMN1	MELK	FOXM1
M	7380	Vivo		Astrocitoma	G2	22155,8	33,47	240,487
F	11233	Vivo	17	Astrocitoma	G2	60028,8	596,36	4343,02
F	14152	Vivo		Astrocitoma	G2	25575,2	95,975	403,372
M	12845	Vivo	20	Astrocitoma	G2	11177,1	34,432	103,295
F	15178	Vivo		Astrocitoma	G2	29406,2	42,059	314,339
M	14108	Vivo	69	Astrocitoma	G2	17405,4	52,721	324,933
F	9005	Vivo	10	Astrocitoma	G2	14550,4	62,77	282,466
F	22811	Vivo	3	Astrocitoma	G2	16081,2	59,136	831,785
M	11849	Morto	15	Astrocitoma	G2	8682,11	123,12	287,597
M	12245	Morto	62	Astrocitoma	G2	8794,14	97,011	847,692
F	7612	Vivo	6	Astrocitoma	G2	17158,3	36,441	218,645
F	10342	Vivo	87	Astrocitoma	G2	15211	47,072	242,085
M	15092	Vivo	19	Astrocitoma	G2	12682,2	10,155	55,8507
F	11330	Morto		Astrocitoma	G2	16127,2	24,081	316,668
F	14603	Vivo	35	Astrocitoma	G2	23235	51,385	256,924
F	11509	Vivo	4	Astrocitoma	G2	16801,6	35,948	208,06
M	11668	Vivo	18	Astrocitoma	G2	17027,6	27,194	162,34
F	9413	Vivo	3	Astrocitoma	G2	18661,9	20,494	136,626
M	13506	Vivo		Astrocitoma	G2	18455,6	31,166	219,942
F	14985	Morto	32	Astrocitoma	G2	16005,8	6,7214	49,2899
F	13396	Vivo	7	Astrocitoma	G2	20383,4	27,945	145,316
F	11465	Vivo	0,09	Astrocitoma	G2	6012,5	22,15	52,2749
M	9614	Vivo	6	Astrocitoma	G2	26941,7	132,28	763,051
M	11070	Vivo	5	Astrocitoma	G2	17693,4	23,412	102,274
M	18494	Vivo	10	Astrocitoma	G2	22034	6,3462	90,1161
F	14592	Vivo	21	Astrocitoma	G2	16602,6	4,38	98,551
M	16202	Vivo	0,19	Astrocitoma	G2	24820,4	117,32	550,392
F	15513	Vivo	20	Astrocitoma	G2	14883,5	73,043	341,581
M	10167	Vivo		Astrocitoma	G2	15245,4	57,077	252,909
F	13222	Vivo	1	Astrocitoma	G2	32165,7	63,622	215,335
M	13216	Vivo	6	Astrocitoma	G2	11535,7	171,65	829,387
M	10960	Vivo	7	Astrocitoma	G2	16185,8	218,41	905,566
F	14375	Vivo	7	Astrocitoma	G2	14804,8	36,303	118,808
M	7760	Vivo	0,09	Astrocitoma	G2	33911,7	115,25	761,381
F	22585	Morto	3	Astrocitoma	G2	32170,9	33,316	264,774
M	14310	Vivo	0,2	Astrocitoma	G2	16496,9	55,644	489,078
F	16280	Vivo	11	Astrocitoma	G2	23027,8	28,089	379,199
F	13663	Vivo	30	Astrocitoma	G2	18235	10,468	113,402

M	16415	Vivo	22	Astrocitoma	G2	21584,6	122,12	490,683
M	10422	Vivo	50	Astrocitoma	G2	21119,3	118,75	599,889
M	12849	Morto		Astrocitoma	G2	20850,6	19,284	63,6365
M	8820	Vivo	0,09	Astrocitoma	G2	16575,1	49,511	369,68
M	10933	Vivo	7	Astrocitoma	G2	11302	88,372	452,639
F	8403	Vivo	23	Astrocitoma	G2	12061,5	179,42	1539,02
M	10108	Vivo	83	Astrocitoma	G2	9106,95	63,225	167,739
F	11970	Vivo	0,7	Astrocitoma	G2	11158	0,9922	16,867
