

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

“Perfil de expressão dos microRNAs: miR-21, miR-221 e miR-222 e sua correlação com os mecanismos de angiogênese e apoptose em glioblastomas e oligodendrogliomas”

LUDMILLA COSTA VELOSO DE AGUIAR

Ribeirão Preto

2011

LUDMILLA COSTA VELOSO DE AGUIAR

“Perfil de expressão dos microRNAs: miR-21, miR-221 e miR-222 e sua correlação com os mecanismos de angiogênese e apoptose em glioblastomas e oligodendrogliomas”

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, área de concentração Clínica Cirúrgica - opção: Morfologia e Medicina Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Gilberto Carlotti Jr.

RIBEIRÃO PRETO

2011

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ludmilla Costa Veloso de Aguiar

Perfil de expressão dos microRNAs: miR-21, miR-221 e miR-222 e sua correlação com os mecanismos de angiogênese e apoptose em glioblastomas e oligodendrogliomas.

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

Área de concentração: Clínica Cirúrgica – opção: Morfologia e Medicina Experimental.

Aprovado em :

Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico,

Aos meus pais,

Nelson Veloso de Aguiar e Denize Costa da Silva Aguiar,

Por terem me gerado, me criado com muito amor e carinho,
muita dedicação, empenho, e muita confiança.

Sem o apoio e o amor incondicional de vocês nada disso teria
acontecido e, certamente eu não teria chegado até aqui.

Vocês são meu espelho, minha vida!

Dedico,

Ao meu irmão,

Nelder Costa Veloso de Aguiar,

Por me amar e me apoiar sempre que preciso de um jeito
muito divertido e único.

Meu confidente, meu amigão, meu irmãozão!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof.Dr. Carlos Gilberto Carlotti Junior,
Pela confiança e disponibilidade em me receber em seu laboratório.
Pelas suas valiosas orientações.

À Prof^ª.Dr^ª Daniela Pretti da Cunha Tirapelli,
Pela oportunidade, confiança, dedicação e carinho.
Por ter estado sempre comigo quando eu mais precisei, me ensinando, me ajudando
sempre a escolher o melhor caminho a seguir.
Meus sinceros e verdadeiros agradecimentos.

Ao Prof.Dr. Luis Fernando Tirapelli,
Por toda a disponibilidade e dedicação em passar seus conhecimentos.

Aos meus pais,
Por terem me dado a vida e por me preparar tão bem para ela.
Pelo amor incondicional.
Por terem me proporcionado a conquista de mais um sonho.
Minha gratidão sempre será eterna a vocês.

Ao meu único e mais amado irmão,
Por ser essa pessoa maravilhosa e que me deu muita força em todo esse trajeto
somente com sua alegria e vontade de viver.

Às minhas avós,
Reny Costa da Silva e Ruth Sbragia Veloso de Aguiar,
Por sempre e em qualquer situação, se desdobrarem para me ajudar.
Por sempre me colocar em suas orações, emitindo muitas energias positivas,
mesmo as duas estando distante de mim.

À minha tia Sandra,
Por ter me ajudado incondicionalmente durante todo esse tempo.
Por sempre ter mostrado a todos o orgulho que sente em me ter como sobrinha,
sempre me hospedando com muito amor e carinho em sua casa.

Aos meus tios,
Dayse Mara Costa da Silva, Danilo Costa da Silva, Cláudio Costa da Silva, Roberto
Costa da Silva (*in memoriam*), Nilton Veloso de Aguiar (*in memoriam*), por cada um,
com um jeito mais irreverente que o outro, sempre terem cuidado de mim, torcido por
mim.

Aos meus primos,
Pela infância inesquecível que me proporcionaram.

À minha amiga irmã.

Cristiane Iozzi,

Por ter me indicado para que eu pudesse realizar mais um sonho da minha vida. Um sonho que para mim era impossível, mas ela, depois de Deus, permitiu que se realizasse da maneira mais simples possível.

Por ter aberto a porta da sua vida sem medo, sem cautela.

Por ter me colocado em sua casa, perante sua própria família, me aconchegando e fazendo com que eu conseguisse superar toda a saudade dos meus.

Pela verdadeira Amizade, dedicação, companheirismo, parceria.

Você, certamente, é para Sempre.

Em especial à Tia Hilda, Tio Jorge, Viviane,

Por terem me ajudado como se eu fosse uma filha/irmã de sangue.

Por me mostrar que, mesmo com esse mundo louco, ainda se pode ter uma família unida.

Por todos os conselhos e ensinamentos.

Por me adotar como mais uma integrante da família.

Pessoas iluminadas para as quais minhas palavras de afeto não se comparam às suas ações de amor, amizade e dedicação.

Minha eterna gratidão.

À toda Família Iozzi,

Tia Silvia, Tio Cascão, Pozão, Pozinho, Vó Neide, Vô Zoroastro (*in memoriam*) Tio Jú, Regiane,

Por terem sido minha família durante todo esse tempo que fiquei longe dos meus.

Por terem me amado e me aceitado como um parente de verdade, me incluindo entre eles de uma forma inexplicável.

Às minhas verdadeiras amigas,

Ana Patrícia, Janine, Lívia Stipp, Luana, Lud Branco, Manu, Maíta, Mirela Nathália Zanelato,

Por terem me ensinado o que é a Amizade de verdade.

Por terem cuidado de mim, me dando amor, apoio, palavras de esperança nos momentos em que eu quis desistir.

Vocês são pra sempre em minha vida e esse Sempre NUNCA acaba.

Ao Paulinho e ao Neto,

Por sempre estarem disponíveis e terem sido muito prestativos em me ajudar, principalmente nos meus momentos de desespero, que não foram poucos.

Por sempre terem falado palavras de incentivo, todas as vezes que eu achei que alguma coisa iria dar errado.

À todos que passaram pelo laboratório e aos que hoje lá estão,

Por terem compartilhado de suas histórias, experiências e experimentos, por de um jeito ou de outro, fazerem também parte desta minha experiência de vida.

À todos os funcionários do Centro Cirúrgico, em especial ao João da neurocirurgia,

Por terem colaborado na realização deste trabalho.

Por sempre terem sido prestativos.

Aos funcionários do Departamento, em especial a Elis e a Juliana,
Por sempre estarem disponíveis em tirar minhas dúvidas.
Por serem sempre muito prestativas e irem atrás das mais importantes assinaturas.

À todos que direta ou indiretamente, fizeram parte dessa história,
Vocês foram personagens muito importantes dessa minha experiência inesquecível.

Meu muito obrigada!

“E você aprende que realmente pode suportar...
que realmente é forte, e que pode ir muito mais
longe depois de pensar que não se pode mais”.

Sheakespeare

RESUMO

Aguiar, L.C.V. **Perfil de expressão dos microRNAs: miR-21, miR-221 e miR-222 e a sua correlação com os mecanismos de angiogênese e apoptose em glioblastomas e oligodendrogliomas.** 2011. 81f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

O Glioblastoma multiforme (GBM) é o mais comum dos tumores cerebrais primários, acometendo cerca de 50-55% dos gliomas em adultos, e seu pico de incidência é de aproximadamente 65 anos de idade. Apesar de cirurgia, quimioterapia e radioterapia, os GBMs são sempre fatais, com uma média de sobrevida menor que um ano e podendo chegar a 5 anos em 10% dos casos. O processo da angiogênese é a maior característica das células cancerosas, sendo os glioblastomas os maiores tumores angiogênicos. A cascata de angiogêneses ocorre provavelmente em resposta a hipóxia, iniciando a produção do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e de outros fatores pró-angiogênicos. O processo de apoptose também é grande importância nos tumores cerebrais, visto que sua ausência favorece a progressão e o crescimento tumoral. Os MicroRNAs (miRNA) são pequenos RNAs não codificadores de proteína, contendo aproximadamente de 18 a 24 nucleotídeos que regulam a expressão gênica em nível pós-transcricional, por degradação de RNA mensageiro (RNAm). Mais de 400 miRNAs foram identificados no genoma humano, mas a relevância da maior parte deles a processos fisiológicos e patológicos permanece incerta. A superexpressão de miRNA pode levar a uma regulação inibitória da função de genes supressores de tumor, bem como a diminuição da expressão de miRNA pode estimular a atividade da oncogênese. O objetivo deste estudo foi quantificar a expressão dos microRNAs MiR-221, miR-222, e miR-21 em glioblastomas e correlacionar a expressão desses microRNAs com o mecanismo de angiogênese através da expressão do VEGF-A e mecanismo de apoptose através da expressão da SURVIVIN. Os pacientes com diagnóstico de glioblastoma apresentam maior expressão do microRNA-21 e microRNA-222 quando comparado com o grupo controle. A expressão do microRNA-221 não foi diferente entre os grupos estudados. Os pacientes com diagnóstico de glioblastoma e oligodendroglioma apresentaram maior expressão do gene *VEGF-A* em relação ao grupo controle. O gene *SURVIVIN* apresentou menor expressão no grupo controle do que nos pacientes com diagnóstico glioblastoma. Estes resultados sugerem o envolvimento do mecanismo de angiogênese pelo gene *VEGF-A* em glioblastomas e oligodendrogliomas, e com o mecanismo de apoptose pelo gene *SURVIVIN* em glioblastomas. A possível relação com o mecanismo de angiogênese também pode ser constatada pelo aumento da expressão do miR-222 em glioblastomas. Assim como a hiperexpressão dos miR-21 e miR-222 reforçam a possível ligação do mecanismo de apoptose na formação dos glioblastomas. Não houve correlação entre a expressão dos microRNAs miR-21, miR-221 e miR-222 e os genes *VEGF-A* e *SURVIVIN* com os parâmetros clínicos gênero e raça.

Palavras-chave: glioblastoma, oligodendroglioma, microRNA, angiogênese, apoptose.

ABSTRACT

AGUIAR, L.V. **Expression profile of microRNAs: miR-21, miR-221 and miR-222 in glioblastomas and oligodendrogliomas and its correlation with the mechanisms of angiogenesis and apoptosis.** 81f. - Faculty of Medicine, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, 2011.

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common primary brain tumors, affecting approximately 50-55% of gliomas in adults, and their peak incidence is approximately 65 years old. Despite surgery, chemotherapy and radiotherapy, GBMs are always fatal, with a median survival of less than one year and may reach 5 years in 10% of cases. The process of angiogenesis is the major characteristic of cancer cells, glioblastoma being among the major angiogenic tumors. The cascade of angiogenesis is probably in response to hypoxia, initiating the production of vascular endothelial growth factor (VEGF) and other pro-angiogenic factors. The process of apoptosis is also important in brain tumors, whereas its absence favors the progression and tumor growth. The MicroRNAs (miRNA) are small noncoding RNAs of protein, containing 18 to 24 nucleotides that regulate gene expression in post-transcriptional level by degradation of a messenger RNA (mRNA). More than 400 miRNAs have been identified in the human genome, but the relevance of most of them the physiological and pathological processes remains unclear. Overexpression of miRNA regulation may lead to an inhibitory function of tumor suppressor genes, as well as decreased expression of miRNA may stimulate the activity of oncogenesis. The aim of this study was to quantify the expression of microRNA miR-221, miR-222 and miR-21 in glioblastomas and correlate expression of these microRNAs to the mechanism of angiogenesis by VEGF-A gene expression and apoptosis through the expression of SURVIVIN gene. Patients diagnosed with glioblastoma have a higher expression of microRNA-21 and miRNA-222 as compared with the control group. The expression of microRNA-221 was not different between groups. Patients diagnosed with glioblastoma and oligodendroglioma showed higher expression of VEGF-A gene in the control group. The SURVIVIN gene expression was less in the control group than in patients with glioblastoma. These results suggest the involvement of the mechanism of angiogenesis by VEGF-A gene in glioblastomas and oligodendrogliomas and the mechanism of apoptosis by SURVIVIN gene in glioblastomas. There was no correlation between the expression of miR-21 microRNAs, miR-221 and miR-222 and VEGF-A gene and SURVIVIN with the parameter settings and clinical gender and race.

Keywords: glioblastoma, microRNAs, angiogenesis, apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema do processo da angiogênese	26
Figura 2	Esquema da Biogênese do microRNA.....	32
Figura 3	Figura da representação da média dos valores (\pm desvio padrão) da expressão do gene VEGF-A correlacionada aos parâmetros clínicos dos pacientes	55
Figura 4	Figura da representação da média dos valores (\pm desvio padrão) da expressão dos microRNAs: miR-21, miR-221 e miR correlacionada ao parâmetro clínico dos pacientes.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Dados Clínicos dos pacientes com glioblastoma	39
Tabela 2	Dados Clínicos dos pacientes com Oligodendroglioma Anaplásico.....	40
Tabela 3	Seqüência dos primers utilizados.....	46

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Perfil de expressão do gene <i>VEGF</i> nos tumores cerebrais e tecido controle	50
Gráfico 2	Perfil de expressão do gene <i>SURVIVIN</i> nos tumores cerebrais e tecido controle	51
Gráfico 3	Perfil de expressão do micorRNA-21 nos tumores cerebrais e tecido controle	52
Gráfico 4	Perfil de expressão do microRNA-221 nos tumores cerebrais e tecido controle	53
Gráfico 5	Perfil de expressão do microRNA-222 nos tumores cerebrais e tecido controle	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SNC	Sistema Nervoso Central
OMS	Organização Mundial de Saúde
GBM	Glioblastoma Multiforme
INCA	Instituto Nacional do Câncer
EGFR	Receptor do Fator de Crescimento
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaqueta
PDGRF	Receptor do Fator de Crescimento Derivado de Plaqueta
VEGF	Fator de Crescimento Vascular Endotelial
BFGF	Fator de Crescimento Fibroblástico
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TNFA	Fator de Necrose Tumoral alfa
TNFB	Fator de Necrose Tumoral beta
TGFA	Fator de Transformação de Crescimento alfa
IAP	Proteína Inibidora de Apoptose
miR	MicroRNA
DNA	Ácido desoxiribonucléico
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
cDNA	DNA complementar
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RQ-PCR	Transcrição reversa quantitativa da PCR
CT	Ciclo Treshold
PBS	Bufer salina fosfatada

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	20
2.1. Tumores Astrocíticos.....	20
2.1.1. Astrocitomas Pilocíticos (Grau I).....	20
2.1.2. Astrocitomas de baixo grau (Grau II).....	21
2.1.3. Astrocitomas Anaplásicos (Grau III).....	21
2.1.4. Glioblastomas (Grau IV).....	22
2.1.5 Oligodendrogliomas.....	24
2.2. Expressão gênica nos astrocitomas e o mecanismo de Angiogênese.....	25
2.2.1. VEGF.....	27
2.3. Expressão gênica nos astrocitomas e o mecanismo de apoptose.....	28
2.3.1. <i>SURVIVIN</i>	30
2.4. microRNAs.....	30
2.5. microRNA e angiogênese.....	33
2.6. microRNAs e apoptose.....	34
3. OBJETIVOS.....	36
4. PACIENTES E MÉTODOS.....	38
4.1. Pacientes.....	38
4.2. Métodos.....	41
4.3. Análise Estatística.....	48
5. RESULTADOS.....	50
6. DISCUSSÃO.....	58
7. CONCLUSÕES.....	65
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
ANEXOS.....	76
Anexo A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	76
Anexo B – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	81

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Os tumores do Sistema Nervoso Central (SNC) correspondem cerca de 2% dos tumores malignos, sendo os mais comuns os gliomas. Estes podem variar em malignidade e, até mesmo os chamados benignos são comumente letais pela tendência a transformação maligna com o tempo e pelas suas propriedades infiltrativas (BEHIN et al., 2003).

