

Isabella Gomes

**IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES PREDITIVOS DA SOBREVIVÊNCIA AO TRATAMENTO COM
TEMOZOLOMIDA NO GLIOBLASTOMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Rui Manuel Reis
Coorientador: Dr. Marcus M. Matsushita

Barretos, SP
2020

Isabella Gomes

**IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES PREDITIVOS DA SOBREVIVÊNCIA AO TRATAMENTO COM
TEMOZOLOMIDA NO GLIOBLASTOMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Rui Manuel Reis
Coorientador: Dr. Marcus M. Matsushita

Barretos, SP
2020

G633i Gomes, Isabella.

Identificação de biomarcadores preditivos da sobrevida ao tratamento com temozolomida no glioblastoma. / Isabella Gomes. - Barretos, SP - 2020.
99 f. : il.

Orientador: Rui Manuel Vieira Reis.

Coorientador: Marcus de Medeiros Matsushita.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos, 2020.

1. Biomarcadores de prognóstico. 2. Glioblastoma. 3. NanoString. 4. MGMT. 5. Temozolomida. I. Autor. II. Reis, Rui Manuel Vieira. III. Matsushita, Marcus de Medeiros. IV. Título.

CDD 616.994

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada por Martins Fideles dos Santos Neto CRB 8/9570
Biblioteca da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos

FOLHA DE APROVAÇÃO

Isabella Gomes

Identificação de biomarcadores preditivos da resposta ao tratamento com temozolomida no glioblastoma.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação PIO XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde - Área de Concentração: Oncologia

Data da aprovação: 17/04/2020

Banca Examinadora:

Dr. Jeremy Squire

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Dr. Vinicius Duval da Silva

Instituição: Hospital do Câncer de Barretos

Dr. Rui Manuel Vieira Reis

Orientador/Presidente da Banca

SUPORTE À PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO

Este trabalho recebeu apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) através de Auxílio à Pesquisa – Regular (Processo número 2018/10511-6).

As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.

DECLARAÇÃO DE RESPONSABILIDADE DOS PESQUISADORES

“Esta dissertação foi elaborada e está apresentada de acordo com as normas da Pós-Graduação do Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII, baseando-se no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Oncologia e no Manual de Apresentação de Dissertações e Teses do Hospital de Câncer de Barretos. Os pesquisadores declaram ainda que este trabalho foi realizado em concordância com o Código de Boas Práticas Científicas (FAPESP), não havendo nada em seu conteúdo que possa ser considerado como plágio, fabricação ou falsificação de dados. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos. Embora o Núcleo de Apoio ao Pesquisador do Hospital de Câncer de Barretos tenha realizado as análises estatísticas e orientado sua interpretação, a descrição da metodologia estatística, a apresentação dos resultados e suas conclusões são de inteira responsabilidade dos pesquisadores envolvidos. Os pesquisadores declaram não ter qualquer conflito de interesse relacionado a este estudo.”

DEDICATÓRIA

*Para **Cesar, Silvia e Carlos** que me
acompanharam nessa jornada e
dão sentido à minha vida.
Sem vocês nada disso seria possível.*

AGRADECIMENTOS

Com grande alegria e gratidão, completo mais um ciclo da minha vida. E nada seria possível sozinha.

Primeiramente, agradeço a Deus que me iluminou e guiou meus passos nessa caminhada.

Agradeço imensamente ao Prof. Dr. Rui Reis, meu orientador, por sua disponibilidade e compreensão desde a primeira conversa; onde ao me dizer que fazes o que gosta trouxe brilho aos meus olhos, me fazendo acreditar que eu também poderia. Por todos os ensinamentos acadêmicos e de vida. Obrigada por me guiar nessa jornada fantástica. Serei sempre grata por todas as oportunidades a mim oferecidas.

Ao meu coorientador Dr. Marcus de Medeiros Matsushita, por sua ajuda.

Aos meus pais Valdecir Cesar Gomes e Silvia Maria Rocha Gomes por todos os esforços para garantir que eu continuasse no caminho dos estudos. Pelos exemplos de vida, educação que me ofereceram e por quem me tornei. Tudo o que sou, devo a vocês.

Ao Carlos, por compreender todos os meus sentimentos. Por me incentivar e nunca permitir que eu duvidasse da minha capacidade. Obrigada pelo carinho e por trazer meus pés ao chão nos momentos difíceis. Por me manterem em pé e não me deixarem desistir, amo vocês.

À Carla, minha irmã de alma, pelas alegrias, tristezas e dores compartilhadas. Obrigada pelo carinho, puxões de orelha e sua capacidade de me trazer paz em cada conversa.

A Dra. Mariana Bizarro dos Reis por me acolher. Por sua paciência, disposição em me ensinar e ajudar sempre que precisei. Obrigada por enxugar minhas lágrimas nos momentos de desespero.

A Dra. Adriane Feijó Evangelista, sem palavras para agradecer. Obrigada por toda a ajuda, ensinamentos e carinho. Você tem minha admiração!

A Dra. Gisele Caravina de Almeida, pela ajuda e disponibilidade em me ensinar.

A Dra. Gisele Melo Gonçalves, por sua ajuda e envolvimento no projeto.

Aos amigos, Bruna Aparecida Crivellari, Raquel Descie Veraldi Leite, Bruna Pereira Sorroche, Renan de Jesus Teixeira, Renata Barbosa Vahia Abreu, Thais Moraes, Edilene Santos de Andrade, Karina dos Santos, Ana Luiza Vicente, pelo carinho, lágrimas e ajuda nos momentos de desespero. Pelas pausas para o café, onde recuperávamos o fôlego para

continuar. Vocês tornaram essa caminhada melhor!

Ao Rafael Vanhoz por toda ajuda e amizade.

Ao Dr. Bruno Costa e Dr. Vinicius Duval, pela disponibilidade e contribuições nas bancas de acompanhamento.

Agradeço também aos biólogos, Departamento de patologia, Diagnóstico molecular, aos estatísticos do NEB. Também a Pós-graduação por todo o suporte.

E por fim, ao Hospital de Câncer de Barretos por abrir as portas para a pesquisa e aos pacientes; pois, sem eles não seria possível.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Epidemiologia	1
1.2 Histologia.....	2
1.3 Tratamento.....	4
1.4 Glioblastoma: subgrupos moleculares	4
1.5 Alterações moleculares.....	7
1.6 Mecanismos de modelação da resposta terapêutica	10
1.7 Genes relacionados ao prognóstico e quimioresistência.....	13
2. JUSTIFICATIVA	15
3. HIPÓTESE	15
4. OBJETIVOS	16
4.1 Objetivo geral.....	16
4.2 Objetivos específicos	16
5. MATERIAL E MÉTODOS	17
5.1 Delineamento do estudo	17
5.2 Aspectos éticos	17
5.3 Critérios de inclusão	17
5.4 Critérios de exclusão.....	18
5.5 População de estudo	18
5.6 Análise molecular	19
5.6.1 Análise da expressão proteica de ATRX e <i>IDH1</i> R132H	19
5.6.2 Extração de DNA de material parafinado	20
5.6.3 Análise de mutações de <i>TERT</i>	21
5.6.4 Metilação de <i>MGMT</i>	22
5.6.5 Extração de RNA total de material parafinado.....	22
5.6.6 Análise da expressão gênica das vias de reparo e danos no DNA pela plataforma nCounter – NanoString.....	23
5.7 Análises de Bioinformática.....	25
5.8 Análise Estatística.....	26
6. RESULTADOS	28
6.1 Perfil molecular	31
6.1.1 Análise da expressão proteica de <i>IDH1</i> R132H e ATRX	31
6.1.2 Análise da metilação do <i>MGMT</i>	34
6.1.3 Análise de mutações em <i>TERT</i>	36

6.2 Análise da expressão em genes de danos e vias de reparo em GBM.....	38
6.3 Análise da expressão em genes de danos e vias de reparo e impacto clínico-patológico em GBM <i>IDH^{WT}</i>	43
6.4 Impacto clínico e molecular na sobrevida dos pacientes.....	46
7.DISSCUSSÃO.....	55
8.CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS.....	60
ANEXOS	70
Anexo A – Ficha de coleta.....	70
Anexo B – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.	76
Anexo C – Lista de genes do painel <i>nCounter Vantage™ RNA Panel for DNA Damage and Repair</i>	77