M	18443	Vivo	107	Astrocitoma	G2	14743,4	500,15	4062,38
M	15589	Vivo	4	Astrocitoma	G2	19025,5	27,105	103,745
M	24252	Morto	-0,03	Astrocitoma	G2	14429,8	436,24	479,592
M	11312	Vivo	14	Astrocitoma	G2	22836,7	3,1739	103,944
F	12580	Vivo	7	Astrocitoma	G2	27565,6	83,861	212,119
M	7716	Vivo	2	Astrocitoma	G2	18880,4	14,721	219,478
M	12417	Vivo	20	Astrocitoma	G2	6410,78	42,254	218,147
M	17381	Vivo	18	Astrocitoma	G2	7643,58	79,112	193,126
M	24055	Vivo	5	Astrocitoma	G2	19658,7	42,126	214,841
M	22738	Vivo	39	Astrocitoma	G2	11589,9	3,5378	45,9916
M	9044	Morto	94	Astrocitoma	G2	18591	67,247	311,93
F	12631	Vivo		Astrocitoma	G2	37171,4	123,86	634,116
M	11884	Vivo	23	Astrocitoma	G2	34546,7	127,18	717,816
M	8817	Vivo		Astrocitoma	G2	19185,4	405,08	1508,24
F	19142	Vivo	0,2	Astrocitoma	G2	17560,9	7,9154	140,216
M	17289	Vivo	10	Astrocitoma	G2	16970,8	52,875	295,478
F	14767	Vivo	35	Astrocitoma	G2	19247,9	52,737	220,254
M	11666	Morto	17	Astrocitoma	G3	16217,8	19,578	109,225
F	12557	Morto	21	Astrocitoma	G3	17555,7	139,86	501,572
M	21183	Vivo	4	Astrocitoma	G3	10734,7	760,78	3437,89
M	12460	Vivo	0,09	Astrocitoma	G3	27067,3	213,86	915,88
M	10253	Vivo	9	Astrocitoma	G3	17145,6	101,1	526,842
F	17465	Morto		Astrocitoma	G3	24619,7	52,151	332,899
F	10724	Vivo	42	Astrocitoma	G3	19871,4	59,523	338,821
M	20394	Vivo	0,5	Astrocitoma	G3	8777,66	1149,7	3501,72
M	14920	Vivo	0,09	Astrocitoma	G3	7883,62	160,91	952,115
M	12655	Morto	79	Astrocitoma	G3	23372	229,19	1275,16
M	7913	Vivo	0,2	Astrocitoma	G3	11013,9	60,492	345,67
F	15866	Vivo	15	Astrocitoma	G3	13745,8	162,95	702,853
F	21129	Morto	5	Astrocitoma	G3	9830,3	159,3	689,9
M	21824	Morto	8	Astrocitoma	G3	11545	893,45	3555,63
F	19866	Morto	6	Astrocitoma	G3	14912	242,25	1735,48
F	13453	Vivo	7	Astrocitoma	G3	21413,4	87,586	316,854
M	19156	Vivo	42	Astrocitoma	G3	20130,9	176,43	459,314
F	16334	Vivo		Astrocitoma	G3	25714	9,3099	119,167
M	18161	Vivo	6	Astrocitoma	G3	16382,5	13,975	207,009

M	20180	Morto		Astrocitoma	G3	9405,03	363,64	1246,55
F	12107	Vivo	5	Astrocitoma	G3	13268,5	182,84	817,077
M	23484	Morto	12	Astrocitoma	G3	17657,9	141,69	453,595
F	16300	Vivo		Astrocitoma	G3	14929,7	13,101	111,357
M	14418	Vivo	40	Astrocitoma	G3	20175,2	28,751	234,965
F	19138	Vivo	10	Astrocitoma	G3	39037,9	508,92	4021,21
M	14858	Vivo	4	Astrocitoma	G3	19247,5	391,46	1269,54
F	19903	Vivo		Astrocitoma	G3	47408,8	310,92	2051,38
F	23180	Morto		Astrocitoma	G3	10928,1	66,292	173,859
M	16890	Morto	16	Astrocitoma	G3	15181,1	818,83	2961,72
M	14212	Morto	67	Astrocitoma	G3	28257,2	179,98	895,32
