

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – USP
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO – FMRP
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR E BIOAGENTES
PATOGENICOS

Isabela Spido Dias

Caracterização de PIMREG como biomarcador em gliomas

Ribeirão Preto

2023

Isabela Spido Dias

Caracterização de PIMREG como biomarcador em gliomas

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (FMRP-USP), como parte dos pré-requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Biologia Celular e Molecular

Orientadora: Prof^a. Dra. Leticia Fröhlich Archangelo

Ribeirão Preto

2023

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

Dias, Isabela Spido

Caracterização de PIMREG como biomarcador em gliomas.
Ribeirão Preto, 2023.

111 f.: il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto (FMRP-USP) – Área de concentração: Biologia Celular
e Molecular

Orientadora: Archangelo, Leticia Fröhlich

1. PIMREG; 2. Gliomas; 3. Imuno-histoquímica; 4. TMA; 5 Ki-67; 6-
Marcador de proliferação.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Isabela Spido Dias

Caracterização de PIMREG como biomarcador em gliomas

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (FMRP-USP), como parte dos pré-requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Molecular

Orientadora: Prof^a. Dra. Leticia Fröhlich Archangelo

Parecer: _____, _____
/____ /____

Banca examinadora

Prof.Dr.:

Instituição:

Assinatura:

Prof.Dr.:

Instituição:

Assinatura:

Prof.Dr.:

Instituição:

Assinatura:

Dedico aos meus pais, Rosana e João, às minhas irmãs, Nathalia e Marcela e ao meu marido, Diego. Obrigada por todo apoio e incentivo para que eu pudesse alcançar esse objetivo.

AGRADECIMENTOS

EM ESPECIAL, à **Profa. Dra. Leticia F. Archangelo**, por ter me aceito em seu laboratório e ter me dado a oportunidade de realizar este trabalho. Agradeço pela orientação durante essa trajetória; por prontamente responder meus e-mails; pela disponibilidade; pelas inúmeras correções, inclusive, aos fins de semana; tudo isso foi muito importante para meu amadurecimento. Obrigada pelos conselhos de como eu deveria me portar nas apresentações e o que deveria ser feito para melhorá-las. Agradeço pela humildade em ter compartilhado comigo suas vivências durante sua trajetória acadêmica; por ter estado presente; pelo auxílio em todas as etapas desse processo; que foi muito importante para minha formação profissional e pessoal.

EM ESPECIAL, aos colaboradores, **Dr. Luciano N. Serafini e Dr. Fabiano P. Saggiore**, peças fundamentais nesse trabalho, por terem dedicado o tempo deles, na maioria das vezes, fora do horário de expediente, para ajudar na seleção e análise de todos os pacientes desse estudo. Agradeço por todas as reuniões; pela disposição e disponibilidade em ensinar; pelo auxílio em resolver os problemas que surgiram ao longo desse trabalho; e, principalmente, por terem compartilhado comigo a ética e o respeito que devemos ter ao trabalhar com amostras de pacientes.

EM ESPECIAL, à técnica **Deise L. Chesca** do Laboratório de Histopatologia do Prof. Dr. Luciano N. Serafini, por ter fornecido todo o suporte para a produção dos blocos de TMAs, cortes histológicos e imunomarcações. Agradeço a humildade em ter compartilhado comigo toda a sua experiência na realização dessas metodologias e por toda ajuda e auxílio nas padronizações da IHC.

À **Dra. Camila Melo**, por toda a ajuda e disponibilidade durante esses anos. Todo auxílio que precisei, foi a ela quem recorri, e sempre recebi sua ajuda. Agradeço por ter, várias vezes, pegado na minha mão e mostrado o caminho, por toda ajuda na submissão do trabalho para o Comitê de Ética e por todas as correções da escrita desse trabalho.

Às minhas amigas e colegas de laboratório, **Me. Mariana S. L. Mamede, Maria Vitória de R. Gasparini, Me. Mariana de S. Sena, Giovanna G. de Almeida e Laís do Carmo**, por toda ajuda, apoio, suporte emocional e por dividirem todo esse processo comigo. Durante essa jornada, vocês foram essenciais. Obrigada, minha amiga, **Mariana L. Mamede**, pelo tempo disponibilizado na correção da escrita desse trabalho, por todos os conselhos e sugestões para que ele fosse concretizado.

À **Silvia Nascimento**, por todo suporte técnico no Laboratório de Investigação Molecular Câncer (LIMCa).

À **Dra. Vanessa C. Arfelli**, por ter compartilhado seu conhecimento durante meu estágio no laboratório, por ter sanado minhas dúvidas que surgiam durante as leituras dos artigos e pelo seu entusiasmo pela ciência, que contagia quem está à sua volta. Agradeço, por mesmo que em outro país, tenha disponibilizado seu tempo para assistir e dar sugestões na minha apresentação do exame de qualificação.

À **Dra. Nathália Acésio**, pela ajuda na organização das amostras dos pacientes e na extração do DNA genômico das amostras tumorais.

À técnica **Vani Malves** do Laboratório Multiusuário de Histotécnica (LMH), pelos serviços prestados em histologia e por todo apoio.

Ao **Cesar Júnior** e ao **Décio**, funcionários do SERPAT, pela separação das lâminas e dos blocos de cada caso desse projeto.

Ao pessoal do **Laboratório de Pediatria do HC-FMRP-USP**, em especial, a minha chefe **Tânia M. B. Trevilato**, por ter me apoiado e incentivado a realizar o estágio no LIMCa, a prestar a prova do mestrado e por todo apoio durante a realização desse trabalho. Agradeço pelos conselhos dados, pelos ensinamentos profissionais e pessoais. Todo o seu apoio foi fundamental para que esse ciclo terminasse. Aos meus companheiros de trabalho, **Dr. José Simon**, **Dra. Ana Vitória B. Margutti** e **Me. Philippe Pinheiro Paiva**, por todo incentivo nessa caminhada.

Às alunas do curso de especialização, **Bruna**, **Isabela** e **Larissa**, pela convivência diária, pela ajuda nas apresentações em inglês, pelo incentivo e por todos os momentos compartilhados.

Ao **Renato**, do Departamento de Neurologia, por me ajudar e ensinar a encontrar a melhor forma de quantificar as imunomarcações das proteínas de interesse do meu trabalho através do *software Fiji ImageJ*.

À **Adriana Ap. Marques** do Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática no Hemocentro de Ribeirão Preto, por me auxiliar nas etapas de sequenciamento por eletroforese capilar.

Aos meus queridos pais, **Rosana** e **João**, por tudo o que fizeram e fazem para que consiga alcançar meu objetivo, por me estimularem a continuar a jornada, mesmo que seja árdua, por entenderem minha ausência, em alguns momentos, ao longo desses anos. Obrigada, por serem exemplo, e por terem cultivado em mim valores e princípios que sempre levarei comigo.

Às minhas irmãs, **Nathalia e Marcela**, por todo apoio, amizade, confiança e principalmente por me incentivarem nos estudos.

Ao meu esposo e companheiro de vida, **Diego Villar**, por estar presente em minha vida, me incentivando e apoiando ao longo desses treze anos. Obrigada, por nos momentos mais difíceis ter me dado força para enfrentar os desafios, por me ensinar a ter paciência e encarar a vida de uma forma mais leve. Agradeço por acreditar em mim e em meu potencial, mesmo muitas vezes, eu mesma não acreditando. Sou grata por poder compartilhar mais essa conquista ao seu lado.

Às minhas amigas, **Ana Laura Paiva, Fernanda Ap. Costa, Pâmela Januário, Sabrina Reis e Érica Almeida**, que acompanharam de perto toda essa etapa. Obrigada pelo incentivo, por me escutarem desabafar, pelos conselhos, pelas conversas, por assistirem as prévias das minhas apresentações, pelos cafés, abraços e sorrisos.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pela concessão do apoio financeiro sob o processo número 2019/26035-1, e a **Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FAEPA)** sob o processo número 445/2020.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pelo apoio financeiro através de bolsa concedida durante seis meses.

Ao **Departamento de Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto** e à **Coordenação do Programa de Pós-Graduação**, pela infraestrutura, pelos equipamentos multiusuários, pela assistência e pelas disciplinas que tive a oportunidade de cursar durante a pós-graduação, que contribuíram para minha formação. Em especial, à secretaria do programa, **Gabriela Bunhotto**, que sempre esteve disposta a tirar todas as dúvidas e a instruir os alunos.

Aos docentes, **membros da banca examinadora**, pelo tempo disponibilizado e dedicado na avaliação desse trabalho.

À **Deus**, por ter sido todo o meu suporte durante esse processo.

A todos que de alguma forma contribuíram para minha formação profissional e pessoal.

“Viver é enfrentar um problema atrás do outro. O modo como você o encara é que faz a diferença”.

(Benjamin Franklin).

RESUMO

DIAS, I.S. “**Caracterização de PIMREG como biomarcador em gliomas**”. 2023, 111 f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

Os tumores do sistema nervoso central (SNC) se originam a partir da proliferação descontrolada de células da glia, apresentando diferentes perfis patológicos, histológicos e moleculares, os quais determinam as características clínicas da doença e a resposta terapêutica. Os gliomas representam cerca de 40% a 60% de todos os tumores primários do (SNC), sendo mais comum em adultos. Baseado na classificação histológica e grau de malignidade os tumores podem ser classificados em: astrocitoma (grau 2-4), oligodendroglioma (grau 2-3) e glioblastoma (GBM) (grau 4). GBM é o subtipo mais agressivo entre gliomas, sendo uma doença heterogênea e que apresenta um tempo médio de sobrevivência de 12 a 15 meses após o diagnóstico. A recorrência da doença é bastante comum para esse tipo de tumor e não existe um tratamento terapêutico alvo-específico. Desta forma, existe uma necessidade inerente de buscar novos biomarcadores moleculares para definir melhor as categorias de diagnóstico, prognóstico e prevenção de resposta terapêutica. PIMREG é um marcador de proliferação que desempenha papel no controle do ciclo celular e tumorigênese. Pesquisadores relataram níveis elevados de *PIMREG* em amostras tumorais em relação ao tecido normal de pacientes com diversos tipos de câncer. Dados recentes do nosso grupo mostraram que as amostras de pacientes com glioma apresentam níveis elevados do transcrito de *PIMREG* e que estão relacionados positivamente com o grau de malignidade, sendo que o subtipo GBM apresenta maior expressão. Assim, nós hipotetizamos que PIMREG poderia ser um potencial biomarcador para esse tipo de tumor. O objetivo do presente trabalho foi analisar a expressão proteica de PIMREG em amostras fixadas e embebidas em de pacientes com diferentes subtipos e graus de gliomas difusos. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética sob o nº parecer: 4.137.485, com emenda nº5.301.366. Foram utilizados 87 casos retrospectivos de amostras tumorais de pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP). Treze *Tissue Microarray* (TMAs) foram produzidos, cada qual com 24 cilindros, sendo um deles com controle negativo e os demais com amostras tumorais (3 regiões representativas por amostra, escolhidas pelos patologistas). Após, na técnica de imuno-histoquímica (IHQ) a recuperação antigênica foi realizada em panela à vapor com tampão TRIS-EDTA pH 9,0 para PIMREG e com tampão citrato pH 6,0 para Ki-67 (biomarcador utilizado na prática clínica). As incubações dos anticorpos primários anti-FAM64A (Sigma-Aldrich - HPA049934) na concentração 1:50 e do anticorpo anti-Ki-67 (Abcam® - ab16667) na concentração 1:150 foram overnight. Para detecção do anticorpo primário PIMREG e Ki-67 foi utilizado o sistema de detecção *HRP/DAB IHC Detection Kit-Micro-polymer*. As lâminas imunomarcadas foram digitalizadas utilizando o sistema de escaneamento de lâminas *Scan Scope VS120* e microscópio BX61 (Olympus). A expressão de PIMREG e Ki-67 foi quantificada através do número de núcleos com marcação positiva, pelo número total de núcleos, expresso em porcentagem (multiplicado por 100), avaliado com o *software ImageJ (Fiji)*. As análises mostraram que há maior expressão de PIMREG na região tumoral quando comparada com a região não tumoral. Entre os graus histológicos de malignidade do tumor, a expressão de PIMREG é mais elevada no grau 4. O grau de associação entre PIMREG e Ki-67 foi Spermán $r = 0.6592$, sugerindo que existe correlação entre as

duas variáveis. Houve significância da influência da expressão log de PIMREG na sobrevida dos pacientes através da regressão de Cox com as variáveis: idade, óbito e grau de malignidade. Através da curva ROC foram obtidos dois pontos de corte (1,16 e 2,04) para imunoexpressão de PIMREG para avaliar a taxa de sobrevida nos dois grupos observando que os grupos com expressão acima dos pontos de corte a mediana de sobrevida foi de 14-16 meses. Além disso, a expressão gênica de *PIMREG* foi avaliada em 1106 amostras de glioma do corte do *Atlas do Genoma do Câncer* (TCGA). Os níveis do transcrito de *PIMREG* se mostraram mais elevados no grupo que não possui metilação na região promotora do gene *MGMT*, nos grupos que apresentam homodeleção de *CDKN2A/CDKN2B* e no grupo que apresenta os genes de *IDH* selvagens. Coletivamente, nossos dados mostram a relação da expressão gênica e proteica de PIMREG com o subtipo mais agressivo do tumor e sugere que esta proteína tem potencial para ser utilizada como um biomarcador para indicar progressão da doença.

Palavras-chave: PIMREG, gliomas, imuno-histoquímica, TMA, Ki-67, marcador de proliferação.

ABSTRACT

DIAS, I.S. “**Characterization of PIMREG as a biomarker in gliomas**”. 2023 111 f. Master’s degree dissertation - School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

Central nervous system (CNS) tumors originate from the uncontrolled proliferation of glia cells, presenting different pathological, histological, and molecular profiles, which determine the clinical characteristics of the disease and the therapeutic response. Gliomas represent about 40% to 60% of all primary tumors of the (CNS), being more common in adults. Based on histological classification and the degree of malignancy tumors can be classified in astrocytoma (grade 2-4), oligodendroglioma (grade 2-3) and glioblastoma (GBM) (grade 4). GBM is the most aggressive subtype among gliomas, being an heterogeneous disease with an overall survival of 12-15 months after diagnosis. The recurrence of the disease often occurs for this type of tumor and no target-directed therapy are available. Thus, there is a need for novel molecular biomarkers for better classification and to predict prognosis and therapeutic response. PIMREG is a proliferation marker that plays a role in cell cycle control and tumorigenesis. Researchers reported high levels of *PIMREG* in tumor samples of patients with different types of cancer. Recent data from our group showed that samples of glioma patients have high levels of *PIMREG* transcript and that they are positively related to the degree of malignancy, being GBM subtype with the highest expression. Thus, we hypothesized that PIMREG could be a potential biomarker for this type of tumor. The objective of the present work was to analyze the protein expression of PIMREG in histological cuts of tumor samples of patients with different subtypes and malignant grades of diffuse gliomas. The work was approved by the local Ethics Committee under the registration number 4.137.485, with amendment n°. 5.301.366. Eighty-seven retrospective cases of patient tumor samples from the Hospital das Clínicas of the Ribeirão Preto Medical School (HCFMRP) were used. Thirteen Tissue Microarray (TMAs) were produced. Each TMA contained 24 cylinders, one of negative control and 23 tumor samples (3 representative regions per sample, chosen by pathologists). For the immunohistochemistry (IHC), antigenic recovery was performed with Tris-EDTA pH 9.0 for PIMREG and with pH 6.0 citrate buffer for Ki-67 (biomarker used in clinical practice). Samples were incubated with anti-FAM64A (SIGMA-ALDRICH-HPA049934; 1:50) and anti-Ki-67 (ABCAM®-AB1667; 1:150) primary antibodies overnight. For detection of the primary antibody, the HRP/DAB IHC detection system was used. The immunostained slides were scanned using the Scan Scope VS120 scanning system and BX61 microscope (Olympus). The expression of PIMREG and Ki-67 was quantified by the number of positive stained nuclei, by the total number of nuclei, expressed in a percentage (multiplied 100), using the IMAGEJ software (Fiji). The analyzes revealed that PIMREG is highly expressed in the tumor region compared to the non-tumor region. Also, PIMREG expression is higher in grade 4 of malignancy. The degree of Spearman association between PIMREG and Ki-67 was $r = 0.6592$, suggesting that there is correlation between the expression of both proteins. There was a significance of PIMREG log expression on patient survival through Cox regression with: age, death, and degree of malignancy. Through the ROC curve, two cutoff points (1.16 and 2.04) were obtained for IMPREG immunoexpression to assess the survival rate in both groups, noting that the groups with expression above the cutoff points the median survival was 14 -16 months. In addition, we evaluated *PIMREG*'s gene expression in 1106 patient samples of The Cancer Genome Atlas (TCGA) data

base. *PIMREG* gene expression was higher in the group without MGMT promoter methylation, in the groups with *CDKN2A/CDKN2B* homodelation, and the group harboring the wild type *IDH* genes. Collectively, our data show the relationship of *PIMREG* gene and protein expression with the most aggressive subtype of glioma and suggests that this protein has the potential to be used as a biomarker to indicate disease progression.

Keywords: *PIMREG*, gliomas, immunohistochemistry; TMA; Ki-67, proliferation marker.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Fluxograma com as etapas envolvidas na construção dos TMAs.....37
- Figura 2** – Fluxograma com os passos para obtenção da série com 87 pacientes..39
- Figura 3** – Etapas no processo de montagem dos blocos de TMA.....40
- Figura 4** – Passo a passo de como foram realizadas as análises das imunomarcações em cada imagem, utilizando o *software* Fiji ImageJ.....44
- Figura 5** – Análise da expressão proteica por Western Blot em lisados de células U2OS DRGFP selvagem e nocaute de PIMREG.....58
- Figura 6** - Fotomicrografias em cortes histológicos utilizados para as imunomarcações (PIMREG e Ki-67).....59
- Figura 7** – Imunoexpressão de PIMREG e de Ki-67 em amostras de pacientes com gliomas difusos de baixo grau.....60
- Figura 8** – Imunoexpressão de PIMREG e de Ki-67 em amostras de pacientes com gliomas difusos de alto grau.....61
- Figura 9** – Correlação da imunoexpressão de PIMREG e de Ki-67 em amostras de pacientes com gliomas difusos63
- Figura 10** – Quantificação da imunoexpressão de PIMREG e de Ki-67 nas amostras de regiões tumorais e não tumorais.....64
- Figura 11** – A imunoexpressão de PIMREG e Ki-67 é mais elevada em amostras de pacientes com gliomas de alto grau.....65
- Figura 12** – Aumento da imunoexpressão de PIMREG e Ki-67 nos pacientes diagnosticados com o grau 4 de malignidade.....66
- Figura 13** –Curva ROC obtida pela imunoexpressão de PIMREG e o óbito.....69
- Figura 14** –Curva de Kaplan-Meier em relação à imunoexpressão de PIMREG e o tempo de sobrevida dos pacientes utilizando 2,04 como ponto de corte.....70

Figura 15 –Curva ROC obtida pela imunexpressão de PIMREG e o grau de malignidade.....	71
Figura 16 - Curva de Kaplan-Meier em relação à imunexpressão de PIMREG e o tempo de sobrevida dos pacientes utilizando 1,16 como ponto de corte.....	72
Figura 17 – Níveis do transcrito <i>PIMREG</i> nas amostras dos pacientes com glioma do TCGA.....	75
Figura 18 – Correlação da expressão do transcrito de <i>PIMREG</i> e de <i>Ki-67 (MIB1)</i> nas amostras dos pacientes do TCGA.....	76
Figura 19 – Exemplo do gráfico de razão de pontos gerados após análise com <i>software</i> Coffalyser.Net com o kit P088.....	78
Figura 20 – Exemplo do gráfico de razão de pontos gerados após análise com <i>software</i> Coffalyser.Net com o kit ME012	79

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Programa do termociclador usado para MLPA.....51

Quadro 2 – Programa do termociclador usado para MS-MLPA.....52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação dos gliomas do tipo adulto, segundo OMS, 2021.....	24
Tabela 2 – Valores utilizados no <i>software Fiji ImageJ</i> para quantificação das lâminas imunomarcadas com PIMREG e Ki-67.....	47
Tabela 3 – Dados clínico-patológicos dos pacientes com gliomas difusos do tipo adulto.....	57
Tabela 4 – Análise univariada da imunexpressão de PIMREG com os dados clínicos da série dos pacientes.....	67
Tabela 5 – Análise da influência de PIMREG na sobrevida dos pacientes através da regressão Cox utilizando como variável o evento de óbito.....	67
Tabela 6 – Porcentagem de células marcadas com PIMREG antes da realização do tratamento e após a recidiva do tumor Análise da influência de PIMREG na sobrevida dos pacientes através da regressão Cox utilizando a variável grau de malignidade.....	68
Tabela 7- Análise da influência de PIMREG na sobrevida dos pacientes através da regressão Cox utilizando as variáveis: grau de malignidade e idade.....	68
Tabela 8 - Porcentagem de células marcadas com PIMREG antes da realização do tratamento e após a recidiva do tumor.....	73
Tabela 9 - Porcentagem de células marcadas com PIMREG antes da realização do tratamento e após a recidiva do tumor.....	80

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

°C: graus celsius

µl: microlitro

µm: micrômetro

g: força g (unidade de aceleração)

kDa: quilodalton

M: molar

ml: microlitro

rpm: rotação por minuto

AIC: 5-amino-imidazol-4-carboxamida

APC/C: anaphase-promoting complex/cyclosome

AUC: área sob a curva

BER: *base excision repair*

BSA: albumina de soro bovino

CDKN2A/2B: *cyclin dependent kinase inhibitor 2A/2B*

C-IMPACT now: the Consortium to Inform Molecular and Practical Approaches to CNS Tumor Taxonomy

D-2HG: D-2-hidroxi-glutarato

DAB: *diaminobenzidine tetrahydrochloride*

DNA: ácido desoxirribonucleico

DSS: *extran sulfate sodium*

EGFR: *epidermal growth factor receptor*

FFEP: tecidos fixados em formalina e embebido em parafina

FISH: hibridação *In Situ por fluorescência*

G0: quiescente

GGM: glioblastoma

H&E: hematoxilina e eosina

HRP: *horseradish peroxidase*

IDH1/2: isocitrato desidrogenase 1/2

IHQ: imuno-histoquímica

Ki-67: proteína nuclear não histona

MGMT: O⁶-metilguanina-DNA metiltransferase

MLPA: *multiplex ligation-dependent probe amplification*

mRNA: RNA mensageiro

MS-MLPA: methylation-specific MLPA
MTIC: 5-(3-metiltriazen-1-il)-imidazol-4-carboxamida
NEC: *not elsewhere classified*
NOS: *nor otherwise specified*
OMS: organização mundial de saúde
PBS: tampão fosfato-salino
PCR: reação em cadeia da polimerase
PIMREG: PICALM *interacting mitotic regulator*
QT: quimioterapia
RGB: *red, green, blue*
RNA: ribonucleic acid
ROC: *receiver operator characteristic curve*
SERPAT: serviço de patologia
SNC: sistema nervoso central
SOE: sem outras especificações
TCGA: *the cancer genome atlas*
TERT: *telomerase reverse transcriptase*
TMA: *tissue microarray*
TMZ: temozolomida
 α -KG: α -cetogluturato

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 Classificação dos gliomas.....	22
1.2 Biomarcadores em gliomas	27
1.3 PIMREG.....	28
2 OBJETIVOS	34
2.1 Objetivo Geral.....	34
2.2 Objetivos específicos	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1 Aspectos Éticos	36
3.2 Casuística	36
3.3 Confeção dos arranjos teciduais em matrizes (TMAs, <i>Tissue Microarrays</i>)...	39
3.4 Imuno-histoquímica (IHQ).....	40
3.4.1 Análise das Imunomarcações	42
3.5 Caracterização Molecular	47
3.5.1 Extração de DNA genômico das amostras em parafina.....	48
3.5.2 MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplification).....	48
3.6 Análise <i>in silico</i> do transcrito de <i>PIMREG</i> em amostras do TCGA.....	52
3.7 Análise estatística.....	53
4 RESULTADOS	55
4.1 Características clínico-patológicas dos pacientes	55
4.2 Padronização das reações de imuno-histoquímica com o anticorpo de PIMREG para uso em material fixado em formalina.....	58
4.3 A imunoexpressão de PIMREG se correlaciona com a de Ki-67 em gliomas difusos	62
4.4 A imunoexpressão de PIMREG é aumentada em amostras tumorais	63
4.5 A imunoexpressão de PIMREG correlaciona-se positivamente com o grau de malignidade em glioma.....	64
4.6 Análise da imunoexpressão de PIMREG com os dados clínico-patológicos dos pacientes.	66
4.7 Expressão gênica de <i>PIMREG</i> é mais elevada no subtipo mais agressivo de glioma.....	73
4.8 Otimização do diagnóstico histopatológico por meio de avaliação molecular (MLPA e MS-MLPA) em nove amostras.....	76
5 DISCUSSÃO	82
6 CONCLUSÃO	89
7 REFERÊNCIAS	92
ANEXOS	99

Anexo A- Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa – HC-FMRP – Aprovação do projeto original	99
Anexo B - Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa – HC-FMRP – Aprovação da emenda do projeto inicial.....	104
APÊNDICE	110
APÊNDICE A- Valores das médias de cada paciente após quantificações das imunomarcações de PIMREG e Ki-67 utilizado nas análises.	110

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Classificação dos gliomas

Os gliomas representam cerca de 40% a 60% de todos os tumores primários do sistema nervoso central (SNC), sendo mais comum em adultos (INCA, 2018; YANG, *et al.*, 2022). Nos Estados Unidos, estima-se, aproximadamente, 24.810 novos casos diagnosticados para o ano de 2023 e, desses, 18.990 progrediram ao óbito (SIEGEL *et al.*, 2022).

No Brasil, estima-se 6.110 novos casos de gliomas do SNC em homens e 5.380 em mulheres para cada ano do triênio 2023-2025, totalizando 11.490 novos casos. No estado de São Paulo, são esperados 2.370 novos casos segundo estimativa publicada pelo INCA (INCA, 2022). Embora a taxa de incidência seja baixa em comparação aos outros tipos de tumores, esse tipo de câncer contribui para a morbidade global, devido à sua localização e agressividade (INCA, 2022).

Os gliomas se originam a partir da proliferação descontrolada de células da glia (astrocitomas, oligodendrogliomas, ependimomas e micróglia), apresentando diferentes perfis patológicos, histológicos e moleculares, os quais determinam as características clínicas da doença e a resposta terapêutica (YANG *et al.*, 2022).

Em 2017, foi criado o *C-IMPACT now (the Consortium to Inform Molecular and Practical Approaches to CNS Tumor Taxonomy)*, formado por especialistas renomados na área, para realizar recomendações práticas sobre os avanços recentes no campo da classificação dos tumores do SNC (LOUIS *et al.*, 2017). Desde então, foram publicadas recomendações a respeito dos novos critérios que devem ser incorporados para uma melhor classificação dos tumores do SNC, o que forneceu novos *insights* para a 5ª edição da classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) divulgada em junho de 2021 (LOUIS *et al.*, 2020; 2021).

De acordo com a 5ª edição da OMS, os critérios utilizados para classificar os gliomas integram o perfil genético; novos marcadores moleculares; o tradicional exame histológico, de acordo com o tipo celular predominante; e o grau de malignidade, que varia do grau 2 ao 4, conforme alguns critérios, como aumento da densidade celular, atipia nuclear, hiperplasia vascular e necrose (LOUIS *et al.*, 2021).

A classificação histológica é uma forma de prever o comportamento biológico da neoplasia, contribuindo para a escolha das terapias conforme o diagnóstico. Na 3ª edição da OMS, em 2007, foram publicados os critérios histológicos para classificação dos gliomas, que incluem a escala de malignidade. O termo difuso é utilizado para

classificar os gliomas que não possuem uma boa delimitação do tumor, tendo como principal característica a infiltração. Os tumores classificados como de grau 1 são benignos, bem delimitados e geralmente císticos, com baixo potencial proliferativo e os pacientes diagnosticados com esse tipo de tumor apresentam resultados favoráveis após remoção cirúrgica; os tumores de grau 2 possuem lesões com capacidade infiltrativa, que geralmente progridem para graus de malignidade mais elevados; os tumores de grau 3 correspondem àqueles que possuem atipia nuclear e alta atividade mitótica; e os de grau 4 correspondem às neoplasias com altos níveis de atipia, hiperplasia vascular, necrose, alta atividade mitótica e extensa infiltração. Dessa forma, o aumento da escala de malignidade do tumor está diretamente relacionado ao pior prognóstico da doença (LOUIS *et al.*, 2007; LOUIS *et al.*, 2016; PERRY, A.; WESSELING, P., 2016; 2016. LOUIS *et al.*, 2021).