Quatro graus de malignidade dos tumores cerebrais primários são reconhecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS), sendo os graus I e II tumores biologicamente menos agressivos e os graus III e IV considerados os mais agressivos. Segundo a OMS em 2007, os gliomas malignos em adultos são classificados em vários tipos histológicos, sendo os mais freqüentes os Astrocitomas, os Oligodendrogliomas e os Oligoastrocitomas (COLLINS, 2002, ICHIMURA et al., 2004, JANSEN et al., 2010).

Em 2005, de um total de 58 milhões de mortes ocorridas no mundo, o câncer foi responsável por 7,6 milhões, o que representou 13 % de todas as mortes. Estima-se que em 2020 o número de casos novos anuais seja da ordem de 15 milhões. Cerca de 60 % destes novos casos ocorrerão em países em desenvolvimento. No Brasil, as estimativas para o ano de 2010 e válidas também para o ano de 2011, apontam a ocorrência de 489.270 casos novos de câncer (INCA, 2010).

A elucidação dos fatores relacionados com esse crescimento permite a elaboração de práticas preventivas com vistas à redução desses tumores devido à sua alta letalidade (MONTEIRO e KOIFMAN, 2003).

Vários estudos visando esclarecer as vias moleculares envolvidas no desenvolvimento dos tumores cerebrais tem se destacado na literatura, dentre eles a análise da expressão dos microRNAs. Os glioblastomas e os oligodendrogliomas apresentam um comportamento extremamente agressivo e, apesar dos avanços que ocorreram na cirurgia, quimioterapia e radioterapia, as taxas de sobrevida destes pacientes são muito baixas. Visto que os microRNAs tem demonstrado um papel na regulação do desenvolvimento tumoral, a elucidação do seu envolvimento com o mecanismo de angiogênese em glioblastomas e oligodendrogliomas, pode trazer melhores subsídios para elucidação das diversas alterações moleculares envolvidas nestes tipos de tumores. Assim como, admite-se que o estudo dos reguladores da apoptose possa desvendar alguns aspectos ainda pouco esclarecidos acerca do processo de tumorigênese e da progressão destes tumores, revelando ainda novas possibilidades terapêuticas.

REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

Os gliomas são tumores intracraniais originados das células da glia que possuem capacidade de invadir regiões adjacentes do tecido normal, sendo altamente infiltrativos, de difícil de controle e praticamente impossível de removê-los totalmente em uma cirurgia, contribuindo assim para freqüentes recidivas e conseqüentemente um aumento nos índices de mortalidade e morbidez dessa doença. Estes são classificados em astrocitomas, oligodendrogliomas e oligoastrocitomas, e são histologicamente relacionados em grau I, II, III, IV, segundo a OMS (NUTT et al., 2001).

2.1. Tumores Astrocíticos

Os tumores astrocíticos compreendem uma ampla variedade de neoplasias com características clínicas, histopatológicas e genéticas distintas. Constituem o principal tipo histológico entre os tumores primários do SNC. Na classificação histopatológica da OMS para tumores próprios do SNC, admite-se que as diversas apresentações histológicas dos astrocitomas possam ser divididas em diferentes graus de malignidade, variando de I a IV (KLEIHUES et al., 2002).

2.1.1. Astrocitomas Pilocíticos (Grau I)

Os astrocitomas grau I exibem irregularidades genéticas distintas dos demais graus, o que reforça a teoria de rara progressão para fenótipos mais malignos, estando mais presente em crianças (FARIA et al., 2006).

São tumores considerados de bom prognóstico. Quando se localizam em regiões onde é possível sua ressecção completa, geralmente são curáveis. Podem

ocorrer tanto no encéfalo quanto na medula, sendo raros na última (ALMEIDA e CLARA, 2005).

2.1.2. Astrocitomas de baixo grau (Grau II)

Os astrocitomas difusos de baixo grau de malignidade possuem um crescimento lento com alto grau de diferenciação molecular que infiltra difusamente o tecido cerebral adjacente (BEHIN et al., 2003; KAYE e WALKER, 2000). O pico de incidência ocorre entre 25 e 40 anos com predominância no sexo masculino e a média de sobrevida é de 7 anos (COLLINS, 2002).

A formação do astrocitoma grau II é associada a, pelo menos, três alterações genéticas e moleculares: inativação do gene supressor tumoral P53 (cromossomo 17p), perda do cromossomo 22q (detectada em 20% a 30% dos astrocitomas) e ativação do fator de crescimento derivado de plaqueta (*FGDP*), (Platelet-Derived Growth Factor) e/ou do seu receptor, que por sua vez está correlacionado com a inativação P53 (TORSTEN e WIESTLER, 1997). Geralmente esse tipo de tumor tem tendência a progredir para astrocitomas de maior alto grau.

2.1.3. Astrocitomas Anaplásicos (Grau III)

Astrocitoma anaplásico é um tumor infiltrativo que possui um grande potencial proliferativo com anaplasia focal ou dispersa. Possui localização similar a dos astrocitomas de baixo grau, sendo encontrados preferencialmente nos hemisférios cerebrais. A média de incidência deste tumor é de 40 anos e geralmente atingem homens adultos e tendem a progredir para glioblastomas (UNO, 2006).

A perda do cromossomo 19q parece ocorrer exclusivamente em tumores gliais, sendo detectado em todos os graus dos astrocitomas, especialmente no

astrocitoma grau III (44%) (CHOSDOL et al., 2002). As mutações no gene TP53 são observadas na mesma frequência dos astrocitomas de grau II e essas mutações acontecem devido a uma falha na via desse gene, que no caso dos astrocitomas de grau III, aparecem não-funcional em aproximadamente 60% dos casos (COLLINS, 2002).

2.1.4. Glioblastomas (Grau IV)

O Glioblastoma Multiforme (GBM) é o mais comum dos tumores cerebrais primários, e correspondem a cerca de 50-55% dos gliomas em adultos, e seu pico de incidência é de aproximadamente 65 anos de idade, acometendo mais homens que mulheres em uma relação de 3:2. Representam 29% de todos os tumores cerebrais e 69% de todos os casos de tumores astrocíticos e oligodendrogliais. Apesar de cirurgia, quimioterapia e radioterapia, os GBMs são sempre fatais, com uma média de sobrevida menor que um ano, podendo chegar a 5 anos em 10% dos casos. (FREI et al., 1998; OHGAKI e KLEIHUES, 2007). Estão localizados mais comumente nos lobos frontal e temporal, podendo acometer mais de um lobo (FERREIRA et al., 2004).

Vias moleculares distintas podem caracterizar a progressão para o glioblastoma: uma podendo ser desenvolvida como resultado da progressão a partir de um astrocitoma anaplásico (baixo grau), ou diretamente se apresentando como um glioblastoma primário "de novo" sem evidência de lesão precursora de menor malignidade. (FRANCO-HERNÁNDEZ et al., 2007).

Na gênese dos glioblastomas existem alterações moleculares em nível de genes supressor tumoral, oncogêneses e genes reparadores de DNA, sendo as mais comuns, mutações no gene P53, amplificação/rearranjo do receptor do fator de

crescimento epidermal (*EGFR*), e amplificação/superexpressão de *MDM2* (BURTON et al., 2002; FRANCO-HERNÁNDEZ et al., 2007).

O glioblastoma primário, em sua maioria (>90% dos GBMs), desenvolve-se em pacientes mais velhos, surge sem uma lesão precursora menos maligna identificável e rapidamente após uma história clínica curta. Frequentemente, contém mutação no *PTEN* (25%), deleção no P16 (31%), *EGFR* amplificado ou superexpresso (36%), perda de heterozigosidade (LOH) do cromossomo 10q (70%) e, menos frequentemente, amplificação no *MDM2* (OHGAKI e KLEIHUES, 2007).

O glioblastoma secundário predomina em pacientes mais jovens e se desenvolvem mais lentamente de um astrocitoma de baixo grau ou o anaplásico. O diagnóstico deste requer evidências clínicas (neuroimagem) ou histológicas de evolução de um astrocitoma menos maligno. Mutações no TP53 são as mais frequentes e as primeiras alterações genéticas detectáveis, já presentes em 60% dos astrocitomas de baixo grau; enquanto a amplificação e superexpressão do *EGFR* são menos frequentes (OHGAKI e KLEIHUES, 2007; XIE et al., 2006).

Estudos relatam que a média de sobrevida dos pacientes com glioblastoma secundário é significativamente mais longa que a do glioblastoma primário. Entretanto, esta diferença é considerada em grande parte, porque a idade mais jovem é um fator consistente e que pode prever a sobrevida nos pacientes com glioblastoma. Um estudo dos efeitos prognósticos dependentes da idade revelou que pacientes mais velhos estão associados com significativo aumento do risco de morte. A cada dez anos incrementados, a idade de diagnóstico sofre um aumento de 37% no risco de morrer. (BATCHELOR et al., 2004).

2.1.5 Oligodendrogliomas

O oligodendroglioma é o terceiro tipo de tumor mais comum entre os gliomas. Fazem parte de 2-5% dos tumores cerebrais primários e de 4-15% dos gliomas (ENGELHARD et al.,2003).

Estudos clínicos realizados por Van den Bent (2000), confirmaram que as perdas dos alelos do braço curto do cromossomo 1 (del 1p) e braço longo do cromossomo 19 (del 19q) são associadas com o fenótipo oligodendroglial. Acredita-se que estas regiões do cromossomo contêm genes supressores de tumor, que quando perdidos leva ao desenvolvimento e/ou progressão do tumor.

Trata-se de um tumor de baixo grau ou bem diferenciado, considerado pela Organização Mundial de Saúde como um glioma grau II. O termo Oligodendroglioma Anaplásico é usado para o fenótipo mais maligno, que é o glioma grau III. No oligodendroglioma grau II, pode ser vistas atipias nucleares e mitoses ocasionais, já nos oligodendrogliomas anaplásicos, observa-se atividade mitótica, proliferação microvascular perceptível, e/ou necrose visível (ENGELHARD, 2002).

Acredita-se que resultam de uma transformação neoplásica de oligodendrócitos e, conseqüentemente, elas se desenvolvem em qualquer local, em proporção relativa ao volume da substância branca. Mais de 90% surgem na substância branca supratentorial, mais comumente nos lobos frontal e temporal. Menos de 10% ocorre na fossa posterior e medula espinhal (ENGELHARD, 2003).

Oligodendrogliomas evoluem de modo tipicamente lento, com crescimento infiltrativo e têm uma tendência para invadir as leptomeninges (REIFENBERGER et al., 2000).

O exame histológico mostra celularidade moderada, com células tumorais uniformemente arredondada, núcleos homogêneos e o citoplasma com inchaço evidente, apresentando aspecto de “ovo frito” (ENGELHARD, 2003).

2.2. Expressão gênica nos astrocitomas e o mecanismo de Angiogênese.

Embora a etiologia dos tumores cerebrais permaneça desconhecida, existem evidências que a geração de radicais livres por fatores intrínsecos e/ou extrínsecos pode ter um papel crucial nos eventos iniciais da tumorigênese. Os radicais livres podem induzir modificações químicas das bases de DNA, levando à mutações espontâneas de genes supressores tumorais e/ou oncogenes. Estes eventos iniciais podem induzir eventos genéticos mais tardiamente e, por fim, neoplasia cerebral (PREUSSER et al., 2006).

Dentre as alterações genéticas e moleculares geradas na formação do tumor cerebral destacam-se a amplificação do receptor do fator de crescimento epidérmico (*EGFR*), a superexpressão do fator de crescimento derivado de plaqueta (*PDGF*) e seu receptor (*PDGFR*), da perda do gene supressor de tumor TP53 e do fator de crescimento vascular endotelial (*VEGF*) (KLEIHUES e CAVENNE, 2000).

O corpo humano como um todo necessita de oxigênio e nutrientes, que são transportados através do sistema de vasos sanguíneos. Para que este transporte seja adequado é necessário um sistema altamente desenvolvido. Esta eficiência é mantida por meio da angiogênese. O mecanismo da angiogênese consiste na formação de novos vasos a partir dos vasos pré-existentes envolvendo processos de divisão celular, degradação seletiva da membrana basal e do ambiente da matriz extracelular, ativando a proliferação da célula endotelial e sua migração (Figura 1). Além disso, sua regulação é dependente de indutores e inibidores liberados por

ambas as células tumorais e endoteliais (CHAN et al., 1998; FERRARA, 2004; KARAMYSHEVA, 2008). Em adultos ela é rigorosamente controlada por um processo fisiológico denominado “balanço angiogênico” - um equilíbrio entre os sinais excitatórios e inibitórios do crescimento dos vasos sanguíneos. Em situações normais, a formação destes novos vasos ocorre durante a cicatrização, a regeneração do organismo e, no sistema reprodutivo feminino, durante a ovulação e formação da placenta (MASS et al., 2001).

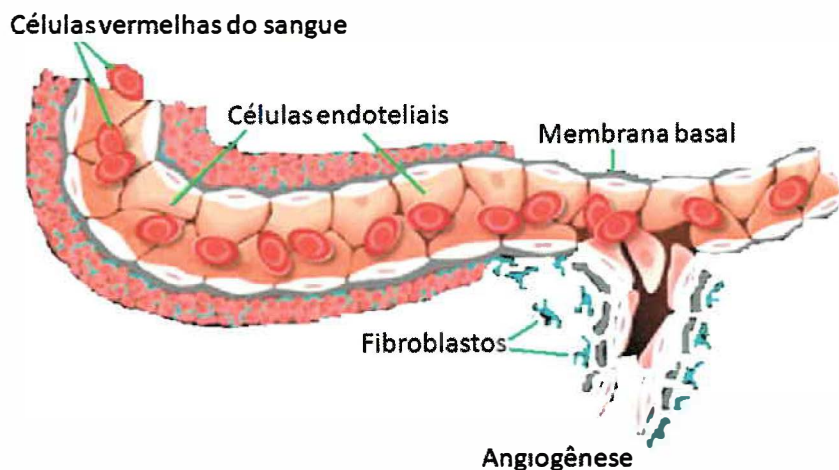


Figura 1: Esquema do processo da angiogênese (FREITAS et.al., 2009).

Algumas moléculas promotoras da angiogênese já foram caracterizadas, entre elas, o fator de crescimento ligado à heparina, o fator de crescimento fibroblástico básico (*BFGF*), fatores de necrose tumoral alfa e beta (*TNFA* e *TNFB*), fator de transformação de crescimento alfa (*TGFA*), fator de crescimento derivado de plaquetas (*PDGF*). O fator de crescimento vascular endotelial (*VEGF*) destaca-se dentre todos os fatores mencionados acima. Sua função está relacionada com a regulação endógena deste processo (KERBEL, 2008).

Os glioblastomas (GBMs) estão entre os tumores mais altamente vascularizados, com níveis extremamente elevados de inúmeros fatores pró-angiogênicos (*VEGF*, *BFGF*, *IL8*). Neste há uma superexpressão de *VEGF* pelas células tumorais que é provavelmente o resultado combinado das alterações genéticas acumuladas e hipóxia, correlacionando assim, com fenótipo mais maligno deste tipo de tumor (BRAT et al., 2003; KAUR et al., 2004).

2.2.1. VEGF

Para que haja um crescimento em torno de 1 a 2 mm de diâmetro, o tumor necessita de um suplemento sanguíneo independente, que é adquirido pela expressão de fatores de crescimento (dentre eles os *VEGFs*) que promovem a angiogênese. Até esse diâmetro os tumores recebem oxigênio e nutrientes por difusão simples dispensando a irrigação por vasos sanguíneos próprios. A partir deste tamanho, na ausência de vascularização neoformada, o tumor deixa de crescer e ocorre morte celular induzida pela hipóxia e pela formação de óxido nítrico (FENTON et al., 2000, FREITAS et al., 2009).