M	21200	Morto	7	Astrocitoma	G3	7153,98	231,33	1573,72
M	24411	Morto	8	Astrocitoma	G3	17816,6	949,07	1621,27
F	13338	Vivo	6	Astrocitoma	G3	18897,9	215,64	772,856
M	15092	Vivo	4	Astrocitoma	G3	23116	10,434	327,378
M	13460	Vivo	83	Astrocitoma	G3	17139,2	12,07	129,477
M	12152	Vivo	81	Astrocitoma	G3	18909,9	236,43	1641,58
M	15481	Morto	41	Astrocitoma	G3	41770,9	2075,3	18945,3
M	8571	Morto		Astrocitoma	G3	28457,1	1192,4	3462,72
M	8340	Vivo	8	Astrocitoma	G3	13787,9	204,57	925,873
F	11971	Morto		Astrocitoma	G3	11805,4	205,2	1311,63
F	12757	Vivo		Astrocitoma	G3	16593,5	53,495	317,344
F	11305	Vivo	16	Astrocitoma	G3	5625,67	165,71	311,778
F	27039	Morto	6	Astrocitoma	G3	7505,52	238,68	916,575
M	19234	Vivo	10	Astrocitoma	G3	9395,95	140,46	885,718
M	13503	Vivo	21	Astrocitoma	G3	11322,3	65,128	333,155
F	12229	Morto		Astrocitoma	G3	29831,8	1784,3	2925,14
M	22850	Vivo	2	Astrocitoma	G3	27782,5	28,637	168,519
M	21095	Morto	19	Astrocitoma	G3	11162,1	183,06	1480,23
M	11474	Vivo	19	Astrocitoma	G3	18562,8	32,205	111,255
M	17843	Vivo	17	Astrocitoma	G3	23944,8	55,485	449,211
M	14933	Morto	11	Astrocitoma	G3	8234,94	416,66	1252,12
M	11906	Morto		Astrocitoma	G3	14790,3	122,78	2296,44
F	16275	Morto	31	Astrocitoma	G3	20187,1	232,69	1087,39
F	13595	Vivo	5	Astrocitoma	G3	14374,6	90,1	240,62
F	16560	Vivo	4	Astrocitoma	G3	12365,9	1788,8	6383,43
M	10678	Vivo	30	Astrocitoma	G3	20729,2	193,42	882,3
M	17744	Vivo	50	Astrocitoma	G3	19010,1	109,41	361,418
F	13961	Vivo	9	Astrocitoma	G3	2657,83	49,857	105,649
F	21106	Vivo	8	Astrocitoma	G3	19634,6	281,06	1365,92
M	11221	Vivo	19	Astrocitoma	G3	31815,4	1011,6	7960,37
M	23263	Morto		Astrocitoma	G3	25963,9	260,97	927,634
M	12725	Morto	50	Astrocitoma	G3	35117,5	380,83	5714,07
F	21745	Vivo	18	Astrocitoma	G3	22200,1	264,32	814,032

M	12111	Vivo	14	Astrocitoma	G3	11551,3	91,307	360,264
F	10170	Vivo	7	Astrocitoma	G3	15867,2	150,53	757,397
F	17874	Vivo	4	Astrocitoma	G3	15614,5	78,796	614,613
M	16137	Vivo	7	Astrocitoma	G3	27575,9	39,494	169,258
M	22948	Vivo	24	Astrocitoma	G3	22946,1	1963,1	9015,75
F	18748	Vivo	12	Astrocitoma	G3	13095,5	415,51	2188,88
F	20296	Vivo	0,2	Astrocitoma	G3	23266,7	409,11	1337,47
M	24578	Morto	7	Astrocitoma	G3	7621,41	237,95	958,682
M	8335	Vivo		Astrocitoma	G3	19795	520,87	2143,04
F	18686	Morto	19	Astrocitoma	G3	14059,6	758,04	3153,18
F	12606	Vivo	18	Astrocitoma	G3	14461,3	784,05	2514,4
F	17857	Morto	62	Astrocitoma	G3	18812,7	42,38	226,346
M	12848	Vivo	0,2	Astrocitoma	G3	21230,8	57,055	292,718