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Incidência e mortalidade de tumores do Sistema Nervoso Central para a América do Sul no ano de 2018. À direita incidência de novos casos e à esquerda mortalidade por câncer do SNC para cada 100.000 habitantes de 20+85 anos, ambos os sexos. 1
- Figura 2** - Distribuição dos tumores cerebrais primários e outros tumores do SNC de acordo com comportamento e histologia. 2
- Figura 3** - Imagem representativa de tumor primário de GBM corado por hematoxilina-eosina (HE). Em **A)** Atipia nuclear (HE, 100x). **B)** Atipia nuclear (HE, 400x). **C)** Necrose (HE, 100x). **D)** Proliferação microvascular (HE, 100x). 3
- Figura 4** - Imagem representativa de tumor primário de GBM corado por hematoxilina-eosina (HE, 400x). Em **A)** e **B)** Satelitose. 4
- Figura 5** - Classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) de 2016 com os três principais grupos. 6
- Figura 6** - Vias metabólicas de uma célula tumoral cerebral portadora de mutação em IDH1, causando o acúmulo de um metabólito aberrante, o 2-hidroxioglutarato, levando a metilação do DNA e histonas. 7
- Figura 7** - A atividade da telomerase neutraliza o encurtamento dos telômeros que leva à senescência celular e o mecanismo alternativo de alongamento de telômeros independente da telomerase (ALT). 8
- Figura 8** - Interação de Temozolomida (TMZ) com mecanismos de reparo do DNA em glioblastomas. MGMT: O-6-metilguanina DNA metiltransferase. MMR: mismatch repair; BER: base excision repair. 11
- Figura 9** – Grupos de sobrevivência. 19
- Figura 10** - Tecnologia nCounter® (NanoString). 23
- Figura 11** - Imunoistoquímica para expressão proteica de IDH1 R132H. **A)** Amostra com expressão negativa (DAB e HE, 100x). **B)** Amostra com expressão negativa (DAB e HE, 200X). **C)** Amostra com expressão negativa (DAB e HE, 400X). **D)** Amostra positiva (DAB e HE, 100X). **E)** Amostra positiva (DAB e HE, 200X). **F)** Amostra positiva (DAB e HE, 400X). 31
- Figura 12** - Imunoistoquímica para expressão proteica de ATRX. **A)** Amostra com expressão negativa (DAB e HE, 100x). **B)** Amostra com expressão negativa (DAB e HE, 200X). **C)**

Amostra com expressão negativa (DAB e HE, 400X). D) Amostra positiva (DAB e HE, 100X). E) Amostra positiva (DAB e HE, 200X). F) Amostra positiva (DAB e HE, 400X).	32
Figura 13 - Kaplan-Meier – A) Curvas de sobrevida global em meses segundo tipo de doença. B) Curvas de sobrevida global em meses segundo a expressão de ATRX.....	34
Figura 14 - Pirogramas representativos da análise de metilação no gene <i>MGMT</i> em GBM. Sequência analisada: YGAYGTTYGTAGGTTTTYGT. A) <i>MGMTp</i> metilado. B) <i>MGMTp</i> sem a metilação.	35
Figura 15 - Metilação no promotor de <i>MGMT</i> . A) Distribuição dos níveis de metilação no promotor de <i>MGMT</i> nos casos metilados ($\geq 10\%$ metilação) e casos não metilados ($< 10\%$ metilação). B) Porcentagem de alelos metilados em cada CpG investigada (média).	36
Figura 16 - Eletroferogramas representativos do Sequenciamento (Sanger). A) Amostra <i>TERTp</i> ^{WT} ; B) Amostra com mutação em c.-124: G>A; C) Amostra com mutação em c.-146: G>A.	37
Figura 17 - Pirogramas representativos do Sequenciamento. A) Amostra <i>TERTp</i> ^{WT} ; B) Amostra com mutação em c.-124: G>A; C) Amostra com mutação em c.-146: G>A.	38
Figura 18 - <i>Heatmap</i> - expressão diferencial entre GBM primário e GBM secundário.	39
Figura 19 - Análise de enriquecimento para o processo de reparo de excisão de nucleotídeos. Os genes significativos nesse processo encontram-se destacados com asterisco.	41
Figura 20 - Análise de enriquecimento para o processo de reparo de excisão de bases. Os genes significativos nesse processo encontram-se destacados com asterisco.....	42
Figura 21 - Análise de enriquecimento para o processo de anemia de Fanconi. Os genes significativos nesse processo encontram-se destacados com asterisco.....	42
Figura 22 - <i>Heatmap</i> dos transcritos diferencialmente expressos entre pacientes com alta sobrevida em relação aos pacientes com baixa sobrevida, com nível de significância de $p = 0,01$ e Fold-change $\geq 1,5$	43
Figura 23 - <i>Heatmap</i> dos transcritos diferencialmente expressos entre pacientes com sobrevidas de 2-10 e 25-82 meses, com nível de significância de $p = 0,05$ e Fold-change $\geq 1,5$	44
Figura 24 - Teste anova para analisar a expressão do gene MPG nos quatro grupos de sobrevida.	44

Figura 25 - Teste Anova para analisar a expressão diferencial dos genes <i>MGMT</i> e <i>CDK7</i> nos quatro grupos de sobrevida.	45
Figura 26 - Gráfico de dispersão da expressão x metilação do gene <i>MGMT</i>	45
Figura 27 - Kaplan-Meier – A) Curvas de sobrevida global em meses segundo tipo da 1ª cirurgia. B) Curvas de sobrevida global em meses segundo a quantidade de ciclos de TMZ. C) Curvas de sobrevida global em meses segundo a metilação de <i>MGMT</i> . D) Curvas de sobrevida global em meses segundo a expressão de mRNA de <i>MGMT</i> ...	50
Figura 28 - Kaplan-Meier – Curvas de sobrevida global em meses segundo a mutação no promotor de <i>TERT</i>	51
Figura 29 - Kaplan-Meier – A) Curvas de sobrevida livre de progressão segundo o tipo de resposta. B) Curvas de sobrevida livre de progressão em meses segundo a metilação de <i>MGMT</i>	52
Figura 30 - String – das interações proteicas.	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Subdivisão dos grupos moleculares de glioblastoma.....	5
Tabela 2 - Principais alterações entre sobrevida de curto e longo prazo.....	14
Tabela 3 - Painel utilizado para análise de expressão gênica. Este painel avalia a expressão de genes envolvidos no dano e vias de reparo do DNA.	24
Tabela 4 - Dados demográficos e clínico-patológicos de pacientes portadores de Glioblastoma coletados pela análise de prontuários no Serviço de Arquivos Médicos e Estatística do Hospital de Câncer de Barretos (SAME).	29
Tabela 5 - Resultados da expressão proteica de IDH1.....	32
Tabela 6 - Resultados da expressão proteica de ATRX.	33
Tabela 7 - Resultados da metilação de MGMT.	35
Tabela 8 - Resultados da mutação de TERT.	36
Tabela 9 - Processos de reparo de DNA enriquecidos que se encontraram induzidos nos diferentes intervalos de sobrevida após tratamento com temozolomida.....	40
Tabela 10 - Processos de reparo de DNA enriquecidos que se encontraram reprimidos nos diferentes intervalos de sobrevida após tratamento com temozolomida.....	40
Tabela 11 - Dados demográficos e clínico-patológicos de pacientes portadores de glioblastoma primário tratados com temozolomida associados à sobrevida.....	48
Tabela 12 - Análise univariada dos genes diferencialmente expressos.....	52
Tabela 13 - Análise multivariada dos genes diferencialmente expressos associados a sobrevida global.....	53
Tabela 14 - Análise multivariada.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	Alongamento de telômeros independente da telomerase
BER	<i>Base excision repair</i>
CpG	Citosina precedida de guanina
DAB	Diaminobenzidina
DAPI	<i>4, 6-diamidino-2-fenilindol</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECOG	Performance Status (Eastern Cooperative Oncology Group)
FFPE	Fixado em formalina e parafinado (<i>Formalin-Fixed Paraffin-Embedded</i>)
FISH	Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência (<i>Fluorescence in situ hybridization</i>)
GBM	Glioblastoma
Gy	<i>Gray</i>
HE	<i>Hematoxilina eosina</i>
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HCB	Hospital de Câncer de Barretos
INCA	Instituto Nacional do Câncer
KPS	<i>Karnofsky Performance Status</i>
MMR	<i>Mismatch Repair</i>
mRNA	RNA mensageiro
PCR	Reação em cadeia da polimerase
TMZ	Temozolomida
WHO	<i>World Health Organization</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

μL	Microlitros
mL	Mililitros
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
%	Porcentagem
<	Menor
>	Maior
\leq	Menor ou igual
\geq	Maior ou igual

RESUMO

Identificação de biomarcadores preditivos da sobrevida ao tratamento com temozolomida no glioblastoma.