Os principais marcadores moleculares utilizados na prática clínica para classificar os gliomas são: mutações no gene 1 ou 2 da isocitrato desidrogenase (*IDH* – *do inglês isocitrate dehydrogenase*), podendo ser selvagem ou mutante; co-deleção dos braços curto e longo dos cromossomos 1 e 19 (1p/19q); homodeleção dos genes *CDKN2A/2B* (*cyclin dependent kinase inhibitor 2A/2B*); mutação no gene *TERT* (*telomerase reverse transcriptase*); alterações nos cromossomos 7 e 10; e amplificação do gene *EGFR* (*epidermal growth factor receptor*). O *status* da metilação da região promotora do gene *MGMT* (*O⁶-metilguanina-DNA metiltransferase*) identifica os pacientes com maior probabilidade de se beneficiar do tratamento padrão ouro com temozolomida (TMZ) (descrito abaixo). (LOUIS *et al.*, 2021). A designação *NOS* (“*Nor Otherwise Specified*”) é utilizada quando não existem informações suficientes para classificar o tumor, e a designação *NEC* (“*Not Elsewhere Classified*”) é utilizada quando o diagnóstico molecular foi realizado, porém o resultado, juntamente com os dados clínicos e histopatológicos, não permite um diagnóstico segundo critérios da OMS (LOUIS, *et al.*, 2021; SONODA, *et al.*, 2020). Baseado na classificação histológica, no grau de malignidade e nos marcadores moleculares, os tumores podem ser classificados em: astrocitoma *IDH* mutante (grau 2,3 e 4); oligodendroglioma, *IDH* mutante e 1p19q co-deletado (grau 2-3); e glioblastoma (GBM), *IDH* selvagem (grau 4) (LOUIS *et al.*, 2021) (Tabela 1).

Tabela 1 - Classificação dos gliomas do tipo adulto, segundo OMS, 2021.

Tipo histológico	Grau de estadiamento	Marcadores moleculares
Astrocitoma	2-4	Mutação em <i>IDH</i> ; Alteração em <i>CDKN2A/2B</i> .
Oligodendroglioma	2-3	Mutação em <i>IDH</i> ; co-deleção 1p19q; mutação <i>TERT</i> .
Glioblastoma	4	<i>IDH</i> selvagem; alteração cromossomo 7/10; mutação <i>TERT</i> .

Adaptado (LOUIS *et al.*, 2021).

Os oligodendrogliomas são formados por oligodendrócitos, com núcleo arredondado, bem delimitado, com células uniformes e sem prolongamentos. Esse tipo de tumor apresenta vacúolo perinuclear, com vasos finos e delicados, e possui uma incidência menor, quando comparado com os astrocitomas e os GBMs. O tumor tende a recidivar após processo cirúrgico, progredindo para um grau de malignidade mais elevado (LOUIS *et al.*, 2007; PERRY, A.; WESSELING, P., 2016; LOUIS *et al.*, 2021).

Astrocitomas são neoplasias originadas nos astrócitos e são o tipo histológico mais comum dentre os gliomas. Os tumores classificados como astrocitomas difusos apresentam infiltração da região tumoral com o tecido nervoso normal, não permitindo uma delimitação na neoplasia, o que, em muitos casos, inviabiliza a ressecção total do tumor. Esse tipo de tumor apresenta grandes áreas de anaplasia, irregularidade nuclear, hiper cromasia e tende a recidivar após o processo cirúrgico (LOUIS *et al.*, 2007; LOUIS *et al.*, 2016; PERRY, A.; WESSELING, P., 2016; LOUIS *et al.*, 2021).

GBM é o tipo mais comum de glioma difuso em adultos, apresentando proliferação celular descontrolada, crescimento rápido e está associado à alta taxa de mortalidade (LOUIS *et al.*, 2007; 2016; 2021). Dessa forma, o aumento do grau de malignidade em glioma está relacionado ao aumento da taxa de mortalidade. Os GBMs podem ser classificados em: primário, quando o tumor está avançado ao diagnóstico, ou secundário, quando ocorre a progressão de um tumor de baixo grau. Porém, apesar das diferenças em sua ontologia, do ponto de vista histológico, eles são indistinguíveis (COHEN *et al.*, 2013; LOUIS *et al.*, 2016).

O tempo médio de sobrevida de um paciente com GBM é de, aproximadamente, 15 meses após o diagnóstico, mesmo com o tratamento

convencional, que consiste em ressecção cirúrgica em sua máxima extensão (quando possível), radioterapia (RT) e quimioterapia (QT) com temozolomida (TMZ) - nome comercial Temodar ou Temodal (OSTROM *et al.*, 2015; LAH, T.T., NOVAK, M. and BREZNIK, B., 2020).

TMZ é um agente alquilante de DNA, que é capaz de conduzir quebras de dupla fita de DNA, através da metilação das bases de guanina e de adenina, e provocar parada do ciclo celular nas fases G2/M (OSTROM *et al.*, 2015; LEE, Y.S, 2016; ELLIS, *et al.*, 2019, LAH, T.T., NOVAK, M. and BREZNIK, B., 2020). TMZ é um derivado imidazotetrazina do agente alquilante dacarbazina, sendo lipofílico, o que permite com que a droga penetre na barreira hematoencefálica. A droga é administrada por via oral nos pacientes, pois o composto é convertido em monometil triazeno 5-(3-metiltriazen-1-il)-imidazol-4-carboxamida (MTIC) somente em pH fisiológico (7,0). O MTIC, em contato com a água, é hidrolisado em 5-amino-imidazol-4-carboxamida (AIC) e em metil-hidrazina (metildiazônio), que metila o DNA (ZHANG *et al.*, 2012).

As principais lesões induzidas por TMZ são: N₇ metilguanina (N₇-meG) e N₃ metiladenina (N₃-meA), reparadas por mecanismo de excisão de base BER (*base excision repair*). Enquanto que a lesão O⁶ metilguanina (O⁶-meG), menos frequente, porém mais citotóxica para a célula, é revertida pelo produto do gene *MGMT* (O⁶-metilguanina-DNA metiltransferase) por mecanismo de reparo direto (revisado em (FU, D.; CALVO, J. A.; SAMSON, L. D., 2012; ERASIMUS *et al.*, 2016). As terapias adjuvantes induzem danos no DNA, que visam, eventualmente, conduzir as células tumorais à morte celular. Porém, a recorrência da doença é bastante comum, ocorrendo em média 7 meses após a cirurgia (LEE, Y.S., 2016; STUPP *et al.*, 2009).

Dessa forma, existe uma necessidade inerente de buscar novos marcadores moleculares para definir melhor as categorias de diagnóstico, prognóstico e prevenção de resposta terapêutica (revisado em (MOLINARI, CURRAN, GRANT, 2019)). O *status* de metilação do promotor *MGMT*, por exemplo, foi o primeiro biomarcador utilizado na clínica médica para predizer a resposta de pacientes com GBM frente ao tratamento com TMZ. Quando expresso, o gene *MGMT* produz a enzima de reparo O⁶-metilguanina-DNA metiltransferase, que reverte a lesão O⁶-metilguanina no DNA causada pela TMZ, removendo o grupo aquil e tornando as células resistentes a esse tratamento. Enquanto que, a metilação do promotor *MGMT* resulta em inibição da expressão de *MGMT* e, conseqüentemente, desabilita as células a repararem o dano, tornando-as sensíveis ao tratamento (HEGI, *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2018; ANG *et*

al., 2020). Dessa forma, os pacientes que possuem metilação do gene *MGMT* são beneficiados pelo tratamento com TMZ e essa é uma forma de direcionar o tratamento para que seja mais eficiente (CHEN *et al.*, 2018; ANG *et al.*, 2020).

Em um estudo realizado no ano de 2008, *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), forneceu uma visão detalhada das alterações genômicas em uma grande coorte de GBM com 206 amostras de pacientes. O sequenciamento de vários genes dessas amostras possibilitou a identificação de mutação pontual na isocitrato desidrogenase (VERHAAK *et al.*, 2010). IDH1 e IDH2 são enzimas metabólicas essenciais que convertem o isocitrato em α -cetoglutarato (α -KG).

As mutações mais comuns em IDH1 (R132H) e em IDH2 (R172H) são alterações de resíduo único, que substituem uma arginina por uma histidina, criando uma função adicional para a enzima, pela qual ela converte α -KG em D-2-hidroxi-glutarato (D-2HG) (LUDWIG *et al.*, 2017; MONDESEIR *et al.*, 2016). A superprodução de D-2HG interfere no metabolismo celular e na regulação epigenética, contribuindo para a oncogênese. Altos níveis de D-2HG inibem dioxigenases dependentes de α -KG, incluindo histona e desmetilases de DNA, levando à hipermetilação de histonas e DNA e, finalmente, um bloqueio na diferenciação celular (FIGUEROA *et al.*, 2010; MONDESIR *et al.*, 2016; ZHU *et al.*, 2017).

Mutações em *IDH* são consideradas uns dos primeiros eventos na gênese do glioma e, embora a presença delas esteja relacionada a produção de D-2HG e aparenta contribuir para oncogênese, de fato, elas estão associadas a subtipos menos agressivos de gliomas e à sobrevida prolongada (MONDESIR *et al.*, 2016; ZHU *et al.*, 2017).

A co-deleção de 1p19q auxilia na classificação do subtipo oligodendroglial (grau de estadiamento 2-3) dos tumores do SNC, e os pacientes que possuem a co-deleção dispõem de um melhor prognóstico. A sobrevida média dos pacientes que apresentam a co-deleção foi de, aproximadamente, 7 anos, enquanto que para os pacientes que não possuem a co-deleção, a taxa de sobrevida foi de, aproximadamente, 3 anos. (FALLON *et al.*, 2004; JENKINS *et al.*, 2006; revisado em (GALANIS *et al.*, 2011).

Diante disso, essas mutações tornaram-se parte integrante do diagnóstico molecular de gliomas, juntamente com outros marcadores mencionados, como o *status* da metilação do promotor *MGMT* e co-deleção 1p19q, sendo utilizados como biomarcadores de prognóstico (LOUIS *et al.*, 2021).

Assim, a combinação de características histológicas e moleculares auxilia em um diagnóstico mais preciso, diminuindo a disparidade entre observadores (revisado em (MOLINARI, CURRAN, GRANT, 2019; LOUIS *et al.*, 2021)).

1.2 Biomarcadores em gliomas

Os biomarcadores são classificados em marcadores prognósticos, os quais auxiliam no diagnóstico clínico e progressão da doença independente do tratamento; e os marcadores preditivos auxiliam na resposta frente a um tratamento específico, a fim de identificar os pacientes que possuem maior probabilidade de se beneficiar do tratamento (revisado em (SULLIVAN, C.A.W e CHUNG, G.G., 2010); GALANIS *et al.*, 2010; HAYNES, H.R; PIRAGUA, S.C. e KURIAN, K.M, 2014), e ajudam na identificação de mecanismos de escape ou resistência durante o tratamento (TABATABAI, *et al.*, 2012).

O gene *MKI67* codifica a proteína nuclear não histona Ki-67, com peso molecular de, aproximadamente, 395 kDa, localizada no núcleo das células durante as fases G1, S, G2 e M do ciclo celular, mas não está presente na fase G0 (quiescente) (AZAMBUJA *et al.*, 2007; ALKHAIBARY *et al.*, 2019). A expressão de Ki-67 varia ao longo do ciclo celular, atinge o seu pico durante a mitose e está associada à proliferação celular (ALKHAIBARY, *et al.*, 2019; SOLIMAN, N. A. e YUSSIF, S. M, 2016).

A proteína Ki-67 é um importante biomarcador de prognóstico utilizado na prática clínica e a imunoexpressão da sua proteína reflete, diretamente, o estado fisiológico proliferativo da célula. Esse parâmetro é utilizado com frequência em diversos tipos de câncer, como câncer de mama, de próstata, de pulmão, cânceres gastrointestinais, sarcomas e gliomas (SORBYE *et al.*, 2012; CIANCIO *et al.*, 2012; JOSEFSSO *et al.*, 2012; SOLIMAN, N. A. E YUSSIF, S. M, 2016; NIELSEN *et al.*, 2018; ALKHAIBARY *et al.*, 2019).

Para avaliar a proliferação das células no tecido tumoral, é utilizada, como parâmetro, a marcação da proteína Ki-67 através da técnica de imuno-histoquímica (IHQ), um método eficaz de avaliação para o prognóstico da doença, amplamente utilizado para auxiliar na rotina patológica. O valor do índice de proliferação celular é calculado pelo número de células tumorais marcadas sobre o número total de células, multiplicadas por 100. Para calcular o índice de proliferação celular de Ki-67, são

consideradas apenas aquelas células marcadas que apresentam coloração positiva (coloração marrom) e nuclear. (LÉON *et al.*, 2018; NIELSEN *et al.*, 2018).

O mau prognóstico em diversos tipos de câncer, como câncer de mama (SOLIMAN, N. A. e YUSSIF, S. M, 2016), câncer de pulmão (MARTINHO *et al.*, 2004), tumores neuro-endócrinos (NADLER *et al.*, 2013) e em gliomas (NIELSEN *et al.*, 2018; ALKHAIBARY *et al.*, 2019) está associado aos altos níveis/porcentagem de marcação das células por Ki-67, que indicam que os níveis de proliferação celular estão associados à baixa sobrevida dos pacientes. Em um estudo publicado em 2016, observou-se que os pacientes com câncer de mama que apresentaram a expressão de Ki-67 maior que 15% tiveram maior incidência de metástase do que os pacientes que tiveram a expressão menor que 15% (SOLIMAN, N. A. e YUSSIF, S. M, 2016).

Nos gliomas, Ki-67 também é utilizado como marcador para auxiliar na classificação do grau de malignidade do tumor. Os valores gerais do índice de proliferação de Ki-67 nos gliomas difusos (astrocitomas e oligodendrogliomas) de baixo grau de malignidade (grau 2) estão abaixo de 15%, e para os gliomas de alto grau (grau 3 e 4) estão entre 15 e 20% (LOUIS *et al.*, 2016; NIELSEN *et al.*, 2018). No entanto, como existe uma heterogeneidade no tumor, esses valores de corte do índice de proliferação de Ki-67 não são bem definidos para os subtipos de gliomas, sendo uma limitação do estudo (NIELSEN *et al.*, 2018).

1.3 PIMREG

O gene que codifica PIMREG (*PICALM interacting mitotic regulator*) está localizado no cromossomo 17p13.2 e é composto por 6 éxons (primeiro éxon não-codificante), de tamanho total de 7 kb e peso molecular de 27 kDa. PIMREG possui duas isoformas, uma de 238 e a outra de 248 aminoácidos, ambas compartilham os primeiros 228 resíduos (ARCHANGELO *et al.*, 2006). A proteína, descrita inicialmente como CATS, é também conhecida como FAM64A e RCS1 (ARCHANGELO *et al.*, 2013; ZHAO *et al.*, 2008).

PIMREG é localizada majoritariamente no núcleo e enriquecida no nucléolo e é considerada um regulador mitótico, uma vez que é substrato do complexo promotor da anáfase/ciclossomo (APC/C) e está relacionada ao controle da transição de metáfase para anáfase. Ademais, PIMREG interage com PICALM e a proteína de fusão leucêmica PICALM/AF10, sequestrando-a para o núcleo e inibindo sua capacidade de ativar a transcrição (ARCHANGELO *et al.*, 2006; ARCHANGELO *et al.*,

2008; ZHAO *et al.*, 2008). Barbutti e colaboradores (2016) demonstraram que o silenciamento de *PIMREG* alterou a progressão do ciclo celular de células leucêmicas, atestado pela diminuição da expressão dos reguladores do ciclo como ciclina A, E e B1, sugerindo provável papel dessa proteína no controle da proliferação celular (BARBUTTI *et al.*, 2016).

Em tecido normal, *PIMREG* é expressa no timo, baço e cólon e, em menor grau, no intestino delgado, ovário e testículos (ARCHANGELO *et al.*, 2006). A proteína é altamente expressa em linhagens celulares tumorais, mas não em células que não se encontram em estado de proliferação. Sua expressão é induzida por mitógenos e de forma dependente do ciclo celular, sendo os seus níveis mais elevados nas fases S e G2 e mais reduzidos na fase G1 (ARCHANGELO *et al.*, 2006; ARCHANGELO *et al.*, 2008). Assim, os níveis de *PIMREG* estão relacionados ao estado proliferativo das células e a proteína é considerada um marcador de proliferação (ARCHANGELO *et al.*, 2008).

Em camundongos, foi demonstrado que *Pimreg* é altamente expressa em núcleos de cardiomiócitos fetais submetidos à condição de hipóxia, e essa condição foi contida pela exposição ao oxigênio, apontando o papel de *PIMREG* como regulador da proliferação dependente de hipóxia (HASHIMOTO *et al.*, 2017).

Trabalhos recentes têm relatado a expressão do transcrito de *PIMREG* em diversos tipos de câncer (revisado em ARCHANGELO, 2018). Foi descrito um conjunto de genes *BIRC5*, *CENPA* e *PIMREG* super-regulados no câncer de mama triplo-negativo e essa expressão foi relacionada com o mau prognóstico da doença. A alta expressão de *PIMREG* foi relacionada com a baixa sobrevida dos pacientes, indicando-o como potencial marcador de prognóstico e alvo terapêutico no tratamento da doença (ZHANG *et al.*, 2014).

Em uma análise Pan-câncer realizada com 13 diferentes tipos de amostras tumorais (carcinoma urotelial da bexiga; câncer de mama; adenocarcinoma de cólon; carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço; carcinoma de células renais com cromofobia renal; carcinoma de células renais de células claras de rim; carcinoma de células papilares renais; carcinoma hepatocelular; adenocarcinoma de pulmão; carcinoma de células escamosas do pulmão; adenocarcinoma de próstata; carcinoma da tireoide e carcinoma endometrial do corpo uterino) em comparação com tecido normal, a baixa sobrevida dos pacientes foi relacionada com a elevada expressão de *PIMREG* em 11 tipos de câncer (HU *et al.*, 2017). A alta expressão de *PIMREG*

também foi encontrada em carcinoma de células renais (YAMADA *et al.*, 2018; WEI *et al.*, 2019), câncer pancreático (JIAO *et al.*, 2019), câncer de mama (HU *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2019; JIANG *et al.*, 2019; YAO *et al.*, 2019), câncer de próstata (ZHOU *et al.*, 2021) e em gliomas (SERAFIM *et al.*, 2022).

Todos esses estudos que avaliaram, predominantemente, dados de expressão gênica (RNAseq) em amostras tumorais de pacientes, depositados em bancos de dados públicos, mostram que a alta expressão do transcrito está relacionada ao grau de malignidade da doença e mau prognóstico, sugerindo o potencial papel de *PIMREG* como um biomarcador de prognóstico e progressão tumoral, não só em câncer de mama, mas também em câncer de pâncreas, (JIAO *et al.*, 2019), de células renais (WEI *et al.*, 2019; YAMADA *et al.*, 2018) e em gliomas (SERAFIM *et al.*, 2022).

No câncer de mama negativo para expressão de HER-2, *PIMREG* pode ser um biomarcador preditivo em resposta ao tratamento adjuvante com paclitaxel, participando no controle da migração e metástase (Li *et al.*, 2019). Diante do exposto, todos esses achados sugerem que *PIMREG* pode ser um biomarcador prognóstico valioso devido à correlação positiva entre o aumento de sua expressão com o aumento da malignidade do tumor e inversamente proporcional à sobrevida dos pacientes com câncer.

No estudo de Jiang e colaboradores, 2019, a relação da alta expressão de *PIMREG* com à baixa taxa de sobrevida também foi observada em um ensaio *in vivo*, no qual os camundongos inoculados com linhagem celular de câncer de mama superexpressas com *PIMREG* apresentaram menor taxa de sobrevida do que os camundongos inoculados com células silenciadas para *PIMREG* (JIANG *et al.*, 2019). Ademais, foi observada metástase nos pulmões dos camundongos superexpressos, indicando, mais uma vez, a relação de *PIMREG* com a proliferação celular (JIANG *et al.*, 2019). Em outro estudo, níveis aumentados da expressão de marcadores mesenquimais (N-caderina, vimentina, ZEB1, TWIST) e, conseqüente, diminuição do nível do marcador epitelial (E-caderina) em amostras de câncer de mama, mostraram a relação de *PIMREG* na transição epitélio-mesenquimal (ZHANG *et al.*, 2019).

Uma função importante de *PIMREG*, demonstrada em modelo animal, foi inferida ao observar que a superexpressão e o *knock-down* de *PIMREG* potencializou e inibiu, respectivamente, a ativação de STAT3 induzida por IL-6 (XU *et al.*, 2019). Como observado pelo ensaio de imunoprecipitação de cromatina, a superexpressão de *PIMREG* facilitou a ligação de STAT3 aos promotores de seus genes alvo

(SOCS3), enquanto o *knock-down* inibiu a transcrição de *FOS* e *SOCS3*, genes alvo *downstream* da via de *STAT3*, o que, conseqüentemente, diminuiu a ligação de *STAT3* ao promotor *SOCS3* (XU *et al.*, 2019). Outro achado desse estudo foi que a deficiência de *Pimreg* suprimiu a diferenciação de linfócitos do tipo *Th17* e inibiu a transcrição dos genes alvos (*c-Myc*, *Pcna*, *Bcl-xl* e *Ccnd1*) dessas células diferenciadas. Com isso, a baixa expressão de *Pimreg* diminuiu a severidade da colite induzida por *extran sulfate sodium* (DSS) e as inflamações foram menos graves, quando comparada aos camundongos selvagens. Ademais, esses resultados mostraram a relação do potencial papel de *PIMREG* como um regulador positivo na atividade de *STAT3*, podendo levar ao desenvolvimento de distúrbios autoimunes e ao desenvolvimento de tumores quando expresso (XU *et al.*, 2019).

Além disso, dados recentes de análises *in silico* publicadas pelo nosso grupo de pesquisa mostraram que, quando comparada a expressão gênica de *PIMREG* em diversos tipos tumorais e seus respectivos tecidos não tumorais, o transcrito estava mais presente no tecido tumoral (SERAFIM *et al.*, 2022). Dentre os tipos tumorais, GBM é o tipo de câncer que apresenta os níveis mais elevados de *PIMREG* e que, em gliomas, o nível da expressão gênica está diretamente relacionado com o grau de malignidade (SERAFIM *et al.*, 2022). Esses resultados mencionados acima enfatizam a relação da expressão gênica de *PIMREG* com a progressão do glioma.

Ainda diante da relação da importância de *PIMREG* em gliomas, foi observado que a expressão de *PIMREG* está mais elevada no grupo de pacientes com *IDH selvagem* (GBM), indicando a sua relação com o subtipo mais agressivo da neoplasia. Na análise de sobrevida, os pacientes com alta expressão de *PIMREG* apresentaram uma taxa mediana de sobrevida de aproximadamente 24 meses, enquanto que, no grupo com baixa expressão do transcrito, a taxa de sobrevida foi de aproximadamente 95 meses (SERAFIM *et al.*, 2022).

Ademais, ensaios funcionais realizados em células de GBM mostraram que a expressão de *PIMREG* aumenta mediante o tratamento com o agente genotóxico TMZ de forma dose dependente e o aumento nos níveis de *PIMREG* foi acompanhado pelo aumento da fosforilação da histona H2AX, um marcador de dano no DNA, em um ensaio de *Western blot* (SERAFIM *et al.*, 2022).

Diante do fato de *PIMREG* ser um marcador de proliferação e das evidências que *PIMREG* desempenhe um papel importante no desenvolvimento do sistema nervoso central, assim como dos gliomas, adicionado ao fato de *PIMREG* ter sido

sugerido como um possível marcador de progressão e prognóstico em alguns tipos de cânceres, nossa hipótese é que a imunexpressão de PIMREG reflita a sua expressão gênica em tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina (TFEP) e que seja diretamente proporcional ao grau de malignidade e ao índice de proliferação celular, para que, dessa forma, possa ser considerado como um potencial biomarcador para esse tipo de tumor.

JUSTIFICATIVA

Embasados nos dados da literatura e nos resultados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa, esperamos que a imunexpressão de PIMREG reflita a sua transcrição e que possa ser um biomarcador de progressão tumoral e/ou prognóstico em gliomas difusos. Ademais, não há relato na literatura que avalie a expressão de PIMREG em gliomas, sendo necessário, assim, a realização da avaliação da sua expressão numa série de casos, de diferentes graus de malignidade e de forma sistematizada. Dessa forma, ao padronizar os ensaios das reações IHQs para a análise de expressão proteica de PIMREG em amostras de gliomas difusos de graus distintos de malignidade numa série de pacientes operados no HCFMRP, poderemos determinar se PIMREG é um biomarcador. Nossa perspectiva é que a implantação da análise de PIMREG por IHQ possa, eventualmente, ser utilizada na rotina do laboratório de patologia para uma melhor caracterização dos tumores e, assim, possa ter poder preditivo de prognóstico.

• **OBJETIVOS**

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar se a imunexpressão de PIMREG pode ser utilizada como marcador de progressão tumoral e/ou prognóstico em gliomas difusos.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Padronizar o anticorpo que reconheça PIMREG para tecido FFEP em IHQ;

2.2.2 Analisar a expressão de PIMREG por IHQ em arranjos de matrizes teciduais (TMA) numa série de gliomas difusos de diferentes tipos histológicos e graus de malignidade;

2.2.3. Relacionar a imunexpressão de PIMREG com os dados clínico-patológicos numa série de amostras de gliomas difusos com diferentes graus de malignidade;

2.2.4 Avaliar se há correlação entre a imunexpressão de PIMREG e a sobrevida dos pacientes e na resposta ao tratamento na série dos pacientes;

2.2.5 Avaliar *in sílico* se há correlação entre a expressão do transcrito de *PIMREG* com outros biomarcadores utilizados na clínica oncológica, tais como o *status* da metilação do *MGMT*, homodeleção de *CDKN2A/2B* e a presença de mutações nos genes *IDH1/IDH2* das amostras de gliomas difusos, graus 2 a 4, do TCGA.

. MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Aspectos Éticos

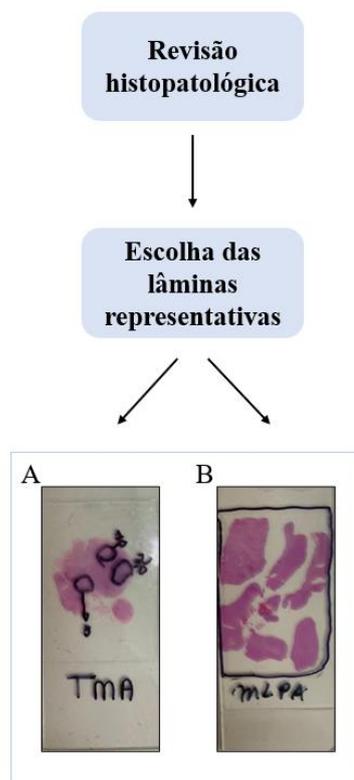
Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), conforme parecer no 4.137.485, de 06 de julho de 2020 (Anexo A). Foi solicitada uma emenda ao projeto inicial incluindo amostras de pacientes que eventualmente apresentaram recidivas da neoplasia no biênio 2021/2022, cuja aprovação consta no parecer no 5.301.366, de 21 de março de 2022 (Anexo B).

3.2 Casuística

As amostras de biópsias de gliomas em tecido FFEP foram obtidas no arquivo de blocos e lâminas do Serviço de Patologia (SERPAT) do HCFMRP-USP, compreendendo o período de 2005 a 2022.

As lâminas coradas com hematoxilina e eosina (H&E) foram revisadas por 2 médicos patologistas do SERPAT com experiência na área (F.P.S. e L.N.). As áreas representativas das neoplasias (“spots”) foram selecionadas e marcadas para a obtenção das respectivas punções (Figura 1), que foram posteriormente transferidos para os blocos de TMA, conforme ilustrado na figura 2.

Figura 1 – Fluxograma com as etapas envolvidas na construção dos TMAs.



Nota: Após a revisão histopatológica de cada caso em cortes histológicos corados com H&E e a confirmação dos diagnósticos de acordo com a classificação da 5ª edição da OMS (2021) pelos patologistas envolvidos, foram selecionadas as lâminas mais representativas de cada caso, de acordo com os critérios de inclusão e exclusão. A seguir, foram realizadas as marcações das regiões de interesse (1 a 3 regiões por caso) nas diferentes lâminas de cada caso. Finalmente, os blocos de tecido tumoral embebido em parafina foram comparados com os respectivos cortes histológicos a fim de se obter as punções das regiões de interesse, as quais foram transferidos para os blocos de TMA. **(A)** Exemplo das marcações de três regiões distintas da neoplasia (“cores”) para confecção dos TMAs. **(B)** Exemplo da escolha e marcação da região da neoplasia pelos patologistas para extração de DNA e realização da técnica de MLPA (descritos no item 3.5.1 e 3.5.2).