F	22034	Vivo	0,4	Astrocitoma	G3	5476,35	124,29	358,393
M	17729	Morto	23	Astrocitoma	G3	9883,4	433,8	1497,27
F	16945	Morto	12	Astrocitoma	G3	11377,4	252,85	904,136
M	16982	Morto		Astrocitoma	G3	11847,9	784,67	2699,63
F	8912	Vivo	0,2	Astrocitoma	G3	7523,77	143,08	1264,9
F	23769	Vivo	14	Astrocitoma	G3	7645,24	913,97	3873,24
M	24242	Morto	5	Astrocitoma	G3	10886,5	604,52	2368,13
M	19236	Morto		Astrocitoma	G3	27356	137,01	469,619
M	25419	Morto	10	Astrocitoma	G3	22671,3	70,323	259,742
M	19207	Morto	7	Astrocitoma	G3	4998,63	451,63	2187,73
M	25266	Morto	7	Astrocitoma	G3	29791,9	265,46	2220,62
F	16021	Morto	49	Astrocitoma	G3	10042,3	219,14	411,528
F	12836	Vivo	211	Astrocitoma	G3	21864	846,75	3815,66
M	13565	Morto	18	Astrocitoma	G3	29786,8	2027,3	11254,4
F	21199	Morto	14	Astrocitoma	G3	40300,2	1574,5	2793,74
F	12092	Vivo	13	Astrocitoma	G3	36076,7	127,74	476,327
M	12851	Vivo	0	Astrocitoma	G3	18053,2	555,66	2939,52
F	12402	Morto	7	Astrocitoma	G3	36027,4	1573,2	6976,79
F	16161	Vivo		Astrocitoma	G3	20580,5	102,5	397,647
M	14375	Vivo	2	Astrocitoma	G3	26508,9	312,63	926,233
M	16037	Vivo	3	Astrocitoma	G3	22070,5	444,13	1547,17
M	11741	Vivo	2	Astrocitoma	G3	15757,1	100,24	323,115
F	25772	Morto	5	Astrocitoma	G3	7899,09	402,12	1023,86
F	14205	Morto	18	Astrocitoma	G3	26309,8	428,59	1839,19
F	22837	Morto	57	Astrocitoma	G3	24614,9	29,48	247,633
M	11014	Morto	6	Astrocitoma	G3	20944,1	24,631	215,525
M	21020	Morto		Astrocitoma	G3	21280,2	1078,3	3753,59
F	15066	Vivo	18	Astrocitoma	G3	18413,5	263,36	1348,43
F	21761	Vivo	9	Astrocitoma	G3	15181,9	669,04	2303,16
M	17692	Vivo	5	Astrocitoma	G3	24867,5	467,32	1866,37
M	13990	Vivo	12	Astrocitoma	G3	19069,3	239,11	1068,58

F	20625	Vivo	10	Astrocitoma	G3	18621,6	26,627	157,448
F	16297	Morto	43	Astrocitoma	G3	14271,8	220,75	846,904
M	25570	Vivo	18	Astrocitoma	G3	13566,6	12,06	38,0355
M	11083	Vivo		Astrocitoma	G3	17848,5	276,07	1207,13
F	8271	Vivo	11	Astrocitoma	G3	17695,2	295,64	1011,48
F	16667	Morto	10	Astrocitoma	G3	17500,4	312,83	877,03
M	17499	Vivo	15	Astrocitoma	G3	17476,3	204,38	1322,1
M	12266	Morto	43	Astrocitoma	G3	20443,9	14,557	236,882
M	10812	Vivo	30	Astrocitoma	G3	16811,3	15,909	124,378
M	14496	Vivo	19	Astrocitoma	G3	16088,4	24,811	165,705
F	10989	Vivo	5	Astrocitoma	G3	17672,4	184,37	721,539
M	13621	Vivo	14	Astrocitoma	G3	18886,8	105,17	625,319
F	11855	Vivo	43	Astrocitoma	G3	21826,6	146,41	624,326
M	11509	Vivo	70	Astrocitoma	G3	17229,7	988,48	3178,19
F	19869	Vivo	3	Astrocitoma	G3	22089,5	180,61	701,421