O *VEGF* é membro da família de citocinas que desempenha papel importante na angiogênese. Este é considerado como um fator potente para a proliferação vascular, difusível e específico pelas células do endotélio, e desempenha um papel ímpar na regulação do crescimento vascular, fisiológico e patológico (KUNG et al., 2006). O mesmo induz a angiogênese atuando diretamente nas células endoteliais ao se ligar e ativar receptores de membrana pertencentes à família de receptores tirosina quinase.

Em humanos, foram identificados seis membros: *VEGF-A*, *VEGF-B*, *VEGF-C*, *VEGF-D*, *VEGF-E* e *P1GF* (em inglês: *Placental Growth Factor*), tendo o *VEGF-A*, ou apenas *VEGF*, um papel mais ativo no processo angiogênico (HOEBEN et al., 2004).

Este processo continua mesmo com o câncer em seu estágio avançado. Com isso, ocorre a neovascularização direcionada para o tumor sólido, com subsequente crescimento e metástase.

2.3. Expressão gênica nos astrocitomas e o mecanismo de apoptose.

A apoptose é um processo pelo qual as células sofrem morte programada; é a oposição para a proliferação. Trata-se morfologicamente da retração e fragmentação do núcleo e da célula, sem que haja ruptura da membrana celular. Isso impede a inflamação do tecido circundante. Esta depende da ativação de diferentes vias de sinalização que são muitas vezes desreguladas no câncer (KRAKSTAD e CHEKENYA, 2010).

A homeostase normal do tecido é mantida por uma coordenação entre proliferação celular e apoptose celular, e a ruptura deste equilíbrio pode levar à transformação e progressão neoplásica (DAS et al., 2002).

A apoptose pode ser deflagrada por estímulos externos através de receptores específicos na superfície celular chamados receptores de morte ou por estímulos internos de estresse intracelular, tais como lesão do DNA ou perturbações no ciclo celular ou nas vias metabólicas. Essas diferentes vias culminam com a ativação de proteases conhecidas como caspases, que apresentam papel fundamental no processo de morte celular (PAROLIN e REANSON, 2001).

As caspases estão presentes no citosol sob a forma de pró-enzimas inativas, tornando-se ativas após clivagem proteolítica nos resíduos de ácido aspártico, onde ativam outros membros da família de caspases em uma cascata (DAS et al., 2002; PAROLIN e REANSON, 2001).

As caspases são divididas em duas classes: as iniciadoras e as efetoras. As caspases iniciadoras são caracterizadas por uma extensa região N-terminal (>90 aminoácidos), que se constitui de um ou mais domínios adaptadores, importantes para desenvolver sua função; enquanto as caspases efetoras normalmente contêm 20 a 30 resíduos em sua seqüência de prodomínios (SHI, 2002).

Alguns membros, tais como a caspase-8, ocupam posição proximal na cascata proteolítica e agem como reguladoras e iniciadoras, enquanto outras como a caspase-3 agem como efetoras na fragmentação celular (PATEL et al., 1998).

Um dos mecanismos pelos quais a apoptose pode ser deflagrada é através dos receptores de morte presentes na superfície celular, que são ativados em resposta ao acoplamento de ligantes específicos. A maioria dos receptores da morte identificados são membros da superfamília de receptores para o fator de necrose tumoral (*TNF*), caracterizada por apresentar porção extracelular rica em cisteína e uma região citoplasmática, chamada domínio de morte ("*death domain*"), essencial para transdução intracelular do sinal de morte. Entre esses receptores, um dos mais estudados e melhor caracterizados é o receptor *FAS* (CD95 ou APO-1). Quando o ligante-*Fas* se acopla ao receptor *FAS*, as moléculas individuais do receptor se trimerizam formando agregados de cadeias de morte. Este agregado permite que as mesmas se liguem a uma proteína adaptadora presente no citosol, chamada cadeia da morte associada ao *Fas* ("*Fas-associated death domain*", *FADD*). A ligação desse complexo à pro-caspase-8 resulta na ativação dessa enzima por clivagem proteolítica. A caspase-8 pode então, diretamente ou pela via mitocondrial, ativar a caspase-3 (caspase efetora), induzindo então a morte celular (PAROLIN e REANSON, 2001).

A família das proteínas inibidoras de apoptose (*IAP*) age como um fator importante na inibição da apoptose, caracterizada pela presença de

aproximadamente 70-80 aminoácidos. As IAPs podem se ligar diretamente as caspases e inibir sua atividade na indução de apoptose e, portanto, desempenhar um papel crítico na decidir o destino da célula (ZHEN et al., 2005).

2.3.1. SURVIVIN

Identificada pela primeira vez por Ambrosini et al. (1997), a Survivin é um membro da família IAP. É altamente expressa na fase G2/M do ciclo celular, podendo efetivamente impedir o processo de apoptose celular pela ligação especificamente nas caspases-3 e caspase-7, inibindo sua atividade. Além disso a *SURVIVIN* desempenha um papel muito importante na angiogênese (ZHEN et al., 2005).

Recentemente, estudos realizados por Das et al., (2002) utilizando a reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR), imunohistoquímica e Western Blot, mostraram que o mRNA e proteína *SURVIVIN* encontravam-se superexpressas em gliomas. Além disso, a superexpressão da *SURVIVIN* é significativamente associada com a tumorigênese dos gliomas.

Estudos têm mostrado, em tecidos fetais normais, presença de transcritos da proteína *SURVIVIN* no rim e no fígado, e em menor quantidade, nos pulmões e no cérebro. A presença da *SURVIVIN* parece estar correlacionada com o comportamento agressivo do tumor e seu prognóstico (SASAKI et al., 2002).

No entanto, a relação da *SURVIVIN* com a proliferação, apoptose e angiogênese em gliomas ainda é incerto.

2.4. microRNAs

Os microRNAs (miR) são pequenos RNAs não codificadores de proteína, contendo aproximadamente de 18 a 24 nucleotídeos que regulam a expressão

gênica em nível pós-transcricional, por degradação de um RNA mensageiro (RNAm). Mais de 400 microRNAs foram identificados no genoma humano, mas a relevância do envolvimento deles na maior parte dos processos fisiológicos e patológicos permanece incerta (OZEN et al., 2008).

A biogênese dos microRNAs se dá a partir, primeiramente, do transcrito primário (pri-microRNA), que geralmente contém centenas a milhares de pares de base, apresentados em uma estrutura *hairpin*, que é processada pela enzima RNase III, Drosha formando o microRNA precursor (pré-microRNA) de aproximadamente 70 nucleotídeos. A proteína exportina-5 leva esse produto ao citoplasma para ser processado pela RNase III, Dicer, gerando um microRNA fita dupla de ~22 nucleotídeos. Uma das fitas do *duplex* de microRNA é degradada enquanto a outra permanece no complexo RISC para controlar a expressão pós-transcricional de genes-alvo, levando a repressão pós-transcricional ou a degradação do RNAm (Figura 2) (CHEN, 2008; FILHO e KIMURA, 2006).

Gregory et al. (2005), relatam que a superexpressão de microRNA pode levar a uma regulação inibitória da função de genes supressores de tumor, bem como a diminuição da expressão de microRNA pode estimular a atividade das oncogenes.

Os microRNAs exercem seus efeitos regulatórios ligando-se à região 3' não traduzida de RNAm-alvo. Este mecanismo de atuação permite a redução dos níveis protéicos de seus genes-alvo, raramente afetando o nível de expressão transcricional (KIM, 2005). A regulação pós-transcricional exercida pelos microRNAs na região 3' não traduzida depende do grau de complementaridade com o RNAm-alvo, podendo ocorrer por inibição traducional ou degradação do RNAm. Em função dos microRNAs possuírem seqüências pequenas e agirem sem a necessidade de pareamento completo, um único miRNA pode regular muitos RNAm-alvo, além de

cooperarem no controle de um único RNAm (BRENNECKE et.al., 2005). Alguns estudos indicam que um miRNA possa regular 200 RNAs apresentando funções totalmente diversas. Desta forma, os microRNAs constituem uma enorme e complexa rede regulatória da sinalização celular.

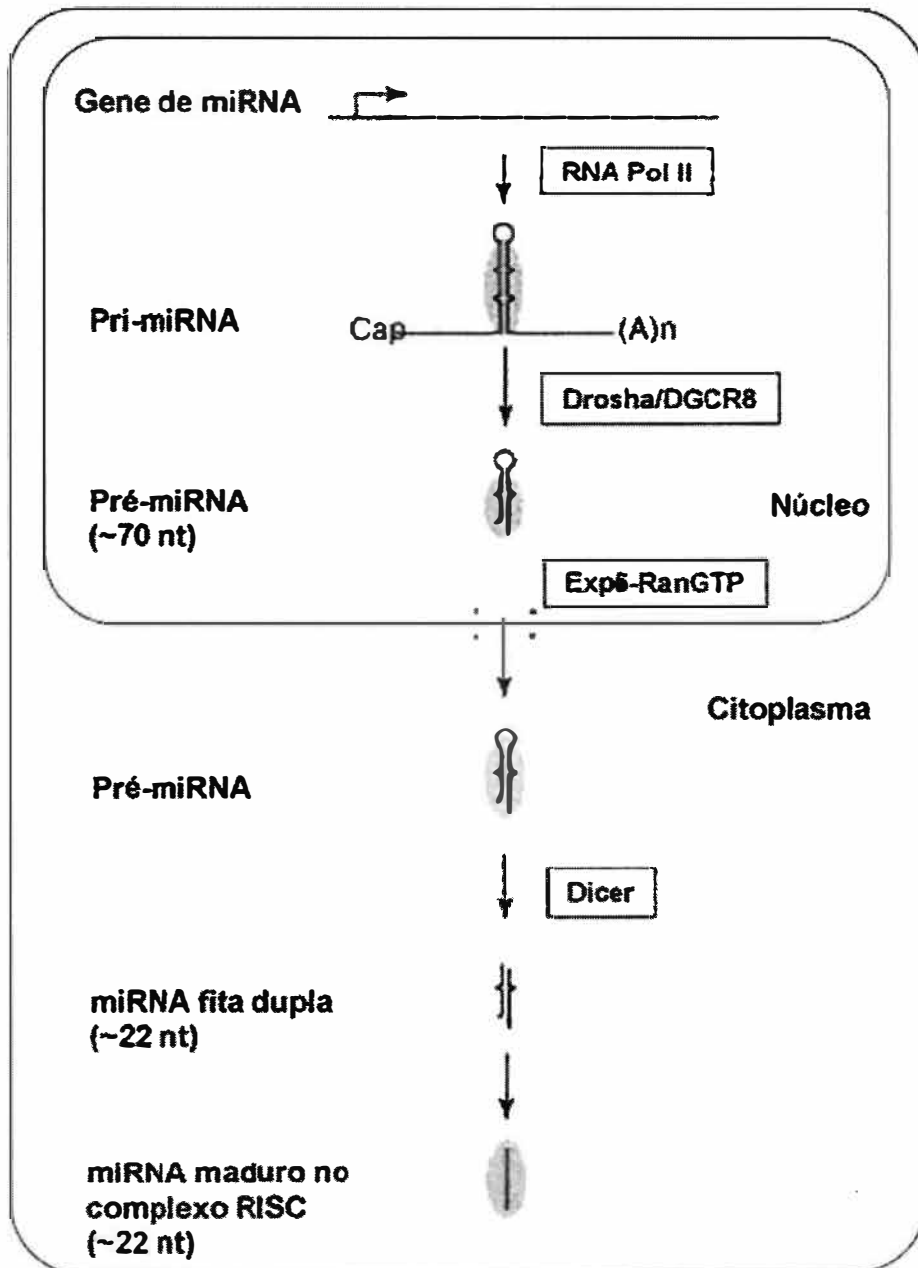


Figura 2. Esquema da Biogênese do microRNA (adaptado de Kim, Trends Genet 22(3):165-73, 2006)

2.5. microRNA e angiogênese

Existe uma crescente evidência de que microRNAs específicos estão envolvidos em diversos processos biológicos, tais como cardiogênese, proliferação e diferenciação de células músculo-esqueléticas, morfogênese cerebral, oncogênese, e diferenciação de linhagens hematopoiéticas, porém, o papel específico dos microRNAs na biologia da célula vascular e endotelial ainda é bastante limitado (URBICH et al., 2008).

Yang et al.(2005), obtiveram evidências sobre a importância dos microRNAs na regulação da angiogênese através de observações do processo da angiogênese embrionária, onde foi constatado que a presença destes comprometeu severamente os sacos embrionários e o embrião, e agiu reduzindo severamente a expressão de importantes reguladores positivos da angiogênese.

Conti et al. (2009), mostraram que os miR-21 e miR-221 estão superexpressos em tumores astrocíticos humanos, e que o miR-181b está hipoexpresso. O miR-21 apresentou-se superexpresso em tumores de baixo e alto grau de malignidade, enquanto a superexpressão do miR-221 foi mais evidente em tumores de alto grau.

Sage et al. (2007), observaram em estudo realizado com linhagem de células de glioblastoma que a elevada expressão dos miR-221/222 está associada com nível menor de p27^{kip1} na fase G1/S. Sendo assim, concluíram que esse microRNAs funcionam como oncogênese, ao controlar a progressão do ciclo celular através da inibição da p27^{kip1}

Corsten et al. (2007), consideraram a hipótese de que talvez a supressão do miR-21 pudesse aumentar a sensibilidade do tumor às terapias citotóxicas. Nos experimentos “in vitro” houve um aumento sinérgico na atividade das caspases e

uma redução significativa da viabilidade das células de glioblastoma. Este sinergismo também foi confirmado "in vivo" no cérebro murino, demonstrando que o miR-21 pode ser um possível alvo para intervenções terapêuticas, empregando tratamento combinado entre a modulação do miR-21 e quimioterapia antineoplásica.

Chan et al. (2005), notaram através do perfil do tumor do glioblastoma e linhagens celulares um aumento dos níveis do miR-21. No mesmo estudo, a inibição do miR-21 em células de glioblastoma levou ao aumento da morte celular, sugerindo que este estaria atuando como um oncogene inibindo a morte celular em glioblastomas.

2.6. microRNAs e apoptose

Os microRNAs tem sido considerado como importantes reguladores envolvidos em muitos processos biológicos, incluindo a proliferação e diferenciação celular, apoptose e metabolismo, influenciando assim, o desenvolvimento da doença. Eles podem regular a expressão de pelo menos 1/3 de todos os genes humanos e estão envolvidos com a regulação do metabolismo e da apoptose (AMBROS, 2004).

Em tumores malignos, os microRNA oncogênicos encontram-se superexpressos e atuam estimulando a proliferação celular e inibindo a ação de genes supressores tumorais e genes que controlam a apoptose (COWLAND et al., 2007 e ZHANG et al., 2007).

Estudos realizados com moscas, o microRNA *bantan* acelera a proliferação e previne a apoptose através da regulação do gene proapoptótico *hid* (BRENNECKE et al., 2003).

O papel dos microRNAs na sinalização da apoptose ainda não foi totalmente determinada, no entanto, vários estudos têm indicado um papel neste processo.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

- Quantificar a expressão dos microRNAs: miR-21, miR-221, miR-222 e em glioblastomas e olidendrogliomas pela técnica de PCR em tempo real.
- Analisar o mecanismo de angiogênese pela expressão do *VEGF-A* em glioblastomas e olidendrogliomas pela técnica de PCR em tempo real.
- Analisar o mecanismo de apoptose pela expressão gênica do *SURVIVIN* glioblastomas e olidendrogliomas pela técnica de PCR em tempo real.
- Correlacionar a expressão dos microRNAs: miR-21, miR-221, miR-222 e dos genes *VEGF* e *SURVIVIN* com os parâmetros clínicos: gênero e raça nos glioblastomas e olidendrogliomas.