Gomes, I., Dissertação de Mestrado, Hospital de Câncer de Barretos, 2020.

INTRODUÇÃO: O glioblastoma (GBM) é um tumor altamente agressivo e invasivo associado a elevadas taxas de mortalidade e curta sobrevida. O tratamento padrão consiste na ressecção cirúrgica do tumor, acompanhado por radioterapia e quimioterapia associada ao uso de temozolomida (TMZ), um agente alquilante de DNA que tem mostrado aumento na sobrevida global de pacientes portadores de GBM. Entretanto, a resposta ao tratamento é bastante heterogênea e imprevisível. Nesse sentido, a investigação de biomarcadores preditivos de resposta à TMZ é de suma importância, para uma medicina mais precisa e eficaz. **OBJETIVOS:** O objetivo deste estudo foi identificar um perfil gênico de resposta à temozolomida em pacientes com glioblastoma. Os pacientes foram caracterizados molecularmente, e os dados clínicos, e moleculares foram associados com a assinatura gênica. **MÉTODOS:** Foram incluídas no estudo 107 amostras de GBM fixadas em formalina e embebidas em parafina (FFPE) de pacientes tratados com cirurgia, radioterapia e TMZ no Hospital de Câncer de Barretos. A análise de metilação em *MGMT*, foi realizada através de pirosequenciamento. As mutações em *TERT* foram avaliadas por metodologia de sequenciamento de Sanger e pirosequenciamento. A expressão proteica de ATRX e IDH1 R132H foram avaliadas por imunohistoquímica. A avaliação da expressão (mRNA) de 180 genes envolvidos no reparo do DNA foi realizada utilizando a plataforma nCounter – NanoString utilizando o painel *DNA Damage and Repair DNA*. **RESULTADOS:** A sobrevida global mediana foi de 17 meses, variando de 02-83 meses. Baseado na expressão de IDH1, os casos foram subclassificados em GBM primários (*IDH^{WT}*) 85% (91/107) e GBM secundários (*IDH^{MUT}*) (15,0%, 16/107). A perda de expressão de ATRX foi encontrada em 6,6% (6/91) dos GBMs *IDH^{WT}* e 56,2% (9/16) dos GBMs *IDH^{MUT}*. Mutações no promotor de *TERT* foram observadas em 70,5% (48/68) de GBMs *IDH^{WT}* e em nenhum (0%) dos 8 GBMs *IDH^{MUT}* conclusivos. A metilação no promotor de *MGMT* foi identificada em 54,0% (33/61) dos GBMs *IDH^{WT}* e 62,5% (10/16) dos GBMs *IDH^{MUT}*. A técnica

nCounter foi conclusiva em todas as 107 amostras. As análises subsequentes foram realizadas somente no subgrupo de GBM primário (*IDH^{WT}*) que foi dividido em 4 grupos de acordo com a sua sobrevida: grupo 1) 02-10 meses; grupo 2) 11-16 meses; grupo 3) 17-24 meses; e grupo 4) 25-83 meses. A análise gênica identificou 17 genes (*CDK7, DDB2, ERCC1, ERCC3, ERCC4, ERCC5, ERCC6, ERCC8, EXO1, FANCA, FANCB, FANCC, MGMT, NEIL1, NEIL2, PCNA e POLD4*) diferencialmente expressos entre os pacientes com sobrevida de longa (>16 meses SG) e curta (<16 meses SG). Os genes *MGMT* e *CDK7* foram diferencialmente expressos entre os 4 grupos de sobrevida, com níveis mais altos de expressão nos grupos de 2-10 meses e 11-16 meses. No grupo de 2-10 meses a via de reparo BER estava induzida; enquanto as vias NER e anemia Fanconi reprimidos. Encontramos maior sobrevida em pacientes tratados com ≥ 6 ciclos de TMZ (mediana: 18 meses, IC95% 16,0-19,9 vs mediana: 10 meses, IC95% 7,9-12,0), ($P < 0,001$). A metilação em *MGMT* foi significativamente associada a maior sobrevida global (mediana: 18 meses, IC 95% 16,1-19,812 vs mediana: 12 meses, IC 95% 9,0-14,9), ($P = 0,0001$). Observamos uma associação significativa entre metilação de *MGMT* e a sua baixa expressão gênica por NanoString ($p < 0,0001$). Na análise multivariada, 4 genes (*MGMT, ERCC6, EXO1* e *POLD4*) foram marcadores independentes de sobrevida dos GBM primários. **CONCLUSÃO:** Realizamos a classificação tumoral hoje preconizada pela OMS para pacientes com GBM. A metilação de *MGMT* se mostrou um preditor significativo da sobrevida em pacientes tratados com TMZ. Encontramos uma assinatura genética de 4 genes, significativamente associados com a sobrevida de pacientes com GBM primários, tratados com temozolomida.

PALAVRAS-CHAVE: Biomarcadores de prognóstico, Glioblastoma, NanoString, MGMT, Temozolomida.

ABSTRACT

Identification of predictive biomarkers of survival in temozolomide treatment in glioblastoma.

Gomes, I., Master Thesis, Barretos Cancer Hospital, 2020.

INTRODUCTION: Glioblastoma (GBM) is a highly aggressive and invasive tumor associated with high mortality and low survival rates. The standard treatment consists of surgical resection of tumors, accompanied by radiotherapy and chemotherapy with the use of temozolomide (TMZ), a DNA alkylating agent that has increased the overall survival of patients with GBM. However, the response to the treatment is very heterogeneous and unpredictable. In this sense, an investigation of predictive biomarkers of response to TMZ is of paramount importance, for a more accurate and effective medicine. **OBJECTIVES:** The aim of this study was to identify a genetic profile of response to temozolomide in patients with glioblastoma. Patients were characterized molecularly, and clinical and molecular data were associated with genetic signature. **METHODS:** The study included 107 formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) samples from patients with GBM treated with TMZ at the Barretos Cancer Hospital. The methylation analysis of *MGMT* was carried out by pyrosequencing. *TERT* mutations were evaluated using Sanger sequencing and pyrosequencing methodology. The protein expression of ATRX and IDH1 R132H was evaluated by immunohistochemistry. The mRNA expression profile of 180 genes involved in DNA repair was performed using the nCounter - NanoString platform using the commercial DNA Damage and Repair DNA panel. **RESULTS:** The median overall survival was 17 months, ranging from 02 to 83 months. Based on the expression of IDH1, the cases were subclassified into primary GBM (IDH^{WT}) 85% (91/107) and secondary GBM (IDH^{MUT}) (15.0%, 16/107). Loss of ATRX expression was found in 6.6% (6/91) of the GBMs IDH^{WT} and 56.2% (9/16) of the GBMs IDH^{MUT}. Mutations in *TERT* promoter were observed in 70.5% (48/68) of the IDH^{WT} GBMs and none (0%) of the 8 conclusive IDH^{MUT} GBMs. Methylation in *MGMT* promoter was identified in 54.0% (33/61) of the GBMs IDH^{WT} and 62.5% (10/16) of the GBMs IDH^{MUT}. The gene expression profile was conclusive in all 107 cases. The subsequent analyzes were performed only in the subgroup of primary GBM (IDH^{WT}), which was divided

into 4 groups according to their survival: group 1) 02-10 months; group 2) 11-16 months; group 3) 17-24 months; and group 4) 25-83 months. The genetic analysis identified 17 genes (*CDK7*, *DDB2*, *ERCC1*, *ERCC3*, *ERCC4*, *ERCC5*, *ERCC6*, *ERCC8*, *EXO1*, *FANCA*, *FANCB*, *FANCC*, *MGMT*, *NEIL1*, *NEIL2*, *PCNA* and *POLD4*) differentially expressed among patients with long survival (> 16 months SG) and short (<16 months SG). The *MGMT* and *CDK7* genes were differentially expressed between the 4 survival groups, with higher levels of expression in the groups from 2 to 10 months and 11 to 16 months. In the group 2 to 10 months after the BER repair, it was induced; while the NER and Fanconi anemia repressed. Longer survival was found in patients undergoing ≥ 6 cycles of TMZ (mean: 18 months, 95% CI 16.0-19.9 vs mean: 10 months, 95% CI 7.9-12.0), ($P < 0.001$). Methylation in *MGMT* was associated with higher overall survival (mean: 18 months, 95% CI 16.1-19.812 vs mean: 12 months, 95% CI 9.0-14.9), ($P = 0.0001$). We observed a significant association between the methylation of *MGMT* and its low genetic expression by NanoString ($p < 0.0001$). In the multivariate analysis, 4 genes (*MGMT*, *ERCC6*, *EXO1* and *POLD4*) were independent markers of survival of the primary GBM.