M	15230	Vivo	50	Astrocitoma	G3	21026,2	309,82	1284,44
M	20175	Vivo	16	Astrocitoma	G3	25884,3	2446,7	6857,81
F	21990	Morto	11	Astrocitoma	G3	5613,4	238,41	1946,41
F	22565	Vivo	5	Astrocitoma	G3	14986,7	133,07	1715,83
F	13606	Vivo	7	Astrocitoma	G3	20614,9	1123,2	3149,36
F	13332	Vivo	4	Astrocitoma	G3	13317,5	184,79	802,168
M	17134	Vivo	17	Astrocitoma	G3	11878,4	69,527	233,183

SEXO	IDADE	STATUS	Meses de vida	Diagnóstico	GRAU	Subtipo	STMN1	MELK	FOXMI
M	18659	Morto		GBM	G4		4669,562	811,8509	901,2681
M	21613	Morto	15	GBM	G4	Clássico	10873,33	468,4959	2801,375
M	21838	not reported	14	GBM	G4		7982,299	89,9723	256,7502
M	23759	Morto	4	GBM	G4	Neural	15977,54	1641,9	5171,9
F	23782	alive	1	GBM	G4	Mesenquimal	9232,269	334,8992	1363,211
F	23674	Morto	13	GBM	G4	Clássico	19344,71	1102,487	3255,526
M	19824	Morto	3	GBM	G4	Proneural	29162,9	1726,318	4314,716
M	24471	Morto	19	GBM	G4	Clássico	15183,65	1455,981	3200,212
F	23107	Morto	0,19	GBM	G4	Mesenquimal	5265,378	412,0204	1202,736
M	24658	Morto	7	GBM	G4	Clássico	10522,37	314,7326	1281,352
F	28977	Morto	2	GBM	G4	Neural	14182,66	409,7054	1627,401
F	26395	Morto	3	GBM	G4	Mesenquimal	13931,78	366,7967	1063,602
F	19444	Morto	21	GBM	G4	Clássico	7802,298	568,9458	1671,533
M	19503	Morto	9	GBM	G4	Proneural	30793,06	1288,012	5350,039
F	18195	Morto	29	GBM	G4	Mesenquimal	6898,162	186,8666	975,4174
M	28759	Morto	14	GBM	G4	Proneural	14757,16	564,6171	1790,568
M	7827	Morto	50	GBM	G4	Proneural	19658,5	329,6422	2048,304
M	22257	Morto	24	GBM	G4	G-CIMP	18311,75	431,8418	3149,308
M	14235	Morto	53	GBM	G4	Neural	47932,03	888,7611	2823,785
M	16301	Morto	2	GBM	G4	Clássico	18007,91	745,9348	2652,092
F	19090	Morto	17	GBM	G4	Neural	11339,6	430,3532	1056,037
M	19366	Vivo	1	GBM	G4	Mesenquimal	21346,99	1424,9	4924,19
F	27831	Morto	3	GBM	G4	Neural	18387,83	256,9469	1944,266
M	13257	Vivo		GBM	G4		17111,85	1587,002	2473,739
F	17781	Morto	7	GBM	G4	Mesenquimal	13523,96	1725,824	6029,42
M	20929	Vivo	7	GBM	G4	Neural	33876,39	713,1404	561,9132
M	26467	Morto	1	GBM	G4	Neural	27865,68	320,0077	1089,277
M	22273	Morto	5	GBM	G4	Proneural	12856,79	971,6098	3850,418
M	20641	Morto	5	GBM	G4	Proneural	18429,93	1190,159	4232,722
F	21698	Morto	11	GBM	G4	Proneural	42928,76	1587,071	4895,986
M	22949	Morto	10	GBM	G4	Neural	27868,35	852,3861	2982,376
M	17037	Morto	13	GBM	G4	Proneural	50879,5	1008,425	2465,038
M	22527	Vivo	8	GBM	G4	Clássico	6775,827	685,2256	2067,097
M	21560	Vivo	14	GBM	G4	G-CIMP	12302,83	792,3782	3228,646
M	23317	Morto	40	GBM	G4	Mesenquimal	8494,868	436,9701	1165,253