PACIENTES E MÉTODOS

4. PACIENTES E MÉTODOS

Para a utilização das peças ressecadas para fins de pesquisa, foram solicitados os termos de consentimento livre e esclarecidos dos pacientes ou familiares (anexo A). O protocolo para esta pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do HCFMRP/SP (Processo HCRP nº 9274/2009 (anexo B)).

4.1. Pacientes

As amostras analisadas no presente estudo foram de pacientes operados pela equipe de neurocirurgia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP/USP) no período compreendido entre os anos de 2004 a 2008 (Tabelas 1 e 2). Foram analisadas 17 amostras de Glioblastoma Multiforme (grau IV) e 12 amostras de Oligodendroglioma Anaplásico (grau III). Como grupo controle foi estudado 10 amostras de substância branca obtidas de pacientes submetidos à cirurgia de epilepsia.

Tabela 1. Dados Clínicos dos pacientes com glioblastoma.

SNC	Nome	Sexo	Raça	Data Nasc.	Registro	Cirurgia
159	J.A.B.	Fem.	Branco	02/10/49	0684599J	18/02/04
184	J.D.	Masc.	branco	23/06/40	0694204D	06/05/04
224	E.R.S.	Masc.	Branco	26/10/43	0268030K	14/11/04
228	T.V.F.	Masc.	Branco	27/09/67	0652287K	01/12/04
240	G.G.R.	Fem.	Branco	21/06/34	0727396B	30/03/05
244	S.W.S.	Masc.	branco	11/09/37	0737192H	04/10/05
318	L.F.A.	Masc.	branco	07/11/37	0817396A	14/06/07
321	V.S.D.	Masc.	Branco	14/03/62	0560673B	27/06/07
323	A.M.D.O.	Fem.	branco	25/12/44	0819237A	28/06/07
357	M.A.M.	Masc.	branco	10/11/62	0833605C	01/11/07
423	P.L.G.	Masc.	branco	01/02/54	0795327A	08/05/08
437	M.V.	Fem.	Branco	12/12/38	0291700I	17/06/07
441	M.D.B.O.	Fem.	Branco	08/10/42	0859546G	25/09/08
458	T.G.F.	Masc.	branco	03/09/46	0863852I	31/07/08
465	A.A.O.	Fem.	Branco	12/08/75	0862840H	14/08/08
467	A.M.	Masc.	branco	23/08/45	0416419G	19/08/08
469	M.B.	Masc.	branco	19/07/44	0867305J	20/08/08
477	M.B.P.T.	Fem.	branco	06/10/81	0564874F	10/09/08
485	J.R.M.C.	Masc.	Negro	22/11/47	0547710G	25/09/08
488	A.A.A.	Masc.	branco	08/02/39	0871739E	03/10/08
350	A.A.A.	Masc.	Branco	08/12/41	0830804K	08/10/07

Tabela 2. Dados Clínicos dos pacientes com Oligodendroglioma Anaplásico

SNC	Nome	Sexo	Raça	Data Nasc.	Registro	Cirurgia
92	A.T.	Masc.	Branco	13/08/57	0456032K	21/05/03
110	L.A.M.	Masc.	Branco	15/04/55	0659956B	10/07/03
201	O.C	Masc.	Branco	13/12/43	0703746K	12/08/04
253	C.M.S.F.	Fem.	Mulato	13/03/71	0766679G	22/03/06
254	M.A.O.R.	Fem.	Branco	17/02/67	0767548E	22/03/06
263	M.C.R.	Masc.	Branco	01/01/62	0776103D	13/06/06
291	L.M.S.	Masc.	Branco	06/12/32	0802229J	29/01/07
302	L.A.M.	Masc.	Mulato	15/04/55	0659956B	27/02/07
324	W.W.M.	Fem.	Branco	31/12/74	0719921K	28/06/07
361	M.S.P.S.	Fem.	Mulato	02/07/60	0719531B	21/11/07
368	E.A.	Fem.	Branco	18/07/68	0836218I	06/12/07
376	A.F.S.	Masc.	Branco	23/05/38	0036892A	24/12/07
395	E.A.	Fem.	Branco	18/07/68	0836218I	18/02/08
399	F.A.S	Masc.	Branco	16/05/58	0842712I	21/02/08
481	J.N.S	Masc.	Branco	07/04/70	0608355G	16/09/08
502	J.C.P.O	Masc.	Branco	07/03/78	0878000E	12/11/08
578	J.R.F.	Masc.	Branco	18/11/68	0004185B	21/05/09

Após o procedimento cirúrgico uma parte das amostras do tumor foi imediatamente estocada em nitrogênio líquido (-196°C) e a outra parte encaminhada ao Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo HC-FMRP/USP, para a confirmação do laudo através do exame anátomo-patológico.

4.2. Métodos

Extração do RNA

Para a extração de RNA das amostras de glioblastomas multiforme e oligodendrogliomas anaplásicos foram adicionados 250 μl de PBS (phosphate-buffered saline) e 750 μl de Trizol® (Invitrogen, EUA). O fragmento de tecido foi homogeneizado com a utilização de um aparelho Politron®. Após permanência em temperatura ambiente por 5 minutos, acrescentou-se 200 μl de clorofórmio, agitando-se vigorosamente por 15 segundos. A solução final foi centrifugada a 4°C por 15 minutos a 14.000 rpm, separando o líquido em duas partes: uma parte aquosa (transparente), presente na região superior do ependorf e uma outra parte, já no fundo do ependorf, de cor rosada. A fase aquosa (superior) de cada frasco foi transferida para novos tubos. Em seguida foram adicionados mais 500 μl de trizol em cada ependorf, onde imediatamente, com a própria pipeta em uso, ia homogeneizando o material. Após ter feito isso, foram adicionados 200 μl de clorofórmio, não precisando este ser homogeneizado. Em seguida agitou-se o ependorf manualmente por 15 segundos e deixou por 5 minutos em temperatura ambiente, onde foi levado em seguida para a centrifuga com os mesmos parâmetros

anteriores. O RNA foi precipitado com 500µl de álcool isopropílico 100% e permaneceu a -80°C por pelo menos 12 horas.

No dia seguinte, a amostra foi centrifugada a 4°C por 15 minutos a 14.000 rpm, desprezando-se o sobrenadante a seguir. Foi acrescentado 1000µl de etanol 70% seguido novamente de centrifugação refrigerada por 15 minutos a 14.000 rpm. A fase superior foi desprezada e o precipitado seco dissolvido com água tratada com 12µl de H₂O DEPC por pelo menos 15 minutos. Esse material foi, em seguida, aliquoteado, identificado e armazenado a -80°C.

Para verificação da integridade do RNA obtido, cada amostra foi, ao final da etapa descrita acima, submetida à eletroforese em gel de agarose a 1% para RNA.

Síntese de DNA complementar (cDNA) dos microRNAs

Para a síntese do cDNA (DNA complementar) do microRNA a transcrição reversa foi realizada utilizando o kit comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). Para cada 5ng de RNA, foi adicionado 0,75µl de RT Buffer; seguido de 0,075µl de dNTP's; 1,5µl de Primers específicos (miRNAs ou controles endógenos) e 0,5µl da enzima MultiScribeTM, 0,094µl de RNase out (1.9U), completando com água DEPC o volume final de 7,5µl, sendo as amostras incubadas no termociclador por 30 min a 16 ° C, 30 min a 42 °C, 5 min a 85 ° C e, em seguida, realizada a 4°C. Para o PCR em tempo real, foi utilizado 4,5µL do cDNA das amostras diluído 1:4 em um volume final de reação de 10µL.

Síntese de cDNA para os genes *VEGF-A* e *SURVIVIN*

A transcrição reversa foi realizada utilizando o kit comercial (Applied Biosystems) High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit de acordo com as

instruções do fabricante para a síntese do cDNA (DNA complementar). Para cada 1µg RNA, foi adicionado 2,5µl de RT Buffer; seguido de 1,0µl de dNTP's; 2,5µl Random Primers e 1,25µl da enzima MultiScribe™.

PCR em tempo real

RQ microRNAs: miR-21, miR-221 e miR-222

O método de PCR em tempo real é utilizado para a confirmação da expressão diferencial de microRNAs.

A partir do cDNA obtido das amostras, é realizada a amplificação por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) quantitativo em tempo real (RQ-PCR), com a utilização da TaqMan Master Mix (Applied Biosystems).

Para a análise quantitativa da expressão de microRNAs, são utilizados os sistemas disponíveis comercialmente TaqMan Assay-on-demand, compostos por oligonucleotídeos e sondas (Applied Biosystems). Para a formação do mix que iria ser processado pelo PCR em tempo real, foram utilizadas 4,5µl do cDNA da amostra, 5µl do reagente e 0,5µl da sonda específica, completando um volume final de 10µl.

Considerando-se as diferenças causadas por quantidades distintas de cDNA utilizadas nas reações, os valores de CT determinados para as diferentes amostras, são normatizados. O CT determinado para uma amostra (para um determinado gene) é subtraído do CT determinado para um gene house-keeping (neste caso o *RNU24* ou *RNU48*) na mesma amostra, originando o chamado Δ CT. Os valores de Δ CT podem, para um mesmo gene, ser comparados de maneira diferente, obtendo-se uma quantificação relativa da expressão deste gene em diferentes amostras. A cada ciclo, o número de cópias em uma reação de PCR duplica. Assim, o número de

ciclos que separa o Δ CT de uma amostra do Δ CT de outra amostra de referência ($\Delta\Delta$ CT), reflete a diferença existente entre as amostras. Esta diferença, em termos de nível de expressão gênica relativa, é obtida de forma aproximada, aplicando a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$.

As condições padrão de amplificação serão 95°C por 10 minutos, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto (anelamento e extensão simultânea). Todas as reações serão realizadas em duplicata e analisadas no aparelho 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Os dados serão constantemente coletados durante o PCR e analisados em ABI-7500 SDS “software package”.

RQ Genes *VEGF-A* e *SURVIVIN*

As seqüências de oligonucleotídeos dos genes *VEGF-A* e *SURVIVIN*, escolhidos para o estudo foram confeccionadas pela empresa Invitrogen (EUA). Todas as seqüências foram conferidas no Basic Local Alignment Search Tool – BLAST (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

A técnica de PCR em tempo real consiste em acompanhar o número de cópias formado na reação de PCR, a cada ciclo. O número de cópias é proporcional à fluorescência quantificada pelo aparelho oriunda do intercalamento (e aumento de fluorescência) de moléculas fluorescentes nos produtos de PCR formados (método SYBRGreen). Uma vez amplificado, um limite de fluorescência (na fase exponencial da amplificação) denominado de CT (Cycle Threshold) é estipulado determinando o ciclo em que cada amostra alcança este limite de detecção. Para a formação do mix que iria ser processado pelo PCR em tempo real, foram utilizados 3µl do cDNA da amostra, 3µl de primers e 6µl do SYBRGreen, completando um volume final de 12µl.

Os valores de CT determinados para as diferentes amostras, são normalizados considerando-se as diferenças causadas por quantidades distintas de cDNA utilizadas nas reações. O CT determinado para uma amostra (para um determinado gene) é subtraído do CT determinado para um gene house-keeping (neste caso TBP e HPRT) na mesma amostra, originando o chamado Δ CT. Os valores de Δ CT podem, para um mesmo gene, ser comparados de maneira diferente, obtendo-se uma quantificação relativa da expressão deste gene em diferentes amostras. A cada ciclo, o número de cópias em uma reação de PCR duplica. Assim, o número de ciclos que separa o Δ CT de uma amostra do Δ CT de uma outra amostra de referência ($\Delta\Delta$ CT), reflete a diferença existente entre as amostras. Essa diferença, em termos de nível de expressão gênica relativa, é obtida de forma aproximada, aplicando a fórmula $2^{-\Delta\Delta$ CT}.

Realizamos a quantificação relativa do genes *VEGF-A* e *SURVIVIN*, utilizando o gene *TBP* e *HPRT* como normalizador. As reações de PCR em tempo real foram realizadas em duplicata, utilizando o reagente SYBrGreen Mix (Applied Biosystems, EUA). A amplificação foi realizada em um volume final de 12 μ l, utilizando 6 μ l do reagente específico SYBrGreen Máster Mix, 3 μ l de cada primer específico e 3 de cDNA diluído. Um aparelho de detecção de PCR em tempo real 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) foi utilizado juntamente com o software Sequence Detection System para a obtenção dos valores de CT. Os dados foram então exportados para planilhas do software Excel para cálculo dos valores de Δ CT. O software GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Prism, Inc, San Diego, CA, EUA), foi utilizado para gerar os gráficos e calcular a significância estatística.

As condições padrão de amplificação foram 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto (anelamento e extensão, simultâneos).

As seqüências 5' – 3' dos primers forward (-f) e reverse (-r) utilizados em conjunto com o Máster Mix SYBrGreen, foram:

Tabela 3 - Seqüência dos primers utilizados.

GENE	primers forward (-f)	reverse (-r)
VEGF-A	GCCAGCACATAGGAGAGAT	TCGGCTTGTCACATTTTTCTTG
SURVIVIN	AGGACCACCGCATCTCTAC	CAAGTCTGGCTCGTTCTCA
TBP	GAGCTGTGATGTGAAGTTTCC	TCTGGGTTTGATCATTCTGTAG
HPRT	TGAGGATTTGGAAAGGGTGT	GAGCACACAGAGGGCTACAA

Curvas de Calibração = Primers

As curvas de calibração foram elaboradas em triplicata, a partir de diluições seriadas de cDNA (cDNA puro e diluições 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}) derivados de um pool das amostras controle. As diluições seriadas forneceram um gráfico da fluorescência total emitida *versus* ciclo da PCR. As curvas-padrão são derivadas dos gráficos de amplificação quando plotados em um novo gráfico, que fornece uma relação linear entre o CT *versus* o logaritmo do número inicial de cópias lidas, onde é possível estimar matematicamente os valores do *slope* e de *intercept*:

Slope = - log (E+1), onde E = eficiência de amplificação

Intercept = log (Nt) ou (Nt = $10^{\text{intercept}}$), onde Nt = número de moléculas amplificadas ao “threshold”

As curvas-padrão construídas para cada gene obtiveram uma eficiência superior a 95%. Somente foram consideradas curvas-padrão satisfatórias para referência aquelas com slope entre 3,1 e 3,9.

Curva de Dissociação (Melting Curve)

A especificidade do SYBR™ Green é determinada através dos primers utilizados e da análise da curva de dissociação. O controle realizado através da curva de dissociação utiliza a característica do SYBR™ Green de emitir fluorescência apenas quando o DNA encontra-se em dupla-fita. Ao final de cada amplificação normal com SYBR™ Green, foi adicionado um passo de aproximadamente 20 minutos de duração, no qual a temperatura aumenta gradualmente de 60 para 95°C. À medida que os produtos gerados por PCR desnaturam com o aumento da temperatura, cai o sinal fluorescente do SYBR™. O gráfico resultante permite verificar se há um ou mais produtos de PCR presentes em cada reação, devido a diferenças de temperatura de melting (T_m) entre produtos de PCR determinadas pelo número e composição de bases nitrogenadas de cada um. Desta forma, todos os produtos de PCR de um primer específico devem apresentar uma mesma temperatura de dissociação. A análise da curva de dissociação poderá indicar erros devido a presença de artefatos como formação de “primer-dimer” (dímeros de primers), “mispriming” (pareamento em regiões não homólogas) e cross-dimers entre outros.

Após a amplificação da RQ-PCR, o aparelho foi programado para a realização de uma curva de dissociação. As amostras que apresentaram curvas de dissociação com temperatura diferentes e/ou mais de um ponto de dissociação em uma mesma amostra foram desconsideradas e repetidas.