CONCLUSION: We performed the molecular classification recommended today by the WHO for patients with GBM. Methylation of *MGMT* showed a significant predictor of survival in patients undergoing TMZ. He found a genetic signature of 4 genes, associated with patients diagnosed with primary GBM, using temozolomide.

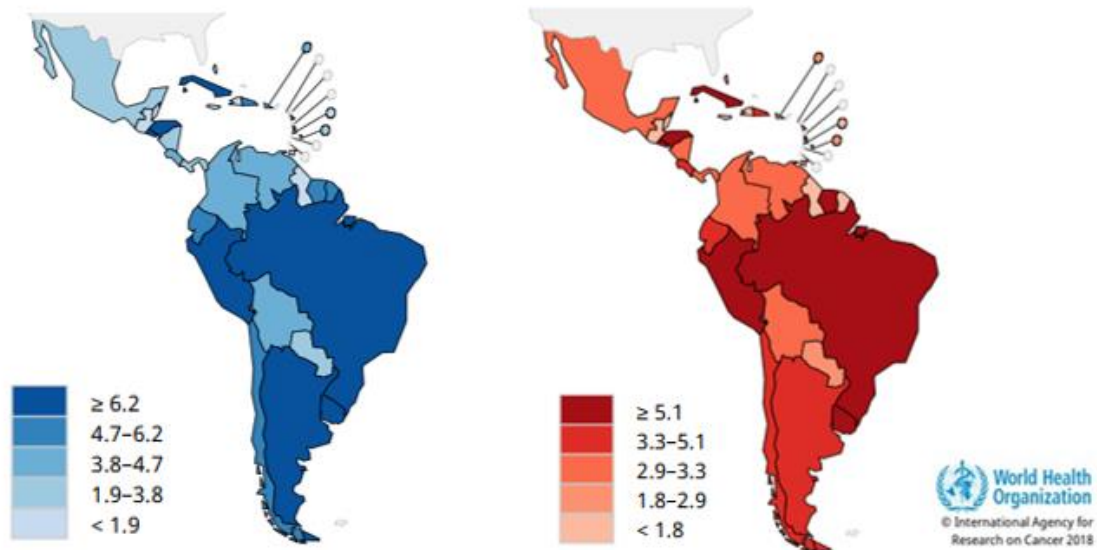
KEYWORDS: Prognostic biomarkers, Glioblastoma, NanoString, Temozolomide.

1.INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia

De acordo com o Globocan 2018 (último acesso em 06 de fevereiro de 2020), a taxa de incidência dos tumores do sistema nervoso central (SNC) no Brasil em ambos os sexos, de 20 a mais de 85 anos é de 7,2 para cada 100.000 habitantes em 2018. Estes tumores também apresentam elevada taxa de mortalidade, sendo de 6,5 também em ambos os sexos no Brasil para cada 100.000 habitantes (Figura 1) ¹.

Segundo estimativas da base nacional do INCA, no Brasil, são estimados 5.870 novos casos de câncer do Sistema Nervoso Central em homens e 5.220 em mulheres para cada ano do triênio 2020-2022; o que corresponde a um risco estimado de 5,61 casos novos para cada 100 mil homens e 4,85 novos casos a cada 100 mil mulheres. Ocupando a 10ª posição dos tipos de tumores mais incidentes estimados para 2020 em mulheres ².



Fonte: Modificado de Globocan 2019 ¹.

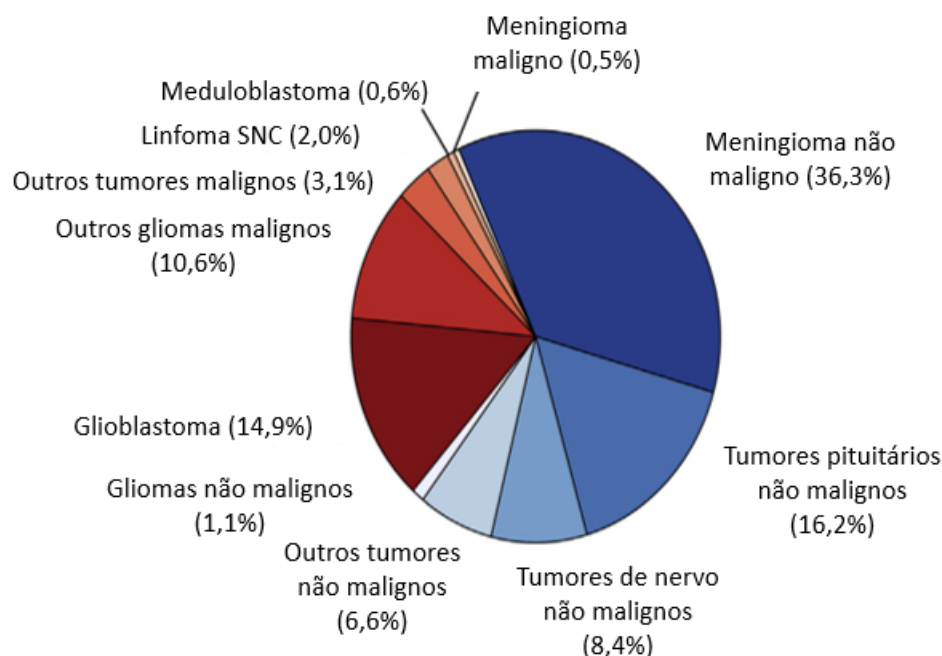
Figura 1 - Incidência e mortalidade de tumores do Sistema Nervoso Central para a América do Sul no ano de 2018. À direita incidência de novos casos e à esquerda mortalidade por câncer do SNC para cada 100.000 habitantes de 20+85 anos, ambos os sexos.

Entre tumores do SNC (Figura 2), estão os gliomas, representando aproximadamente 80% de todos os tumores cerebrais malignos e mais da metade dos diagnósticos de gliomas

são glioblastomas (GBMs) ³.

Glioblastoma (GBM) é o tumor cerebral mais frequente em adultos, correspondendo a aproximadamente 15% de todas as neoplasias intracranianas e aproximadamente 45-50% de todos os tumores cerebrais primários ⁴. É o subtipo de glioma mais agressivo, sendo caracterizado por elevada taxa de proliferação e infiltração difusa tecidual, vascularização, apoptose desregulada e necrose, levando a uma alta taxa de mortalidade ⁵.

O prognóstico é muito reservado e pacientes com glioblastoma apresentam baixa taxa de sobrevida (sobrevida global mediana de 15 a 18 meses); sendo em 1 ano de 37,4% e a sobrevida em 5 anos é de 4,9%, além de muitos deles desenvolverem progressão tumoral ^{3, 6, 7}.



Fonte: Modificado de Ostrom *et al* 2017 ⁸.

Figura 2 - Distribuição dos tumores cerebrais primários e outros tumores do SNC de acordo com comportamento e histologia.

1.2 Histologia

Clinicamente o GBM pode ocorrer a partir da progressão de um glioma de baixo grau (astrocitoma grau II ou III) e normalmente afetando pacientes jovens antes dos 45 anos, sendo denominado GBM secundário. Entretanto, a grande maioria dos GBMs surgem “de novo” (GBM primário), sem evidências de lesão de menor grau de malignidade, acometendo

pacientes com idade mediana ao diagnóstico de 62 anos^{51,4}. Ambos os subtipos clínicos são caracterizados por uma elevada celularidade, geralmente composto por células tumorais com pouca diferenciação, marcada atipia nuclear; ou seja, irregularidade dos núcleos e alta atividade mitótica, assim como alta proliferação microvascular e/ou presença de necrose⁴ (Figura 3).

Devido a capacidade migratória das células tumorais no Sistema Nervoso Central, as células tumorais se alinham e acumulam na zona subapical do córtex, região subependimária, ao redor dos neurônios, a chamada satelitose (Figura 4) e vasos sanguíneos⁴.