M	22926	Morto	10	GBM	G4	Mesenquimal	11796,2	289,3742	498,7508
M	27196	alive	9	GBM	G4	Clássico	18252,95	2370,872	3324,177
M	21559	Morto	6	GBM	G4	Clássico	7542,646	218,5056	1305,991
M	26247	Morto	12	GBM	G4	Mesenquimal	8537,233	2029,197	3914,558
M	17903	Morto	0,9	GBM	G4	Mesenquimal	4813,307	329,0032	1076,555

F	22161	Morto	14	GBM	G4	Neural	37074,35	2682,483	3621,274
M	18571	Morto	2	GBM	G4	Neural	24830,38	169,1845	656,2997
F	20159	alive	9	GBM	G4	Clássico	9472,176	512,5136	5070,066
F	17237	alive	11	GBM	G4	Mesenquimal	19460,47	660,7917	2887,441
M	17715	Morto	10	GBM	G4	Mesenquimal	17106,87	741,0877	1743,074
M	22867	Morto	15	GBM	G4	Clássico	15449,81	1084,088	2944,308
F	16572	Vivo	5	GBM	G4	G-CIMP	30454,16	925,6957	1468,064
F	22865	Morto	22	GBM	G4	Proneural	69725,76	881,1896	2705,992
F	23063	Morto	25	GBM	G4	Proneural	25336,1	2438,396	8524,433
M	11333	Morto		GBM	G4		29963,39	933,1446	2035,858
M	19494	Vivo	15	GBM	G4	Clássico	21305,54	1047,613	2633,795
M	25326	Morto	2	GBM	G4	Clássico	11985,25	675,0961	2562,921
M	13368	Morto	14	GBM	G4	Clássico	14243,15	969,5984	5270,637
M	18071	Morto	12	GBM	G4	Proneural	35945,24	1116,963	2697,094
F	21678	Morto	9	GBM	G4	Mesenquimal	10899,95	1270,902	2491,825
M	11112	Morto	5	GBM	G4	Neural	9334,415	133,1111	635,2139
M	20932	Morto	5	GBM	G4	Proneural	23576,03	737,0299	4688,026
F	22686	Morto	11	GBM	G4	Mesenquimal	22425,6	1190,703	3607,154
M	14729	Morto	11	GBM	G4	Mesenquimal	12551,12	288,9005	692,4441
M	15736	Morto	24	GBM	G4	Neural	23127,77	706,3941	1549,265
M	18832	Morto	8	GBM	G4	Neural	43865,65	715,9316	1971,286
M	25975	Morto	11	GBM	G4	Mesenquimal	16194,48	333,4901	2276,828
M	25434	Morto	22	GBM	G4	Clássico	8743,714	356,1105	1593,495
F	26796	Morto	2	GBM	G4	Neural	14430,71	190,1787	1255,42
M	21884	Morto	7	GBM	G4	Proneural	12963,22	910,4544	4257,106
F	22029	Morto		GBM	G4		7103,853	1835,254	3240,305
F	24362	alive	2,529827	GBM	G4	Mesenquimal	15763,9	799,908	4504,244
F	26600	Morto		GBM	G4		9907,667	415,1823	1792,372
F	25425	Morto	5	GBM	G4	Neural	44031,82	1161,389	1726,42
F	17714	Morto		GBM	G4		27498,25	754,5928	2481,045
M	22916	Morto	15	GBM	G4	Mesenquimal	7599,816	660,1086	2484,587
M	25684	Morto	7	GBM	G4	Proneural	27740,6	1378,182	5587,594
M	26490	Morto	14	GBM	G4	Neural	15177,2	2130,152	5371,462
M	26491	Vivo	9	GBM	G4	Mesenquimal	10500,53	383,5019	858,5493
F	25421	Vivo	7	GBM	G4	Mesenquimal	5375,396	315,2802	726,9683
F	28496	Morto	1	GBM	G4	Mesenquimal	22952,42	1809,069	1456,558
F	7936	Vivo	9	GBM	G4	G-CIMP	17739,4	611,1674	1291,322