Para a escolha dos casos, foram utilizados os seguintes critérios:

Critérios de Inclusão:

- i) amostras de gliomas difusos com revisão histopatológica pelos patologistas envolvidos;
- ii) blocos de TFFEP com tecido tumoral suficiente, de acordo com a avaliação dos patologistas, para a realização de cortes adicionais, sem que se inviabilizasse a realização eventual de cortes para futuros exames ancilares.

Critérios de Exclusão:

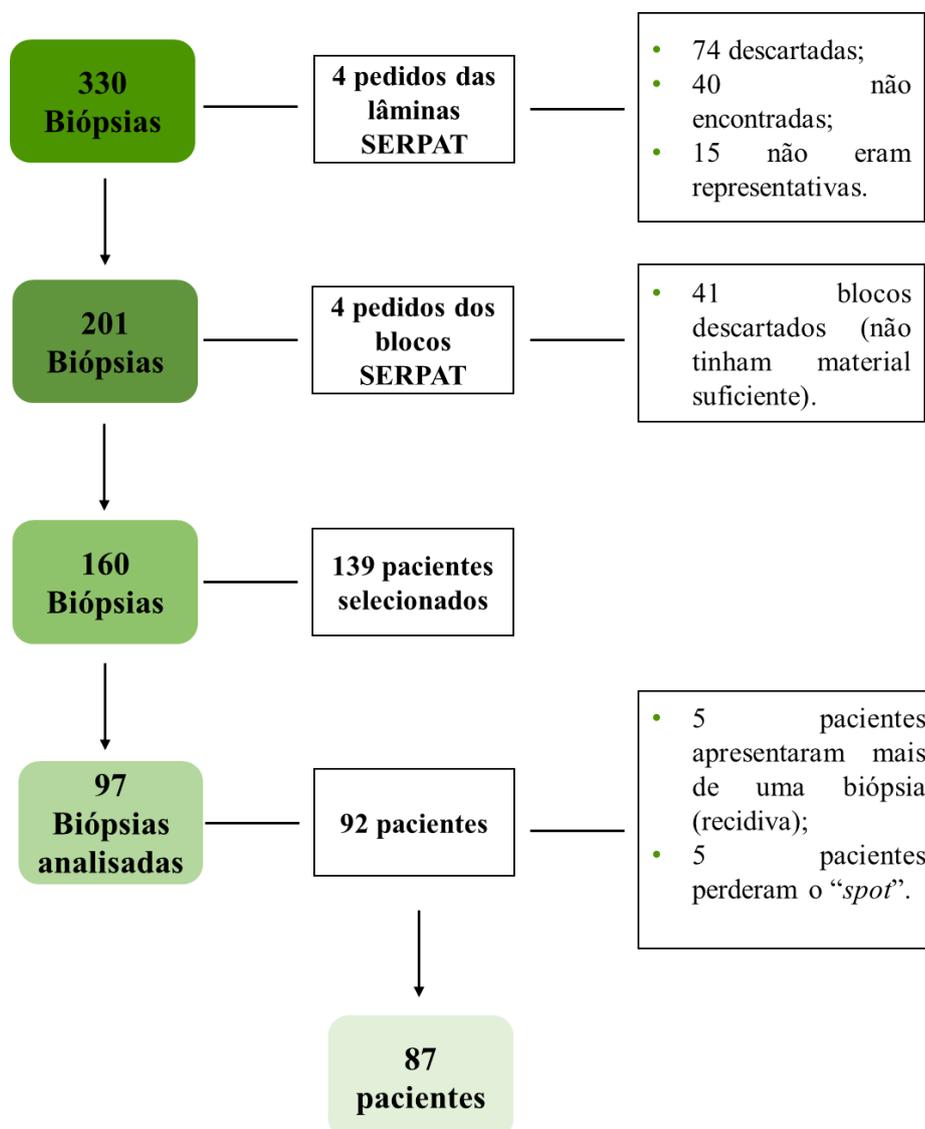
- i) casos com pouco material no bloco de tecido FFEP, de acordo com a avaliação dos patologistas;
- ii) casos em que o material não fosse representativo de tecido tumoral, por exemplo, grande parte da amostra continha necrose e/ou hemorragia.

Com o auxílio do sistema informatizado foi realizado o levantamento dos casos de gliomas operados no HCFMRP-USP no período entre 2005 a 2022, sendo obtidos 330 biópsias. Primeiramente, as lâminas respectivas de cada caso foram requeridas e as regiões de interesse, bem como a revisão histopatológica de cada caso, foram avaliadas pelos médicos patologistas, seguindo as recomendações da classificação vigente dos tumores do sistema nervoso central (LOUIS *et al.*, 2021). Cento e vinte nove biópsias tiveram de ser descartadas: 74 não atendiam os critérios de inclusão; 40 biópsias os respectivos blocos de tecido FFEP não estavam no arquivo histopatológico e em 15 biópsias não havia áreas representativas das neoplasias (extensa necrose e/ou hemorragia, áreas adjacentes à neoplasia).

Desta forma foram incluídas 201 das 330 biópsias inicialmente obtidas. A seguir, ao se avaliar os blocos de tecido FFEP solicitados ao arquivo do SERPAT, outros 41 casos tiveram de ser descartados, pois os respectivos blocos não tinham tecido tumoral remanescente suficiente ou representativo (extensa necrose), totalizando 160 biópsias, correspondendo a 139 pacientes, já que 19 pacientes apresentaram recidivas da neoplasia e, por conseguinte, tiveram mais de uma biópsia.

No decorrer do estudo, foram avaliadas 97 das 160 biópsias disponíveis, pois durante a padronização do anticorpo de PIMREG sua fabricação foi descontinuada e a quantidade que tínhamos do anticorpo não foi suficiente para ser utilizadas em todas as amostras. Em resumo, foram utilizados TFFEP de 97 biópsias provenientes de 92 pacientes com gliomas difusos, onde 5 pacientes apresentaram recidiva e 5 pacientes durante a técnica de IHQ, perderam seu respectivo “spot”, precisando ser removido das análises (Figura 2).

Figura 2 - Fluxograma com os passos para obtenção da série com 87 pacientes.



A fim de se preservar a identidade dos pacientes, as biópsias foram numeradas de forma consecutiva a partir da amostra mais antiga e inseridas em uma tabela (Apêndice A).

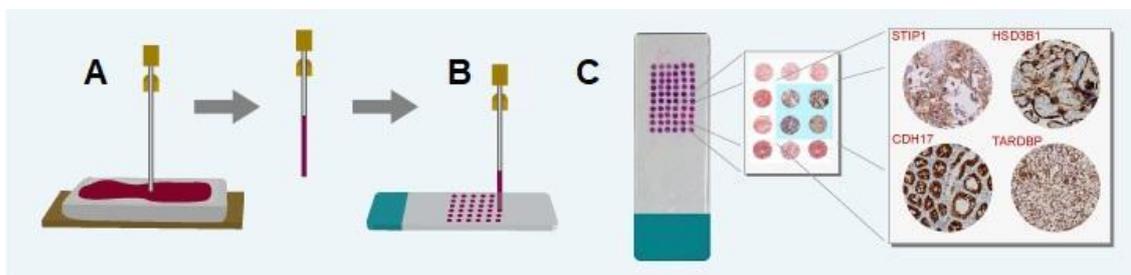
3.3 Confeção dos arranjos teciduais em matrizes (TMAs, *Tissue Microarrays*)

De forma sucinta, para construção dos TMAs, nas áreas de tecido tumoral previamente escolhidas dos blocos de TFFEP (*“blocos doadores”*), foi realizado uma punção cilíndrica com auxílio de uma caneta metálica com 2,0 mm de diâmetro, conforme descrito por Saggiaro e colaboradores (2014). Em cada caso, o paciente foi representado, sempre que possível, por três *“spots”* distintos, com preservação do tecido remanescente de cada bloco. Os *“spots”* de tecido tumoral coletados foram

então, colocados de maneira ordenada no bloco receptor (molde de base do TMA), como demonstrado na etapa B da Figura 3. Desta forma, cada bloco de TMA contém pelo menos 24 “spots” distintos, sendo que um deles é de tecido não tumoral (fígado, utilizado como controle negativo) e 23 são representativos das regiões previamente marcadas pelos patologistas. Assim, para cada TMA foi construído seu respectivo mapa, especificando a posição exata de cada caso/área amostrada, a fim de se realizar a interpretação adequada das reações IHQ (Passo A, figura 4).

Ao todo foram construídos 13 blocos de TMAs que reúnem as amostras tumorais das 97 biópsias selecionadas (92 pacientes). Posteriormente, os blocos de TMA foram submetidos a cortes histológicos com 4 µm de espessura com auxílio de micrótomo (*Microm Zeis – HM315R*) que foram então montados em lâminas silanizadas Starfrost® (Knittel™, Braunschweig, Alemanha). As lâminas foram utilizadas nos ensaios de IHQ (descritas no item 3.4).

Figura 3. Etapas no processo de montagem dos blocos de TMA.



Nota: (A) Punção cilíndrica na área do tecido tumoral. (B) “Spots” inseridos no bloco-molde de TMA em parafina. (C) Cortes dos blocos com as amostras de TMAs em lâmina para posterior imunomarcção. Adaptado de Abnova, 2020 [TMA: arranjos teciduais em matriz].

3.4 Imuno-histoquímica (IHQ)

Os cortes de 4 µm dos TMAs foram colocadas em estufa 65°C por 1 hora, para remover a parafina. O processo de desparafinização teve sequência com a imersão da lâmina em três incubações em xilol absoluto (10 minutos cada) para posterior hidratação em soluções decrescentes de álcool por, aproximadamente, três minutos cada (EtOH absoluto – EtOH 50% e água destilada). A recuperação antigênica foi realizada em panela à vapor, durante 40 minutos, seguida de resfriamento à temperatura ambiente por 30 minutos. Para a imunomarcção com PIMREG (anti-FAM64A, SigmaAldrich™) foi utilizado tampão Tris-EDTA com Tween 20 a 0,01 M em pH 9,0 e para o Ki-67 (anti-Ki-67 - Abcam® - ab16667) foi utilizado tampão citrato de sódio a 0,01 M, em pH 6,0.

O kit *Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB IHC Detection Micro-polymer* (Abcam™ ab236466) foi utilizado no bloqueio da peroxidase endógena; bloqueio da proteína e nas imunomarcações de PIMREG e Ki-67. Após a recuperação antigênica, as lâminas foram lavadas três vezes com tampão fosfato-salino (PBS) pH 7,4. Para o bloqueio da peroxidase endógena nas imunomarcações com PIMREG e Ki-67, foi adicionado o *Peroxide Block*, cobrindo todo o corte na lâmina, por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram lavadas duas vezes com PBS pH 7,4 e foi adicionado o *Protein Block*, cobrindo toda a lâmina, por 10 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação, as lâminas foram lavadas uma vez com PBS pH 7,4.

Para imunomarcação das proteínas de interesse, as lâminas foram incubadas, *overnight*, com anticorpos primários diluídos em PBS contendo 1% de BSA (anti-FAM64A, diluído 1/50, Sigma Aldrich - HPA049934; anti-Ki-67, diluído 1/150, Abcam - ab16667), em temperatura ambiente e em câmara úmida. Em seguida, as lâminas foram lavadas três vezes com PSB pH 7,4 e os cortes com imunomarcações para PIMREG e Ki-67 receberam o micropolímero com o conjugado HRP (*goat anti-rabbit HRP conjugate*), presente no respectivo kit.

Posteriormente, as lâminas foram lavadas quatro vezes em PSB pH 7,4 e incubadas com a solução reveladora 3,3'-*Diaminobenzidine tetrahydrochloride* (DAB) por 5 minutos. Para finalizar, as lâminas foram lavadas quatro vezes com PBS pH 7,4, coradas com Hematoxilina de Harris, por 30 segundos, e lavadas para a remoção do excesso de reagente. Em seguida, as lâminas foram desidratadas em bateria, com concentrações crescentes de álcool (EtOH 50% - EtOH absoluto), por aproximadamente, 1 minuto em cada concentração; incubadas em xilol três vezes e montadas em lâminas permanentes com Permount (*MERCK*, Darmstadt, Germany) e lamínula.

Para as marcações com PIMREG, foram utilizados como controle positivo, uma amostra de um paciente diagnosticado com GBM e para as imunomarcações com Ki-67, utilizou-se amostras de amígdalas palatinas. Os controles negativos foram realizados suprimindo os anticorpos primários.

3.4.1 Análise das Imunomarcações

Após marcação por imuno-histoquímica, todas as lâminas foram digitalizadas através do sistema de escaneamento de lâminas *Scan Scope VS120*, utilizando o microscópio BX61 – *Olympus*, com objetiva de 40X, disponíveis no Departamento de Biologia Celular e Molecular da FMRP.

As imagens obtidas pelo escaneamento estavam em extensão *.vs1* com dimensões de 10496 x 1235 e 75 *dpi (dots of inch)* e foram convertidas em extensão *.tif* através do *plugin* BIOP do *software Fiji ImageJ*, no qual foi possível também adicionar a barra de escala (200 μm), em cada imagem. Após a conversão da extensão, as imagens foram comprimidas em 2048 x 2048 de dimensão e resolução de 300 *dpi*, através do *Photoshop Adobe CS6*. Não houve alteração da qualidade das imagens.

As análises das imunomarcações de PIMREG e Ki-67 foram realizadas pelo sistema automatizado, através do *software Fiji ImageJ*, que analisou a área total de cada um dos *spots* presentes em cada TMA. Para a identificação de cada estrutura, foi utilizada a ferramenta *magic wand tool* (varinha) e foi definido como tolerância de intensidade de cor o valor de 15 na média da escala de cinza dos canais RGB (*Red, Green, Blue*), obtendo sua área em micrômetros (μm^2) (Passos B e C, figura 4). Os valores obtidos pela mensuração da área foram inseridos em uma tabela do Microsoft Excel (Office 365).

As imunomarcações de PIMREG e Ki-67 foram reveladas pela coloração castanha do DAB e ambas as proteínas apresentaram marcação nuclear nas células. Para avaliar a porcentagem de células que expressam PIMREG e Ki-67, foram definidos os parâmetros para cada marcação nas imagens. Para tal, utilizou-se o *software Fiji ImageJ*, através do ícone *Color Threshold*, e o filtro *RGB* (Passo D, figura 4). Foram contados os núcleos marcados com PIMREG, utilizando os valores mínimo e máximo para cada canal de cor da imagem: canal vermelho: 0-255; verde: 0-255 e azul: 0-110. Para contagem dos núcleos não marcados, foram utilizados os seguintes valores: canal vermelho: 0-140; verde: 0-140 e azul: 120-255. Os valores utilizados para a marcação dos núcleos positivos para Ki-67 foram: canal vermelho: 0-255; verde: 0-255 e azul: 0-110 e, para marcação dos núcleos não marcados, foram: canal vermelho: 0-160; verde: 0-160 e azul: 120-255 (Tabela 2).

Após definidos os parâmetros para cada marcação, foram ajustados os valores para análise de partícula. Definiu-se o valor de 11-200 μm como parâmetro para

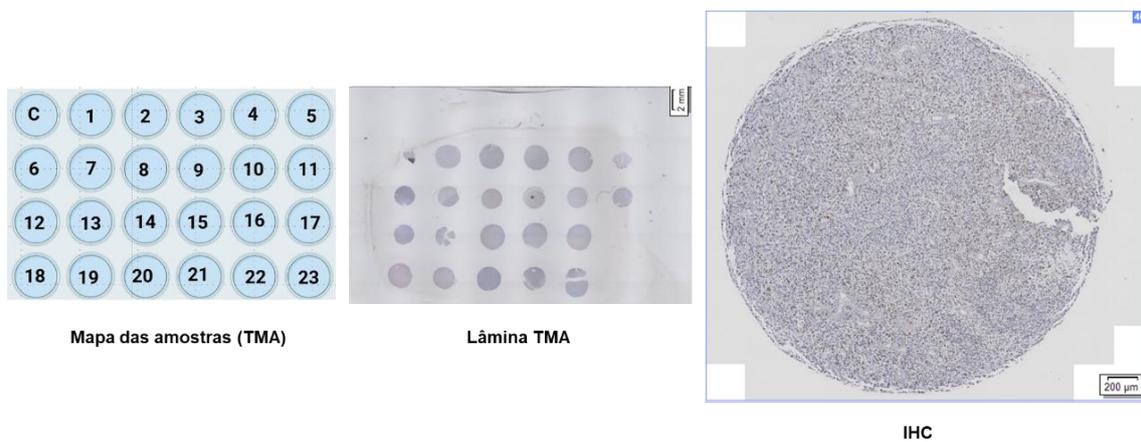
identificação, pelo *software*, das partículas de interesse. Assim, só foram contabilizadas as partículas, ou seja, os núcleos que tivessem dentro dessa faixa de tamanho, tanto para imunomarcação positiva, quanto negativa (Passo E, figura 4). Com isso, o *software* calculou os valores absolutos para o número de núcleos marcados e núcleos não marcados (Passo F, figura 4). Os valores gerados foram inseridos em uma tabela do Microsoft Excel (Office 365).

Assim, a porcentagem da marcação se deu através do número de células marcadas sobre o total de células, multiplicado por 100, conforme a fórmula abaixo:

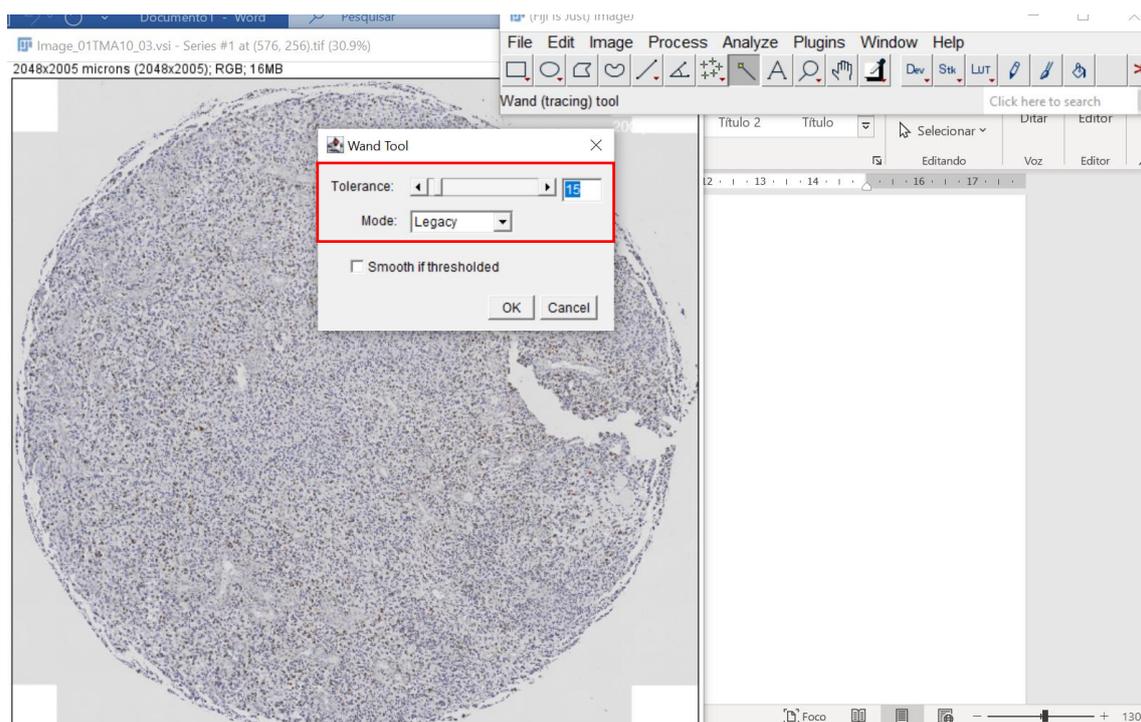
$$\% \text{ Expressão de PIMREG e Ki-67} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de núcleos} + x 100}{\text{N}^\circ \text{ total de núcleos}}$$

Figura 4 - Passo a passo de como foram realizadas as análises das imunomarcações em cada imagem, utilizando o software *Fiji ImageJ*.

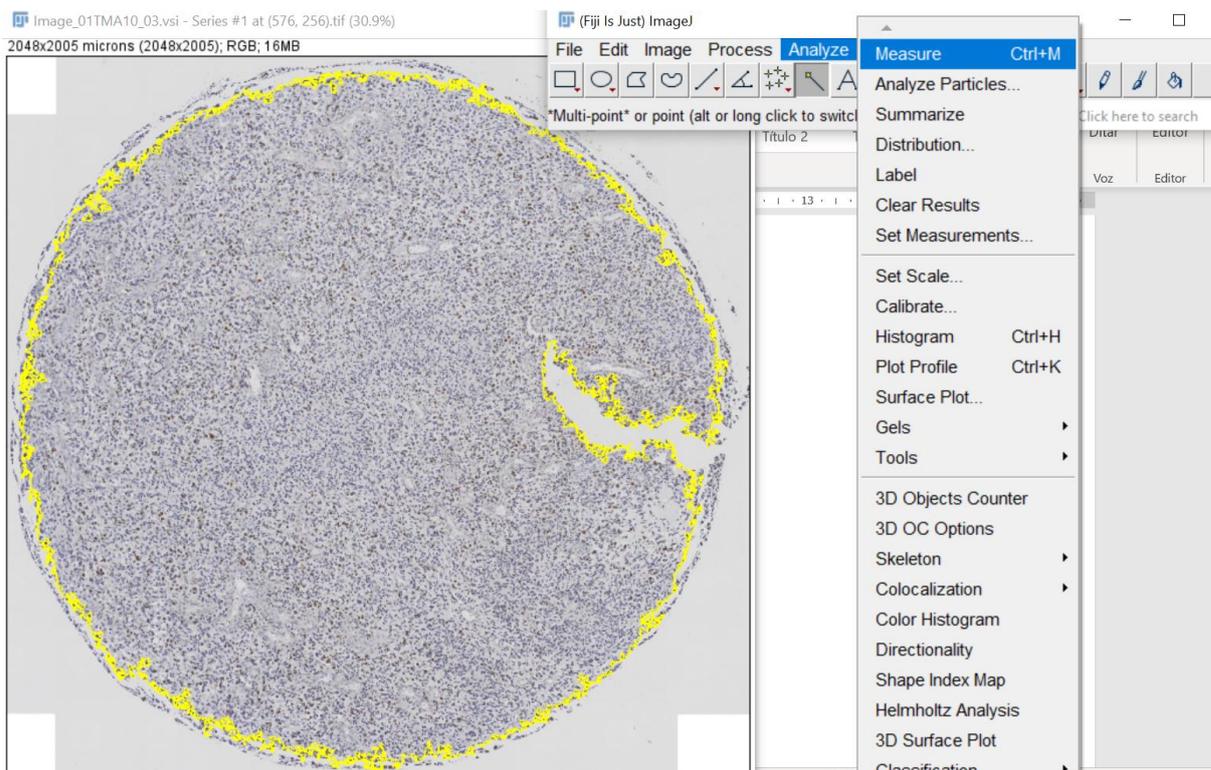
A



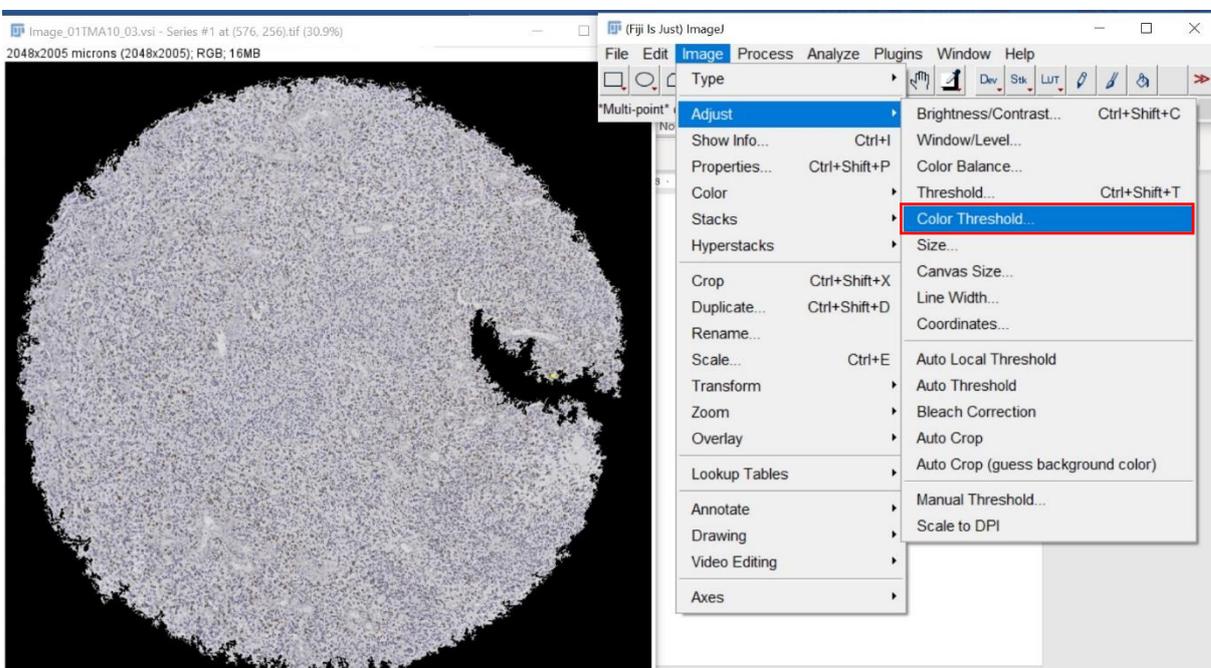
B



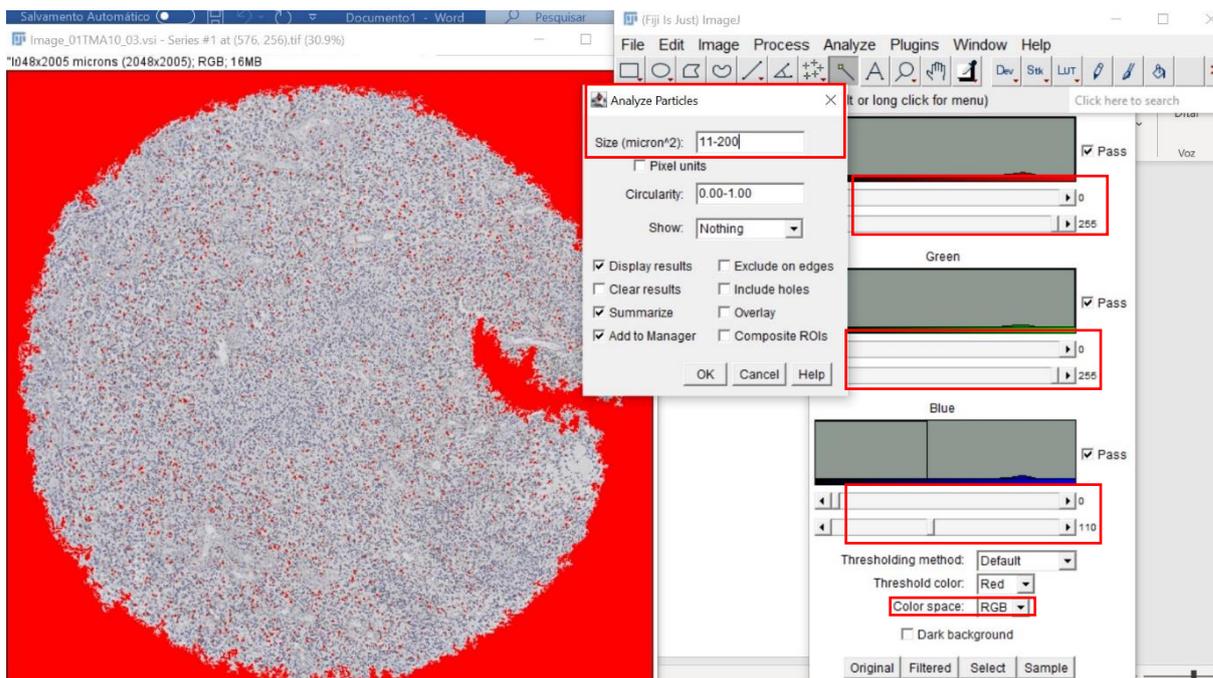
C



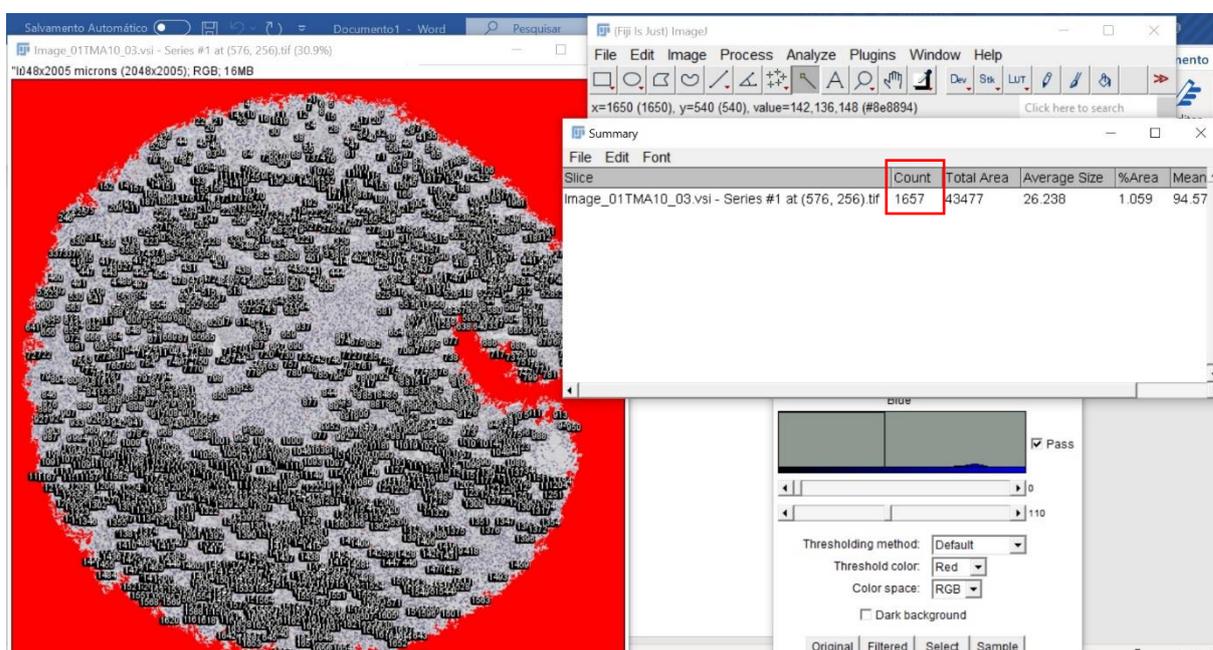
D



E



F



Nota: (A) Primeiro, foi feito o mapa com o número das amostras em cada lâminas de TMA. Em seguida, as lâminas foram escaneada no Microscópio *ScanScope Olympus BX61VS* e, para cada *spot*, foi gerada uma imagem no aumento de 40x. (B) Para mensurar a área de cada *spot* do TMA, foi selecionado o ícone *magic wand tool*, utilizando o valor de 15 na média da escala de cinza dos canais RGB. (C) Após inserido o valor de tolerância, foram dados dois cliques no centro da imagem e, assim, foi mensurado o valor da área do *spot* através da função *Adjust* → *Mensure*. (D) Para inserir os valores para a quantificação, primeiro, foi verificado se a imagem estava calibrada na barra superior da imagem (unidade de medida – micrômetro). Após a conferência da unidade de medida, foi aberto o *Color*

Threshold. **(E)** Em seguida, foram ajustados os valores dos canais para as marcações positivas e negativas (PIMREG e Ki-67), realizadas uma por vez. Após o ajuste dos valores para cada marcação, foram inseridos os valores de 11-200 micrômetros para a análise das partículas. **(F)** Finalmente, após inserido todos os parâmetros na etapa anterior, a análise foi realizada automaticamente pelo *software*, obtendo, assim, o valor absoluto do número de células marcadas e/ou não marcadas. Os valores absolutos obtidos de cada marcação positiva e negativa de PIMREG e Ki-67 foram inseridos em uma tabela do Microsoft Excel (Office 365) e a expressão, em porcentagem, de cada proteína foi calculada pelo número de células marcadas sobre o número de células totais presentes no *spot*, multiplicado por 100.