4.3. Análise Estatística

A análise estatística da expressão gênica pelo método quantitativo de PCR em tempo real das amostras de Glioblastomas, Oligodendrogliomas, Substância Branca e dos genes *VEGF-A* e *SURVIVIN* foram realizadas pelo método *Kruskal-Wallis test* e *Mann-Whitney test*, usando *GraphPad Prism version 4.00 for Windows*, (GraphPad Software, San Diego California USA). Foi considerado estatisticamente significativo valores de $p < 0.05$.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

As amostras de Glioblastoma e Oligodendroglioma foram examinadas para a quantificação da expressão gênica, por PCR em tempo real, do gene envolvido no mecanismo de angiogênese *VEGF-A* (Gráfico 1).

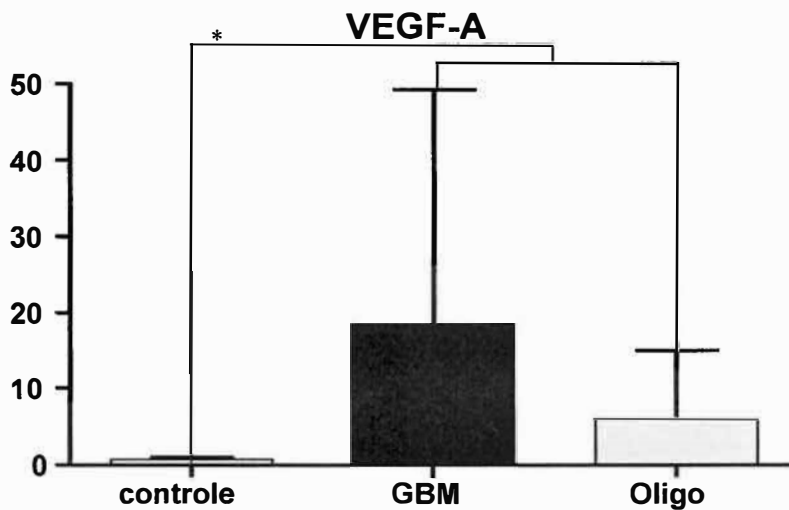


Gráfico 1: Perfil de expressão do gene *VEGF-A* nos tumores cerebrais e tecido controle. Representação da média dos valores (\pm desvio padrão) da expressão do gene *VEGF-A* entre os grupos estudados. Houve diferença significativa ($p = 0,006$, teste Kruskal-Wallis) na expressão do gene *VEGF-A* entre os grupos estudados. No pós-teste de Dunn's os glioblastoma em relação ao grupo controle apresentaram $p < 0,0001$ e os oligodendrogliomas em relação ao grupo controle apresentaram $p < 0,05$.

As amostras de Glioblastoma e Oligodendroglioma foram examinadas para a quantificação da expressão gênica, por PCR em tempo real, do gene envolvido no mecanismo de apoptose *SURVIVIN* (Gráfico 2).

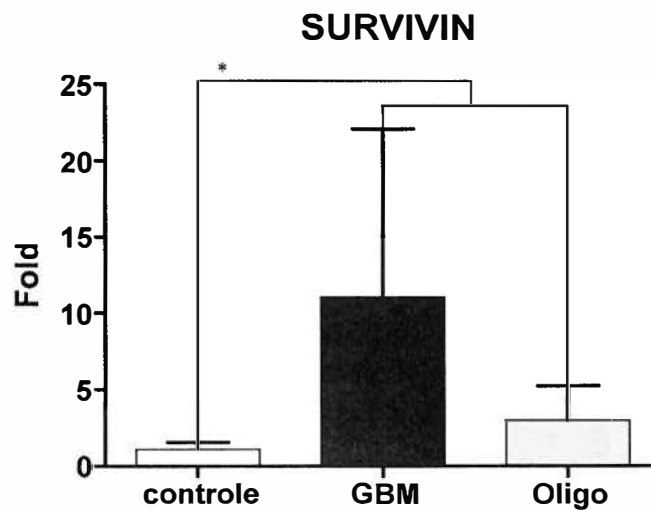


Gráfico 2: Perfil de expressão do gene *SURVIVIN* nos tumores cerebrais e tecido controle. Representação da média dos valores (\pm desvio padrão) da expressão do gene *SURVIVIN* entre os grupos estudados. Houve diferença significativa ($p = 0,0008$, teste Kruskal-Wallis) na expressão do gene *SURVIVIN* entre os grupos estudados. No pós-teste de Dunn's os glioblastoma em relação ao grupo controle apresentaram $p < 0,001$ e os oligodendrogliomas em relação ao grupo controle apresentaram $p < 0,05$.

As amostras de Glioblastoma e Oligodendroglioma foram examinadas para a quantificação da expressão gênica, por PCR em tempo real, do miR-21 (Gráfico 3).

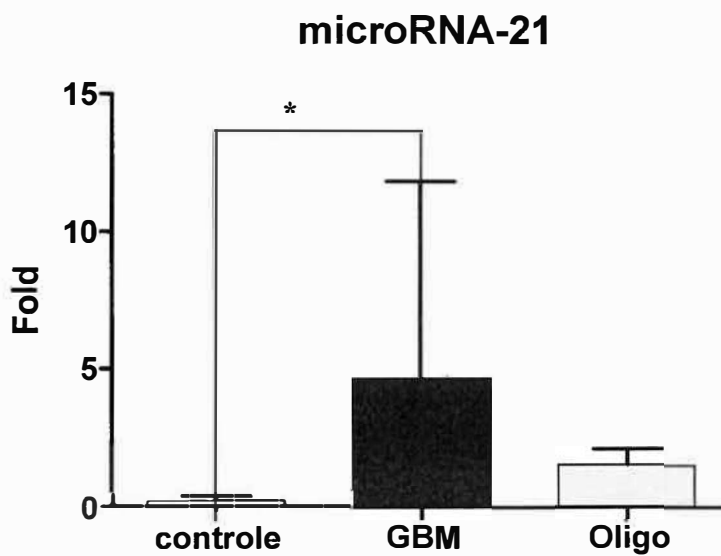


Gráfico 3: Perfil de expressão do miR-21 nos tumores cerebrais e tecido controle. Representação da média dos valores (\pm desvio padrão) da expressão do miR-21 entre os grupos estudados. Houve diferença significativa ($p = 0,0443$, teste Kruskal-Wallis) na expressão do miR-21 entre os grupos estudados. No pós-teste de Dunn's os glioblastoma em relação ao grupo controle apresentaram $p < 0,05$.

As amostras de Glioblastoma e Oligodendroglioma foram examinadas para a quantificação da expressão gênica, por PCR em tempo real, do miR-221 (Gráfico 4).

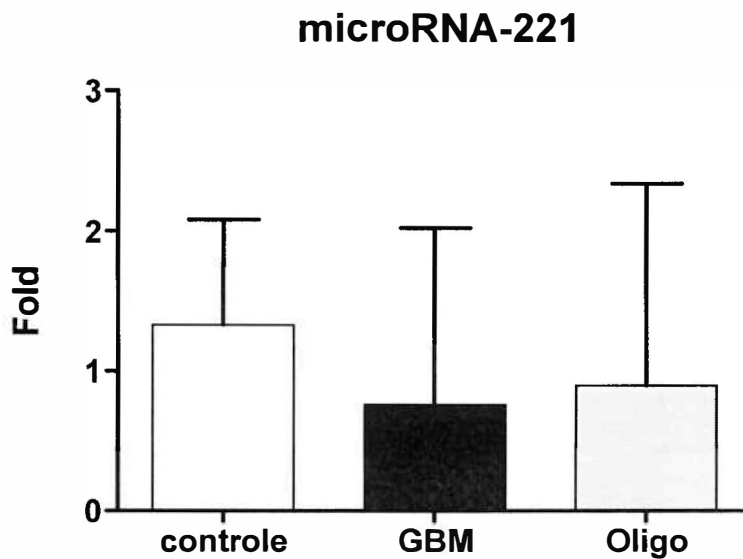


Gráfico 4: Perfil de expressão do miR-221 nos tumores cerebrais e tecido controle. Representação da média dos valores (\pm desvio padrão) da expressão do miR-221 entre os grupos estudados. Não houve diferença significativa ($p = 0,9487$, teste Kruskal-Wallis) na expressão do miR-21 entre os grupos estudados.

As amostras de Glioblastoma e Oligodendroglioma foram examinadas para a quantificação da expressão gênica, por PCR em tempo real, do miR-222 (Gráfico 5).

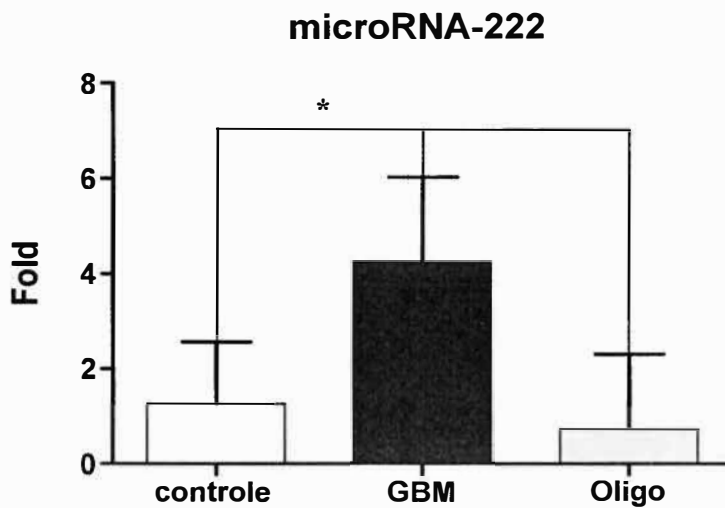


Gráfico 5: Perfil de expressão do miR-222 nos tumores cerebrais e tecido controle. Representação da média dos valores (\pm desvio padrão) da expressão do miR-222 entre os grupos estudados. Houve diferença significativa ($p = 0,0335$, teste Kruskal-Wallis) na expressão do miR-222 entre os grupos estudados. No pós-teste de Dunn's os glioblastoma em relação aos controles e oligodendrogliomas apresentaram $p < 0,05$.

As amostras de Glioblastoma e Oligodendroglioma foram examinadas para a quantificação da expressão gênica, por PCR em tempo real, dos miR-21, miR-221 e miR-222 e comparadas aos parâmetros clínicos (Figura 3).

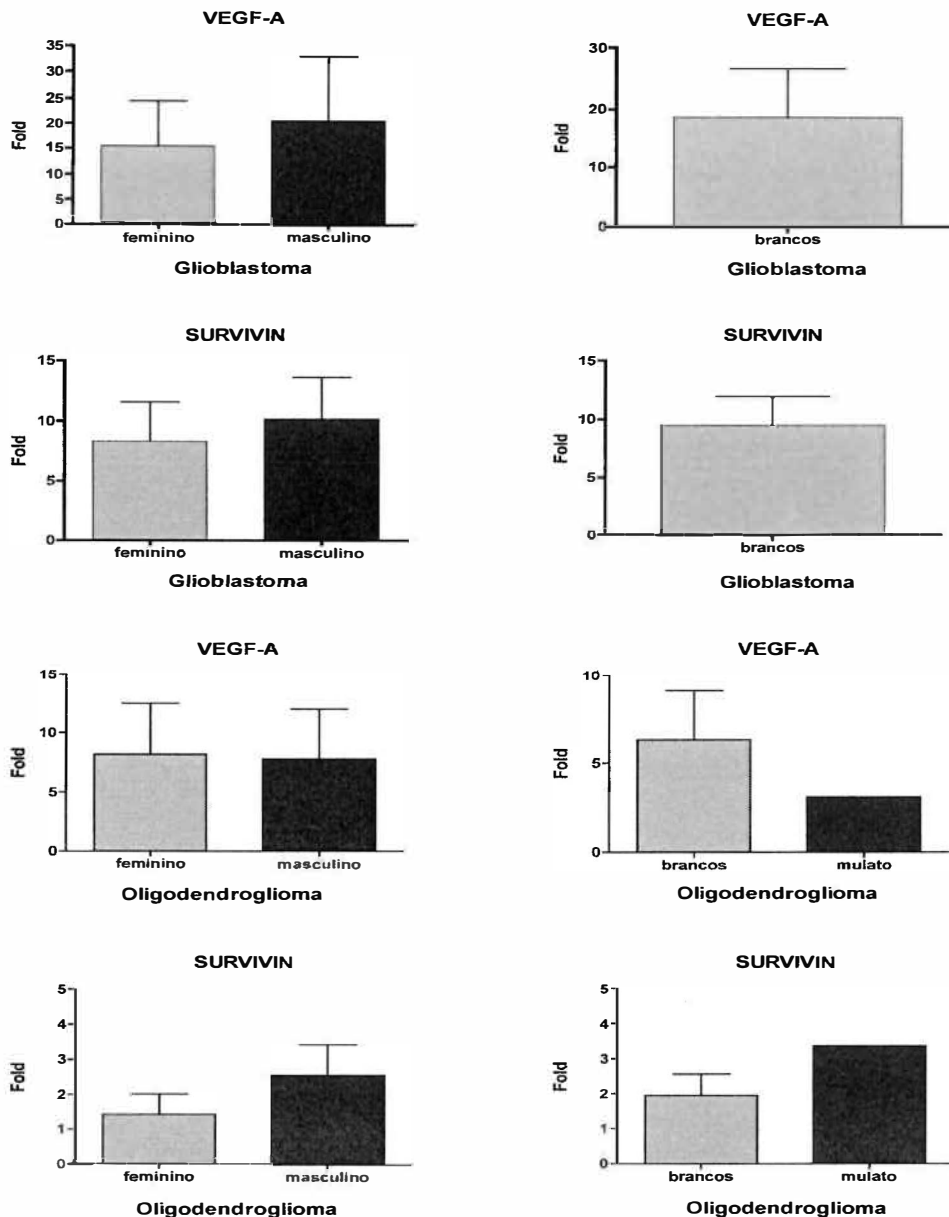


Figura 3. Representação da média dos valores (\pm desvio padrão) da expressão do gene *VEGF-A* correlacionada aos parâmetros clínicos dos pacientes: gênero, não apresentou diferença significativa ($p = 0,6889$, teste Mann-Whitney) quando comparado os gêneros nos glioblastomas. Nos oligodendrogliomas também não houve diferença significativa ($p = 0,8763$, teste Mann-Whitney) quando comparado os gêneros. A expressão do gene *SURVIVIN* não apresentou diferença significativa quando comparado entre os gêneros nos glioblastoma ($p = 0,7250$, teste Mann-Whitney) e nos oligodendrogliomas ($p = 0,5303$, teste Mann-Whitney). Nos glioblastomas e oligodendrogliomas apenas um paciente era da raça mulato e os demais eram brancos.

As amostras de Glioblastoma e Oligodendroglioma foram examinadas para a quantificação da expressão gênica, por PCR em tempo real, dos genes *VEGF-A* e *SURVIVIN* comparadas aos parâmetros clínicos (Figura 4).