M	25665	Morto	4	GBM	G4	Neural	12173,13	171,0937	789,9432
F	21421	Morto		GBM	G4		26500,33	727,1474	870,8693
M	23096	Morto	5	GBM	G4	Mesenquimal	7561,222	846,8795	3236,491
M	21232	Morto	3	GBM	G4	Clássico	19104,78	989,885	4126,02
F	22798	Morto	2	GBM	G4	Mesenquimal	8650,574	1025,008	1011,505
M	24488	Morto	0,7	GBM	G4	Neural	36005,81	1214,569	1957,644
M	20555	Morto	7	GBM	G4	Mesenquimal	21768,73	1318,345	2873,852

F	20463	Morto	3	GBM	G4	Clássico	13778,33	1099,58	3160,417
F	28240	Vivo	4	GBM	G4	Mesenquimal	11730,11	2272,899	3600,836
F	26490	Morto	8	GBM	G4	Proneural	13650,32	822,9866	3757,054
F	25812	Morto	9	GBM	G4	Clássico	15247,09	1001,385	4376,035
M	21193	Morto	17	GBM	G4	Neural	16999,08	1327,368	3443,643
M	20050	Morto	11	GBM	G4	Mesenquimal	3961,687	124,6373	452,5522
M	24050	Morto	13	GBM	G4	Clássico	14574,33	1201,152	4026,82
M	27319	Vivo	7	GBM	G4	Mesenquimal	9401,167	601,8455	2364,698
M	17515	Morto	11	GBM	G4	Clássico	13118,8	545,8881	2731,383
M	19239	Vivo	13	GBM	G4	Mesenquimal	19294,2	865,1867	2634,642
F	27584	Morto	2	GBM	G4	Mesenquimal	7848,787	405,4381	2058,14
M	24844	Morto		GBM	G4		11200,84	1620,008	3320,706
M	23394	Morto	16	GBM	G4	Mesenquimal	7157,5	178,7682	457,755
F	8922	Vivo	0,4	GBM	G4	Mesenquimal	21443,37	852,0048	2585,947
M	24134	Morto	5	GBM	G4	Proneural	28498,66	1002,794	1845,664
F	8533	Vivo	6	GBM	G4	Proneural	42353,09	2522,323	3956,756
M	21920	Morto	34	GBM	G4	Mesenquimal	19113,91	1252,357	2512,664
M	24505	Morto	13	GBM	G4	Clássico	10569,96	383,4526	1726,178
F	20063	Morto	11	GBM	G4	Clássico	14284,62	1069,203	2859,374
M	24477	Vivo	8	GBM	G4	Neural	28046,64	1818,421	4267,832
F	21776	Morto	19	GBM	G4	Mesenquimal	12524,2	1380,053	5285,692
M	17880	Morto	6	GBM	G4	Mesenquimal	13593,04	933,096	2112,354
M	23211	Vivo	4	GBM	G4	Neural	9195,995	656,9821	7045,234
M	18219	Morto		GBM	G4		21409,96	136,1091	251,8019
F	27511	Morto	12	GBM	G4	Proneural	26164,91	1308,245	2524,824
F	23343	Morto	47	GBM	G4	Clássico	9936,173	627,0308	1768,718
M	26856	Morto	10	GBM	G4	Clássico	8021,592	633,9853	1846,041
M	24085	Morto		GBM	G4		4929,915	75,87819	179,9397
M	17894	Morto	12	GBM	G4	Mesenquimal	27381,47	2896,773	9065,673
M	18435	Vivo	5	GBM	G4	Clássico	9280,972	746,696	1714,509
M	23034	Morto	16	GBM	G4	Clássico	22327,35	2169,991	4638,423
F	29802	Morto	13	GBM	G4	Clássico	9565,574	630,0437	2104,7
M	20568	Morto	40	GBM	G4	Neural	9919,741	296,301	1056,077
M	31111	Morto	3	GBM	G4	Proneural	19874,83	333,0114	1241,657
M	27980	Morto	1	GBM	G4	Mesenquimal	20217,4	531,325	2739,508