Tabela 2 – Valores utilizados no *software Fiji ImageJ* para quantificação das lâminas imunomarcadas com PIMREG e Ki-67.

Marcação	Canais	Células Marcadas (marrom)	Células Não Marcadas (azul)
PIMREG	Vermelho	0-255	0-140
	Verde	0-255	0-140
	Azul	0-110	120-255
Ki-67	Vermelho	0-255	0-160
	Verde	0-255	0-160
	Azul	0-110	120-255

Esses valores foram utilizados em todas as lâminas. Na coluna de células marcadas estão os valores de mínimo e máximo para cada canal de cor da imagem, utilizados para as marcações positivas e, na outra coluna, encontram-se os valores utilizados para contagem das células não marcadas.

3.5 Caracterização Molecular

A rotina de diagnóstico do HC é realizada por análises histopatológicas. Para adicionar informações referentes as características moleculares dos pacientes, e assim, melhor caracterizar e definir os subgrupos avaliados no estudo, foi iniciada a padronização da metodologia de MLPA (descrita no item 3.5.2). A técnica permite caracterizar as amostras em relação as seguintes alterações moleculares: mutações no gene 1 ou 2 da isocitrato desidrogenase (*IDH* selvagem ou mutante); a co-deleção de 1p/19q; o status de metilação do promotor do gene *MGMT* e a deleção de *CDKN2A/2B*, as quais foram incorporadas na classificação mais recente dos subgrupos de gliomas (OMS, 2021) (Tabela 1).

3.5.1 Extração de DNA genômico das amostras em parafina

Após a identificação e marcação das regiões com prevalência de tecido tumoral pelos patologistas (figura 1), foi realizada a extração de DNA seguindo o protocolo do fabricante - *Kit ReliaPrep™ FFPE gDNA Miniprep System (Progema Corporation)*. Para a extração do DNA genômico, 6 cortes de 20 µm de tecido tumoral foram adicionados, juntamente com 500 µl do óleo mineral, em um microtubo de 1,5 mL e incubados, por 5 minutos, a 80°C, sob agitação de 450 rpm. Em seguida, foram adicionados 200 µl do tampão de lise, centrifugados a 10.000 x g por 1 minuto. Foram adicionados 20 µl da proteinase K diretamente na fase aquosa e incubados em um termobloco, a 56°C, por 1 hora e 20 minutos e, a 80°C, por 4 horas e 15 minutos. Após o término das incubações, foram adicionados 10 µl RNase e incubados a temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, foram acrescentados 220 µl de *Buffer BL* e 240 µl de etanol e centrifugados a 10.000 x g por 2 minutos. O conteúdo do microtubo foi transferido para o tubo *Binding Column*, inserido em um tubo coletor (*Collection tube*), e centrifugado a 10.000 x g por 2 minutos. Foi descartado o sobrenadante e o tubo foi inserido no mesmo tubo coletor. Então, foram adicionados 500 µl de *Wash Solution* e centrifugados novamente a 10.000 x g por 2 minutos. Essa etapa foi repetida por mais uma vez e, em seguida, a coluna foi centrifugado a 16.000 x g, por 5 minutos e transferida para um novo tubo coletor de 1,5 mL. O DNA foi eluído com 20 µl de *Elution Buffer*, incubado em temperatura ambiente por 3 minutos e centrifugado a 10.000 x g por 2 minutos. O DNA eluído foi quantificado em espectrofotômetro *NanoDrop One* (Thermo Fischer Scientific) e, em seguida, armazenado a -20°C para posteriormente ser utilizado na técnica de MLPA (descrita no item 3.5.2).

3.5.2 MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplification)

Para a triagem molecular das amostras, foi utilizada a técnica *Multiplex Ligation- dependent Probe Amplification* (MLPA), descrita por Schouten e colaboradores (2002). Esse é um método sensível, semiquantitativo, capaz de detectar deleções e duplicações de diversos genes, além de mutações pontuais que são reconhecidas através de sondas específicas que hibridizam no DNA.

Assim, para verificar a presença de mutações pontuais no gene *IDH1*, *IDH2* e metilação da região promotora do gene *MGMT*, foi utilizado o kit *SALSA MLPA ME012* (MRC – Holland - Amsterdã, Holanda) – MS-MLPA. O kit contém 31 sondas que possuem entre 121 e 317 nucleotídeos. Dessas, 6 sondas contêm o sítio de

reconhecimento da enzima *HhaI* e fornecem informações sobre o estado de metilação da região promotora do gene *MGMT*; 4 sondas são específicas para as mutações pontuais em *IDH1* e *IDH2* e 18 sondas são de referência, que têm, como alvo, regiões estáveis em gliomas.

Para a análise da co-deleção 1p19q, foi utilizado o kit *SALSA MLPA MIX P088* oligodendroglioma – MLPA (MRC – Holland – Amsterdã, Holanda). O kit contém, ao todo, 59 sondas entre 126 e 509 nucleotídeos. Dessas, 19 sondas são do braço 1p e 3 sondas do braço 1q; 12 sondas do braço 19q e 2 sondas do braço 19p; 4 sondas são específicas para mutações pontuais em *IDH1* e *IDH2*; 3 sondas são específicas para mutações pontuais em *CDKN2A/2B* e 14 sondas de referência, que têm como alvo regiões estáveis em oligodendrogliomas.

Os ensaios de MLPA e MS-MLPA foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. Para cada reação, recomenda-se o uso de, no mínimo, 3 amostras de DNA controle (que não apresentam as alterações detectadas pelas sondas dos kits) e um controle negativo (utilizou-se água no lugar do DNA). Como amostras controles, foram selecionadas biópsias de tecido FFPE de pacientes com epilepsia.

A reação começa com a desnaturação do DNA, no qual foi utilizado entre 9-11 ng em 5 µl de DNA para amostras teste e controle, e 5 µl de água ultrapura (controle negativo). Os tubos com DNA foram colocados no termociclador à 98°C por 5 minutos e após ter passado o tempo de incubação, a temperatura abaixou para 25°C. O kit contém o reagente de hibridização com a mistura de sondas e tampão. Cada sonda consiste em dois oligonucleotídeos (direita e esquerda), ambos possuem uma sequência homóloga a um *primer* universal e uma sequência de hibridização ao DNA alvo. O oligonucleotídeo da direita contém uma sequência *stuffer* (define o tamanho de cada sonda) e o da esquerda contém um marcador fluorescente.

Após o resfriamento das amostras a 25°C, elas foram retiradas do termociclador e, em cada tubo, foram adicionados 1,5 µl do *MLPA Buffer* + 1,5 µl da sonda específica para cada reação (*MLPA P088* e *MS-MLPA ME012*). Os tubos foram recolocados no termociclador à 95°C por 1 minuto e incubados por 18 horas a 60°C para hibridização das sondas. No dia seguinte, as amostras foram mantidas a 54°C (MLPA) e 20°C (MS-MLPA). Sem remover os tubos, para que houvesse a ligação das sondas na reação de MLPA foram adicionados 25 µl de água ultrapura, 3 µl de *ligase buffer A*, 3 µl de *ligase buffer B*, e 1 µl da enzima *Ligase-65* (unindo os dois

oligonucleotídeos). Na reação de MS-MLPA, foram adicionados 10 µl de água ultrapura e 3 µl de *Buffer A*. Essa solução foi homogeneizada e transferiu-se 10 µl da reação (tubo A) para um segundo tubo (tubo B). Quando o termociclador chegou a 48°C, no tubo A foi adicionado um *mix* de 8,25 µl de água ultrapura, 1,5 µl de *Buffer B* e 0,25 µl de *ligase 65*; no tubo B foi adicionado um *mix* de 7,75 µl de água ultrapura, 1,5 µl de *Buffer B*, 0,25 µl de *ligase 65* e 0,5 µl de *SALSA HhaI* por amostra. Em seguida, as amostras do MLPA foram mantidas no termociclador a 54°C por 15 minutos e as amostras do MS-MLPA mantidas a 48°C por 15 minutos. Após a incubação, os tubos de MLPA e MS-MLPA foram submetidos a 98°C por 5 minutos e quando chegaram à 20°C, houve uma pausa para adição do *mix* de PCR. Para a reação de PCR e, portanto, amplificação das regiões hibridizadas com a sonda, foi pipetado um *mix* com 7,5 µl de água ultrapura, 2 µl de *SALSA PCR primer mix* e 0,5 µl da *SALSA polymerase* por amostra. Nas amostras do MS-MLPA, foi adicionado um *mix* com 3,75 µl de água ultrapura, 1 µl de *SALSA PCR primer mix* e 0,25 µl de *SALSA polymerase* por amostra. Uma vez que o *mix* foi acrescentando em ambas as reações (MLPA e MS-MLPA), foi iniciada a etapa de PCR no termociclador à 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 60 segundos. Após completados 35 ciclos, as amostras ficaram a 72°C por 20 minutos e após resfriamento a 15°C, foram removidas do termociclador (Quadros 1 e 2).

Finalizada a reação, as amostras foram armazenadas, protegidas da luz, a -20°C e, posteriormente, submetidas a separação dos fragmentos por meio de eletroforese capilar – (*Applied Biosystems Sanger Sequencing 3500 Series Genetic Analyzers - ABI – 3500*) de 24 capilares, 50cm – POP 7, disponível no Laboratório Multiusuário do Hemocentro de Ribeirão Preto – SP.

Para a corrida eletroforética, foi pipetado um *mix* com 0,7 µl da reação de PCR da etapa anterior, 0,2 µl do marcador *LIZ GS 500 size standard* (Thermo Fischer Scientific) e 9 µl de *Hi-Di™ Formamide* (Thermo Fischer Scientific) em uma placa de 0,2 µl. A placa foi selada e aquecida a 86°C por 3 minutos e, em seguida, resfriada a 4°C por 2 minutos para desnaturar e facilitar a migração dos fragmentos durante a corrida. Em seguida, a placa foi colocada no equipamento para a leitura dos fragmentos. Os dados gerados pelo sequenciador de Sanger foram analisados, utilizando o *software Coffalyser.Net* (versão v.220513.1739), disponibilizado pela MCR Holland (Amsterdã, Holanda).

Para os protocolos de MLPA e MS-MLPA, foram utilizados os seguintes programas do termociclador, com incubações longas e pontos de parada para manuseio das amostras (Quadros 1 e 2).

Quadro 1 – Programa do termociclador usado para MLPA.

Desnaturação do DNA		
1. 98°C	5 minutos	}
2. 25°C	Pausa	
Reação de hibridização		} 1° dia
3. 95°C	1 minuto	
4. 60°C	18 horas	
Reação de ligação		}
5. 54°C	Pausa	
6. 54°C	15 minutos	
7. 98°C	5 minutos	
8. 20°C	Pausa	} 2° dia
Reação de PCR		
9. 95°C	30 segundos	}
60°C	30 segundos	
72°C	60 segundos	
		} 35 ciclos
10. 72°C	20 minutos	
11. 15°C	Pausa	

Quando 2 – Programa do termociclador usado para MS-MLPA.

Desnaturação do DNA		
1. 98°C	5 minutos	}
2. 25°C	Pausa	
Reação de hibridização		} 1° dia
3. 95°C	1 minuto	
4. 60°C	18 horas	
Reação de ligação		} 2° dia
5. 20°C	Pausa	
6. 48°C	Pausa	
7. 48°C	15 minutos	
8. 98°C	5 minutos	
9. 20°C	Pausa	
Reação de PCR		} 35 ciclos
10. 95°C	30 segundos	
60°C	30 segundos	
72°C	60 segundos	
11. 72°C	20 minutos	
12. 15°C	Pausa	

3.6 Análise *in silico* do transcrito de *PIMREG* em amostras do TCGA

Para análise da expressão gênica de *PIMREG*, foi realizado o *download* de dados normalizados da expressão de mRNA, obtidos por meio do RNAseq das amostras de pacientes com glioma, depositadas no banco de dados públicos do TCGA. Os dados obtidos através da plataforma cBioPortal *for Cancer Genomics* foram dos seguintes estudos: i) brain lower grade glioma (TCGA, PanCancer Atlas, 514 samples) e ii) glioblastoma multiforme (TCGA, PanCancer Atlas, 592 samples) com acesso em março de 2022. Os dados baixados, já normalizados, foram diretamente analisados, sem processamento prévio. Após ter sido realizado o *download* da expressão de *PIMREG* na coorte do TCGA, foram baixados os dados das informações clínicas dos pacientes, como, idade, sexo, grau histológico do tumor, além das informações referentes as seguintes alterações: *IDH* mutado ou selvagem; co-deleção de 1p19q e metilação ou não do gene *MGMT*. O *status* de deleção de *CDKN2A/2B* e a expressão de *MIB1* também foram baixados através da plataforma cBioPortal *for Cancer Genomics* na coorte descrita acima.

Foi elaborado uma tabela no Microsoft Excel (Office 365) que continham todas as informações de interesse (*IDH* mutado ou selvagem; co-deleção 1p19q; metilação ou não *MGMT*; homodeleção ou não de *CDKN2A/2B*; expressão de *MIB1*) apenas dos pacientes que tinham expressão de *PIMREG*. A partir desses dados, foram feitas as comparações da expressão de *PIMREG* com: *IDH* mutado ou selvagem; *IDH* selvagem, *IDH* mutado e co-deletado e *IDH* mutado e não-codeletado; *MGMT* metilado e não metilado e *CDKN2A/2B* homodeletado ou não deletado.

3.7 Análise estatística

As análises foram realizadas utilizando o software *GraphPad InStat 8.0* (*GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EUA*) e o software *SPSS versão 22.01* (*Statistical Package for the Social Sciences*). Nas análises da expressão de *PIMREG* e *Ki-67* na coorte do HCRP (grupo tumoral e não tumoral) e demais dados provenientes do TCGA, foi utilizado o teste não paramétrico Mann-Whitney. Para analisar a expressão do *log* de *PIMREG* e do *log* de *Ki-67* nos diferentes graus histológicos, foi utilizado ANOVA e, então, o teste *post hoc* de Bonferroni. O teste não paramétrico Kruskal-Wallis foi utilizado para avaliar a expressão gênica de *PIMREG* nos subtipos *IDH* mutado, *IDH* selvagem e *IDH* co-deletado (1p19q). A correlação entre a expressão proteica e gênica de *PIMREG* e *Ki-67* foi avaliada por correlação de Spearman. Para avaliar os efeitos das variáveis categóricas sobre *log* de *PIMREG* foi aplicado o teste t para amostras independentes, comparando os valores de *log* de *PIMREG* em cada categoria da variável. Para verificar o efeito de *log* de *PIMREG* sobre o tempo de sobrevivida utilizamos a regressão de Cox univariada. As probabilidades de sobrevivência foram calculadas usando o método de Kaplan-Meier e as diferenças entre as taxas de sobrevivência foram testadas usando o teste log-rank. Foi adotado como nível de significância $p \leq 0,05$ em todas as análises.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Características clínico-patológicas dos pacientes

Foram analisados oitenta e sete dos 92 pacientes com gliomas difusos selecionados, pois as amostras de tecido tumoral de 5 pacientes foram perdidas durante o procedimento das reações de IHQ. A maioria dos pacientes era do sexo masculino, que correspondiam a 51,7% dos casos (Tabela 3). A média de idade dos pacientes ao diagnóstico foi de 50,5 anos e a mediana de 51 anos (variação de 18 a 85 anos). Desses, 52,9% tinham mais de 50 anos.

O diagnóstico histopatológico foi realizado de acordo com os preceitos da 5ª classificação vigente da OMS para os tumores do SNC (LOUIS *et al.*, 2021). Como a realização das reações de *FISH* (hibridação *In Situ por fluorescência*) para a pesquisa da co-deleção 1p/19q não foi possível de ser realizada em todos os casos devido à falta de insumos e de pessoal técnico no SERPAT do HCFMRP-USP, em 13 dos 87 pacientes o diagnóstico realizado foi de “*glioma difuso de morfologia ambígua*” SOE (Sem outras especificações). Desta forma, a casuística ficou assim constituída: astrocitomas SOE n=2 casos (2,3%) vs *IDH1* mutado n=4 (4,6%) graus 2 a 4; oligodendrogliomas SOE, graus 2 ou 3, n= 15 casos (17,2%); gliomas difusos com morfologia ambígua SOE, graus 3 ou 4, n=14 (16,1%); GBM SOE, grau 4, n=46 casos (52,9%) e GBM *IDH1* selvagem, grau 4, n=6 (6,9%). Como pode ser observado na Tabela 3, 83,9% dos pacientes foram classificados dentre os gliomas de alto grau de malignidade (graus 3 ou 4) e 16,1% como glioma de baixo grau de malignidade (grau 2).

A localização dos tumores estava descrita no prontuário de 75 pacientes, sendo que o lobo frontal foi o mais acometido [28 dos 75 casos (32,2%)]. Devido às localizações do tumor, a ressecção radical (quando é retirado mais que 90% macroscopicamente) da neoplasia foi descrita em 47 pacientes (55,3 %) e a ressecção parcial (quando é retirado menos que 90% macroscopicamente) em 38 pacientes (44,7%). Em dois pacientes não havia a informação sobre a extensão da ressecção nos seus prontuários. No total, 55 pacientes (63,2%) receberam tratamento adjuvante; sendo que 38 pacientes (69%) foram submetidos à radioterapia e quimioterapia com TMZ, 14 pacientes (25,5%) foram submetidos somente à radioterapia e 3 pacientes (5,5%) foram tratados com TMZ. Durante a evolução clínica, 5 pacientes (5,7%) apresentaram recidivas da neoplasia e suas amostras puderam ser analisadas neste

trabalho. Ao término do estudo, pelo menos 57,5% dos pacientes morreram de causas relacionadas à neoplasia (Tabela 3).

Tabela 3 - Dados clínico-patológicos dos pacientes com gliomas difusos do tipo adulto.

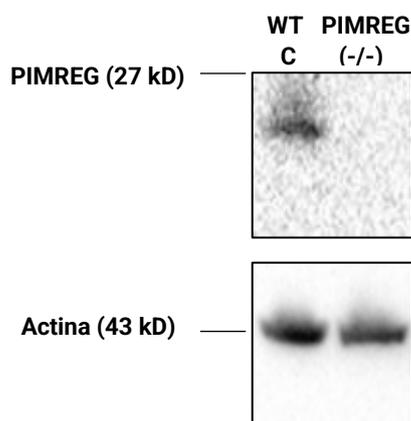
Características		Nº (%)
Gênero	Masculino	45 (51,7)
	Feminino	42 (48,3)
Idade (anos)	> 50	46 (52,9)
	≤ 50	41 (47,1)
Tipo histológico	Astrocitomas SOE (2,3,4)	2 (2,3)
	Astrocitomas <i>IDH1</i> Mutado (2,3,4)	4 (4,6)
	Oligodendrogliomas SOE (2,3)	15 (17,2)
	Gliomas difusos com morfologia ambígua (oligo/astro) SOE (3,4)	14 (16,1)
	Glioblastomas SOE (4)	46 (52,9)
	Glioblastoma <i>IDH</i> selvagem (4)	6 (6,9)
Grau de malignidade	Alto grau (3,4)	73 (83,9)
	Baixo grau (2)	14 (16,1)
Localização do tumor	Lobo frontal	28 (32,2)
	Lobo temporal	21 (24,1)
	Lobo occipital	6 (7,0)
	Lobo parietal	20 (22,9)
	Não especificado	12 (13,8)
Ressecção Tumoral ¹	Radical	47 (54)
	Parcial	38 (46)
Tipos de tratamentos	Cirurgia +RT	14 (25,5)
	Cirurgia + TMZ	3 (5,5)
	Cirurgia + RT + TMZ	38 (69,0)
Recidivas	Sim	5 (5,7)
	Não	82 (94,3)
Óbito pela neoplasia	Sim	50 (57,5)
	Não	37 (42,5)

¹ A informação sobre a ressecção do tumor estava presente no prontuário de 85 pacientes. R (ressecção radical > 90%); S (ressecção parcial <90%). Apenas 55 pacientes receberam tratamento adjuvante. SOE (sem outras especificações).

4.2 Padronização das reações de imuno-histoquímica com o anticorpo de PIMREG para uso em material fixado em formalina.

A especificidade do anticorpo comercial utilizado para as imunomarcações de PIMREG (anti-FAM64A - (SigmaAldrich – HPA049934)) foi inicialmente avaliada em lisado proteico de células U2OS (osteossarcoma) nocautes para *PIMREG* (gentilmente cedidas pela aluna Maria Vitória De Rizzo Gasparini). Como observado no ensaio de *Western blot*, a banda de PIMREG, presente no lisado da linhagem parental (WT), está ausente na linhagem nocaute (*PIMREG*^{-/-}), confirmando assim, a especificidade do anticorpo para detectar a proteína de interesse (Figura 5).

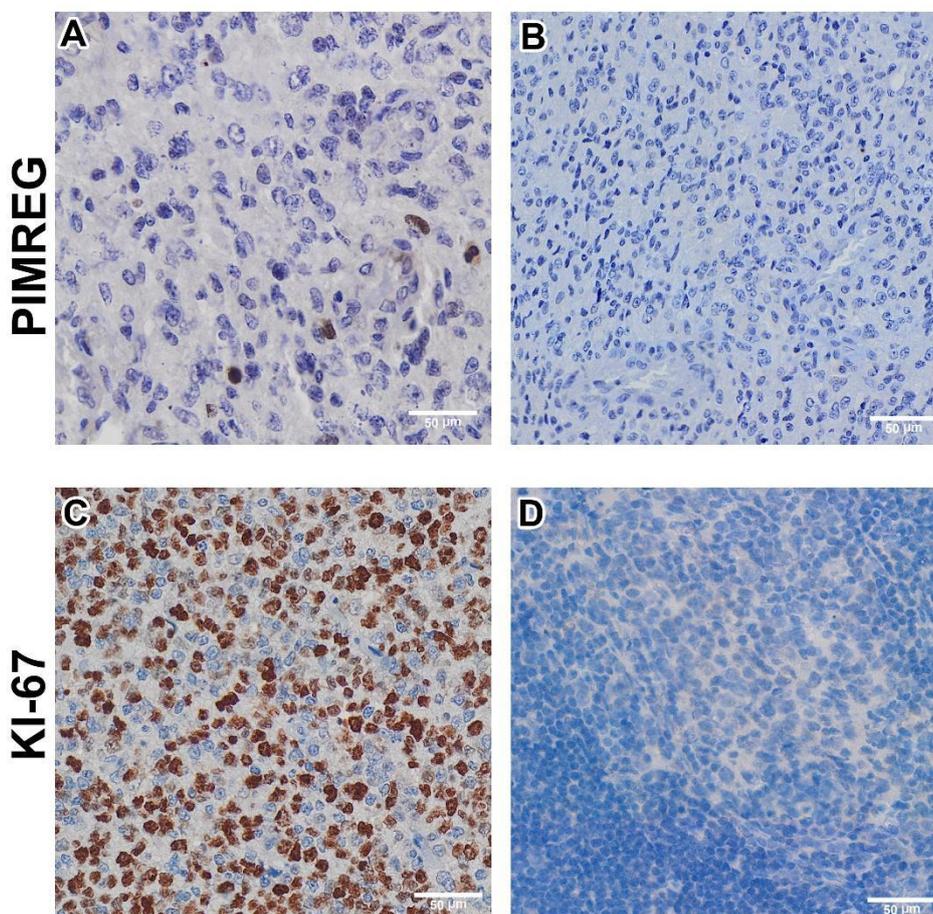
Figura 5: Análise de expressão proteica por *Western blot* em lisados de células U2OS DRGFP selvagem e nocaute de PIMREG.



Nota: Gel de poliacrilamida 12%, 30 µg de proteína. C: controle (lisado proteico de células U2OS DRGFP parentais *wild type*); (-/-): lisado proteico de células U2OS DRGFP nocaute de PIMREG. Membrana incubada com anticorpos que reconhecem PIMREG (anti-FAM64A) e beta-actina, utilizada como controle de carregamento do gel.

A detecção de PIMREG em tecido FFEP com o anticorpo policlonal anti-FAM64A, originalmente desenvolvido para ser utilizado em tecidos não fixados em formalina, foi padronizada. A marcação específica e esperada de PIMREG, isto é, no núcleo celular somente foi obtida por meio de recuperação antigênica com o tampão Tris-EDTA com Tween 20 a 0,01 M em; pH 9,0 (Figura 6).

Figura 6 - Fotomicrografias em cortes histológicos utilizados para as imunomarcações (PIMREG e Ki-67).