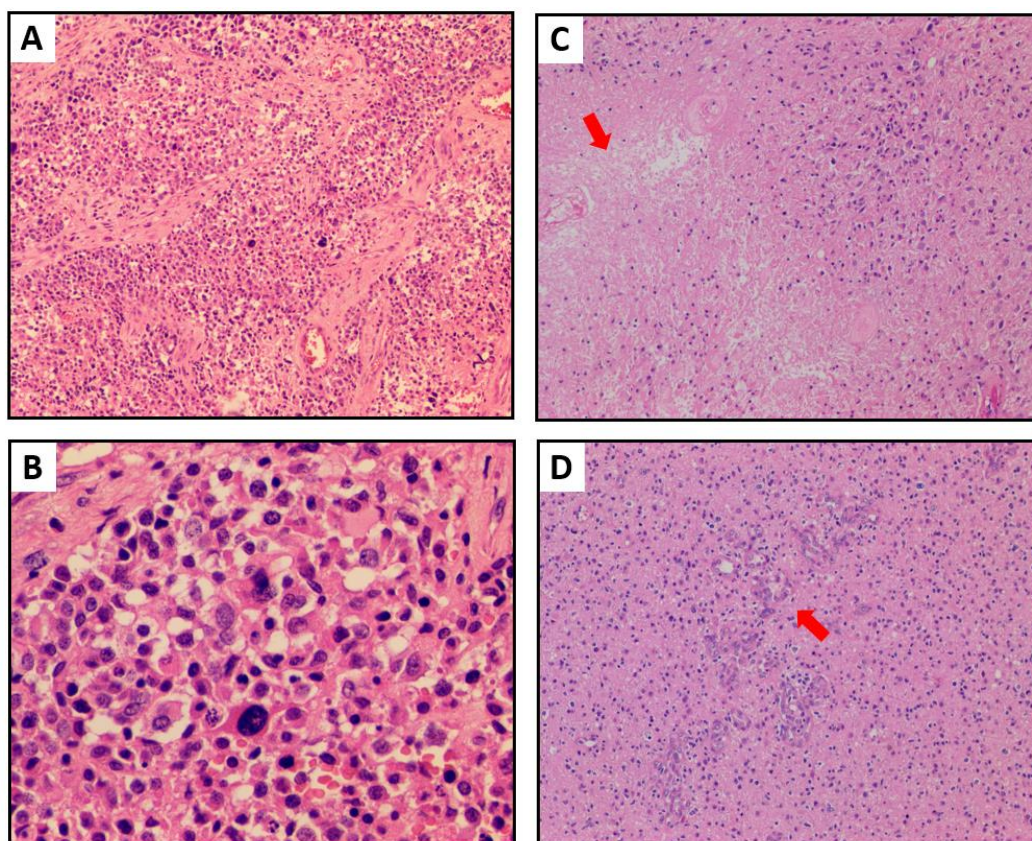


Figura 3 - Imagem representativa de tumor primário de GBM corado por hematoxilina-eosina (HE). Em **A**) Atipia nuclear (HE, 100x). **B**) Atipia nuclear (HE, 400x). **C**) Necrose (HE, 100x). **D**) Proliferação microvascular (HE, 100x).

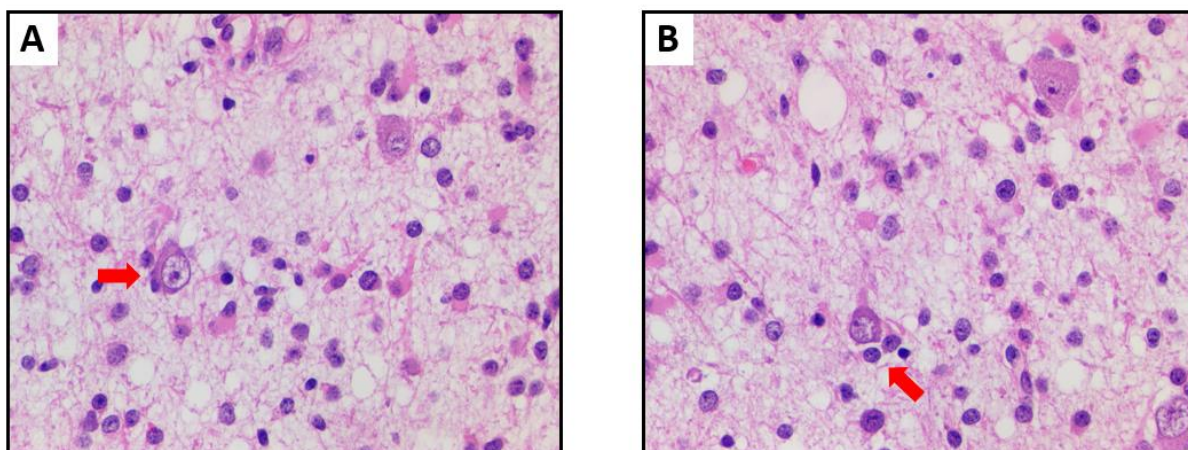


Figura 4 - Imagem representativa de tumor primário de GBM corado por hematoxilina-eosina (HE, 400x). Em **A**) e **B**) Satelitose.

Alguns subtipos histológicos observados são GBM de pequenas células, GBM com componente primitivo neuronal, GBM de células gigantes, GBM com componente oligodendroglial, gliosarcoma, GBM epitelióide, entre outros ⁴.

1.3 Tratamento

A terapia padrão de glioblastomas consiste em cirurgia associada ao tratamento com radioterapia e temozolomida, um agente alquilante que quebra a dupla-fita do DNA, interrompendo o ciclo celular e causando a morte celular ⁹. Após a ressecção tumoral os pacientes são submetidos à uma dose oral diária de 75mg/m² de superfície corporal 7 dias por semana, do primeiro ao último dia de radioterapia concomitante com dose total de 60 Gy em 30 frações diárias de 2 Gy. Seguido por até 6 ciclos de TMZ (150-200 mg/m²) por 5 dias consecutivos a cada 28 dias na fase adjuvante ^{11, 52}. Apesar de todo tratamento, a sobrevida global mediana é baixa e bastante heterogênea, variando de 14,6 a 17 meses, com taxas sobrevida em 2 anos de 26-33%, em 5 anos de 4-9,8%, e em 10 anos menor de 1% ^{11, 72, 73, 14}.

1.4 Glioblastoma: subgrupos moleculares

Uma melhor compreensão dos eventos genéticos e moleculares que regulam os gliomas emergiu desde a virada do século. Uma característica proeminente disso foi a análise

da expressão gênica, indicando perfis moleculares distintos subjacentes à heterogeneidade tumoral e à progressão maligna ¹².

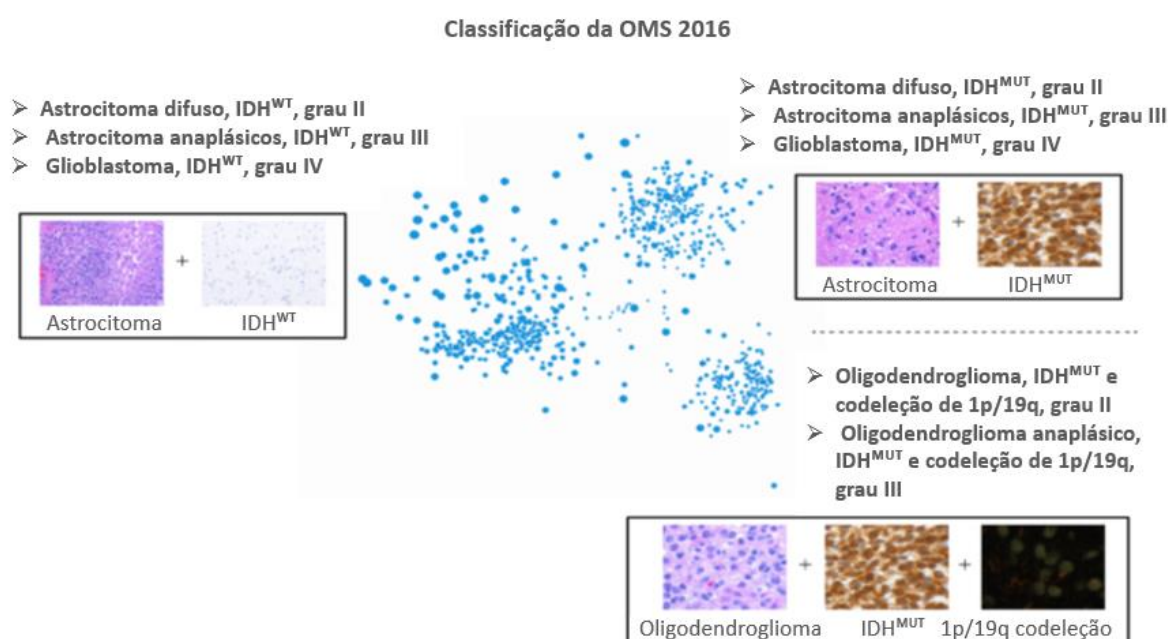
Mais recentemente, ao serem analisados pelo *Cancer Genome Atlas* (TCGA), Verhaak ¹³ e colaboradores associaram as assinaturas moleculares com alterações na sequência de DNA e número de cópias para produzir uma classificação refinada consistindo em subtipos proneurais, clássicos e mesenquimatosos (Tabela 1) ¹⁴. Importante salientar que, embora amplamente aceito, a classificação molecular não é definitiva, pois vários subtipos podem estar presentes em diferentes clones do mesmo tumor do paciente. Verhaak et al descreveu uma subdivisão adicional com base nas mudanças moleculares, entretanto, esta subdivisão não tem papel nas decisões de diagnóstico e tratamento, mas pode ajudar a entender a heterogeneidade do GBM e, no futuro, melhorar o tratamento ¹³.