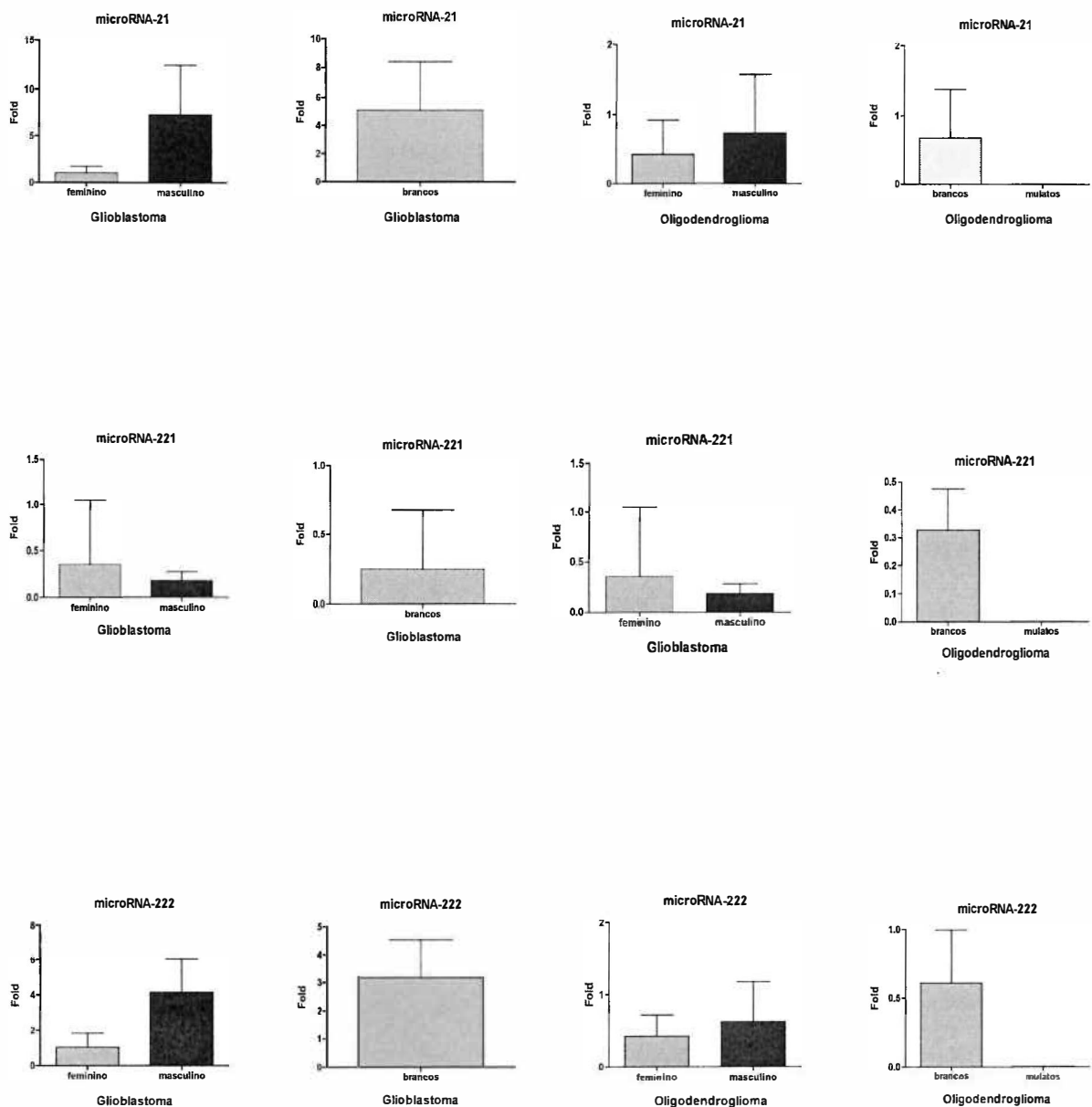


Figura 4. Representação da média dos valores (\pm desvio padrão) da expressão dos microRNAs: miR-21, miR-221 e miR-222 correlacionada ao parâmetro clínico dos pacientes: gênero, não apresentou diferença significativa nos glioblastomas para o miR-21 ($p = 0,2913$, teste Mann-Whitney), miR-221 ($p = 0,2828$, teste Mann-Whitney) e miR-222 ($p = 0,1741$, teste Mann-Whitney). Nos oligodendrogliomas também não houve diferença significativa quando comparado os gêneros para o miR-21 ($p = 0,4762$, teste Mann-Whitney), miR-221 ($p = 0,4318$, teste Mann-Whitney) e miR-222 ($p = 0,7879$, teste Mann-Whitney). Nos glioblastomas todos os pacientes eram brancos e oligodendrogliomas apenas um paciente era da raça mulato sendo os demais eram brancos.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Dentre os tumores astrocíticos, o Glioblastoma Multiforme (segundo a OMS - grau IV) é o tipo mais comum de tumores cerebrais primários em adultos. Está entre os mais letais e de menor sucesso no tratamento de tumores sólidos (FURNARI et al, 2007). Apesar do esforço em desenvolver novas terapias, este tumor apresenta altas taxas mortalidade, com média de sobrevida entre 12-15 meses (OHGAKI e KLEIHUES, 2007). Os oligodendrogliomas anaplásicos (grau III), mais um tipo de tumor das células da glia, apresentam densidade celular elevada, atipia nuclear, mitoses freqüentes, proliferação celular e áreas de necrose. Representam cerca de 4% do total das neoplasias cerebrais e, em relatos mais recentes, sua incidência é de 18 a 33% (EVREN-KELES et al. 2004). Portanto, são necessários mais estudos para caracterizar os eventos moleculares envolvidos no desenvolvimento e progressão destes tumores.

O processo da angiogênese é reconhecido como um dos eventos chave na progressão dos tumores astrocíticos. Um tumor em expansão como qualquer outro tecido, deve ser alimentado com oxigênio e nutrientes para manter sua atividade vital. É sabido que, sem suprimento sanguíneo as dimensões de um tumor não podem exceder 2-3 mm³ devido à hipóxia, levando à morte das células tumorais. Um evento crítico na regulação da angiogênese é a cascata de sinalização que envolvem o fator de crescimento vascular endotelial (*VEGF*). O *VEGF-A* é um fator de sobrevivência de células endoteliais in vivo e in vitro (KARAMYSHEVA, 2008).

O desenvolvimento e a manutenção dos organismos multicelulares dependem de uma interação entre as células que o constituem (GRIVICICH et al., 2007). Vários mecanismos participam deste processo, entre eles a apoptose. A apoptose é

regulada por alguns membros indutores da apoptose e outros inibidores, tendo a família das *IAPs* (proteínas inibidoras de apoptose) um destaque entre eles. A *SURVIVIN* é um membro da família das proteínas inibidoras de apoptose. A expressão desta proteína está correlacionada com o mau prognóstico e comportamento agressivo do tumor. Além disso, a expressão da *SURVIVIN* também é considerada um fator de risco para a resistência ao tratamento de quimioterapia e radiação. As células de gliomas malignos humanos são exemplos de resistência intrínseca a múltiplos estímulos pró-apoptóticos (SASAKI, 2002).

Neste estudo, nós analisamos o perfil de expressão dos genes *VEGF-A* e *SURVIVIN* nos tumores cerebrais, glioblastoma e oligodendroglioma anaplásico. Foi observado que houve um aumento da expressão do *VEGF-A* e da *SURVIVIN*, em ambas as amostras tumorais quando comparadas com o grupo controle.

Chaudhry et al.(2001), em seu estudo observou a vascularização tumoral pela expressão do VEGF. Foram utilizadas 41 amostras de tumores cerebrais primários de origem astrocitária e oligodendroglioma. Através da técnica de imunohistoquímica para detectar a expressão da proteína VEGF em diferentes tipos celulares, os autores encontraram altos níveis de marcação nas amostras. Esses resultados suportam que o VEGF desempenha um papel importante na angiogênese do glioblastoma, astrocitoma anaplásico e oligodendroglioma. Em nossos resultados nós observamos o aumento da expressão do gene *VEGF-A* nos glioblastomas e oligodendrogliomas anaplásicos quando comparado ao grupo controle.

Lucio-Eterovic et al.(2009), também utilizou um anticorpo monoclonal para detecção da expressão da proteína VEGF, afim de investigar os efeitos da terapia antiangiogênica na invasão tumoral e na hipóxia mediante tratamento com anti-VEGF em duas linhagens celulares de glioblastomas. Para isso, os autores

utilizaram várias técnicas, sendo uma delas a técnica de PCR em tempo real. Os mesmos observaram que as linhagens de glioblastoma resistiram ao tratamento antiangiogênico reativando a angiogênese através de um aumento da expressão de fatores pró-angiogênicos e da invasão de áreas do cérebro normal, o que foi visto em associação com o aumento da expressão da matriz das proteínas metaloproteinases *MMP-2*, *MMP-9* e *MMP-12*. O aumento da expressão do gene *VEGF-A* nas amostras de nosso estudo confirmam os achados da literatura e evidenciam o potencial deste gene como terapia alvo para o tratamento de tumores cerebrais. No que se refere aos parâmetros clínicos, gênero e raça nós não observamos correlação com os altos níveis de expressão deste gene. Poucos trabalhos visam esclarecer a relação entre a expressão do *VEGF-A* com dados clínicos dos pacientes.

Vários estudos têm demonstrado o papel do apoptose nos tumores cerebrais, dentre as várias proteínas estudadas tem se destacado a *SURVIVIN*. Em estudo realizado por Kleinschmidt-DeMasters et al. (2003), os autores avaliaram a expressão desta proteína em gliomas. Para isso, utilizaram, dentre outras, as técnicas de imunohistoquímica e PCR em tempo real. O tumor Glioblastoma Multiforme demonstrou níveis moderados da expressão do mRNA da *SURVIVIN* quando comparados com neoplasias malignas epiteliais previamente testada pelos autores. Nós observamos o aumento da expressão do gene *SURVIVIN* tanto nas amostras de glioblastoma como nas amostras de oligodendroglioma anaplásico (KLEINSCHMIDT-DEMASTERS et al., 2003). Os nossos resultados corroboram com os dados da literatura onde o gene *SURVIVIN* se apresentou altamente expresso nas amostras de glioblastomas e oligodendrogliomas anaplásicos quando comparados com o grupo controle.

Yamada et al.(2003), investigaram os níveis de transcrição do mRNA da *SURVIVIN* e suas variantes em nove tipos de células tumorais, incluindo os gliomas, e em 25 amostras de tumor cerebral, através da técnica de PCR em tempo real. Entre as linhagens de células tumorais testadas, as linhagens de GBM apresentaram os maiores níveis de expressão de *SURVIVIN*. Em todas as amostras de tumores cerebrais estudadas, a *SURVIVIN* foi altamente expressa, especialmente em gliomas. Futuros tratamentos envolvendo o silenciamento de genes anti-apoptóticos em tumores malignos tais como os glioblastomas e oligodendrogliomas anaplásicos são promissores, visto que comprovadamente existe uma diferença nos níveis de expressão entre as proteínas pró e anti-apoptóticas. O que vem sendo observado é que existe um aumento na expressão de proteínas anti-apoptóticas como observamos em nossas amostras. Identificar genes envolvidos com o mecanismo de apoptose em tumores cerebrais malignos é muito relevante para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, visando terapia gênica. Nós não observamos nenhuma correlação entre a expressão do gene *SURVIVIN* com os parâmetros clínicos aqui estudados (gênero e raça).

A alteração da expressão de microRNAs vem sendo relacionada a vários tipos tumorais, podendo atuar como oncogenes ou genes supressores de tumor. Em humanos, 50% dos genes de microRNAs estão localizados em sítios genômicos associados ao câncer (CALIN et.al., 2004). Portanto, avaliar os níveis de expressão dos microRNAs nos tumores cerebrais se faz necessário. Nos resultados apresentados no presente estudo sobre a expressão do miR-21 nos glioblastoma e oligodendrogliomas anaplásicos observamos que houve aumento da expressão do mesmo em glioblastomas quando comparados com o grupo controle.

Chan et al. (2005), demonstraram que a alta expressão do miR-21 é uma característica comum dos glioblastomas e que este pode funcionar como um fator anti-apoptótico em cultura de células do glioblastoma multiforme. Chen et al. (2008), utilizaram análise de bioinformática para identificar sítios-alvos do miR-21 em vários genes e observaram que a inibição do miR-21 aumenta os níveis endógenos de *PDCD4*, em linhagens celulares de glioblastomas e a superexpressão do miR-21 inibe a apoptose *PDCD4*-dependente. Estes resultados são compatíveis com os nossos resultados, sendo que em nossas amostras o miR-21 estava superexpresso.

Conti et al. (2009), utilizaram amostras de tumores astrocíticos, graus II-IV em seu estudo e, através das técnicas de PCR em tempo real e Northern Blotting, observaram que os miR-21 e miR-221 estavam superexpressos nas amostras de Glioblastoma Multiforme, quando comparadas com grupo controle. O miR-21 se mostrou superexpresso em todas as amostras do tumor, enquanto os elevados níveis do miR-221 foi encontrado somente em gliomas de alto grau. Ciafrè et al. (2005), examinaram, através da técnica de microarrays, os níveis de expressão global de 245 miRNAs em glioblastomas multiforme. Segundo os autores, os resultados mais interessantes vieram do mi-221, onde se apresentou fortemente aumentado no glioblastoma. Nossos resultados corroboram com a literatura quando observamos o papel não apenas do miR-21, mas também do gene *SURVIVIN* onde ambos estavam altamente expressos, o que consequentemente leva a uma diminuição significativa de morte por apoptose. No entanto, em nosso trabalho o miR-221 não apresentou diferença quando comparados os tumores ao grupo controle, apresentando níveis de expressão semelhante para os dois tipos de tumores (GBM e oligodendroglioma anaplásico).

Os níveis de expressão da p27^{kip1}, um regulador básico do ciclo celular, apresentam-se frequentemente hipoexpressos vários tipos de câncer. Gillies e Lorimer (2007), demonstraram que os níveis da proteína p27^{kip1} se encontram reprimidos por microRNAs nas células tumorais. Os autores usaram a técnica de RNA de interferência para reduzir os níveis de expressão dos microRNAs: miR-221 e miR-222 em linhagens de células de glioblastomas humano e descobriram que isso causou um aumento dos níveis p27^{kip1} e também uma diminuição na proliferação celular. Esses dados demonstram que p27^{kip1} é um alvo direto para os miR-221 e miR-222. Em nosso estudo o miR-222 apresentou-se mais expresso nos glioblastomas em relação ao grupo controle e aos oligodendrogliomas anaplásicos. Estes resultados possibilitam formularmos a hipótese que o miR-222 é importante na angiogênese dos glioblastomas, mas não nos oligodendrogliomas anaplásicos. Ao compararmos os níveis de expressão dos microRNAs: miR-21, miR-221, miR-222 aos dados clínicos sobre o gênero dos pacientes, nenhuma correlação foi encontrada, sendo o mesmo observado para o parâmetro clínico raça, onde nenhuma diferença foi encontrada.

Sobre os microRNAs aqui estudados, ainda não há muitos relatos na literatura a respeito de sua correlação com os oligodendrogliomas anaplásicos. Somente é sabido, a partir de um estudo realizado por Silber et al. (2009) que o miRNA-124 apresentou baixa expressão nesse tipo de tumor em relação aos tecidos cerebrais de controle. Sabendo das influências causadas pelos microRNAs, ainda é necessário que continuem sendo feitas investigações sobre o assunto, afim de elucidar o comportamento dos microRNAs nos tumores cerebrais.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

A avaliação do perfil de expressão dos microRNAs: miR-21, miR-221 e miR-222 em Glioblastomas e Oligodendrogliomas e suas correlações com o mecanismo de angiogênese, através do gene *VEGF-A* e da apoptose através da proteína *SURVIVIN* quando comparado ao tecido não neoplásico, empregando a técnica de PCR em tempo real, permitiu concluir que:

- Os pacientes com diagnóstico de glioblastoma apresentam maior expressão do miR-21 quando comparado com o grupo controle.

- Os pacientes com diagnóstico de glioblastoma apresentam maior expressão do miR-222 em relação ao grupo controle e aos pacientes com diagnóstico de oligodendroglioma anaplásico.

- A expressão do miR-221 não foi diferente entre os grupos estudados.