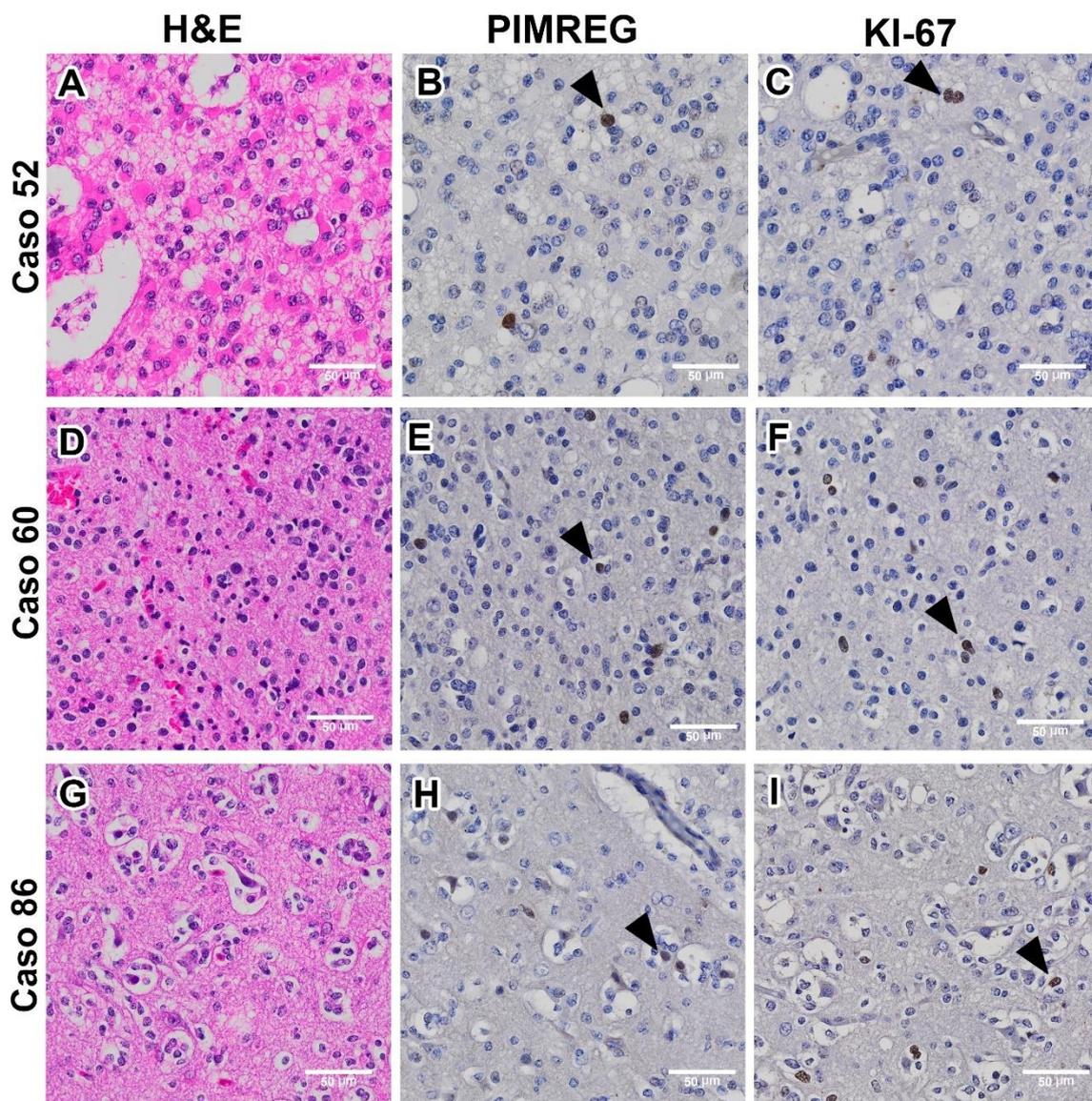


Nota: (A) Amostra de glioblastoma utilizada como controle positivo na padronização da imunomarcção de PIMREG. (B) Controle negativo realizada na mesma amostra, desprovida de anticorpo primário. (C) Corte histológico de amígdala palatina utilizada como controle positivo para imunomarcção de Ki-67. (D) Controle negativo para o Ki-67. Aumento de 40X. Barra de escala de 50 µm.

Uma vez padronizada a imunomarcção em tecido FFEP, a expressão de PIMREG foi avaliada nas amostras de gliomas difusos em 13 blocos de TMAs. Como controles positivos foram utilizados tecido tumoral de paciente diagnosticado com GBM para imunomarcações de PIMREG e tecido de amígdala palatina para imunomarcações de Ki-67. Como controles negativos foram feitas reações nos mesmos tecidos, porém na ausência do anticorpo primário (Figura 6 B e D). As mesmas amostras imunomarcadas com PIMREG, foram marcadas com o anticorpo que reconhece a proteína Ki-67 a título de comparação. As figuras abaixo mostram imagens representativas das imunomarcações em 3 amostras de pacientes de

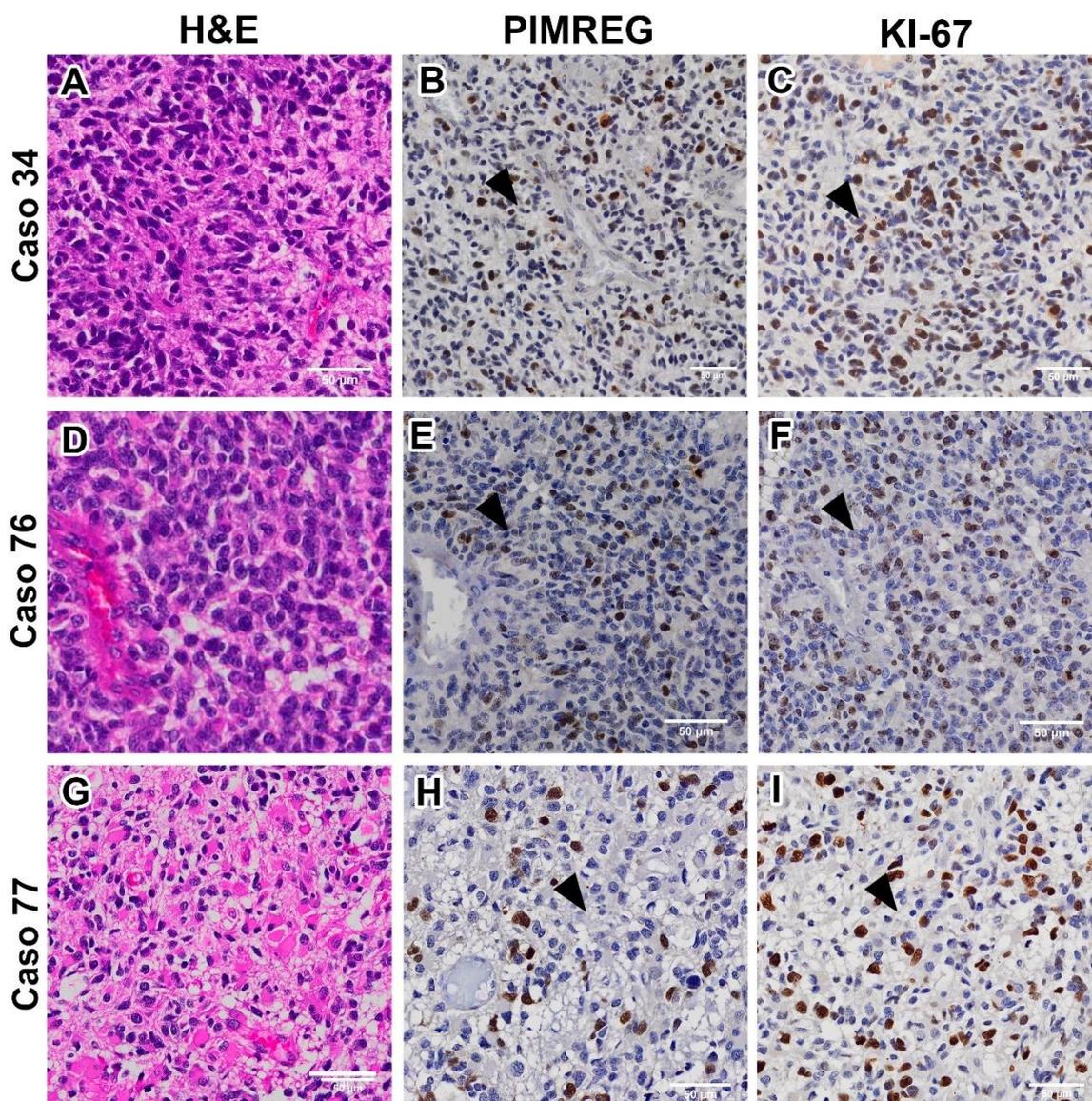
gliomas difusos de baixo grau (grau 2) e de alto grau (grau 3 e 4) de malignidade (Figuras 7 e 8, respectivamente).

Figura 7 – Imunoexpressão de PIMREG e Ki-67 em amostras de pacientes com gliomas difusos de baixo grau.



Nota: As pontas das setas mostram exemplos de núcleos imunomarcados nas reações. Imagens representativas de amostras três pacientes distintos, em aumento de 40x. (A, D e G) Coloração H&E da região do tumor. (B, E e H) Imunomarcação da proteína PIMREG (marcação nuclear em marrom. (C, F e I) Imunomarcação da proteína Ki-67 (marcação nuclear em marrom, indicada pela seta). Barra de escala de 50 µm.

Figura 8 - Imunoexpressão de PIMREG e Ki-67 em amostras de pacientes com gliomas difusos de alto grau.



Nota: As pontas das setas mostram exemplos de núcleos imunomarcados nas reações. Imagens representativas de amostras três pacientes distintos, em aumento de 40x. **(A, D e G)** Coloração H&E da região do tumor. **(B, E e H)** Imunomarcação da proteína PIMREG (marcação nuclear em marrom). **(C, F e I)** Imunomarcação da proteína Ki-67 (marcação nuclear em marrom, indicada pela seta). Barra de escala de 50 µm.

Observou-se que quantidade de núcleos marcados nas amostras dos pacientes classificados como alto grau é visivelmente mais elevada do que nos pacientes classificados em baixo grau. Como pode ser observado pelas imagens de H&E e IHQ, as amostras de alto grau são caracterizadas por atipia celular, alta atividade mitótica e regiões de necrose, enquanto as amostras de baixo grau, por baixa atividade mitótica e regularidade celular.

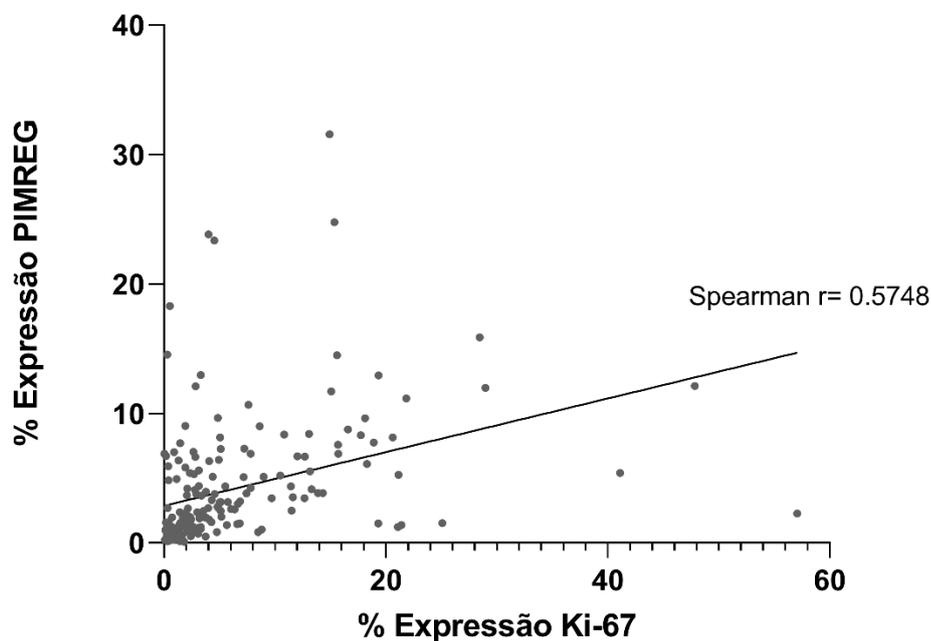
A imunomarcção de PIMREG e de Ki-67 nas amostras de tecido FEEP dos pacientes presentes nos 13 blocos de TMAs foi escaneada e quantificada conforme descrito no item 3.4.1 e os resultados da porcentagem de células imunomarcadas pelo total de células foram compilados na tabela apresentada no Apêndice A e foram utilizados nas análises seguintes.

Como cada paciente foi representado por pelo menos três regiões distintas, foi feito a média da porcentagem em ambas as marcações (PIMREG e Ki-67) para cada paciente. Esses valores foram utilizados nas análises na forma bruta (correlação de PIMREG com Ki-67; curva ROC e curva Kaplan-Meier) ou transformados em \log de 10 (amostras tumorais vs não tumorais; alto grau vs baixo grau; graus de malignidade (2,3 e 4); análise univariada da regressão de Cox com os dados clínicos dos pacientes).

4.3 A imunoexpressão de PIMREG se correlaciona com a de Ki-67 em gliomas difusos

Os níveis de expressão de PIMREG foram comparados, em cada amostra, com os níveis de Ki-67, um biomarcador frequentemente utilizado na prática clínica. Como observado na Figura 9, existe um grau significativo de correlação entre as duas variáveis, com valor do coeficiente de Spearman (r) = 0.5748. Esses dados indicam que PIMREG apresenta um comportamento similar ao de Ki-67 nas amostras tumorais. Assim, a título de comparação, a expressão de Ki-67 foi utilizada em todas as análises posteriores como forma de controle positivo.

Figura 9 – Correlação da imunoposição de PIMREG e de Ki-67 em amostras de pacientes com gliomas difusos.

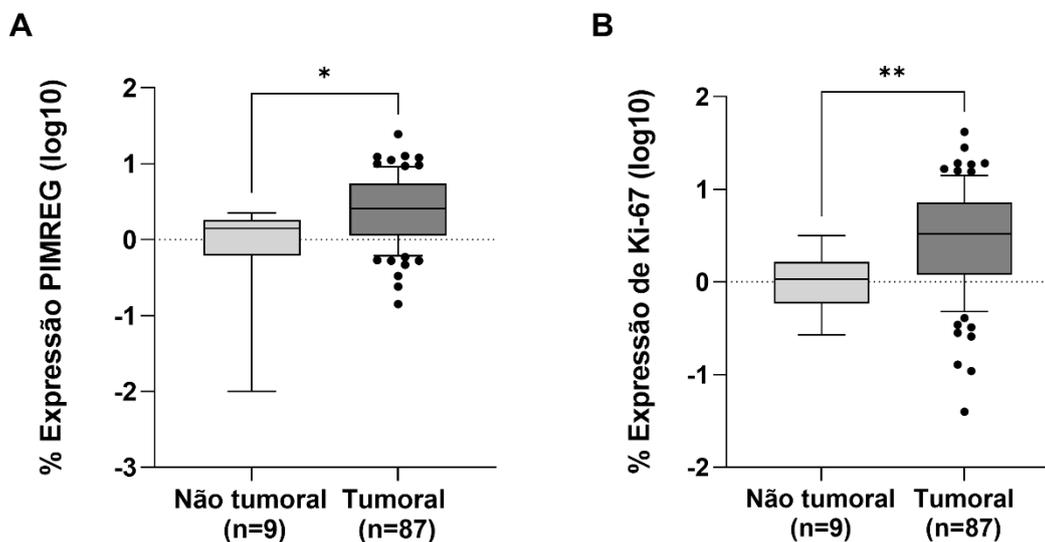


Nota: Os 87 pacientes avaliados foram representados por mais de uma região de interesse. Assim, foram inseridos todos os pontos correspondentes das regiões analisadas para as duas marcações. A Correlação de Spearman $r=0.5748$ foi significativa ($p < 0,0001$).

4.4 A imunoposição de PIMREG é aumentada em amostras tumorais

A expressão de PIMREG foi avaliada nas regiões tumorais e regiões adjacentes não tumorais. Somente em 9 dos 87 pacientes foi possível obter amostras de regiões adjacentes não tumorais, podendo observar que a expressão de PIMREG foi significativamente mais elevada nas regiões tumorais dos pacientes– de forma similar ao observado para a imunomarcção com Ki-67 (Figura 10).

Figura 10 – Quantificação da imunexpressão de PIMREG e de Ki-67 nas amostras de regiões tumorais e não tumorais.

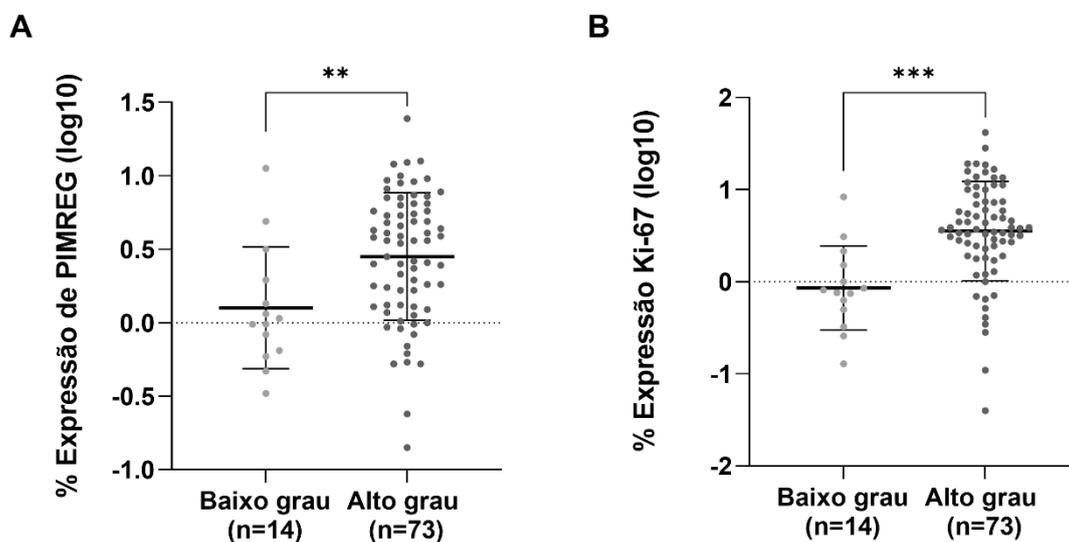


Nota: (A) Porcentagem da expressão de PIMREG (\log_{10}) na região tumoral vs. não tumoral nas amostras dos pacientes com glioma difuso. Teste de Mann-Whitney (*) $p=0,0168$. (B) Porcentagem da expressão de Ki-67 nas mesmas amostras representadas em A. Teste de Mann-Whitney (**) $p=0,0030$.

4.5 A imunexpressão de PIMREG correlaciona-se positivamente com o grau de malignidade em glioma.

A expressão de PIMREG foi avaliada nos diferentes graus de malignidade do tumor. Em relação ao grau de malignidade agrupado (alto e baixo grau), foi possível observar que, a expressão de PIMREG está aumentada de forma significativa no grupo de alto grau quando comparado com o grupo de baixo grau ($p=0,007$) (Figura 11 – A). O mesmo foi observado para a expressão de Ki-67 ($p=0,0001$) (Figura 11 – B).

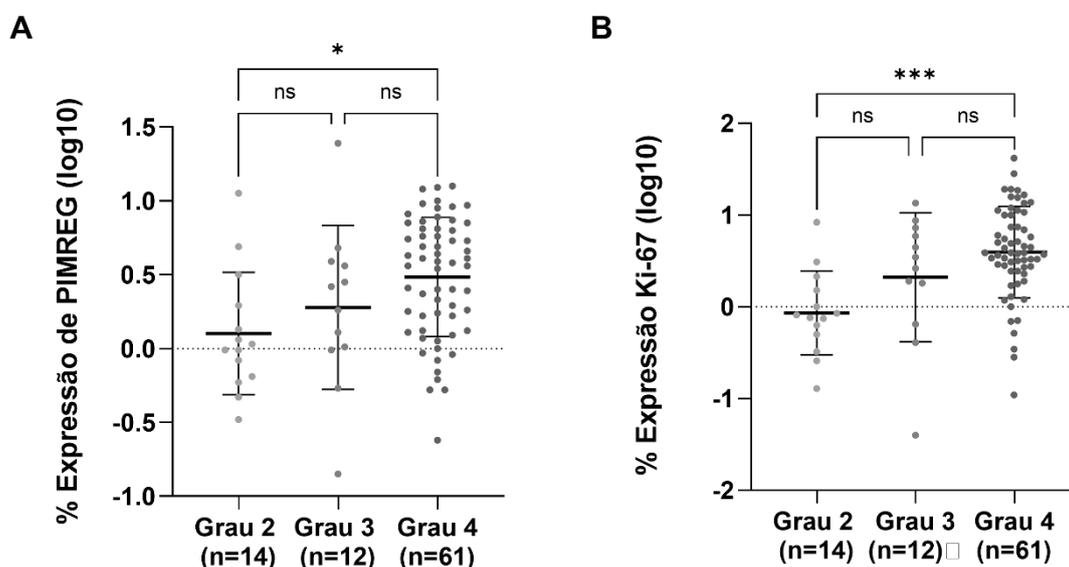
Figura 11 – A imunexpressão de PIMREG e Ki-67 é mais elevada em amostras de pacientes com gliomas de alto grau.



Nota: Nota: Os valores utilizados na análise foram da média das biópsias dos 87 pacientes (\log_{10}). Desses, 73 foram diagnosticados como alto grau e 14 foram diagnosticados como baixo grau. **(A)** Expressão de PIMREG nos pacientes de baixo e alto grau. Teste t (**) $p=0,007$. **(B)** Expressão de Ki-67 nos pacientes de baixo e alto grau. Teste t (***) $p=0.0001$.

Em relação aos graus de malignidade não agrupados (graus 2 a 4), foi possível observar uma diferença significativa na expressão de PIMREG entre o grau 2 e o grau 4 ($p=0.0072$). Entre o grau 2 e 3 ou entre o grau 3 e 4, não houve uma diferença significativa, muito embora tenha sido possível observar uma tendência de aumento progressivo na expressão de PIMREG proporcional ao aumento do grau. (Figura 12 – A). Mais uma vez, o resultado semelhante é observado na análise da expressão de Ki-67 (Figura 12 – B).

Figura 12 – Aumento da imunexpressão de PIMREG e Ki-67 nos pacientes diagnosticados com o grau 4 de malignidade.



Nota: Análise dos valores das médias da expressão de cada proteína (\log_{10}) dos pacientes em cada grau de malignidade (2, 3 e 4). **(A)** Aumento da expressão de PIMREG no grau 4. Existe uma diferença entre o grau de malignidade 2-4 (Teste de Bonferroni (*)) $p=0,01$. **(B)** Aumento da expressão de Ki-67 no grau 4. Existe uma diferença entre o grau de malignidade 2-4 (Teste de Bonferroni (***) $p=0,0001$).

4.6 Análise da imunexpressão de PIMREG com os dados clínico-patológicos dos pacientes.

Conforme observado em análise univariada, não houve associação entre valor de imunexpressão de PIMREG com: o gênero ($p=0,93$) e com os diferentes tipos de tratamentos adjuvantes: TMZ, $p=0,67$; RT, $p=0,61$ e RT + TMZ, $p=0,37$. Porém, houve associação entre o valor de imunexpressão de PIMREG com: a idade ($p= 0,009$), óbito ($p= 0,01$), grau de malignidade (agrupado) ($p= 0,007$) e entre os graus 2 e 4 ($p= 0,01$) (Tabela 4).

Tabela 4 – Análise univariada da imunexpressão de PIMREG com os dados clínicos da série dos pacientes.

Variável	p
Gênero	
F vs M	0,930
Idade (anos)	
<50 vs ≥50	0,009
Óbito	
	0,010
Grau de malignidade (agrupado)	
Alto grau (3 e 4) vs Baixo grau (2)	0,007
Grau de malignidade	
(2-3)	0,880
(2-4)	0,010
(3-4)	0,390
Tratamento	
Cirurgia +RT	0,610
Cirurgia + TMZ	0,670
Cirurgia + RT + TMZ	0,370

Teste t para amostras independentes e teste de Mann-Whitney para o tratamento com TMZ. Os valores significativos estão destacados em negrito na tabela.

Diante desses resultados, foi verificada a influência de PIMREG na sobrevida dos pacientes através da regressão de Cox, utilizando como variável o evento de óbito e observou-se que PIMREG é significativo para a sobrevida ($p= 0,007$), indicando que a cada aumento de 0,1 ponto no valor de PIMREG ($\log 10$), a chance de óbito aumenta em média, 22,7% (Tabela 5).

Tabela 5 – Análise da influência de PIMREG na sobrevida dos pacientes através da regressão Cox utilizando como variável o evento de óbito.

Variável	Exp (B)	p
PIMREG	2,27	0,007

Análise de Regressão de Cox. *Exp (B)* (representa a relação-mudança nas chances de o evento de interesse para uma mudança unitária no preditor) Os valores significativos estão destacados em negrito na tabela.

Olhando a influência de PIMREG na sobrevida utilizando como variável o evento de óbito, porém adicionando a variável grau de malignidade na regressão de Cox, foi possível observar que grau de malignidade é significativo para a sobrevida ($p=0,02$), indicando que quem foi diagnosticado com alto grau de malignidade tem três vezes mais chance de óbito. Nesse modelo, a expressão de PIMREG ($\log 10$) também é significativa para a sobrevida ($p=0,05$), indicando que a cada 0,1 ponto no valor de de PIMREG ($\log 10$) aumenta, em média, 18,1% a chance de óbito (Tabela 6).

Tabela 6 – Análise da influência de PIMREG na sobrevida dos pacientes através da regressão Cox utilizando a variável grau de malignidade.

Variável	<i>Exp (B)</i>	<i>p</i>
PIMREG	1,81	0,05
Grau de malignidade (alto vs baixo)	2,99	0,07

Análise de Regressão de Cox. *Exp (B)* (representa a relação-mudança nas chances de o evento de interesse para uma mudança unitária no preditor). Os valores significativos estão destacados em negrito na tabela.

Porém, quando acrescentado idade no modelo de regressão acima, as variáveis PIMREG ($\log 10$) ($p=0,20$) e grau de malignidade ($p=0,11$) passam a não ser mais significativas, sendo somente idade significativa ($p=0,01$), indicando que cada ano a mais na idade aumenta em média 3% a chance de óbito (Tabela 7).

Tabela 7 – Análise da influência de PIMREG na sobrevida dos pacientes através da regressão Cox utilizando as variáveis: grau de malignidade e idade.

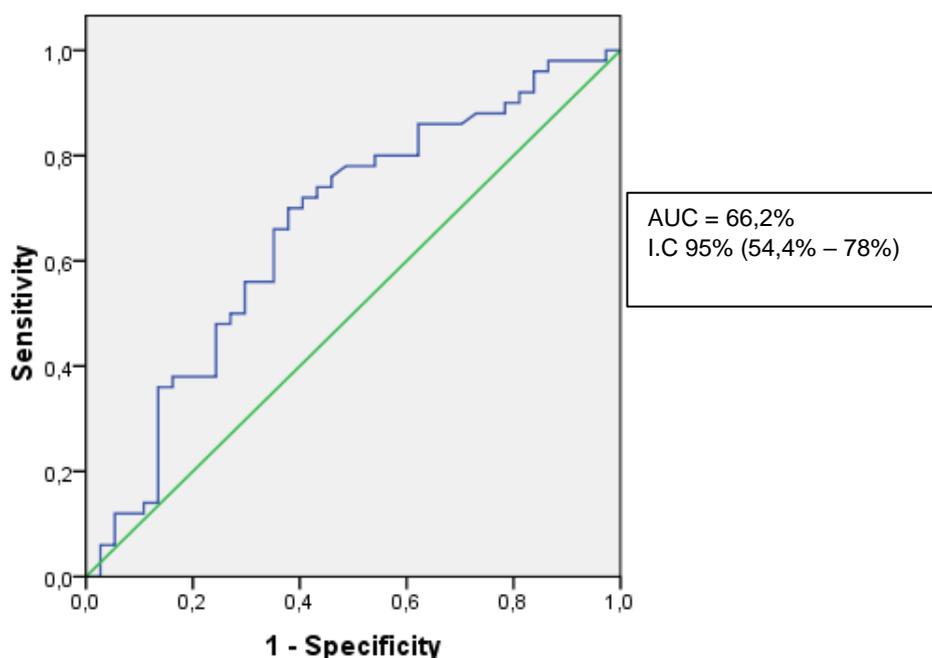
Variável	<i>Exp (B)</i>	<i>p</i>
PIMREG	1,51	0,20
Grau de malignidade (alto vs baixo)	2,26	0,11
Idade (anos)	1,03	0,01

Análise de Regressão de Cox. *Exp (B)* (representa a relação-mudança nas chances de o evento de interesse para uma mudança unitária no preditor). Os valores significativos estão destacados em negrito na tabela.