Tabela 1 - Subdivisão dos grupos moleculares de glioblastoma.

Subgrupos moleculares em glioblastoma	
Clássico	Mutação em <i>EGFR</i> com hiperexpressão. <i>MGMT</i> metilado. Falta mutação em <i>P53</i> . <i>CDKN2A</i> deletado que leva a inativação da via RB. Amplificação do cromossomo 7 e deleção do cromossomo 10. Significativamente melhor para o tratamento em comparação com os tumores clássicos não <i>MGMT</i> -metilados.
Mesenquimal	Mutação em <i>NF</i> que ativa a via PI3K/Akt. Mutação em <i>PTEN</i> que ativa a via RAS. Expressão de YKL-40 e MET que pode causar transição epitelial para mesenquimatosa. Inflamação e necrose. Tumores mesenquimatosos <i>MGMT</i> -metilados parecem responder melhor ao tratamento do que os tumores <i>MGMT</i> não metilados.
Proneural	Mutação em <i>PDGFRA</i> que ativa a via PI3K e a via RAS. Mutação em <i>P53</i> , <i>IDH</i> e <i>PDGFRA</i> . Se <i>PDGFRA</i> estiver mutado, <i>IDH</i> não será mutado assim como o oposto. Nenhuma diferença em resposta ao tratamento quando estratificado para <i>MGMT</i> . Frequente em glioblastomas secundários.

Fonte: NOROXE et al (2016, p. 2) ¹⁴.

Durante muito tempo o diagnóstico de gliomas difusos era realizado somente pelo estudo histopatológico com colorações convencionais, utilizando-se critérios morfológicos para classificação. Entretanto, avanços recentes demonstraram que a classificação molecular de alguns tipos de tumores do SNC tem demonstrado maior acurácia em relação ao prognóstico permitindo a utilização de estratégias de tratamento mais precisas. Recentemente a WHO (World Health Organization, 2016) padronizou uma nova classificação para gliomas difusos, que além de critérios histopatológicos e padrão de crescimento tumoral, inclui também características moleculares como a presença de mutação em *IDH1* ou *IDH2* e a presença de codeleção de 1p19q⁴ como mostra a Figura 5. Para locais sem disponibilidade de testes imunohistoquímicos e moleculares, a OMS permite o uso da nomenclatura da neoplasia acrescida de SOE (sem outra especificação)¹⁴.



Fonte: Modificado de Noroche *et al* 2016¹⁴.

Figura 5 - Classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) de 2016 com os três principais grupos.

De acordo com os critérios de classificação histopatológicos e moleculares estabelecidos pela OMS em 2016, os gliomas difusos foram classificados em: 1) Tumores oligodendrogliais, IDH-mutante e 1p/19q codeleção (classificação II-III da OMS); 2)

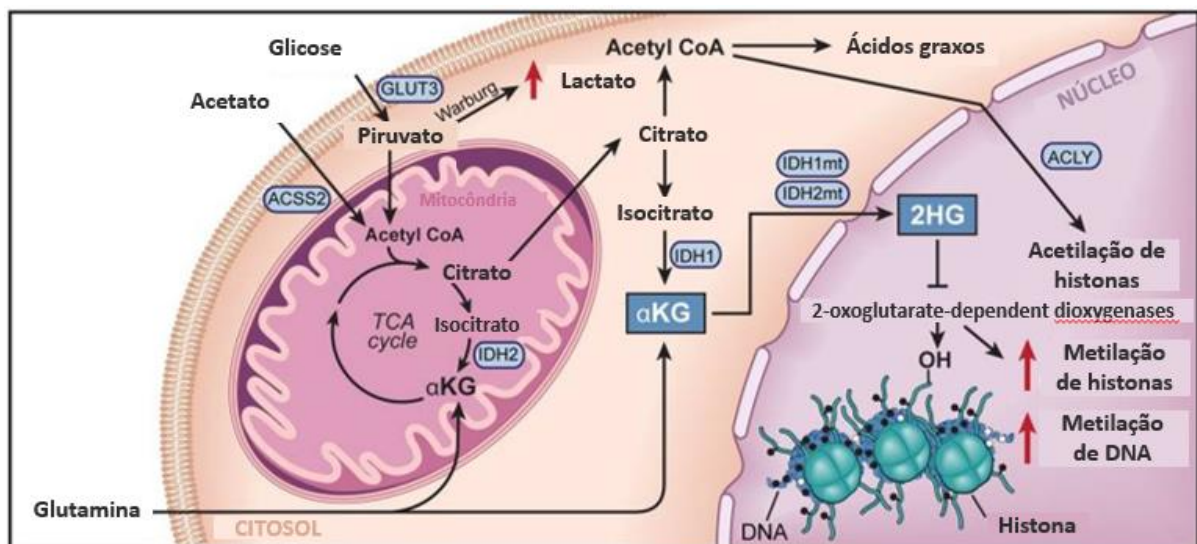
Gliomas/glioblastoma astrocítico, IDH-mutante (II-IV da OMS); e 3) Gliomas astrocíticos/glioblastoma, IDH-mutante (classificação II-IV da OMS) ¹⁴.

1.5 Alterações moleculares

Existe uma busca incessante por novos biomarcadores que melhorem a acurácia do diagnóstico e que possibilitem o desenvolvimento de novas terapias mais eficazes para o tratamento do GBM.

A análise de mutações em *IDH* tem sido recomendada na rotina clínica para facilitar o diagnóstico e classificação dos GBMs em subgrupos moleculares.

As isocitrato desidrogenases (IDHs) compreendem um grupo de cinco proteínas, entre elas IDH1 e IDH2, que atuam no metabolismo oxidativo do organismo. Na presença de mutações dessas nessas enzimas, ocorre diminuição da produção de NADPH e aumento de HIF-alfa, que estão relacionados a efeitos pro-oncogênicos. Mutações nos genes *IDH1* (citossol e peroxissomos) e *IDH2* (matriz mitocondrial) são alterações frequentes em gliomas e glioblastomas secundários, e uma das consequências é a metilação aberrante de histonas em vários resíduos de lisina; bem como, hipermetilação do DNA (Figura 6) ^{17, 18, 19}.



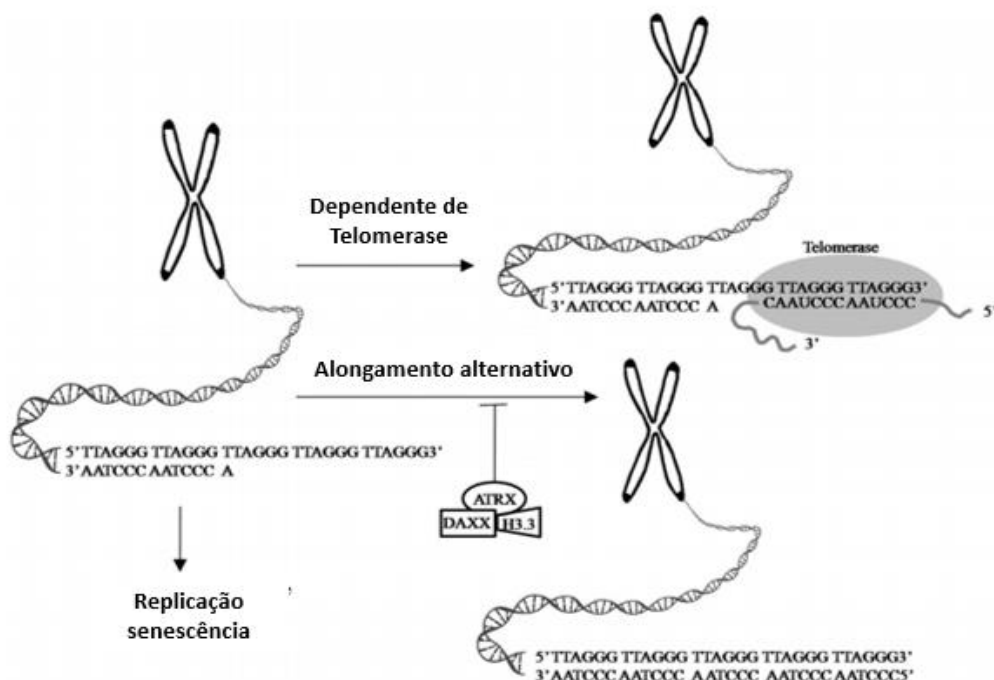
Fonte: Modificado de Mack *et al* 2016 ¹⁹.