- Os pacientes com diagnóstico de glioblastoma e oligodendroglioma anaplásico apresentaram maior expressão do gene *VEGF-A* em relação ao grupo controle. Estes resultados sugerem o envolvimento do mecanismo de angiogênese pelo gene *VEGF-A* em glioblastomas e oligodendrogliomas anaplásicos.

- Os pacientes com diagnóstico de glioblastoma e oligodendroglioma anaplásico apresentaram maior expressão do gene *SURVIVIN* em relação ao grupo

controle. Estes resultados sugerem o envolvimento do mecanismo de apoptose pelo gene *SURVIVIN* em glioblastomas e oligodendroglioma anaplásico.

- Não houve correlação entre a expressão dos microRNAs: miR-21, miR-221 e miR-222 e os parâmetros clínicos gênero e raça. O mesmo ocorreu para os genes *VEGF-A* e *SURVIVIN*, onde não houve correlação entre a expressão destes e os parâmetros clínicos estudados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J.R.W.; CLARA, C.A. Astrocitoma pilocítico do cone medular com comportamento maligno. **COLUNA/COLUMNNA**, v. 4, p. 113-168, 2005.

AMARAL, B.A.; NONAKA, C.F.W.; FREITAS, R.A.; SOUZA, L.B.; PINTO, L.P. MicroRNAs – Biogênese, funções e seu papel potencial na carcinogênese oral. **Odontol. Clín.-Cient**, v. 9, p. 05-109, 2010.

AMBROS, V. microRNAs: tiny regulators with great potential. **Cell**, v.107, p. 823-6, 2001.

AMBROSINI, G.; ADIDA, C.; ALTIERI, D.C. A novel anti-apoptosis gene, SURVIVIN, expressed in cancer and lymphoma. **Nat Med**, v.3, p. 917–921,1997.

BATCHELOR, T.T.; BETENSKY, R.A.; ESPOSITO, J.M.; PHAM, L.D.D.; DORFMAN, M.V.; PISCATELLI, N.; JHUNG, S.; RHEE, D.; LOUIS, D.N. Age-dependent Prognostic Effects of Genetic Alterations in Glioblastoma. **Clinical Cancer Research**, v. 10, p. 228-233, 2004.

BÉHIN, A.; HOANG-XUAN, K.; CARPENTIER, A.F.; DELATTRE, J.Y. Primary brain tumours in adults. **Lancet**, v. 361, p. 323-331, 2003.

BRAT, D.J.; KAUR, B.; VAN MEIR, E.G. Genetic modulation of hypoxia induced gene expression and angiogenesis: relevance to brain tumors. **Front Biosci**, v.8, p.100–116, 2003.

BRENNECKE, J.; STARK, A.; RUSSELL, R.B.; COHEN, S.M. Principles of microRNA-target recognition. **PLoS Biol**, v. 3, p. 85, 2005.

BURTON, E.C.; LAMBORN, K.R.; FORSYTH, P.; SCOTT, J.; O’CAMPO, J.; UYEHARA-LOCK, J.; PRADOS, M.; BERGER, M.; PASSE, S.; UHM, J.; O’NEILL, B.P.; JENKINS, R.B.; ALDAPE, K.D. Aberrant p53, mdm2, and Proliferation Differ in Glioblastomas from Long-Term Compared with Typical Survivors. **Clinical Cancer Research**, v. 8, p. 180–187, 2002.

CALIN, G.A.; SEVIGNANI, C.; DUMITRU, C.D.; HYSLOP, T.; NOCH, E.; YENDAMURI, S.; et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 101, p. 2999-3004, 2004.

CIAFRÈ, S. A.; GALARDI, S.; MANGIOLA, A.; FERRACIN, M.; LIU, C.G.; SABATINO, G.; NEGRINI, M.; MAIRA, G.; CROCE, C.M.; FARACE, M.G. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 334, p. 1351-8, 2005.

CHAN, J.A.; KRICHEVSKY, A.M.; KOSIK, K.S. MicroRNA-21 Is an Antiapoptotic Factor in Human Glioblastoma Cells. **Cancer Res**, v.65, p. 6029-6033, 2005.

CHAUDHRY, I.H.; O'DONOVAN, D.G.; BRENCHLEY, P.E.; REID, H.; ROBERTS, I.S. Vascular endothelial growth factor expression correlates with tumor grade and vascularity in gliomas. **Histopathology**, v.39, p. 409-15, 2001.

CHEN, Y.; LIU, W.; CHAO, T.; ZHANG, Y.; YAN, X.; GONG, Y.; QIANG, B.; YUAN, J.; SUN, M.; PENG, X. MicroRNA-21 down-regulates the expression of tumor suppressor PDCD4 in human glioblastoma cell T98G. **Cancer Lett**, v.18, p.197-205, 2008.

CHOSDOL, K.; CHATTOPADHYAY, P.; SINHA, S. Molecular pathways of glial tumorigenesis. **Curr Sci**, v. 82, p. 648-54, 2002.

COLLINS, V.P. Cellular mechanism target during astrocitoma progression. **Cancer letters**, v.188, p.1-7, 2002.

CONTI, A.; AGUENNOUZ, H.; LA TORRE, D.; TOMASELLO, C.; CARDALI, S.; ANGILERI, F.F.; MAIO, F.; CAMA, A.; GERMANO, A.; VITA, G.; TOMASELLO, F. miR-21 and 221 upregulation and miR-181b downregulation in human grade II–IV astrocytic tumors. **J Neurooncol**, v. 93, p.325-32, 2009.

CORSTEN, M.F.; MIRANDA, R.; KASMIEH, R.; KRICHEVSKYAM, WEISSLEDER, R.; SHAH, K. MicroRNA-21 Knockdown Disrupts Glioma Growth In vivo and Displays Synergistic Cytotoxicity with Neural Precursor Cell–Delivered S-TRAIL in Human Gliomas. **Cancer Res**, v. 67, 2007.

COWLAND, J.B.; HOTHER, C.; GRØNBÆK, K. MicroRNAs and cancer. **APMIS**, v. 115, p. 1090-1106, 2007.

DAI, R.; LI, J.; LIU, Y.; YAN, D.; CHEN, S.; DUAN, C.; LIU, X.; HE, T.; LI, H. miR-221/222 suppression protects against endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis via p27Kip1- and MEK/ERK-mediated cell cycle regulation. **Biol. Chem**, V. 391, p. 791–801, 2010.

DAS, A.; TAN, W.; TEO, J.; SMITH, D.R. Expression of SURVIVIN in primary glioblastomas. **J Cancer ResClin Oncol**, v. 128, p. 302–306, 2002.

ENGELHARD, H.H. Current Diagnosis And Treatment Of Oligodendroglioma. **Neurosurg Focus**, v. 12, 2002.

ENGELHARD, H.H.; STELEA, A.; MUNDT, A. Oligodendroglioma and Anaplastic Oligodendroglioma: clinical features, treatment and prognosis. **Surg Neurol**, v. 60, p. 443–56, 2003.

FANTON, C.P.; MCMAHON, M.; PIEPER, R.O. Dual growth arrest pathways in astrocytes and astrocytic tumors in response to Raf-1 activation. **J. Biol Chem**, v. 276, p. 18871-77, 2001.

FARIA, M.H.G.; PATROCÍNIO, R.M.S.V.; RABENHORST, S.H.B. Astrocitomas Uma revisão abrangente. **Arq Bras Neurocir**, v. 25, p. 23-33, 2006.

FENTON, C.; PATEL, A.; DINAUER, C.; ROBIE, D.K.; TUTTLE, R.M.; FRANCIS, G.L. The Expression of vascular endothelial growth factor and the type 1 vascular endothelial growth factor receptor correlate with the size of papillary thyroid carcinoma in children and young adults. **Thyroid**, v. 10, p. 349-357, 2000.

FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. **Endocr Ver**, v. 25, p. 581-611, 2004.

FERREIRA, N.F.; BARBOSA, M.; AMARAL, L.L.F.; MENDONÇA, R.A.; LIMA, S.S. Estudo através da ressonância magnética de 67 casos de glioblastoma multiforme e a ocorrência de metástases. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 62, p. 695-700, 2004.

FILHO, J.C.M.R.; KIMURA, E.T. MicroRNAs: Nova Classe de Reguladores Gênicos Envolvidos na Função Endócrina e Câncer. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 50, 2006.

FRANCO-HERNÁNDEZ, C.; MARTÍNEZ-GLEZ, Y. V.; REY, J.A. Biología molecular de los glioblastomas. **Neurocirugía**, v. 18, p. 373-382, 2007.

FREI, K.; AMBAR, B.; ADACHI, N.; YONEKAWA, Y.; FONTANA, A. Ex Vivo Malignant Glioma Cells Are Sensitive To Fas (Cd95/Apo- 1) Ligand-Mediated Apoptosis. **Journal of neuroimmunology**, v. 87, p. 105-13, 1998.

FREITAS, G.B.L.; HOELZ, L.V.B.; AGUIAR, D.L.M.; ALENCASTRO, R.B.; SAN GIL, R.A.S. Sistema VEGF, um alvo multi-terapêutico **Rev. Virtual Quim**, v. 1, p. 257-269, 2009.

FURNARI, F.B.; FENTON, T.; BACHOO, R.M.; MUKASA, A, STOMMEL JM, STEGH A, HAHN WC, LIGON KL, LOUIS DN, BRENNAN C, CHIN L, DEPINHO RA, CAVENEE WK. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. **Genes Dev**, v. 21, p. 2683-710, 2007.

GILLIES, J.K.; LORIMER, I.A. Regulation of p27Kip1 by miRNA 221/222 in Glioblastoma. **Cell Cycle**, v. 6, p. 2005-9, 2007.

GREGORY, R.I.; SHIEKHATTAR, R. MicroRNA biogenesis and cancer. **Cancer Res**, v. 65, p. 3509-12, 2005.

GRIVICICH, I.; REGNER,A.; ROCHA, A.B. Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.53, p. 335-343, 2007.

HOEBEN, A.N.N.; LANDUYT, B.A.R.T.; HIGHLEY, M.S.; WILDIERS, H.; VAN OOSTEROM, A.T.; BRUIJN, E. Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis. **Pharmacol. Rev**, v. 56, p. 549, 2004.

ICHIMURA, K.; OHGAKI, H.; KLEIHUES, P.; COLLINS, V.P. Molecular pathogenesis of astrocytic tumours. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 70, p. 137–160, 2004.

INCA. 2009. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer – Rio de Janeiro. **Disponível em: www.inca.gov.br Acessado em: 28 de janeiro de 2010.**

JANSEN, M.; YIP, S.; LOUIS, D.N. Molecular pathology in adult gliomas: diagnostic, prognostic, and predictive markers. **Lancet Neurol**, v. 9, p. 717–26, 2010.

KANNO, S.; ODA, N.; ABE, M.; TERAJ, Y.; ITO, M.; SHITARA, K.; TABAYASHI, K.; SHIBUYA, M.; SATO, Y. Roles of two VEGF receptors, Flt-1 and KDR, in the signal transduction of VEGF effects in human vascular endothelial cells. **Oncogene**, v. 19, p. 2138–2146, 2000.

KARAMYSHEVA, A.F. Mechanisms of Angiogenesis. **BIOCHEMISTRY (Moscow)**, v. 73, 2008.

KAUR, B.; TAN, C.; BRAT, D.J.; POST, D.E.; VAN MEIR, E.G. Genetic and hypoxic regulation of angiogenesis in gliomas. **Journal of Neuro-Oncology** v. 70, p. 229–243, 2004.

KAYE, A.H.; WALKER, D.G. Low grade astrocitomas: controversies in management. **Jornal of Clinical Neurosciense**, v. 7, p. 475-483, 2000.

KERBEL, R.S. Tumor Angiogenesis. **N Engl J Med**, v. 358, p. 2039-49, 2008.

KIM, V.N. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 6, p. 376-85, 2005.

KLEIHUES, P.; CAVENNEE, W.K. World Health Organization classification of tumours: **Pathology & Gentetics – Tumours of the Nervous System**. 1st ed. Lion: IARCP press, p. 9-70. 2000.

KLEIHUES, P.; LOIS, D.N.; SCHEITHAUER, B. W.; BERND, W.; RORKE, L.B.; REIFENBERGER, G.; BURGUER, P.C.; CAVENNE, W. K. The WHO classification of tumours of the nervous system. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 61, p. 215-25, 2002.

KLEINSCHMIDT-DEMASTERS, B.K.; DAVID HEINZ, B.S.; MCCARTHY, P.J.; BOBAK, J.B.; LILLEHEI, K.O.; SHROYER, A.L.W.; SHROYER, K.R. Survivin in Glioblastoma. **Arch Pathol Lab Méd**, v. 127, p. 826–833, 2003.

KRAKSTAD, C.; CHEKENYA, M. Survival signalling and apoptosis resistance in glioblastomas: opportunities for targeted therapeutics. **Molecular Cancer**, v.9, p.135, 2010.

KUNG, S.P.L.C.; YANG, A.H.; CHI, C.W.; TSENG, L.M.; WU, C.W. Expression of c-kit, Flk-1, and Flk-2 receptors in benign and malignant tumor of follicular epithelial origin. **J Chin Med Assoc**, v. 69, p. 74-79, 2006.

LUCIO-ETEROVICK, A.K.; PIAO, Y.; DE GROOT, J.F. Mediators of glioblastoma resistance and invasion during antivascular endothelial growth factor therapy, **Clin. Cancer Res.**, v.15, p. 4589-99, 2009.

MAAS, J.W.; GROOTHUIS, P.G.; DUNSELMAN, G.A.; DE GOEIJ, A.F.; STRUYKER BOUDIER, H.A.; EVERS, J.L. Endometrial angiogenesis throughout the human menstrual cycle. **Hum Reprod**, v.16, p.1557-6, 2001.

MONTEIRO, G.T.R.; KOIFMAN, S. Mortalidade por tumores de cérebro no Brasil, 1980-1998. **Cad. Saúde Pública**, v.19, 2003.

NUTT, C.L.; MATTHEWS, R.T.; HOCKFIELD, S. Glial tumor invasion: a role for the upregulation and deavage of BEHAB/brevican. **Neurocientist**, v. 7, p. 113-22, 2001.

OHGAKI, H.; KLEIHUES, P. Genetic Pathway to Primary and Secondary Glioblastoma. **The American Journal of Pathology**, v. 170, p. 1445-1453, 2007.

OZEN, M.; CREIGHTON, C.J.; OZDEMIR, M.; ITTMANN, M. Widespread desregulation of microRNA expression in human prostate cancer. **Oncogene**, v. 27, p. 1788-93, 2008.

PAROLIN, M.B.; REASON, I.J.M. Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares. **Arq.Gastroenterol**, v. 38, 2001.

PATEL, T.; GORES, G.J. Apoptosis in liver transplantation: a mechanism contributing to immune modulation, preservation injury, neoplasia, and viral disease. **Liver Transplant Surg**, v. 4, p. 42-50, 1998.

PREUSSER, M.; HABERLER, C.; HAINFELLNER, J.A. Malignant glioma: Neurophatology and Neurobiology. **Wien Med Wochenschr**, v. 156, p. 332-337, 2006.

SAGE, C.; NAGEL, R.; EGAN, D.A.; SCHRIER, M.; MESMAN, E.; MANGIOLA, A.; ANILE, C.; MAIRA, G.; MERCATELLI, N.; CIAFRÉ, A.S.; FARACE, M.G.; AGAMI, R. Regulation of the p27^{Kip1} tumor suppressor by miR-221 and miR-222 promotes cancer cell proliferation. **European Molecular Biology Organization**, v. 26, 2007.