Uma curva ROC (*receiver operator characteristic curve*) foi construída a partir dos dados da imunexpressão de PIMREG tendo como óbito a variável discriminante.

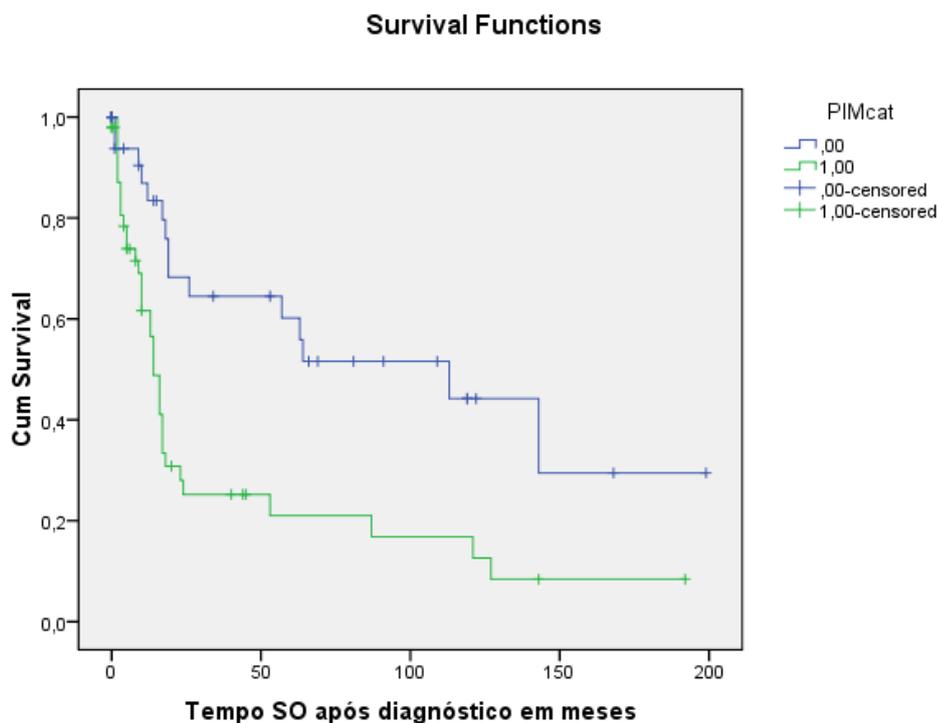
Primeiramente, obteve-se o valor da área sob a curva= 66,2%, I.C 95% (54,4% – 78%), $p=0,01$, indicando que existe diferença entre os valores da imunoexpressão de PIMREG, podendo assim, distinguir dois grupos (Figura 13). O ponto de corte utilizado para discriminar os dois grupos, foi 2,04 (sensibilidade= 70% e especificidade= 62,2%) e o teste de log rank foi significativo ($p=0,001$), indicando que a sobrevida do grupo acima de 2,04 é significativamente inferior, com sobrevida mediana de 14 meses (I.C 95% 11,0-16,9) e média de 40 meses (I.C 95% 21,3 – 59,5), que o grupo que apresenta o valor abaixo de 2,04, com sobrevida mediana de 113 meses (I.C 95% 21,7 – 204,3) e média de 100 meses (I.C 95% 68,6 – 133,1) (Figura 14).

Figura 13 – Curva ROC obtida pela imunoexpressão de PIMREG e o óbito.



Nota: AUC (área sob a curva) mostra a probabilidade de um grupo possuir valores maiores do que outros. Sensibilidade é a probabilidade do teste ser positivo, dado que o indivíduo está doente. Especificidade é a probabilidade do teste dar negativo, dado que o indivíduo não tem a doença. O ponto de corte utilizado para distinguir os dois grupos com alta e baixa expressão de PIMREG foi de 2,04 com sensibilidade= 70% e especificidade= 62,2%

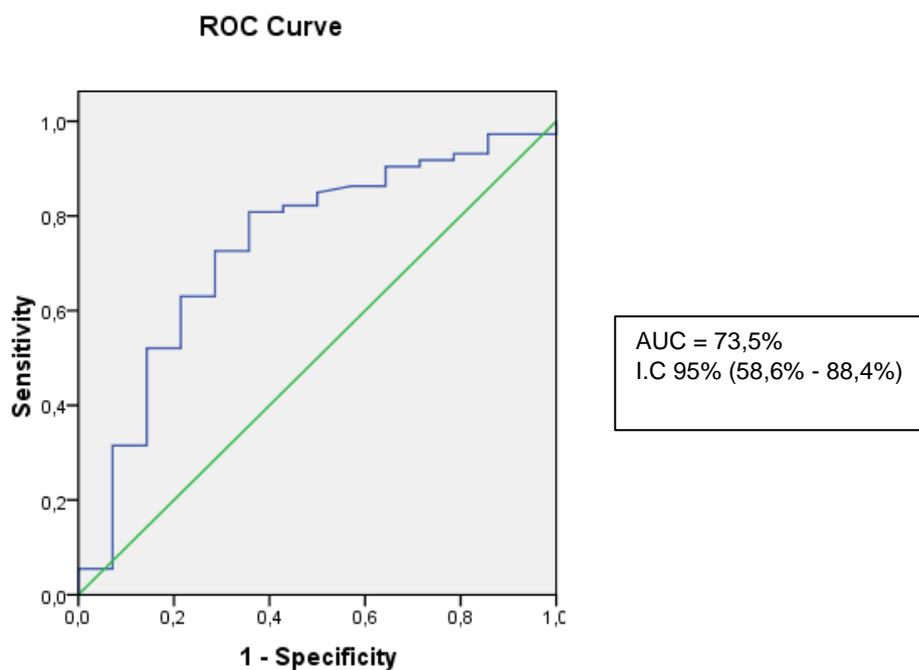
Figura 14 – Curva de Kaplan – Meier em relação à imunexpressão de PIMREG e o tempo de sobrevida dos pacientes utilizando 2,04 como ponto de corte.



Nota: O grupo com imunexpressão de PIMREG maior que 2,04 está representado pela linha em verde e o grupo com imunexpressão menor que 2,04 está representado pela linha em azul. Teste *Log rank* $p = 0,001$.

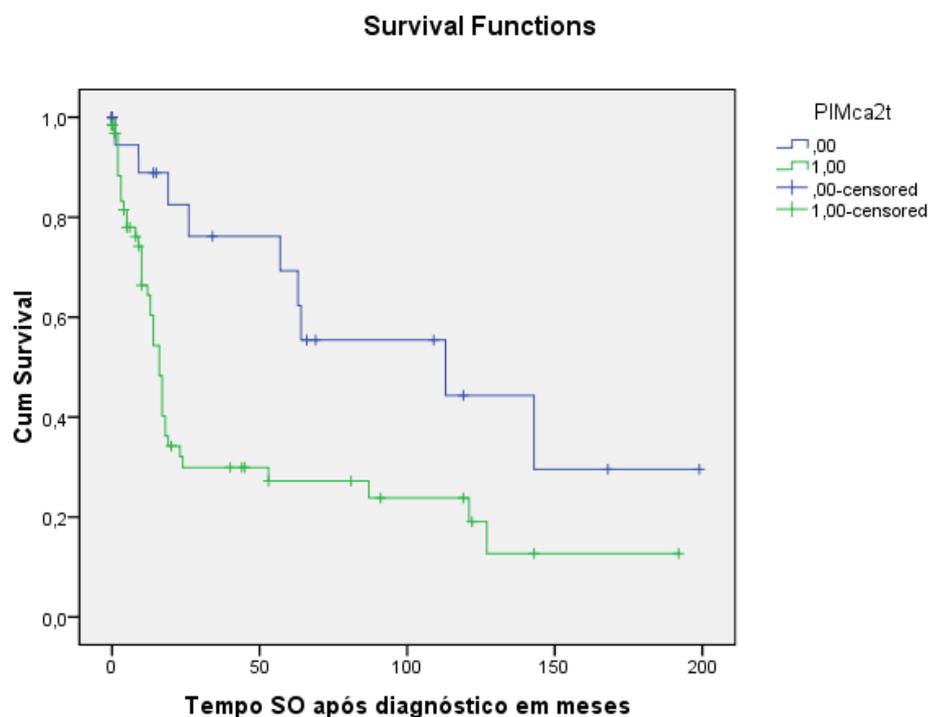
Utilizando o grau de malignidade como a variável discriminante foi construída outra curva ROC para os dados da imunexpressão de PIMREG. O valor da área sob a curva = 73,5%, I.C 95% (58,6% - 88,4%), $p = 0,005$, diferença entre os valores da imunexpressão de PIMREG, podendo assim, distinguir dois grupos (Figura 15). O ponto de corte utilizado foi de 1,16 (sensibilidade de 80,8% e uma especificidade de 64,3%) e o teste de log rank foi significativo ($p = 0,009$), indicando que a sobrevida do grupo com a porcentagem da imunexpressão de PIMREG acima de 1,6 é inferior com mediana de 16 meses (I.C 95% 13,3 – 18,7) e média de 50 meses (I.C 95% 30,8 – 69,8), ao grupo que apresenta a imunexpressão de PIMREG abaixo de 1,6 com mediana de 113 meses (I.C 95% 0-236,2) e média de 108 meses (I.C 95% 70,7 – 146,5) (Figura 16).

Figura 15 – Curva ROC obtida pela imunoexpressão de PIMREG e o grau de malignidade.



Nota: AUC (área sob a curva) mostra a probabilidade de um grupo possuir valores maiores do que outros. Sensibilidade é a probabilidade do teste ser positivo, dado que o indivíduo está doente. Especificidade é a probabilidade do teste dar negativo, dado que o indivíduo não tem a doença. O ponto de corte utilizado para distinguir os dois grupos com alta e baixa expressão de PIMREG foi de 1,16 com sensibilidade de 80,8% e uma especificidade de 64,3%.

Figura 16 – Curva de Kaplan – Meier em relação à imunoposição de PIMREG e o tempo de sobrevivência dos pacientes utilizando 1,16 como ponto de corte.



Nota: O grupo com imunoposição de PIMREG maior que 1,16 está representado pela linha em verde e o grupo com imunoposição menor que 1,16 está representado pela linha em azul. Teste *Log rank* $p = 0,009$.

Na análise da porcentagem da imunomarcção de PIMREG nos 5 pacientes que apresentaram a recidiva da doença, embora o número de pacientes não seja suficiente para uma análise estatística robusta, devido a preciosidade dessas amostras, foi realizado uma análise descritiva para investigar se existe alguma tendência de aumento da imunomarcção de PIMREG nas amostras de recidiva em relação a amostra inicial. Pode-se observar um aumento da expressão de PIMREG nas amostras de recidiva em relação à primeira amostra (Tabela 8).

Tabela 8 – Porcentagem de células marcadas com PIMREG antes da realização do tratamento e após a recidiva do tumor.

N° Caso	1ª amostra	2ª amostra	Tempo de sobrevida (meses)
	PIMREG		
Caso 69	4,85	7,23	45
Caso 74	1,35	1,57	53
Caso 71	0,47	0,51	66
Caso 60	0,44	1,15	57
Caso 16	0,53	2,66	199

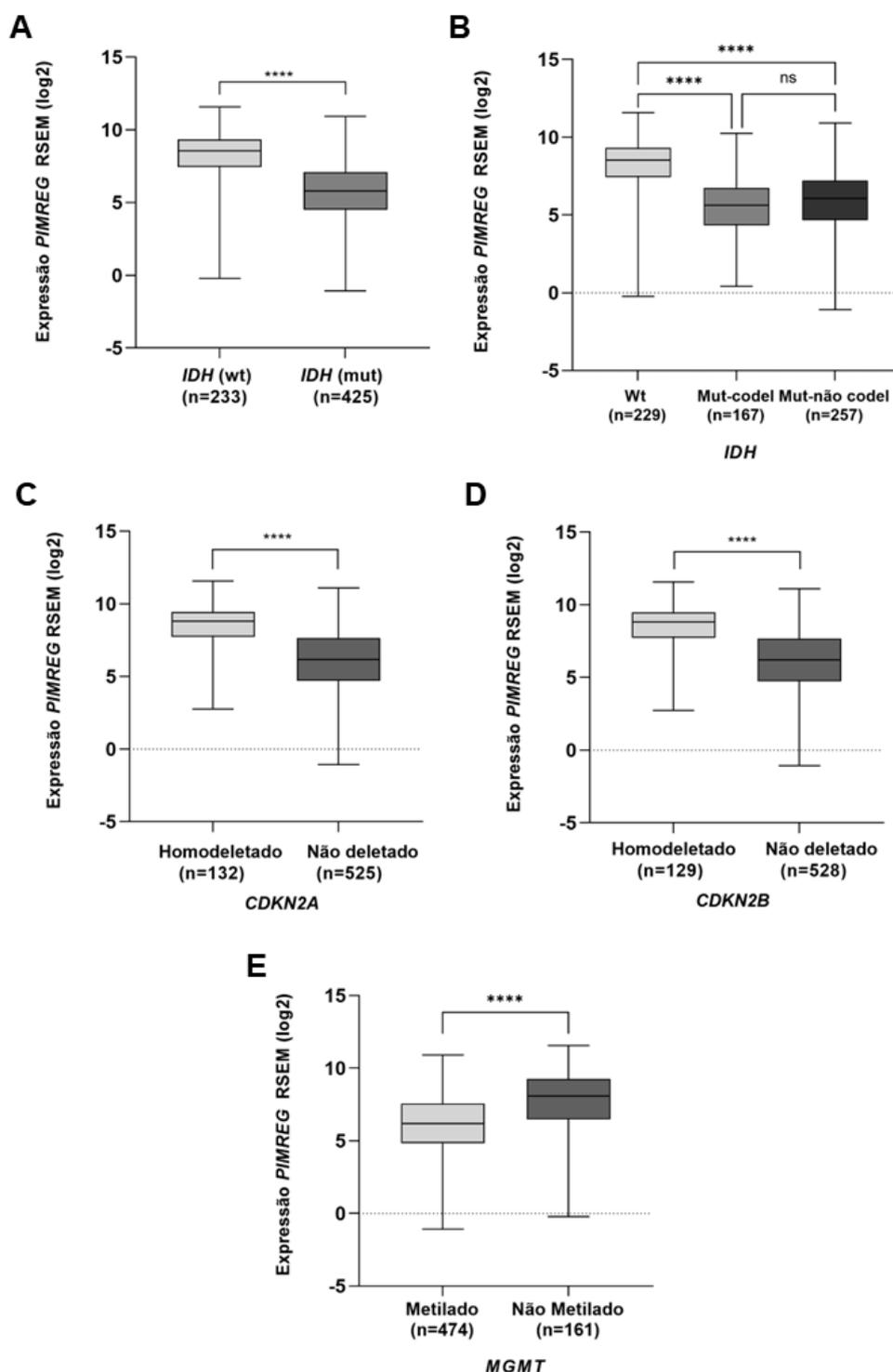
4.7 Expressão gênica de *PIMREG* é mais elevada no subtipo mais agressivo de glioma.

De acordo com a classificação dos gliomas, que inclui as informações moleculares (LOUIS *et al.*, 2016, 2021), o subtipo mais agressivo do tumor (GBM) não apresenta mutação no gene *IDH* nem a co-deleção de 1p19q. No entanto, nos demais subtipos de gliomas (astrocitoma e oligodendroglioma), que possuem um melhor prognóstico, o gene *IDH* está mutado e a co-deleção de 1p19q está presente nos oligodendrogliomas (LOUIS *et al.*, 2021). Assim, foi avaliado a expressão de *PIMREG* em amostras de pacientes depositados no banco de dados públicos TCGA, uma vez que essas amostras apresentam as informações moleculares (descrito no item 3.6) acerca da presença ou não da mutação em *IDH* e da co-deleção de 1p19q. Foi observado que os níveis do transcrito de *PIMREG* foi significativamente mais elevado nos tumores com *IDH*^{selvagem} do que nos pacientes com *IDH*^{mutado} (Figura 17 - A), conforme previamente demonstrado pelo estudo de Serafim e colaboradores (2021) em um coorte mais restrito. Da mesma forma, níveis mais elevados do transcrito de *PIMREG* são observados no subtipo de *IDH*^{selvagem} quando comparado com os grupos *IDH*^{mutado} e a presença ou não da co-deleção de 1p9q (Figura 17 - B).

Alterações genéticas e epigenéticas nos supressores tumorais *CDKN2A/2B*, a exemplo a homodeleção desses genes, estão relacionadas ao subtipo mais agressivo do tumor. Dessa forma, foi avaliado a expressão de *PIMREG* em dois grupos: homodeletados e não deletados para *CDKN2A/2B*, e foi observado que os níveis do

transcrito são mais elevados nos grupos homodeletados (Figura 17 - C e D). O *status* de metilação do promotor *MGMT* é utilizado como biomarcador preditivo em resposta ao tratamento com TMZ. Assim, foi avaliado a expressão do transcrito de *PIMREG* em relação a presença ou não de metilação em *MGMT* e foi observado que a expressão do transcrito é elevada nos pacientes que não apresentam a metilação *MGMT* (Figura 17 - E). Todos esses resultados mostram que a alta expressão de *PIMREG* está correlacionada com o subtipo mais agressivo do tumor (alto grau de malignidade).

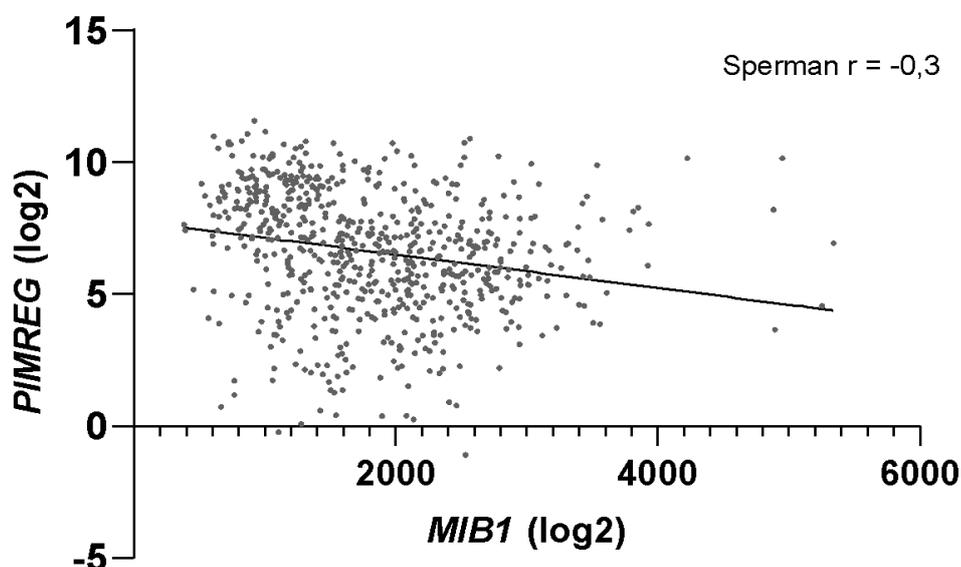
Figura 17 – Níveis do transcrito *PIMREG* nas amostras dos pacientes com glioma do TCGA.



Nota: Expressão do transcrito *PIMREG* em amostras de pacientes do TCGA com gliomas **(A)** *IDH* selvagem e *IDH* mutado. Teste de Mann-Whitney (****) $p < 0,0001$. **(B)** Com mutação *IDH* em comparação com a presença ou ausência da co-deleção de 1p19q. Teste de Kruskal-Wallis (****) $p < 0,0001$. **(C, D)** Com deleção do gene *CDKN2A/2B*. Teste de Mann-Whitney (****) $p < 0,0001$. **(E)** Com metilação da região promotora do gene *MGMT*. Teste de Mann-Whitney (****) $p < 0,0001$. Os valores da expressão gênica estão em escala logarítmica (log₂).

Uma vez observada a correlação positiva da imunomarcagem de PIMREG e de Ki-67 na série de pacientes do HCRP, foi avaliado se essa correlação também existe na expressão do transcrito. Diferente do encontrado para a expressão proteica no presente trabalho, não foi observado uma correlação positiva entre os níveis do transcrito de PIMREG e MIB1 na coorte TCGA (Sperman $r=-0,3$; $p<0,01$) (Figura 18).

Figura 18 – Correlação da expressão do transcrito de *PIMREG* e *Ki-67 (MIB1)* nas amostras dos pacientes do TCGA.



Nota: Correlação de Spearman ($r=-0,3$; $p<0,01$). Os valores da expressão gênica estão em escala logarítmica (\log_2).

4.8 Otimização do diagnóstico histopatológico por meio de avaliação molecular (MLPA e MS-MLPA) em nove amostras.

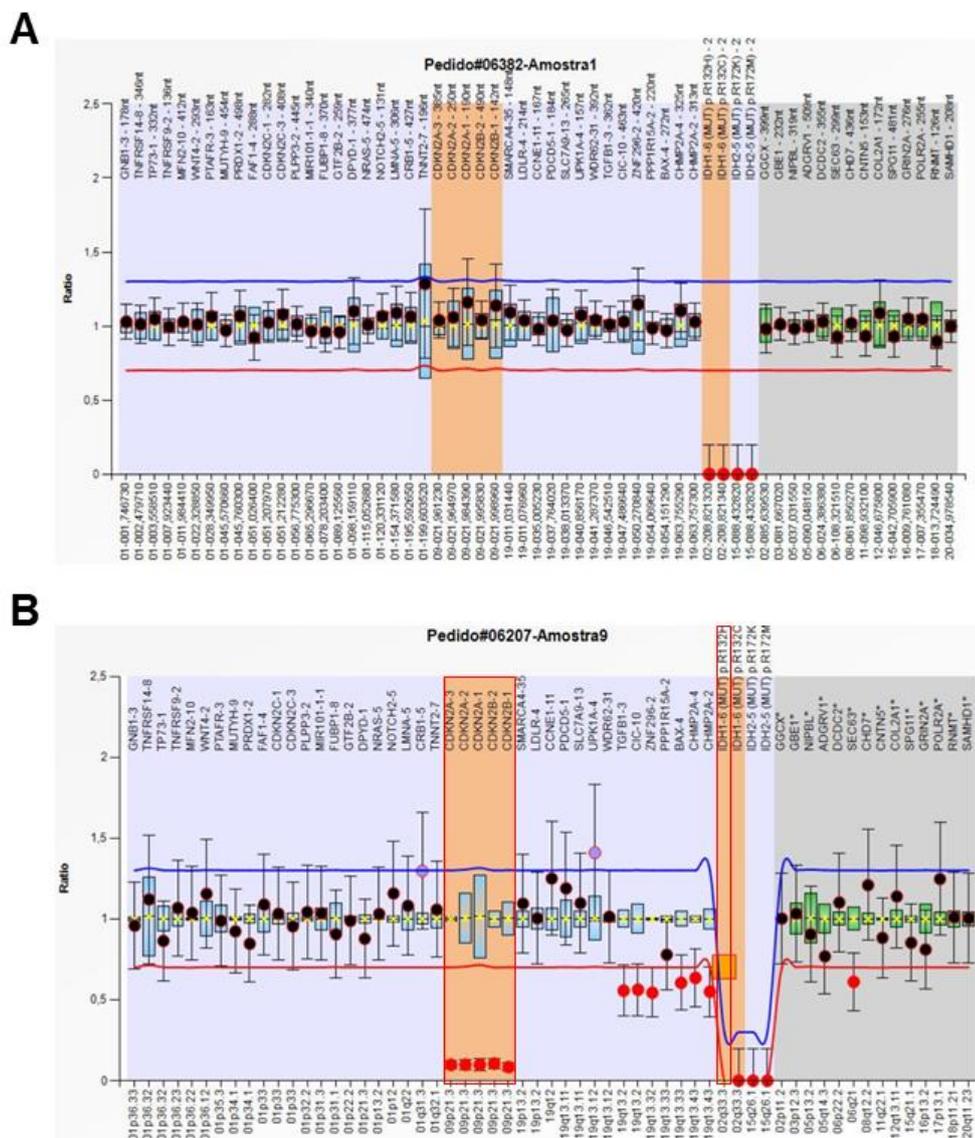
Para auxiliar em um diagnóstico mais preciso e consequentemente melhor classificação dos tumores, procuramos otimizar a técnica de MLPA e MS-MLPA em amostras de tecido FFPE na série de pacientes e obteve sucesso em nove pacientes do HCRP. Após análise no *software Coffalyser* (MRC Holland - Amsterdã, Holanda), foram gerados os gráficos de razão de pontos para cada paciente. Os controles utilizados nas reações são amostras de tecido FFPE não tumorais de pacientes diagnosticados com epilepsia, pois não apresentam alterações nas sondas presentes nos kits utilizados (Figura 19 - A).

Na análise do diagnóstico molecular através do Kit P088 - Oligodendroglioma 1p19q (sondas 1p19q, *IDH1/2*, *CDKN2A/2B*), dos 9 pacientes analisados, 3 apresentaram homodeleção do gene *CDKN2A/2B*; 2 apresentaram mutação em *IDH1* em R132H; 1 paciente apresentou homodeleção de *CDKN2A/2B* e mutação em *IDH1* em R132H; 2 não apresentaram alteração nas sondas e 1 paciente não foi possível identificar se houve ou não alteração nas sondas (Nd – não determinado) (Figura 19 – B) (Tabela 7).

Na técnica de MS-MLPA, uma variante da técnica de MLPA, é possível identificar semi-quantitativamente a metilação da região promotora do gene *MGMT*. A técnica é dividida em duas reações (A – não digerida, pois não foi acrescentado a enzima *HhaI* e B- digerida, onde foi acrescentada a enzima). Dessa forma, o primeiro gráfico de razão de pontos corresponde a variação no número de cópias (reação A) e o segundo gráfico gerado pelo *software* (reação B) é utilizado para análise da metilação da região promotora do gene (Figura 20 - A).

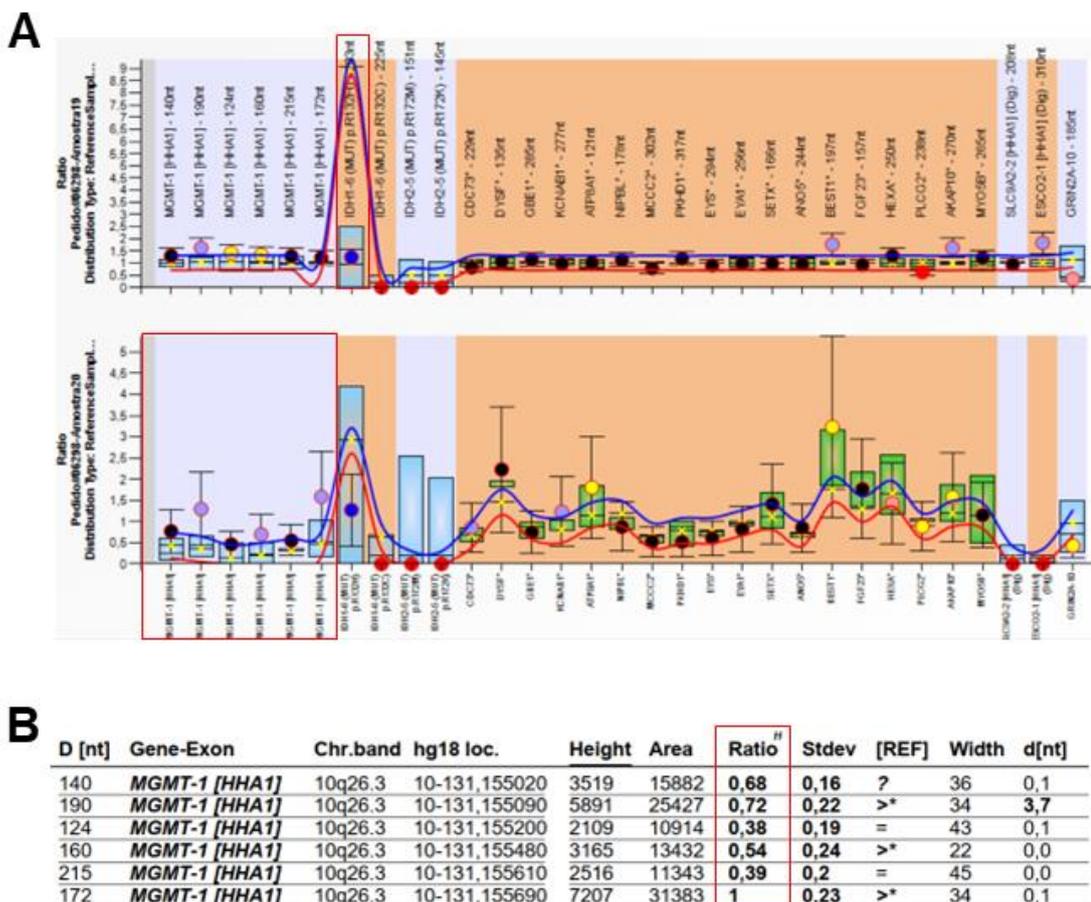
Para identificar se houve ou não metilação de *MGMT*, é observado no segundo gráfico de razão de pontos os valores da razão das seis sondas específicas da região promotora do gene (Figura 20 - A). Assim, é utilizado para o diagnóstico o valor da média dessas seis sondas. Se o valor encontrado estiver entre 0-20% é considerado não metilado; 30–70% metilado parcialmente e entre 70-90% hipermetilado (Figura 20 - B). Com o diagnóstico de metilação parcial ou hipermetilado o paciente se enquadra no tratamento com TMZ, sendo beneficiado. Assim, dos 9 pacientes avaliados pelo Kit MS-MLPA ME012 (metilação da região promotora *MGMT* e mutação em *IDH1/2*), 1 paciente apresentou metilação parcial do gene (aproximadamente 60%); 1 apresentou metilação parcial (60%) e mutação em *IDH1* (R132H); 1 não apresentou metilação *MGMT* e em 6 pacientes não foi possível identificar se houve ou não alteração (Tabela 9).