M	27053	Morto	18	GBM	G4	Neural	16899,74	1642,186	1905,154
F	27387	Morto	28	GBM	G4	Mesenquimal	18679,93	1528,71	3289,629
M	16018	Morto	0,9	GBM	G4	Mesenquimal	7194,089	189,5704	1180,022
M	29964	Vivo	8	GBM	G4	Proneural	17746,37	1320,707	2877,203
M	32612	Morto	0,8	GBM	G4	Proneural	26701,94	461,3251	2750,376
M	29281	Morto	8,	GBM	G4	Mesenquimal	10336,44	802,5188	2308,961
M	28011	Morto	4	GBM	G4	Proneural	18422,2	2245,863	7292,003
M	24622	Morto	10	GBM	G4	Clássico	16827,22	501,2034	2226,224
F	27764	Morto	4	GBM	G4	Neural	12175,79	396,3475	1223,921

F	27930	Morto	4	GBM	G4	Clássico	11771,72	860,5904	1957,793
M	15964	Vivo	15	GBM	G4	G-CIMP	61091,06	1944,955	4859,58
M	16737	Vivo	5	GBM	G4	Clássico	17172,41	873,3354	1656,853
M	29753	Morto	2	GBM	G4	Mesenquimal	5899,121	333,1223	1657,997
M	24447	Morto	16	GBM	G4	Neural	18287,42	892,696	443,7778
F	12529	Morto	14	GBM	G4	Clássico	15993,79	1003,885	6992,178
M	21920	Morto	34	GBM	G4	Clássico	23932,56	708,2845	1999,599
M	15950	Vivo	31	GBM	G4	G-CIMP	11967,94	36,71147	382,1758
F	13451	Morto	14	GBM	G4	Proneural	47379,1	1595,244	4823,308
M	25085	Morto	4	GBM	G4	Clássico	16559,89	892,1513	2299,689
M	27111	Vivo	5	GBM	G4	Proneural	28598,76	1290,671	3307,099
M	17138	Morto	10	GBM	G4	Proneural	50418,42	2660,254	5965,761
M	25318	Morto	27	GBM	G4	Clássico	10497,12	430,1071	5018,677
M	11284	Morto	33	GBM	G4	G-CIMP	19978,56	1862,168	2988,441
F	20449	Morto	5	GBM	G4	Mesenquimal	13911,87	480,9127	1405,834
F	21384	Morto	17	GBM	G4	Mesenquimal	11884,32	375,752	996,8296
M	30580	Morto	4	GBM	G4	Proneural	24291,04	1851,525	4276,269
M	12685	Morto	10	GBM	G4	G-CIMP	30848,33	1282,202	3366,898
F	18433	Morto	47	GBM primário tratado	G4	Proneural	36999,55	1297,842	3776,689
M	19812	Morto	12	GBM	G4	Mesenquimal	9380,199	1689,458	2717,325
F	26643	Vivo	8	GBM	G4	Clássico	10729,22	843,6792	2215,916
F	31267	Morto	3	GBM	G4	Clássico	9620,496	535,7035	2602,78
F	23128	Morto	3	GBM	G4	Clássico	16207,8	991,1279	2740,861
M	22835	Morto	10	GBM	G4	Mesenquimal	9354,497	1080,525	2273,202
F	16662	Vivo	6	GBM	G4	Mesenquimal	16397,31	1896,765	6547,076
M	19657	Morto	2	GBM	G4	Clássico	14057,61	284,8654	1867,552
M	21131	Morto	5	GBM	G4	Proneural	12857,49	703,2978	2058,028
M	18125	Morto	25	GBM	G4	Neural	20801,55	105,1247	333,771
F	19505	Morto	9	GBM	G4	Mesenquimal	5146,85	273,7565	1714,102
F	28762	Morto	4	GBM	G4	Mesenquimal	6288,788	333,6696	1355,468
M	18891	Morto	0,1	GBM	G4	Proneural	34415,55	1834,239	4709,597
M	19053	Morto	15	GBM	G4	Mesenquimal	17398,28	780,2593	2511,459