SASAKI, T.; LOPES, M.B.S.; HANKINS, G.R.; HELM, G.A. Expression of SURVIVIN, an inhibitor of apoptosis protein, in tumors of the nervous system. **Acta Neuropathol**, 2002.

SERRANO, S.V. Influência da transfecção do gene cdkn2a no perfil de expressão gênica de uma linhagem celular de glioblastoma humano. **Tese de Doutorado**, Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2005.

SHI, Y. Mechanisms of Caspase Activation and Inhibition during Apoptosis. **Molecular Cell**, v. 9, p. 459-470, 2002.

SILBER, J.; LIM, D.A.; PETRITSCH, C.; PERSSON, A.I.; MAUNAKEA, A.K.; YU, M.; VANDENBERG, S.R.; GINZINGER, D.G.; JAMES, D.C.; COSTELLO, J.F.; BERGERS, G.; WEISS, W.A.; ALVAREZ-BUYLLA, A.; HODGSON, J.G. miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of Glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells. **BMC Medicine**, v.6, p. 14, 2008.

TORSTEN, P.; WIESTLER, O.D. Molecular neuropathology of astrocytic brain tumor. **J Neuro-Oncol**, v. 35, p.211-22, 1997.

- UNO, M. Estudo das alterações de TP53 em atrocitomas difusos. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2006.
- URBICH, C.; KUEHBACHER, A.; DIMMELER, S. Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis. **Cardiovascular Research**, v. 79, p. 581-8, 2008.
- VAN DEN BENT, M.J. Chemotherapy of oligodendroglial tumours: current developments. **Forum**, v. 10, p. 108–18, 2000.
- XIE, D.; ZENG, Y.X.; WANG, H.J.; WEN, J.M.; TAO, Y.; SHAM, J.S.T.; GUAN, X.Y. Expression of cytoplasmic and nuclear SURVIVIN in primary and secondary human glioblastoma. **British Journal of Cancer**, v. 94, p. 108-114, 2006.
- WONG, ERIC T.; BREM, STEVEN. Antiangiogenesis Treatment for Glioblastoma Multiforme: Challenges and Opportunities. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network (JNCCN)**, v. 6, p. 515-522, 2008.
- YAMADA, Y.; KUROIWA, T.; NAKAGAWA, T.; et al. Transcriptional expression of survivin and its splice variants in brain tumors in humans. **J Neurosurg**, v. 99, p. 738–745, 2003.
- YANG, W.J.; YANG, D.D.; NA, S.; SANDUSKY, G.E.; ZHANG, Q.; ZHAO, G. Dicer is required for embryonic angiogenesis during mouse development. **J Biol Chem**, v. 280, p. 9330-9335, 2005.
- ZHANG, B.; PAN, X.; COBB, G.P.; ANDERSON, T.A. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. **Dev Biol**, v. 302, p. 1-12, 2007.
- ZHEN, H.; ZHANG, X.; HU, P.; YANG, T.; FEI, Z.; ZHANG, J.; FU, L.; HE, X.; MA, F.; WANG, X. Survivin Expression and Its Relation with Proliferation, Apoptosis, and Angiogenesis in Brain Gliomas. **Cancer**, v. 104, 2005.

ANEXOS

ANEXOS

Anexo A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento

Você está sendo admitido(a) neste hospital para o tratamento de uma possível neoplasia cerebral. Como parte de seu tratamento, você será submetido a uma cirurgia. Durante a cirurgia são retirados fragmentos que são utilizados em exames clínico laboratoriais, necessários para um diagnóstico definitivo. O restante do material torna-se sem utilidade.

Para obter um maior conhecimento clínico-científico das neoplasias, o corpo clínico deste hospital (médicos e pesquisadores) desenvolvem pesquisas clínico-científica. Através dessa pesquisa é possível conhecer melhor os mecanismos da doença e, portanto, oferecer novas possibilidades de diagnóstico e tratamento. Ainda mais, este trabalho envolve a busca, em neoplasias, de novos genes ou de lesões genéticas em genes já existentes.

Durante a cirurgia, seu médico cirurgião irá remover o fragmento de neoplasia que não seria usado para diagnóstico. O fragmento será congelado e posteriormente utilizado para pesquisa científica. A obtenção deste fragmento não implicará em riscos adicionais na sua cirurgia e não implicará em aumento no tempo da operação ou na extensão da cirurgia. Se houver consentimento, também será colhida uma amostra de 15ml de sangue para pesquisa. Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP de acordo com o processo HCRP Nº 7645/99.

Este fragmento de tecido será identificado no laboratório por código formado por números e letras e, portanto sua privacidade e identidade serão preservadas. A eventual inclusão dos resultados em publicação científica será feita de modo a manter o anonimato do paciente.

Concordando com a retirada e uso deste fragmento de sua neoplasia, do modo descrito, é necessário esclarecer que você não terá quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre eventuais resultados decorrentes da pesquisa. Se você não concordar em doar o fragmento da peça cirúrgica para pesquisa, sua decisão não influenciará, de nenhum modo, o seu tratamento.

Você receberá uma cópia deste documento e o original será arquivado em seu prontuário.

Caso você tenha questões a fazer sobre este acordo ou alguma dúvida que não tenha sido esclarecida pelo seu médico, por gentileza, entre em contato com a Comissão de Ética do HCFMRP-USP.

Assinatura do(a) paciente ou Representante legal: _____

Nome do(a) paciente: _____

RG-HC do Prontuário Médico: _____

>>> Clinical Genomics <<<

Página 1 de 5

FORMULARIO DE CADASTRO DOS PACIENTES

::Dados de identificação

Q1- Nº de identificação:

Q2- Nome do Paciente:

Q3- Número do prontuário no hospital:

Q4- Hospital:

Q5- Paciente: Internado Ambulatorial

Q6- Diagnóstico principal: Controle Câncer

Q7- CID-10(código): Q8- CID-10(Descrição da doença):

Q9 - Entrevistador:

::Informações Gerais

Q10- Data da Entrevista: dd/mm/aaaa

Q11- Início da entrevista: hh:mm

Q12- Coleta de Sangue: Sim Não Q13- Data: dd/mm/aaaa

Q14 - Sexo: Feminino Masculino

Meu nome é De início eu quero agradecer o(a) senhor(a) por participar nesse estudo. Nós estamos conduzindo um estudo com a finalidade de esclarecer se determinadas características e hábitos de homens e mulheres podem ter relação com algumas doenças. Eu farei várias perguntas cujas respostas serão registradas neste caderno. Devo dizer que tudo que o(a) senhor(a) responder na entrevista será estritamente confidencial e as informações colhidas das inúmeras pessoas que irão participar do estudo serão usadas apenas em relatos científicos, sem nenhuma identificação pessoal.

Os possíveis benefícios desse estudo dependem de que as respostas sejam as mais reais (verdadeiras, sinceras, possíveis). Por favor pergunte se não entender o significado de alguma questão. A qualquer momento o(a) senhor pode se recusar a continuar ou a responder perguntas específicas. Além do questionário o estudo inclui a coleta e uma amostra de sangue.

Se houver necessidade de entrar em contato com o(a) senhor(a), poderia fornecer seu endereço e telefone?

Q15 - Endereço:

Q16 - Bairro:

Q17 - Cidade: Q18 - UF da cidade: Q19 - descrição da cidade:

Q20 - Cep: 00000-000

Q21 - Telefone: (DDD)- 0000-0000

Podemos começar? O(A) Sr(a) poderia assinar essa folha de consentimento?

Q22 -Data de Nascimento: dd/mm/aaaa

Q23 -Qual é

a sua idade?

Qual a sua profissão? (aquela que o(a) sr(a) exerceu por mais tempo): Q24- Q25- Descrição:
 (CBO)

Q26 - Por quanto tempo o(a) sr(a) exerceu esta profissão? anos

Pergunte ao entrevistado como ele/ela se classifica racialmente. Pergunte sobre a raça/origem dos avós.
 O entrevistador decide sobre a classificação racial.

Q27- Raça: Branco Mulato Negro Oriental Índio Q28- (outraraça) Outra:

Q29 - O(A) Sr.(a) já fez algum tratamento para a doença atual? (A doença que o(a) trouxe ao hospital agora?)
 Sim Não

Q30 - Se "Sim", então qual tratamento?

Q31 - Qual a cidade onde o(a) Sr.(a) mora? Q32 - UF da cidade: Q33 - descrição da cidade:

Q34- Há quanto tempo o(a) Sr.(a) mora nessa cidade?(anos) Se menos de 1 ano codifique como 00
 Se o(a) Sr.(a) esta morando há menos de 1 ano nessa cidade, onde o(a) Sr.(a) morava antes?

Q35 - Q36 - UF da cidade: Q37 - descrição da cidade:

Em que cidade/estado/país o(a) sr.(a) nasceu?

Q38 (nacionalidade) - Brasileiro Estrangeiro Q39(onde nasceu) - Q40 - UF da cidade:
 Q41 - descrição da cidade:

Q42(onde nasceu) - País :

Q43 - O(A) sr.(a) estudou em escola? Sim Não

Q44 - Selecione a opção mais elevada quanto ao grau de instrução: Alfabetizado Primário Completo
 Primário Incompleto Secundário Completo Secundário Incompleto Técnico Universitário

:.História de Câncer no Entrevistado e na Família

Quantos irmãos o(a) Sr(a) teve? : Q45 -

Quantos irmãs o(a) Sr(a) teve? : Q46 -

Quantos filhos o(a) Sr(a) teve? : Q47 -

Quantos filhas o(a) Sr(a) teve? : Q48 -

OBS: Segue as opções de preenchimento : Coloque os números e letras em vermelho correspondentes aos campos nos quadros em branco da tabela anexada abaixo :

Tipo de familiar : Próprio(a) Paciente : 01 Mãe: 02 Pai: 03 Irmão: 04 Irmã : 05 Filho: 06 Filha : 07

Vivo/Morto : Vivo: V Morto: M

Tumor : Sim: S Não: N IGN: I

Tabagismo : Sim: S Não: N IGN: I

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
T1	Tipo de familiar	Vivo/Morto	Idade atual ou da morte	Tumor	Tipo de tumor (CID-10)	Idade no diagnostico	Tabagista
L1:	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

L2							
L3							
L4							
L5							
L6							
L7							
L8							
L9							
L10							
L11							
L12							
L13							
L14							
L15							
L16							
L17							
L18							
L19							
L20							
Ln	T1_LnC1	T1_LnC2	T1_LnC3	T1_LnC4	T1_LnC5	T1_LnC6	T1_LnC7

OBS: No banco de dados esta tabela acima está codificada da seguinte forma: Tx_LyCz, onde "x", "y" e "z" representam, respectivamente, "x"

o número da tabela, "y" o número das novas informações incluídas e "z" o número do campo de informações (tipo de familiar,vivo/morto,idade atual ou da morte,tipo do tumor,idade no diagnóstico ou tabagista). Desta forma, o Ly é a localização de uma nova linha e o Cz é a localização da coluna na tabela.

Ex: T1_L3C2 - Tabela1 apresentando informações da linha 3 (y=3) da tabela de história familiar, e da 2ª coluna (C2), que representa o campo com informações de Vivo/Morto.

:::História de Tabagismo

Q49 - O(A) Sr.(a) fuma ou já fumou em média 1 cigarro, charuto ou cachimbo, diariamente, pelo menos por 1 ano?

Sim, ainda fuma Nunca fumou Somente no passado
(se parou de fumar há menos de 12 meses assinalar(sim, ainda fuma))

Gostaríamos que o(a) sr.(a) descrevesse os períodos de sua vida em que fumou cigarro, charuto ou cachimbo, as quantidades que fumou e outros detalhes. Por favor, tente lembrar as mudanças mais importantes quanto à quantidade e tipo de cigarro. Ignore as mudanças que ocorreram por períodos curtos (menos de 1 ano).

Nota para o entrevistador: Evite a superposição de anos para consumo do mesmo tipo de cigarro, por exemplo: utilize 30-40, 41-45 ao invés de 30-40, 40-45.

OBS: Segue as opções de preenchimento : Coloque os números em vermelho correspondentes aos campos nos quadros em branco da tabela anexada abaixo : Tipo de Tabaco : Cigarro : 01 Charuto : 02 Cachimbo : 03 Cigarro de palha: 04

Que tipo de tabaco o(a) sr.(a) fuma ou já fumou?

	C1	C2	C3	C4
T2	Tipo de Tabaco	Idade de Início	idade que Parou	Nº por Dia
L1	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
L2	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
L3	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
L4	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
L5	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Ln	T2 LnC1	T2 LnC2	T2 LnC3	T2 LnC4

OBS: No banco de dados esta tabela acima está codificada da seguinte forma: Tx_LyCz, onde "x", "y" e "z" representam,

respectivamente, "x" o número da tabela, "y" o número das novas informações incluídas e "z" o número do campo de informações (tipo de tabaco, idade de início, idade que parou, nº por dia). Desta forma, o Ly é a localização de uma nova linha e o Cz é a localização da coluna na tabela. Ex: T2_L3C2 - Tabela2

apresentando informações da linha 3 (y=3) da tabela de tabaco, e da 2ª coluna (C2), que representa o campo com informações de idade de início.

:: Hábitos de Bebida

Q50 - O(A) Sr(a) já tomou (ingeriu) bebidas alcoólicas pelo menos 1 vez por mês?

Sim, ainda bebe Nunca Só no passado

(se parou nos últimos 12 meses, a resposta é (sim ainda bebe)

Q51 - Quando o(a) Sr(a) costuma beber(ou bebia)?

Nas refeições Entre as refeições Aos finais de semana Ambos

Descreva os períodos de sua vida durante os quais o(a) tomou bebidas alcoólicas. Por favor, tente resumir as mudanças mais importantes em sua vida em relação à quantidade e tipo de bebida. Ignore quaisquer mudanças ocorridas durante curtos períodos de tempo (menos de 1 ano), ou bebidas consumidas ocasionalmente.

NOTA PARA O ENTREVISTADOR: Evite a superposição de anos de consumo de uma mesma bebida, por exemplo: utilize 30-40,41-45 ao invés de 30-40,40-45. perguntar separadamente para cada bebida.
OBS. Destilados: uísque, conhaque, cachaça e vodca.

OBS: Segue as opções de preenchimento : Coloque os números em vermelho correspondentes aos campos nos quadros em branco da tabela anexada abaixo :

Bebida : Vinho : 01 Cerveja : 02 Destilados : 03

Unidade: Copo pequeno -50ml: 01 Copo médio -100ml: 02 Copo grande -250ml: 03 1/2 garrafa pequena ou lata - 330ml: 04

Garrafa 700-750ml : 05 Garrafa - 1L : 06

Por : Dia : 01 Semana : 02 Mês : 03

	C1	C2	C3	C4	C5	C6
T3	Bebida	Idade de Início	Idade que Parou	Unidade	Unidade Consumidas	Por
L1	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
L2	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
L3	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
L4	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
L5	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

Anexo B – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



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

www.hcrp.usp.br

CÓPIA



Ribeirão Preto, 14 de dezembro de 2009

Ofício nº 4209/2009
CEP/MGV

Prezados Senhores,

O trabalho intitulado **“PERFIL DE EXPRESSÃO DOS miRNAs:mir-221, mir- 222 e mir-21 E SUA CORRELAÇÃO COM O MECANISMO DA ANGIOGÊNESE PELO FATOR DE CRESCIMENTO VASCULAR ENDOTELIAL (VEGF) EM GLIOBLASTOMAS”** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 300ª Reunião Ordinária realizada em 07/12/2009 e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 9274/2009.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.


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

Ilustríssimos Senhores

PROF. DR. CARLOS GILBERTO CARLOTTI JUNIOR
LUDMILLA COSTA VELOSO DE AGUIAR (Aluna)
Depto. de Cirurgia e Anatomia