Figura 19. Exemplo do gráfico de razão de pontos gerados após análise com *software* Coffalyser.Net com o kit P088.



Nota: Exemplo dos gráficos de razão de pontos gerados pelo *software*. **(A)** Resultado de uma das amostras controle, onde todas as sondas (pontos pretos) estão dentro do limite (linhas azul e vermelha) e no nível 1 (eixo Y do gráfico), que indica a presença de dois alelos para as regiões de interesse. **(B)** Resultado da amostra de um paciente (P05) em que foi observado a homodeleção de *CDKN2A/2B*, no gráfico representada pelos pontos vermelhos, com valores da razão abaixo de 0,5 e presença da mutação em *IDH1* (R132H). Os quadrados em vermelho nas imagens, indicam onde houve as alterações. Na parte inferior do gráfico (eixo X), estão descritas as localizações das regiões correspondentes a cada cromossomo de cada gene (descrito na parte superior do gráfico). A região do gráfico com fundo cinza (à esquerda) correspondem as sondas controles presentes no kit. A região do gráfico com coloração salmão, correspondem as regiões com mutações de ponto específicas (*CDKN2A/2B*; *IDH1* e *IDH2*). As bolas em roxo, significam que a média dessas sondas saiu fora da média das sondas de referência, mas não necessariamente existe alguma alteração nessa região.

Figura 20. Exemplo do gráfico de razão de pontos gerados após análise com *software* Coffalyser.Net com o kit ME012.



Nota: Exemplo dos gráficos de razão de pontos gerados pelo *software*. **(A)** Resultado de um paciente (P02) em que foi observado a mutação em *IDH1* (R132H) destacada pelo quadrado vermelho na imagem no primeiro gráfico de razão de pontos. A metilação parcial da região promotora do gene *MGMT*, destacada pelo quadrado em vermelho no segundo gráfico. **(B)** Através da média dos valores de razão das sondas da região promotora de *MGMT*, indicado pelo quadrado em vermelho na tabela gerada pelo *software* é calculada a porcentagem de metilação. Na parte inferior do gráfico (eixo X), estão descritas quais as sondas, e na parte superior do gráfico, estão descritas as sondas e a respectiva quantidade de nucleotídeos.

Tabela 9 – Resumo dos testes de MLPA e MS-MLPA.

N° casos (Idade e gênero)	Diagnóstico histológico	Probemix P088 (sondas para 1p19q, <i>IDH1/2</i> , <i>CDKN2A/2B</i>)	Probemix ME012 (sondas para metilação <i>MGMT</i> , <i>IDH1/2</i>)	Diagnóstico Molecular
19 (45, F)	Glioblastoma, grau 4	Homodeleção em <i>CDKN2A/2B</i>	Nd	Glioblastoma grau 4
9 (65, F)	Glioblastoma, grau 4	Homodeleção em <i>CDKN2A/2B</i>	Metilação parcial (60%)	Glioblastoma grau 4
70 (70, M)	Astrocitoma, grau 4	<i>IDH1</i> mutado R132H	Nd	Astrocitoma grau 4
71 (72, M)	Glioma difuso com morfologia ambígua, grau 3	<i>IDH1</i> mutado R132H	Metilação parcial (60%) e <i>IDH1</i> mut R132H	Astrocitoma grau 4
57 (38, M)	Glioma difuso com morfologia ambígua, grau 3	Homodeleção em <i>CDKN2A/2B</i> e <i>IDH1</i> mutado R132H	Nd	Astrocitoma grau 4
69 (37, F)	Glioblastoma, grau 4	Homodeleção em <i>CDKN2A/2B</i>	Nd	Glioblastoma grau 4
5 (52, M)	Glioblastoma, grau 4	Nd	Não metilado	Glioblastoma grau 4
62 (72, F)	Glioblastoma, grau 4	Na	Nd	Glioblastoma grau 4
67 (76, F)	Glioblastoma, grau 4	Na	Nd	Glioblastoma grau 4

*Feminino (F); Masculino (M); Nd (não determinado); Na (não teve alteração).

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

PIMREG é um marcador de proliferação celular (ARCHANGELO *et al.*, 2008). Recentemente, vários estudos têm mostrado a relação da expressão gênica de *PIMREG* com diversos tipos de câncer (revisado em ARCHANGELO *et al.*, 2018), como câncer de mama, carcinoma de células renais, câncer pancreático, câncer de próstata e glioma (YAMADA *et al.*, 2018; WEI *et al.*, 2019; HU *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2019; JIANG *et al.*, 2019; YAO *et al.*, 2019; ZHOU *et al.*, 2021, SERAFIM *et al.*, 2022), sendo possível observar uma associação do aumento do transcrito conforme o aumento do grau de malignidade da neoplasia, indicando uma possível relação entre a expressão do transcrito de *PIMREG* e a progressão do tumor e, possivelmente, ao pior prognóstico.

Neste estudo, através da investigação *in silico* utilizando banco de dados públicos do TCGA, foi possível observar que há um aumento da expressão gênica de *PIMREG* nos pacientes com *IDH1/2* selvagem; deleção do gene *CDKN2A/2B* e com *status* de metilação da região promotora do gene *MGMT*, indicando a correlação do aumento do transcrito com a progressão do glioma, visto que, todos esses marcadores moleculares estão relacionados ao subtipo mais agressivo de glioma (GBM). Nota-se que esses achados confirmam e ampliam dados descritos anteriormente os quais mostram os níveis do transcrito de *PIMREG* com a progressão do glioma (WANG *et al.*, 2021; SERAFIM *et al.*, 2022; ZHU *et al.*, 2022). Embora essa relação já tenha sido descrita, naqueles estudos os autores não avaliaram a relação da expressão gênica de *PIMREG* com o *status* da região promotora de *MGMT* e com a deleção do gene *CDKN2A/2B* apresentados no presente trabalho.

Em trabalho anterior, nosso grupo mostrou que GBM foi o tipo tumoral que exibiu os níveis mais elevados da expressão de PIMREG em comparação a todos os outros cânceres analisados (SERAFIM *et al.*, 2022). Ainda, foi observado em ensaios funcionais com células de GBM, que houve um aumento da expressão de PIMREG de forma dose dependente frente ao tratamento com o agente quimioterápico TMZ. Esse aumento de PIMREG foi acompanhado pelo aumento da fosforilação da histona H2AX, marcador de dano no DNA (SERAFIM *et al.*, 2022). Naquele trabalho, hipotetizou-se que PIMREG estaria relacionado a resposta de dano e reparo do DNA, e, possivelmente, a resistência de células de GBM frente ao tratamento (SERAFIM *et al.*, 2022). Diante da possível relevância de PIMREG na fisiopatologia dos gliomas, e com o objetivo de investigar se a imunexpressão de PIMREG pode ser utilizada como

marcador de progressão tumoral e/ou prognóstico, neste estudo, foram utilizados TMAs e a técnica de IHQ para avaliar a imunexpressão de PIMREG em amostras de tecido FFEP de pacientes diagnosticados com glioma difusos do tipo adulto.

A utilização de TMAs para análise de IHQ de tecidos FFEP é vantajosa, pois não requer grandes quantidades de tecido do bloco original e, portanto, preserva tecidos valiosos. Além disso, o uso de TMAs permite a marcação, coloração e análise simultânea de várias amostras tumorais (24 punções em cada TMA) de uma única vez, tendo, assim, uma uniformidade experimental e um baixo custo comparado com as abordagens convencionais, como a técnica de IHQ em cortes do tecido inteiro, que necessita de maiores quantidades de anticorpo (JAWHAR, N. MT, 2009). No entanto, esta abordagem apresenta uma limitação, no que se refere ao fato de que o “spot” selecionado para ser incluído no TMA não seja representativo de toda o tecido, mas sim de regiões específicas. Outra questão relacionada ao uso de TMA é que durante a realização das IHQs, eventualmente, pode haver perda de “spot” de tecido na lâmina (JAWHAR, N. MT, 2009) o que, de fato, ocorreu com as amostras de 5 pacientes nesse estudo, e, portanto, precisaram ser removidos das análises.

Neste trabalho, foram produzidos 13 blocos de TMAs e foi possível padronizar a técnica de IHQ com o anticorpo originalmente desenvolvido para ser utilizado em tecido não fixado, para detecção de PIMREG em tecido FFEP. O anticorpo mostrou uma marcação específica e, como esperado, no núcleo das células (ARCHANGELO *et al.*, 2008).

Visualmente, foi observada marcação de PIMREG mais proeminente nos casos diagnosticados como glioma de alto grau de malignidade (grau 3 e 4), quando comparado ao glioma de baixo grau de malignidade (grau 2), indicando que conforme aumenta a malignidade da neoplasia, aumenta a expressão de PIMREG. Esse resultado está de acordo com dados das análises de IHQ realizados em câncer de mama e próstata (JIANG *et al.*, 2019; ZHOU *et al.*, 2021). No entanto, no estudo de Jiang e colaboradores (2019), que utilizou o mesmo anticorpo do presente estudo, a imunomarcção descrita, supostamente, como de PIMREG, encontra-se dispersa no citoplasma da célula e não no núcleo, indicando que, ou a padronização do anticorpo para uso na técnica de IHQ não foi adequada, ou a proteína marcada não se tratava de PIMREG. O estudo de Zhou e colaboradores, utilizando outro anticorpo anti-PIMREG, também descreveu a imunomarcção, supostamente de PIMREG, difusa no citoplasma da célula do tecido de câncer de próstata. (ZHOU *et al.*, 2021). Em resumo,

os resultados apresentados no presente trabalho mostram que o anticorpo utilizado foi específico e eficiente em detectar a proteína PIMREG em tecido FFEP de gliomas difusos do tipo adulto. Ademais, por meio da imunomarcção, foi possível quantificar os valores da porcentagem de PIMREG nas células do tecido tumoral e relacionar esses valores aos dados clínicos da série de pacientes do HCRP.

A análise da correlação entre a porcentagem de núcleos marcados para Ki-67 e PIMREG na série de pacientes do HCRP mostrou que existe um grau significativo de associação entre essas duas variáveis, indicando que PIMREG apresenta um comportamento similar ao de Ki-67, um biomarcador de prognóstico utilizado na prática clínica patológica, o que era esperado, diante da semelhança das funções descritas na literatura para essas proteínas, como, localização nuclear e marcador de proliferação celular (ARCHANGELO *et al.*, 2008; SORBYE *et al.*, 2012; ALKHAIBARY *et al.*, 2019). No entanto, quando comparado a expressão dos transcritos na coorte do TCGA, com um número maior de pacientes, foi observado que não há associação entre essas duas variáveis a nível gênico. Isso indica que, talvez, esses genes sofram regulação pós-transcricional de forma que a expressão proteica não reflita, necessariamente, os níveis do transcrito em um gene ou em ambos. Além disso, foi possível observar que a imunoexpressão de PIMREG estava aumentada nas amostras tumorais, quando comparada com as regiões não tumorais, assim como no grupo de alto grau (graus 3 e 4 de malignidade). Em relação aos graus de malignidade 2-4, foi observada uma tendência de aumento progressivo do nível de expressão de PIMREG relativa aos graus mais altos. No entanto, a diferença significativa foi observada somente entre o grau 2 e 4, mas não entre os demais graus. A título de comparação, foram realizadas as mesmas análises nas amostras com a imunoexpressão de Ki-67, obtendo-se resultados semelhantes.

Na análise univariada de regressão de Cox para verificar a influência de PIMREG na sobrevida dos pacientes, foi observado que as variáveis idade e grau de malignidade são significantes para a sobrevida. Assim, esses resultados corroboram com os achados de outros estudos, com diferentes tipos de câncer, que mostram a relação do aumento da expressão do transcrito de *PIMREG* com a diminuição da taxa de sobrevida em vários tipos de câncer (ZHANG *et al.*, 2014; JIANG *et al.*, 2019; SERAFIM *et al.*, 2022). Além disso, esses resultados reforçam que a expressão de PIMREG está associada à progressão da neoplasia, visto que, a maioria dos pacientes diagnosticados com o tipo mais agressivo do tumor tem mais de 50 anos.

Esses resultados de expressão proteica fundamentam a hipótese de que, assim como Ki-67, talvez PIMREG possa ser utilizado como biomarcador na prática clínica para auxiliar no prognóstico dos pacientes diagnosticados com glioma difuso do tipo adulto.

O fato de não ter sido observado uma diferença significativa da imunexpressão de PIMREG, assim como na imunexpressão de Ki-67, nas amostras correspondentes aos graus 2 e 3 ou 3 e 4 de malignidade, evidencia uma possível limitação do presente estudo. Essa limitação está relacionada ao fato de não termos, ao alcance, as informações da classificação molecular na maioria das amostras, o que dificulta a classificação precisa de alguns pacientes em relação ao grau de malignidade. Por exemplo, nos casos diagnosticados como glioma difuso com morfologia ambígua, graus 3 e 4 de malignidade, a informação sobre a presença da co-deleção de 1p19q seria suficiente para classificá-los como grau 3 de malignidade (LOUIS *et al.*, 2016; 2021). Assim, acreditamos que o uso de marcadores moleculares na classificação de pacientes com gliomas, conforme recomendação da OMS, desde 2016, levaria a uma redistribuição de alguns dos nossos pacientes entre os grupos de graus malignidade que poderia, talvez, modificar o resultado das análises, de modo que refletisse o que foi visto nas análises *in silico* da série de pacientes do TCGA, que adota a informação molecular para classificação dos pacientes. A nível gênico, observou-se um aumento estatisticamente significativo da expressão de *PIMREG* conforme o aumento do grau de malignidade (entre 2 e 3, 3 e 4, e 2 e 4) (WANG *et al.*, 2021; SERAFIM *et al.*, 2022; ZHU *et al.*, 2022).

Diante do exposto, existe uma necessidade em caracterizar molecularmente as amostras utilizadas no presente estudo, para um melhor diagnóstico dos pacientes e enquadramento dos subtipos, conforme recomendação da OMS desde 2016 e a 5ª edição da classificação dos gliomas, publicada em 2021 (LOUIS *et al.*, 2021). Na série dos 87 pacientes do HCRP utilizados no presente trabalho, após vários testes de padronização para a técnica de MLPA, tivemos sucesso na caracterização de nove pacientes. Desses, 7 pacientes mantiveram o diagnóstico estabelecido no prontuário do paciente. No entanto, 2 pacientes, que haviam sido diagnosticados como glioma difuso de morfologia ambígua (grau 3 de estadiamento), após a caracterização molecular e seguindo os critérios da nova classificação (2021), se enquadraram no diagnóstico de astrocitoma grau 4, pois ambos apresentaram a mutação em *IDH1* e não apresentaram a co-deleção de 1p19q, o que caracteriza um oligodendroglioma.

Portanto, esses resultados mostram a importância da realização da técnica de MLPA para uma melhor classificação e análise das amostras.

Vale salientar que, durante a otimização da técnica de MLPA e MS-MLPA, houve dificuldade na padronização devido ao fato de se trabalhar com amostras de DNA provenientes de tecido FFEP, sendo comum, mesmo com a etapa de purificação na extração do DNA, que houvesse resquícios de contaminantes (fenol, etanol) os quais, eventualmente, interferiram na técnica. Isso explicaria o que foi observado nos nossos resultados das análises dos gráficos de razão de ponto gerados pelo *software Coffalyser.net*, apresentando desvios padrões altos nas regiões das sondas de interesse. Nota-se após a extração de DNA, quando analisadas no espectrofotômetro (*Nanodrop*), que as amostras mais antigas tiveram um rendimento e purificação do DNA menores em comparação com as amostras mais recentes. Talvez, outra implicação na técnica seja as condições de fixação do tecido em FFPE, como mostrado em um estudo no qual os tecidos fixados entre 12 a 24 horas, em temperatura ambiente, tiveram um rendimento ideal na extração de DNA para ser utilizado na técnica de MLPA (ATANESYAN *et al.*, 2017). No entanto, não se têm informações se as amostras utilizadas no presente estudo não seguiram o mesmo protocolo de fixação, quando processadas no hospital, podendo ser uma limitação da técnica.

Ao analisar a imunomarcagem de PIMREG nas amostras de 5 pacientes que apresentaram a recidiva da doença, foi possível observar que houve um aumento da expressão da proteína quando comparada ao valor obtido na primeira amostra e, que em 3 das 5 amostras de recidivas, o valor obtido pela imunexpressão de PIMREG foi superior ao *cut-off* de 1,16, indicando que, talvez, esse valor utilizado seja adequado para distinguir os dois grupos. No entanto, se faz necessário avaliar mais amostras de recidivas para poder observar se está correta essa observação.

Na análise de sobrevida, após a dicotomização dos grupos com níveis baixos e altos da expressão de PIMREG a partir dos valores de *cut-off* (1,16 e 2,04), foi possível observar que a taxa de sobrevida dos grupos que tinham expressão de PIMREG acima dos valores de *cut-off* foi menor em comparação ao outro grupo. Assim, o aumento da expressão de PIMREG possui forte associação com a progressão do tumor e, conseqüentemente, baixa sobrevida. Sendo assim, esses resultados ressaltam a importância do papel de PIMREG em gliomas, sugerindo, mais

uma vez, que PIMREG possa ser um promissor candidato como biomarcador de progressão e prognóstico nesse tipo de tumor.

Em resumo, os dados apresentados no presente trabalho confirmam a hipótese apresentada, indicando que a expressão de PIMREG reflete a sua expressão gênica em tecidos FFEP, sendo diretamente proporcional ao grau de malignidade reforçando, assim, o papel de PIMREG como candidato a biomarcador de progressão e prognóstico, podendo auxiliar na prática clínica na classificação dos gliomas difusos do tipo adulto.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

- Foi possível padronizar o anticorpo que reconhece a proteína PIMREG para uso em tecido FFEP.
- Obteve-se amostras de uma série de 87 pacientes diagnosticados com glioma difuso do tipo adulto do HCRP para análise da expressão de PIMREG .
- A porcentagem da imunexpressão de PIMREG foi determinada nas 87 amostras.
- Foi demonstrado que existe correlação entre a imunexpressão de PIMREG e de Ki-67, um marcador utilizado na clínica oncológica, nas amostras analisadas.
- A imunexpressão de PIMREG, é aumentada na região tumoral, quando comparada ao “spot” da região não tumoral.
- A imunexpressão de PIMREG, está significativamente aumentada nos subtipos com maior grau de malignidade (alto grau e grau 4).
- A comparação da imunexpressão de PIMREG com os dados clínicos da série dos pacientes, mostrou que: não houve relação da imunexpressão de PIMREG com o gênero e os tipos de tratamentos, mas houve uma relação significativa com a idade, grau de malignidade e óbito.
- Na análise de regressão de Cox, foi possível observar que PIMREG é significativo para a sobrevida juntamente com o grau de malignidade. No entanto, quando adicionado no modelo a variável idade, PIMREG e grau de malignidade passam a não ser mais significativas.
- A mediana de sobrevida dos pacientes com alta expressão de PIMREG é de aproximadamente 15 meses, enquanto os pacientes com baixa expressão, a sobrevida mediana é de aproximadamente 100 meses (em ambos os pontos de cortes de 2,04 e 1,16 definidos a partir da curva ROC).
- A análise dos dados de expressão gênica dos pacientes do TCGA mostrou que: transcrito de *PIMREG* é mais expresso em pacientes com: *IDH*^{selvagem}, que não possuem metilação do gene *MGMT* e que apresentam homodeleção de *CDKN2A/CDKN2B*, indicando que a sua expressão gênica está relacionada ao subtipo mais agressivo do tumor.

Diante do exposto, concluímos que PIMREG tem potencial para ser utilizado como biomarcador na prática clínica, e auxiliar na determinação da progressão e do prognóstico dos pacientes. A ampliação das análises e validações com um “n amostral” maior se faz necessária. Com isso, os próximos passos deste trabalho envolvem: i) padronizar a IHQ para um novo anticorpo que reconhece PIMREG, já que o utilizado neste trabalho foi descontinuado; ii) fazer os demais TMAs com as amostras dos pacientes restantes, a fim de completar a série de pacientes com um “n amostral” superior; iii) fazer a IHQ de todos os TMAs, inclusive, dos 13 TMAs já realizados e iv) terminar a caracterização molecular da série dos pacientes, através da técnica de MLPA e MS-MLPA para que se possa melhor classificar os pacientes, em especial aqueles que foram diagnosticados como glioma difuso de morfologia ambígua, e reanalisar os dados, levando em consideração esses novos parâmetros.

REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS

ALKHAIBARY, Ali *et al.* Ki-67 labeling index in glioblastoma; does it really matter?. **Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy**, v. 12, n. 2, p. 82-88, 2019.

ANG, Samantha Ya Lyn *et al.* Incidence of biomarkers in high-grade gliomas and their impact on survival in a diverse SouthEast Asian cohort-a population-based study. **BMC cancer**, v. 20, n. 1, p. 1-9, 2020.

ARCHANGELO, Leticia; OHGAMI, Robert S. PIMREG (PICALM interacting mitotic regulator). **Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology**, [s. l.], n. 10, 2018.

ARCHANGELO, Leticia Fröhlich *et al.* The CALM and CALM/AF10 interactor CATS is a marker for proliferation. **Molecular Oncology**, [s. l.], v. 2, n. 4, p. 356–367, 2008.

ARCHANGELO, L. Fröhlich *et al.* The novel CALM interactor CATS influences the subcellular localization of the leukemogenic fusion protein CALM/AF10. **Oncogene**, [s. l.], v. 25, n. 29, p. 4099–4109, 2006.

ATANESYAN, Lilit *et al.* Optimal fixation conditions and DNA extraction methods for MLPA analysis on FFPE tissue-derived DNA. **American journal of clinical pathology**, v. 147, n. 1, p. 60-68, 2017.

BARBUTTI, Isabella *et al.* CATS (FAM64A) abnormal expression reduces clonogenicity of hematopoietic cells. **Oncotarget**, v. 7, n. 42, p. 68385, 2016.

CHEN, Xiaoyue *et al.* A novel enhancer regulates MGMT expression and promotes temozolomide resistance in glioblastoma. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 2949, 2018.

CIANCIO, Nicola *et al.* Prognostic value of p53 and Ki67 expression in fiberoptic bronchial biopsies of patients with non small cell lung cancer. **Multidisciplinary Respiratory Medicine**, v. 7, n. 1, p. 1-6, 2012.

DE AZAMBUJA, E. *et al.* Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12 155 patients. **British journal of cancer**, v. 96, n. 10, p. 1504-1513, 2007.

ERASIMUS, Hélène *et al.* DNA repair mechanisms and their clinical impact in glioblastoma. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 769, p. 19-35, 2016.

ELLIS, Hayley P. *et al.* Clinically actionable insights into initial and matched recurrent glioblastomas to inform novel treatment approaches. **Journal of Oncology**, v. 2019, 2019.

FALLON, Kenneth B. et al. Prognostic value of 1p, 19q, 9p, 10q, and EGFR-FISH analyses in recurrent oligodendrogliomas. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 63, n. 4, p. 314-322, 2004.

FU, Dragony; CALVO, Jennifer A.; SAMSON, Leona D. Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 2, p. 104-120, 2012.

GALANIS, Evanthia et al. Incorporation of biomarker assessment in novel clinical trial designs: personalizing brain tumor treatments. **Current oncology reports**, v. 13, p. 42-49, 2011.

HASHIMOTO, Ken *et al.* Fam64a is a novel cell cycle promoter of hypoxic fetal cardiomyocytes in mice. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, 2017.

HAYNES, Harry R.; CAMELO-PIRAGUA, Sandra; KURIAN, Kathreena M. Prognostic and predictive biomarkers in adult and pediatric gliomas: toward personalized treatment. **Frontiers in oncology**, v. 4, p. 47, 2014.

HEGI, Monika E. *et al.* MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. **New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 10, p. 997-1003, 2005.

HU, Shuofeng *et al.* Transcriptional response profiles of paired tumor-normal samples offer novel perspectives in pan-cancer analysis. **Oncotarget**, v. 8, n. 25, p. 41334, 2017.

INCA - Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2022. **Ministério da Saúde Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva**, 2022.

JANSEN, Michael; YIP, Stephen; LOUIS, David N. Molecular pathology in adult gliomas: diagnostic, prognostic, and predictive markers. **The Lancet Neurology**, v. 9, n. 7, p. 717-726, 2010.

JAWHAR, Nazar MT. Tissue microarray: a rapidly evolving diagnostic and research tool. **Annals of Saudi medicine**, v. 29, n. 2, p. 123-127, 2009.

JENKINS, Robert B. *et al.* A t (1; 19) (q10; p10) mediates the combined deletions of 1p and 19q and predicts a better prognosis of patients with oligodendroglioma. **Cancer research**, v. 66, n. 20, p. 9852-9861, 2006.

JIANG, Lili *et al.* Overexpression of PIMREG promotes breast cancer aggressiveness via constitutive activation of NF- κ B signaling. **EBioMedicine**, [s. l.], v. 43, p. 188–200, 2019.

JIAO, Yan *et al.* Aberrant FAM64A mRNA expression is an independent predictor of poor survival in pancreatic cancer. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 14, n. 1, 2019.

JOSEFSSON, Andreas *et al.* Low endoglin vascular density and Ki67 index in Gleason score 6 tumours may identify prostate cancer patients suitable for surveillance. **Scandinavian journal of urology and nephrology**, v. 46, n. 4, p. 247-257, 2012.

LÉON, Priscilla *et al.* Comparison of cell cycle progression score with two immunohistochemical markers (PTEN and Ki-67) for predicting outcome in prostate cancer after radical prostatectomy. **World journal of urology**, v. 36, p. 1495-1500, 2018.

LAH, Tamara T.; NOVAK, Metka; BREZNIK, Barbara. Brain malignancies: Glioblastoma and brain metastases. In: **Seminars in cancer biology**. Academic Press, 2020. p. 262-273.

LEE, Young-Sun *et al.* Suppression of 14-3-3 γ -mediated surface expression of ANO1 inhibits cancer progression of glioblastoma cells. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 26413, 2016.

LI, Zhi *et al.* A four-gene signature predicts the efficacy of paclitaxel-based neoadjuvant therapy in human epidermal growth factor receptor 2–negative breast cancer. **Journal of cellular biochemistry**, v. 120, n. 4, p. 6046-6056, 2019.

LOUIS, David N. *et al.* The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta neuropathologica**, v. 114, p. 97-109, 2007.

LOUIS, David N. *et al.* The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. **Acta neuropathologica**, v. 131, p. 803-820, 2016.

LOUIS, David N. *et al.* Announcing cIMPACT-NOW: the consortium to inform molecular and practical approaches to CNS tumor taxonomy. **Acta neuropathologica**, v. 133, p. 1-3, 2017.

LOUIS, David N. *et al.* cIMPACT-NOW update 6: new entity and diagnostic principle recommendations of the cIMPACT-Utrecht meeting on future CNS tumor classification and grading. 2020.

LOUIS, David N. *et al.* The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: A summary. **Neuro-Oncology**, [s. l.], v. 23, n. 8, p. 1231–1251, 2021.

LUDWIG, Kirsten; KORNBLUM, Harley I. Molecular markers in glioma. **Journal of neuro-oncology**, v. 134, p. 505-512, 2017.

MARTIN, Benoît *et al.* Ki-67 expression and patients survival in lung cancer: systematic review of the literature with meta-analysis. **British journal of cancer**, v. 91, n. 12, p. 2018-2025, 2004.

MOLINARI, Emanuela; CURRAN, Olimpia E.; GRANT, Robin. Clinical importance of molecular markers of adult diffuse glioma. **Practical neurology**, v. 19, n. 5, p. 412-416, 2019.