Figura 6 - Vias metabólicas de uma célula tumoral cerebral portadora de mutação em *IDH1*, causando o acúmulo de um metabólito aberrante, o 2-hidroxi-glutarato, levando a metilação do DNA e histonas.

As mutações nos genes *IDH1* e *IDH2* resultam em assinaturas moleculares características dos glioblastomas secundários. A frequência mutacional em GBM é de 6,3% no gene *IDH1* e 0,3% em *IDH2* segundo dados do TCGA (Atlas do Genoma do Câncer) de 592 amostras de GBM multiforme disponíveis no banco de dados CBio portal (<http://www.cbioportal.org>)²⁰.

As mutações nos genes *IDH1* e *IDH2*, resultam na produção de altos níveis de 2-hidroxioglutarato que por sua vez reprime as enzimas TET e KDM; e conseqüentemente levam ao aumento de metilação do DNA e metilação de histonas resultando em alterações na transcrição gênica normal¹⁷.

Moléculas associadas ao processo de alongamento de telômeros e imortalização celular, tais como *TERT* e *ATRX* são importantes na evolução, classificação e prognóstico de gliomas. Cada subgrupo pode desenvolver diferentes mecanismos específicos que resultam no alongamento de telômeros; GBMs com mutações no promotor de *TERT* e GBMs com mutações em *IDH* que exibem um alongamento alternativo de telômeros (ALT) devido a mutações com perda de função em *ATRX* (Figura 7)^{15, 16}.



Fonte: Modificado de Fan HC, et al 2019¹⁶.

Figura 7 - A atividade da telomerase neutraliza o encurtamento dos telômeros que leva à senescência celular e o mecanismo alternativo de alongamento de telômeros independente da telomerase (ALT).

O gene *TERT* (*telomerase reverse transcriptase*) codifica uma subunidade catalítica transcriptase reversa do complexo da telomerase que atua na manutenção do tamanho do telômero. A superexpressão de *TERT* aumenta a atividade da telomerase, possibilitando extensão do telômero e imortalização das células, caracterizando um evento celular essencial na progressão neoplásica^{21, 22}. Mutações na região promotora de *TERT* têm sido identificadas em diversos tipos de tumores, estão associados com características clínico-patológicas e com pobre prognóstico além de estar presente em aproximadamente 80% dos GBMs *IDH*^{WT}^{4, 23}.

Recentemente, foram encontradas mutações na região promotora de *TERT* em vários tipos de câncer, incluindo GBMs e oligodendrogliomas. A atividade da telomerase tem um papel importante na tumorigênese e contribui para o desenvolvimento de tumor em diferentes tumores cerebrais, incluindo astrocitomas, GBMs e oligodendrogliomas. As duas mutações mais comuns no *TERT*_p são C228T e C250T, que estão localizadas -124 pares de bases (bp) e -146 pb, respectivamente, a montante do local de início *TERT* ATG (chr5p15.33: 1.295.228 C> T e 1.295.250 C> T, respectivamente). Essas mutações que conferem o alongamento dos telômeros devido à ativação de *TERT*, indica a importância do seu papel no desenvolvimento do câncer e anti-senescência^{24, 25}.

Mutações em genes de remodelação de cromatina são comuns em GBM. Os gliomas pediátricos de alto grau também possuem mutações que afetam diretamente o gene *H3F3A* e menos comumente *HIST1H3B/C*. Nos gliomas pediátricos de alto grau, as mutações H3 estão associadas a mutações em *ATRX* e estão inversamente relacionadas às mutações de *IDH*. Por sua vez, mutações em *ATRX* (proteína ligada ao X da síndrome da talassemia/retardo mental) ocorrem em astrocitomas adultos e GBM, particularmente nos GBMs com mutações de *IDH*^{26, 27, 28}.

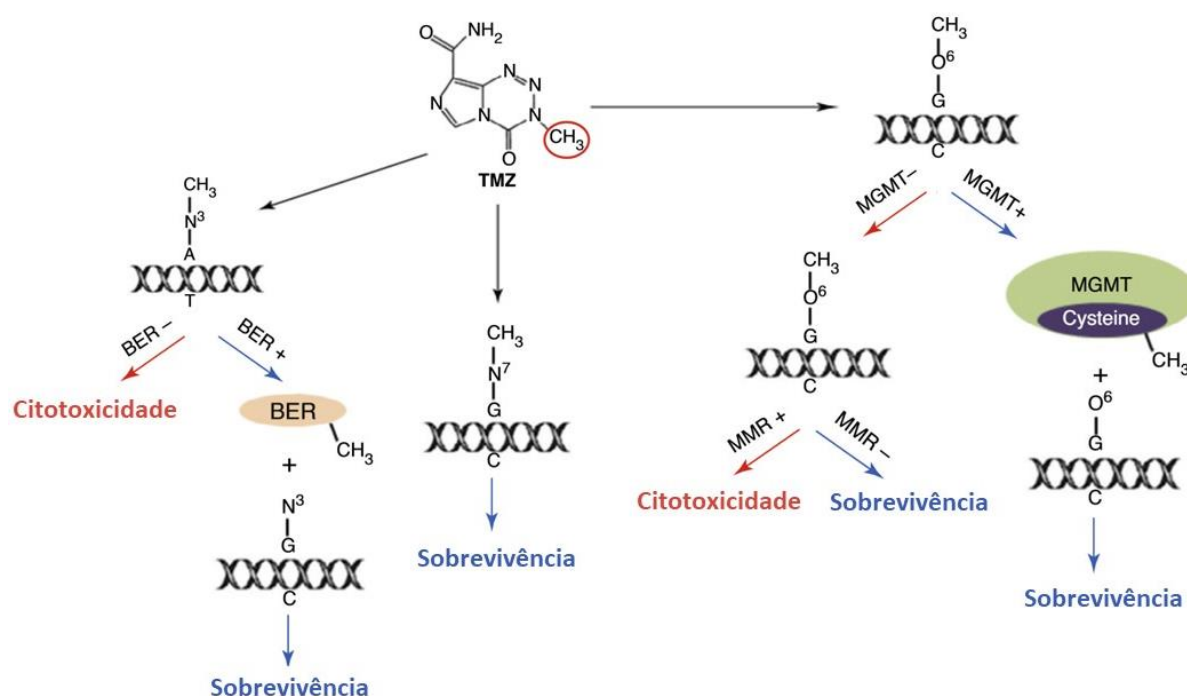
Em relação aos glioblastomas, os dados de deficiência de *ATRX* parecem variar; Liu e colaboradores³⁰ observaram a ausência de *ATRX* em glioblastomas secundários e mais em pacientes jovens, enquanto que Cai e colaboradores^{30, 31} observaram maior expressão de *ATRX* mais proeminente em GBM primário e gliomas anaplásicos do que em gliomas de grau II, e sugeriram como marcador de malignidade. Portanto, parece que mecanismos adicionais de tumorigênese estão envolvidos em gliomas de maior grau e segundo dados do TCGA disponíveis no banco de dados CBio portal (<http://www.cbioportal.org>) a frequência mutacional de *ATRX* em GBM é de 9,3%.

1.6 Mecanismos de modelação da resposta terapêutica

Genes de reparo do DNA possuem como principal função a resposta aos danos na molécula de DNA induzidos por fatores externos, e mutações em genes que desempenham esta função pode levar a defeitos causando ainda mais acúmulos de danos no DNA, o que aumentaria o risco de câncer. Além destes tecidos tumorais apresentarem uma superexpressão de genes de reparo o que leva a maior capacidade de reparar os danos causados e principalmente desenvolver a quimioresistência ⁴⁰. Não só alterações na expressão desses genes, mas fatores epigenéticos podem alterar histonas, levando a alterações nos níveis de metilação nas CpGs do promotor do gene ⁵⁰.

O principal mecanismo descrito de resistência a temozolomida no GBM envolve o reparo do DNA pela enzima MGMT (O-6-metilguanina DNA metiltransferase). O gene *MGMT* localiza-se no 10q26, sendo composto por 5 éxons e uma grande ilha CpG com 763 bases e 98 regiões CpGs, que abarca o primeiro éxon e parte da região promotora. As regiões CpGs são importantes, pois nessas regiões ocorrem fenômenos epigenéticos como a metilação que promove alterações impedindo a transcrição do gene, silenciando-o e assim alterando a expressão de *MGMT* ³².