MONDESIR, Johanna *et al.* IDH1 and IDH2 mutations as novel therapeutic targets: current perspectives. **Journal of blood medicine**, p. 171-180, 2016.

NADLER, Ashlie *et al.* Ki-67 is a reliable pathological grading marker for neuroendocrine tumors. **Virchows archiv**, v. 462, p. 501-505, 2013.

NIELSEN, Ljudmilla AG *et al.* Evaluation of the proliferation marker Ki-67 in gliomas: Interobserver variability and digital quantification. **Diagnostic pathology**, v. 13, n. 1, p. 1-8, 2018.

OSTROM, Quinn T. *et al.* Response to “the epidemiology of glioma in adults: a ‘state of the science’ review”. **Neuro-oncology**, v. 17, n. 4, p. 624-626, 2015.

PERRY, Arie; WESSELING, Pieter. Histologic classification of gliomas. **Handbook of clinical neurology**, v. 134, p. 71-95, 2016.

SAGGIORO, Fabiano P. *et al.* Fas, FasL, and cleaved caspases 8 and 3 in glioblastomas: a tissue microarray-based study. **Pathology-Research and Practice**, v. 210, n. 5, p. 267-273, 2014.

SONODA, Yukihiro. Clinical impact of revisions to the WHO classification of diffuse gliomas and associated future problems. **International Journal of Clinical Oncology**, v. 25, n. 6, p. 1004-1009, 2020.

SCHOUTEN, Jan P. *et al.* Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. **Nucleic acids research**, v. 30, n. 12, p. e57-e57, 2002.

SERAFIM, Rodolfo Bortolozo *et al.* PIMREG expression level predicts glioblastoma patient survival and affects temozolomide resistance and DNA damage response. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, [s. l.], v. 1868, n. 6, 2022.

SORBYE, H. *et al.* Predictive and prognostic factors for treatment and survival in 305 patients with advanced gastrointestinal neuroendocrine carcinoma (WHO G3): the NORDIC NEC study. **Annals of oncology**, v. 24, n. 1, p. 152-160, 2013.

SULLIVAN, Catherine AW; CHUNG, Gina G. Biomarker validation: in situ analysis of protein expression using semiquantitative immunohistochemistry-based techniques. **Clinical Colorectal Cancer**, v. 7, n. 3, p. 172-177, 2008.

SIEGEL, Rebecca L. *et al.* Cancer statistics, 2023. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 73, n. 1, p. 17-48, 2023.

STUPP, Roger *et al.* Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. **The lancet oncology**, v. 10, n. 5, p. 459-466, 2009.

TABATABAI, Ghazaleh *et al.* Clinical implications of molecular neuropathology and biomarkers for malignant glioma. **Current neurology and neuroscience reports**, v. 12, p. 302-307, 2012.

SOLIMAN, Nahed A.; YUSSIF, Shaimaa M. Ki-67 as a prognostic marker according to breast cancer molecular subtype. **Cancer biology & medicine**, v. 13, n. 4, p. 496, 2016.

VERHAAK, Roel GW *et al.* Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. **Cancer cell**, v. 17, n. 1, p. 98-110, 2010.

WANG, Dekang *et al.* Tumor-promoting function of PIMREG in glioma by activating the β -catenin pathway. **3 Biotech**, v. 11, p. 1-11, 2021.

WEI, Wenhao *et al.* Identification of key genes involved in the metastasis of clear cell renal cell carcinoma. **Oncology Letters**, [s. l.], v. 17, n. 5, p. 4321–4328, 2019.

XU, Zhi Sheng *et al.* FAM64A positively regulates STAT3 activity to promote Th17 differentiation and colitis-associated carcinogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 116, n. 21, p. 10447–10452, 2019.

YAMADA, Yasutaka *et al.* Regulation of antitumor miR-144-5p targets oncogenes: Direct regulation of syndecan-3 and its clinical significance. **Cancer Science**, [s. l.], v. 109, n. 9, p. 2919–2936, 2018.

YANG, Keyang *et al.* Glioma targeted therapy: insight into future of molecular approaches. **Molecular Cancer**, v. 21, n. 1, p. 1-32, 2022.

YAO, Zhuocheng *et al.* Knockdown of FAM64A suppresses proliferation and migration of breast cancer cells. **Breast Cancer**, [s. l.], v. 26, n. 6, p. 835–845, 2019.

ZHU, Huixia *et al.* IDH1 R132H mutation enhances cell migration by activating AKT-mTOR signaling pathway, but sensitizes cells to 5-FU treatment as NADPH and GSH are reduced. **PLoS One**, v. 12, n. 1, p. e0169038, 2017.

ZHU, Hua *et al.* Predictive value of PIMREG in the prognosis and response to immune checkpoint blockade of glioma patients. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 2022.

ZHANG, Cheng *et al.* Integrated analysis of expression profiling data identifies three genes in correlation with poor prognosis of triple-negative breast cancer. **International Journal of Oncology**, [s. l.], v. 45, n. 6, p. 2025–2033, 2014.

ZHANG, Jian *et al.* Up-regulation of FAM64A promotes epithelial-to-mesenchymal transition and enhances stemness features in breast cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 513, n. 2, p. 472–478, 2019.

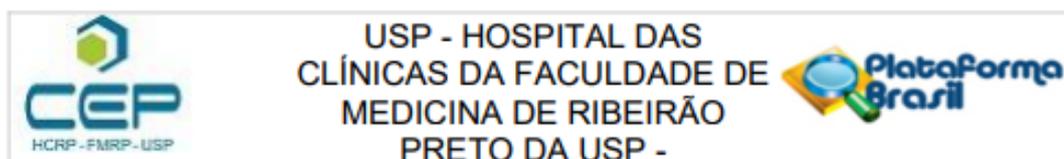
ZHAO, Wei-meng *et al.* **RCS1, a substrate of APC/C, controls the metaphase to anaphase transition.** [S. l.: s. n.], 2008.

ZHOU, Yingchen *et al.* FAM64A is an androgen receptor-regulated feedback tumor promoter in prostate cancer. **Cell Death & Disease**, v. 12, n. 7, p. 668, 2021.

ANEXOS

ANEXOS

Anexo A- Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa – HC-FMRP – Aprovação do projeto original.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização de PIMREG como biomarcador em tumores do sistema nervoso

Pesquisador: ISABELA SPIDO DIAS

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 34208620.5.0000.5440

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE DE SAO PAULO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.137.485

Apresentação do Projeto:

Os tumores do sistema nervoso central (SNC) originam-se a partir da proliferação descontrolada de células da glia, apresentando diferentes perfis patológicos, histológicos e moleculares, os quais determinam as características clínica da doença e a resposta terapêutica. Os gliomas representam cerca de 40% a 60% de todos os tumores primários do (SNC), sendo mais comum em adultos. Baseado na classificação histológica e grau de estadiamento os tumores podem ser classificados em: astrocitoma (grau I-IV), oligodendrogliomas (grau II-III) e oligoastrocitomas (grau II-III).

Glioblastoma (GBM) é o nome dado ao astrocitoma de grau IV. O meduloblastoma (MB) é o tumor cerebral maligno mais comum em crianças correspondendo aproximadamente a 20% de todos os tumores intracranianos pediátricos, sendo altamente agressivo. GBM é uma doença heterogênea e apresenta um tempo médio de sobrevida de 12 a 15 meses após o diagnóstico, mesmo com o tratamento convencional. Porém, a recorrência da doença é bastante comum, e para esse tipo de tumor não existe um tratamento terapêutico alvo. Desta forma, existe uma necessidade inerente de buscar novos marcadores moleculares para definir melhor as categoriais de diagnóstico, prognóstico e prevenção de resposta terapêutica. PIMREG é um marcador de proliferação que desempenha papel no controle do ciclo celular e tumorigênese. Pesquisadores relataram níveis elevados de PIMREG em amostras tumorais em relação ao tecido normal de pacientes com: câncer de mama, células renais, câncer pancreático e osteosarcoma. Dados preliminares do nosso grupo, mostraram que as amostras de pacientes com glioma apresentam níveis elevados de PIMREG e que

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DE RIBEIRÃO
PRETO DA USP -



Continuação do Parecer: 4.137.485

estão relacionados positivamente com o grau de malignidade, sendo que o subtipo GBM, considerado mais agressivo, apresenta maior expressão. Assim, nosso objetivo é investigar se PIMREG é um marcador de progressão tumoral e/ou prognóstico em gliomas e meduloblastoma. Para atingir nosso objetivo pretendemos analisar a expressão de PIMREG em cortes histológicos de tumores de pacientes com diferentes subtipos e graus dessas malignidades; relacionar a expressão de PIMREG com dados clínicos e moleculares e, investigar o impacto da expressão na sobrevida e resposta ao tratamento.

Objetivo da Pesquisa:

Investigar se a proteína PIMREG é um marcador de progressão tumoral e/ou prognóstico em amostras tumorais derivados de pacientes com tumores cerebrais.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: O material utilizado para análises é proveniente de biópsia já realizada nos pacientes, não havendo assim a necessidade do paciente ser submetido a um novo procedimento. Os riscos diante desse estudo poderiam estar relacionados a uma eventual perda de anonimato. Mas, os pesquisadores se comprometem que o máximo de cuidado seja tomado de modo que dados clínicos e epidemiológicos presentes nos prontuários dos pacientes passe por revisão organizada preservando-se o anonimato de cada paciente. Afim de preservar a identidade do paciente as biopsias serão numeradas de forma ordinal, inseridas em uma tabela da amostra mais antiga para a mais recente, de acordo com a categoria de diagnóstico (gliomas, meduloblastomas).

Benefícios: Os benefícios da pesquisa não serão diretos e imediatos para o objeto da pesquisa. No entanto, a pesquisa produzirá conhecimento que contribuirá para o avanço no entendimento da doença e na elucidação de mecanismos moleculares envolvidos. Se a hipótese do trabalho for confirmada, identificaremos um biomarcador com potencial de ser eventualmente utilizado para auxiliar no diagnóstico ou que possa apresentar poder preditivo de prognóstico em câncer do sistema nervoso central.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Corte Histológico -

I- Identificação das amostras de biópsias de gliomas e meduloblastomas oriundas de pacientes operados no HCFMRP-USP entre 1999 a 2019.

II- Revisão histopatológica de cada caso, realizada pelos patologistas.

III- Seleção das lâminas representativas de neoplasia.

IV- O levantamento dos blocos correspondentes às lâminas selecionadas, realizado pelos

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
UF: SP Município: RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DE RIBEIRÃO
PRETO DA USP -



Continuação do Parecer: 4.137.485

patologistas.

V- A escolha dos casos será realizada pelos patologistas seguindo os critérios de inclusão e exclusão.

VI- Para cada bloco selecionado serão realizados os cortes e obtenção de cilindros que serão utilizados nos seguintes ensaios: TMAs, imunohistoquímica e extração de DNA para utilizar na técnica de MLPA.

5.2 Caracterização molecular das amostras - A rotina de diagnóstico do HC é realizada por análises histopatológicas. Adicionalmente, será feito a caracterização das alterações moleculares desejadas nas amostras. Para a triagem molecular será utilizado a técnica Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification – MLPA (Schouten et al., 2002), capaz de detectar deleções e duplicações de diversos genes, além de mutações pontuais reconhecidas através de sondas específicas que hibridizam no DNA. Para cada amostra selecionada serão obtidos até 8 cortes de 10µm, para serem utilizados na extração de DNA, com o kit RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE (ThermoFischer). Em seguida, o kit SALSA MLPA ME012 (MRC – Holland) – MS-MLPA será utilizado para verificar as mutações do gene, IDH1/2 e metilação do gene MGMT. A análise da co-delação 1p19q será feita com o kit SALSA MLPA MIX de Sondas PO88 oligodendrogliomas - MLPA (MRC- Holland). Os ensaios de MLPA e MS-MLPA serão feitos de acordo com o protocolo do fabricante. O software MRC-Coffalyser.Net (MRC-Holland) normaliza os dados através de comparação de cada amostra teste com um conjunto de amostra controle, fornecendo um gráfico das razões das sondas calculadas. 5.3 Confeção de TMAs - Para a construção de blocos de Tissue Microarray (TMA) será realizada uma punção cilíndrica de 1,5 mm de tecido tumoral embebido em parafina da região de representação indicada pelo patologista. Serão coletados 3 pontos independentes de cada amostra. Os cilindros serão colocados de maneira ordenada em base de parafina produzidos em molde de TMA. Os blocos de TMAs reunindo 24 cilindros. Os blocos de TMA serão fatiados em micrótomo (4-6 µm) para confecção das lâminas de TMA, que serão utilizadas nos ensaios de imunohistoquímica. 5.4 Imunohistoquímica - A desparafinização de cortes histológicos e/ou TMAs será feita com xilol e hidratação em série decrescente de álcool e água destilada. A seguir, a recuperação antigênica será realizada no tampão Tris-EDTA pH 9.0 e o bloqueio de epítomos inespecíficos será feita em 3% H₂O₂ em 95% etanol. Após, a imunomarcagem será feita com o anticorpo que reconhece a proteína PIMREG, anti-FAM64A (1:100; HPA049934). Para detecção do anticorpo primário, será utilizado o sistema de detecção HRP/DAB IHC Detection Kit-Micro-polymer. As lâminas imunomarcadas serão digitalizadas utilizando o sistema de escaneamento de lâminas scan scope VS120 e microscópio BX61 (Olympus). Será avaliado a

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRAO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DE RIBEIRÃO
PRETO DA USP -



Continuação do Parecer: 4.137.485

porcentagem de marcação nuclear de PIMREG em relação ao número total de células tumorais, utilizando ferramentas de contagem automática (FJI). Desta forma, será obtido o índice de marcação de PIMREG, que revelará o índice mitótico da amostra. 5.5 Análises Estatística - Correlação entre a expressão de PIMREG e as características dos pacientes, os parâmetros clínicos e moleculares serão avaliados. Para estimar fatores associados, as variáveis categóricas serão comparadas através de teste Qui-quadrado (análise univariada) e regressão de Cox, para análise multivariada. As probabilidades de sobrevivência acumuladas serão calculadas usando o método de Kaplan-Meier. As diferenças entre as taxas de sobrevivência serão testadas usando o teste log-rank. Serão considerados significantes os valores de $p < 0,05$.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentos devidamente apresentados. Solicita a dispensa de aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para a utilização de amostras de tecido tumoral de biópsias de gliomas e meduloblastomas operados no HCFMRP-USP entre 1999 a 2019.

Recomendações:

não se aplica

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012, o projeto de pesquisa, assim como a solicitação de dispensa de aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, podem ser enquadrados na categoria APROVADO.

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1568598.pdf	29/06/2020 10:31:27		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Isabela_final.pdf	29/06/2020 10:08:59	ISABELA SPIDO DIAS	Aceito

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
UF: SP Município: RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DE RIBEIRÃO
PRETO DA USP -



Continuação do Parecer: 4.137.485

Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	29/06/2020 10:08:07	ISABELA SPIDO DIAS	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	25/06/2020 19:04:46	ISABELA SPIDO DIAS	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	24/06/2020 15:07:33	ISABELA SPIDO DIAS	Aceito
Outros	Carta_blocos_parafina.pdf	24/06/2020 15:03:43	ISABELA SPIDO DIAS	Aceito
Outros	Carta_UPC.pdf	24/06/2020 15:02:06	ISABELA SPIDO DIAS	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Dispensa_TCLE.pdf	24/06/2020 14:51:48	ISABELA SPIDO DIAS	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIBEIRAO PRETO, 06 de Julho de 2020

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
(Coordenador(a))

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
UF: SP Município: RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br

Anexo B - Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa – HC-FMRP – Aprovação da emenda do projeto inicial.



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DE RIBEIRÃO
PRETO DA USP -



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Caracterização de PIMREG como biomarcador em tumores do sistema nervoso

Pesquisador: ISABELA SPIDO DIAS

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 34208620.5.0000.5440

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE DE SAO PAULO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.301.366

Apresentação do Projeto:

Os tumores do sistema nervoso central (SNC) originam-se a partir da proliferação descontrolada de células da glia, apresentando diferentes perfis patológicos, histológicos e moleculares, os quais determinam as características clínica da doença e a resposta terapêutica. Os gliomas representam cerca de 40% a 60% de todos os tumores primários do (SNC), sendo mais comum em adultos. Baseado na classificação histológica e grau de estadiamento os tumores podem ser classificados em: astrocitoma (grau I-IV), oligodendrogliomas (grau II-III) e oligoastrocitomas (grau II-III). Glioblastoma (GBM) é o nome dado ao astrocitoma de grau IV. O meduloblastoma (MB) é o tumor cerebral maligno mais comum em crianças correspondendo aproximadamente a 20% de todos os tumores intracranianos pediátricos, sendo altamente agressivo. GBM é uma doença heterogênea e apresenta um tempo médio de sobrevida de 12 a 15 meses após o diagnóstico, mesmo com o tratamento convencional. Porém, a recorrência da doença é bastante comum, e para esse tipo de tumor não existe um tratamento terapêutico alvo. Desta forma, existe uma necessidade inerente de buscar novos marcadores moleculares para definir melhor as categoriais de diagnóstico, prognóstico e prevenção de resposta terapêutica. PIMREG é um marcador de proliferação que desempenha papel no controle do ciclo celular e tumorigênese. Pesquisadores relataram níveis elevados de PIMREG em amostras tumorais em relação ao tecido normal de pacientes com: câncer de mama, células renais, câncer pancreático e osteosarcoma. Dados preliminares do nosso grupo, mostraram que as amostras de pacientes com glioma apresentam níveis elevados de PIMREG e que

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRAO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DE RIBEIRÃO
PRETO DA USP -



Continuação do Parecer: 5.301.366

estão relacionados positivamente com o grau de malignidade, sendo que o subtipo GBM, considerado mais agressivo, apresenta maior expressão. Assim, nosso objetivo é investigar se PIMREG é um marcador de progressão tumoral e/ou prognóstico em gliomas e meduloblastoma. Para atingir nosso objetivo pretendemos analisar a expressão de PIMREG em cortes histológicos de tumores de pacientes com diferentes subtipos e graus dessas malignidades; relacionar a expressão de PIMREG com dados clínicos e moleculares e, investigar o impacto da expressão na sobrevida e resposta ao tratamento.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Investigar se a proteína PIMREG é um marcador de progressão tumoral e/ou prognóstico em amostras tumorais derivados de pacientes com tumores cerebrais.

Objetivo Secundário:

Analisar a expressão de PIMREG, por meio de imunohistoquímica, em cortes histológicos de tumores de pacientes com diferentes subtipos e graus de gliomas e meduloblastoma; Relacionar a expressão de PIMREG com dados clínicos e moleculares e investigar o impacto da expressão de PIMREG na sobrevida e na resposta ao tratamento com temozolomida, (pacientes com GBM).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

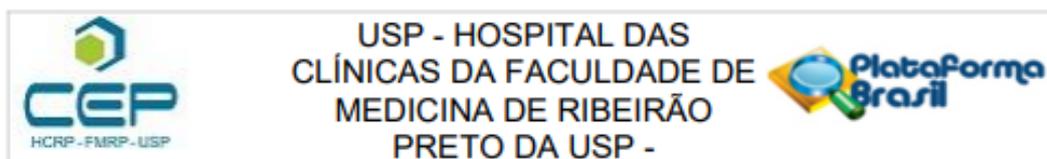
Riscos:

O material utilizado para análises é proveniente de biópsia já realizada nos pacientes, não havendo assim a necessidade do paciente ser submetido a um novo procedimento. Os riscos diante desse estudo poderiam estar relacionados a uma eventual perda de anonimato. Mas, os pesquisadores se comprometem que o máximo de cuidado seja tomado de modo que dados clínicos e epidemiológicos presentes nos prontuários dos pacientes passe por revisão organizada preservando-se o anonimato de cada paciente. Afim de preservar a identidade do paciente as biopsias serão numeradas de forma ordinal, inseridas em uma tabela da amostra mais antiga para a mais recente, de acordo com a categoria de diagnóstico (gliomas, meduloblastomas).

Benefícios:

Os benefícios da pesquisa não serão diretos e imediatos para o objeto da pesquisa. No entanto, a pesquisa produzirá conhecimento que contribuirá para o avanço no entendimento da doença e na elucidação de mecanismos moleculares envolvidos. Se a hipótese do trabalho for confirmada, identificaremos um biomarcador com potencial de ser eventualmente utilizado para auxiliar no

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 5.301.366

diagnostico ou que possa apresentar poder preditivo de prognostico em câncer do sistema nervoso central.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de emenda 1 ao projeto de pesquisa conforme carta datada de 08 de março de 2022.

Justificativa da Emenda:

Venho por meio desta solicitar a inserção das amostras de biópsia de gliomas, embebidas em parafina, dos pacientes arquivadas no laboratório de Neuropatologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da FMRP, do ano de 2020. O projeto de pesquisa intitulado "CARACTERIZAÇÃO DE PIMREG COMO BIOMARCADOR EM TUMORES DO SISTEMA NERVOSO", foi aprovado em 2020 pelo Comitê de Ética sob o número de parecer: 4.137.485. No projeto vamos trabalhar com as amostras de biópsias dos anos 2005-2019. Porém, alguns pacientes apresentaram recidiva da doença e tiveram novas biópsias no ano de 2020. Assim, gostaríamos de solicitar esse adendo para incluirmos esses casos de recidiva do ano de 2020, e os demais pacientes que tiveram suas biópsias nesse respectivo ano, pois será de extrema relevância para o desfecho do projeto. Serão utilizados os dados clínicos e epidemiológicos que constam nos prontuários destes pacientes, através de revisão organizada dos mesmos, com anuência dos docentes da patologia. Os pesquisadores se comprometem a seguir as normas de Boas Práticas em Pesquisa Clínica, a Resolução do CNS 466/12 e manter o sigilo e a confidencialidade dos dados. Reitero que os dados coletados serão utilizados para fins de pesquisa e geração de conhecimento. Somente serão utilizadas as amostras de tecido tumoral de pacientes que se encontram vivos, cujos blocos fixados em formalina e embocado em parafina (TFEP) contenham material suficiente de acordo com a avaliação dos patologistas, para a realização de cortes adicionais, sem que se desbaste o bloco a tal ponto que inviabilize a eventual realização de cortes para exames ancilares e seguiremos os critérios de inclusão e exclusão já apresentados neste projeto.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos da emenda 1 foram devidamente apresentados ao CEP, são eles:

- Projeto1sa_ versao2_2022.pdf;
- CRONOGRAMA2022.pdf;
- Relatorio_2022.pdf;
- Justificativa_2022_LFA.pdf.

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
 Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
 UF: SP Município: RIBEIRAO PRETO
 Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br



**USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DE RIBEIRÃO
PRETO DA USP -**



Continuação do Parecer: 5.301.366

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012, a emenda 1, assim como o projeto de pesquisa Versão 2 – 11/03/2022, deve ser enquadrado na categoria APROVADO. O CEP tomou ciência do relatório parcial de 08/03/2022.

Considerações Finais a critério do CEP:

Emenda ao Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1896888_E1.pdf	11/03/2022 08:15:39		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoIsa_versao2_2022.pdf	11/03/2022 08:15:11	ISABELA SPIDO DIAS	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA2022.pdf	08/03/2022 12:43:36	ISABELA SPIDO DIAS	Aceito
Outros	Relatorio_2022.pdf	08/03/2022 12:40:47	ISABELA SPIDO DIAS	Aceito
Outros	Justificativa_2022_LFA.pdf	08/03/2022 12:38:08	ISABELA SPIDO DIAS	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	25/06/2020 19:04:46	ISABELA SPIDO DIAS	Aceito
Outros	Carta_blocos_parafina.pdf	24/06/2020 15:03:43	ISABELA SPIDO DIAS	Aceito
Outros	Carta_UPC.pdf	24/06/2020 15:02:06	ISABELA SPIDO DIAS	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Dispensa_TCLE.pdf	24/06/2020 14:51:48	ISABELA SPIDO DIAS	Aceito

Situação do Parecer:

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
 Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
 UF: SP Município: RIBEIRAO PRETO
 Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3833-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DE RIBEIRÃO
PRETO DA USP -



Continuação do Parecer: 5.301.366

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIBEIRAO PRETO, 21 de Março de 2022

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
(Coordenador(a))

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
UF: SP Município: RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br

• APÊNDICE

APÊNDICE

APÊNDICE A- Valores das médias de cada paciente após quantificações das imunomarcações de PIMREG e Ki-67 utilizado nas análises.

N ° Caso	PIMREG	Ki-67	PIMREG (log10)	Ki-67 (log10)
1	6,32	3,93	0,80	0,59
2	3,62	6,97	0,56	0,84
3	9,64	4,85	0,98	0,69
4	9,07	0,35	0,96	-0,46
5	4,07	3,39	0,61	0,53
6	0,54	1,84	-0,27	0,26
7	5,81	3,74	0,76	0,57
8	1,13	1,71	0,05	0,23
9	3,82	7,46	0,58	0,87
10	9,00	10,72	0,95	1,03
11	24,62	7,32	1,39	0,86
12	6,39	0,28	0,81	-0,55
13	0,62	0,71	-0,21	-0,15
14	3,13	0,82	0,50	-0,09
15	0,93	0,69	-0,03	-0,16
16	0,53	0,51	-0,28	-0,29
16	2,66	2,17	0,42	0,34
17	11,92	28,40	1,08	1,45
18	4,90	3,29	0,69	0,52
19	1,75	2,47	0,24	0,39
20	1,06	0,63	0,03	-0,20
21	0,83	1,00	-0,08	0,00
22	2,36	3,17	0,37	0,50
23	3,92	4,44	0,59	0,65
24	4,54	16,67	0,66	1,22
25	1,82	1,30	0,26	0,11
26	2,12	7,39	0,33	0,87
27	0,69	2,43	-0,16	0,39
28	0,98	0,04	-0,01	-1,40
29	0,98	0,13	-0,01	-0,89
30	1,32	4,62	0,12	0,66
31	0,53	1,19	-0,28	0,08
32	0,24	0,11	-0,62	-0,96
33	0,65	0,32	-0,19	-0,49
34	8,11	12,02	0,91	1,08
35	2,47	5,46	0,39	0,74
36	4,05	4,41	0,61	0,64
37	0,84	4,49	-0,08	0,65
38	5,35	6,06	0,73	0,78
39	2,59	3,76	0,41	0,58
40	2,52	2,89	0,40	0,46
41	5,78	9,89	0,76	1,00
42	1,17	2,81	0,07	0,45
43	12,32	3,65	1,09	0,56
44	0,59	0,50	-0,23	-0,30

45	5,54	2,78	0,74	0,44
46	1,96	0,75	0,29	-0,12
47	1,00	1,00	0,00	0,00
48	1,65	2,71	0,22	0,43
49	9,37	18,77	0,97	1,27
50	0,91	1,90	-0,04	0,28
51	3,48	5,79	0,54	0,76
52	0,97	1,52	-0,01	0,18
53	1,84	2,62	0,26	0,42
54	6,53	42,03	0,81	1,62
55	1,28	3,49	0,11	0,54
56	4,37	18,90	0,64	1,28
57	1,33	3,07	0,12	0,49
58	2,85	1,90	0,45	0,28
59	7,08	5,18	0,85	0,71
60	0,44	0,42	-0,36	-0,38
60	1,15	3,06	0,06	0,49
61	1,78	15,80	0,25	1,20
62	7,04	2,30	0,85	0,36
63	2,62	5,93	0,42	0,77
64	3,64	3,38	0,56	0,53
65	4,94	0,85	0,69	-0,07
66	1,22	3,33	0,09	0,52
67	5,40	13,57	0,73	1,13
68	1,65	9,99	0,22	1,00
69	4,85	11,12	0,69	1,05
69	7,23	4,10	0,86	0,61
70	3,85	13,88	0,59	1,14
71	0,47	0,74	-0,33	-0,13
71	0,51	1,28	-0,29	0,11
72	1,03	8,81	0,01	0,94
73	7,27	5,00	0,86	0,70
74	1,35	8,34	0,13	0,92
74	1,57	0,27	0,20	-0,57
75	7,75	15,60	0,89	1,19
76	12,51	11,11	1,10	1,05
77	10,04	18,88	1,00	1,28
78	3,63	13,49	0,56	1,13
79	1,94	3,25	0,29	0,51
80	11,19	2,16	1,05	0,33
81	2,51	3,87	0,40	0,59
82	7,34	1,17	0,87	0,07
83	0,14	0,41	-0,85	-0,39
84	1,28	1,77	0,11	0,25
85	4,22	3,92	0,63	0,59
86	0,33	0,26	-0,48	-0,59
87	4,84	0,65	0,68	-0,19

Casos organizados de forma crescente (do mais antigo para o mais recente)