É um marcador molecular importante em estudos envolvendo tumores, pois essa enzima está envolvida na maquinaria de reparo do DNA e sua atividade promove proteção das células neoplásicas contra agentes terapêuticos como, por exemplo, a TMZ (Figura 8) ³³.



Fonte: Modificado de Pegg³³.

Figura 8 - Interação de Temozolomida (TMZ) com mecanismos de reparo do DNA em glioblastomas. MGMT: O-6-metilguanina DNA metiltransferase. MMR: mismatch repair; BER: base excision repair.

A enzima codificada pelo *MGMT* é capaz de remover não apenas os grupos metilo unidos à posição O6 em guaninas, mas também outros grupos alquilo tais como etilo, isopropilo e butilo. No entanto, *MGMT* remove grupos metil muito mais rápido do que outros alquilos³⁴.

Eventos epigenéticos como a hipermetilação da região promotora de *MGMT* promovem a inativação da função reparadora da enzima *MGMT*^{34, 35} caracterizando um evento importante que está relacionado a resposta a terapia com agentes alquilantes em tumores cerebrais. Estudos demonstraram a relação entre a expressão de *MGMT* e a resposta ao tratamento com TMZ, de modo que a presença da metilação no promotor do gene *MGMT* foi associada ao bom prognóstico de pacientes com gliomas tratados com agentes alquilantes e sendo considerado um forte preditor de resposta a TMZ^{36, 37, 38}. A metilação no promotor desse gene ocorre em 30-50% dos glioblastomas primários ou GBM

IDH^{WT} 39.

A via de reparo do DNA *mismatch repair* (MMR) é um sistema que corrige erros em bases de nucleotídeos gerados durante a síntese de DNA 41. Na ausência de *MGMT*, o O6-MG persiste e pode emparelhar-se com a timina. O O6-MG/T resultante é reconhecido pelas proteínas de MMR e apenas as fitas recentemente sintetizadas são excisadas, mantendo O6-MG intacto. Este ciclo de reparo é repetido quando uma outra fita é gerada. Estes ciclos de inserção e excisão da timina ocorrem e levam à parada do ciclo celular e à apoptose 41, 42. Além de sua capacidade essencial de reparar a toxicidade induzida pela TMZ 38.

A via de reparo MMR alterada por mutações nos complexos de proteína MMR causa uma falha em reconhecer e reparar os adutos de O⁶-MG produzidos pela TMZ. Essa falha causa a replicação de DNA e permite que o ciclo celular continue e, assim, torna a TMZ menos eficaz conferindo resistência aos glioblastomas. Essas mutações podem estar presentes naturalmente ou adquiridas pelo tratamento com TMZ. Por sua importância, as estratégias para restaurar o efeito do sistema MMR devem ser desenvolvidas para melhorar o efeito da TMZ 43.

A via de reparo do DNA por excisão de base (BER), é um sistema que está envolvido no reparo do dano do DNA causado por agentes oxidantes, radiações ionizantes ou alquilantes 38.

O sistema de reparo BER é formado por uma série de proteínas com diferentes funções. A poli (ADP-ribose) polimerase-1 (PARP-1) é ativada em resposta ao dano do DNA e desempenha um papel importante no sistema BER. Esta enzima se liga ao DNA e inicia a síntese de um poli (ADP-ribose) (PAR) de NAD⁺, que permite o recrutamento de proteínas do complexo BER (XRCC1, DNA polimerase, ligase, aleta 1) para que ocorra o reparo do DNA. A via BER está envolvida no reparo das metilações N³ e N⁷ causadas pela TMZ. Lesões em N³ (8-20%) são letais se não forem reparadas, contrariamente às lesões N⁷ que são as mais frequentes (80-85%). Estas metilações que representam mais de 90% de metilação causadas por TMZ são rapidamente reparadas pelo BER. No entanto, TMZ torna-se tóxico quando um ou mais componentes da via BER apresentam mutações. Assim, o desenvolvimento de inibidores de PARP, limitando a atividade BER, parece ser uma estratégia promissora para aumentar o efeito de TMZ 43, 44, 45.

1.7 Genes relacionados ao prognóstico e quimioresistência

Apesar da sobrevida global mediana ser de aproximadamente 15 meses, uma grande proporção dos pacientes diagnosticados com GBM morrem nos primeiros 12 meses após o diagnóstico; enquanto apenas 15% sobrevive após 36 meses (Tabela 2). Quando a predição de quais pacientes serão sobreviventes de curto e longo prazo, torna-se possível o desenvolvimento de medicina personalizada efetiva. Entretanto, alguns fatores podem estar associados ao melhor ou pior prognóstico; por exemplo, idade, Karnofsky performance status, extensão da primeira cirurgia e características moleculares do tumor ⁴⁶.

Segundo Stupp e colaboradores, a metilação no promotor do gene *MGMT* é um forte preditor de resposta ao tratamento com TMZ. O estudo demonstrou que pacientes portadores de GBM submetidos ao tratamento de radioterapia associado a TMZ, apresentam metilação na região promotora do *MGMT*, apresentaram maior sobrevida global mediana comparada aos pacientes com *MGMT* não metilado (mediana: 12,6 meses vs 23,4 meses) ¹¹.

Outro estudo avaliou a sobrevida global de pacientes portadores de GBM com mutações em *IDH1/2* e metilação no promotor de *MGMT*, mostrando que os pacientes sobreviventes a longo prazo apresentam o genoma diferencialmente metilado em relação aos pacientes sobreviventes de curto prazo ⁴⁷, portanto o padrão genômico de metilação do DNA também pode apresentar relação com o prognóstico dos pacientes.

Outros trabalhos têm demonstrado que a presença de mutações que resultam na perda de função da proteína p53, foram associadas a maior resistência nos tratamentos com TMZ do que a atividade do *MGMT*; entretanto, o status de p53 não é o único fator determinante da resistência nas células tumorais. A resistência também pode estar associada não apenas aos níveis de expressão da proteína *MGMT*, mas a N-glicosilase-DNA-alkilpurina (APNG). MPG (também chamado de APNG, N-glicosilase-DNA-metilpurina), sintetiza uma enzima de reparo por excisão de base (BER) que repara N³-metiladenina e N⁷-metilguanina. Sua superexpressão nuclear correlaciona-se com pacientes que apresentaram pior sobrevida global ⁴⁸.

As principais alterações moleculares associadas com a sobrevida de pacientes portadores de GBM, *IDH^{WT}* estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2 - Principais alterações entre sobrevida de curto e longo prazo.

	Grupos de sobrevida em GBM <i>IDH</i>^{WT}	Referências
Sobreviventes de curto prazo (Sobrevida global ≤ 12 meses)	Na sobrevida prolongada, níveis aumentados <i>IFNG</i> , <i>CXCL9</i> , <i>LGALS4</i> e <i>CD34</i> e diminuídos de	Michaelson, SR et al. 2018 ⁴⁶ .
Sobreviventes de longo prazo (Sobrevida global ≥ 36 meses)	<i>MGMT</i> .	
Sobreviventes de curto prazo (Sobrevida global ≤ 7 meses)	Ganho de <i>EGFR</i> e perda de <i>CDKN2A</i> em ambos; mas a frequência de mutações foi maior nos sobreviventes de longo prazo. Mutações em <i>BRAF</i> , <i>ATRX</i> nos sobreviventes de longo prazo. Mutações em <i>NF1</i> e mutações/ganho em <i>PTEN</i>	Peng, S et al. 2016 ⁴⁹ .
Sobreviventes de longo prazo (Sobrevida global ≥ 33 meses)	em ambos os grupos. Reguladores ativados na sobrevida de longo prazo <i>STAT5a</i> , <i>NF-kB</i> e <i>IFNG</i> e inibidos <i>MAPK1</i> , <i>ERK1/2</i> e <i>ESR1</i> .	
Sobreviventes de curto prazo (Sobrevida global < 1 ano)	Metilação diferencial entre os grupos.	Hwang, T et al. 2019 ⁴⁷ .
Sobreviventes de longo prazo (Sobrevida global > 3 anos)		

Além disso, alguns associam o aumento da instabilidade genômica ⁴⁹ e ganho concomitante dos cromossomos 19 e 20 nos pacientes com sobrevida de longo prazo ⁵⁶. Enquanto os pacientes com sobrevida de curto prazo tendem a apresentar a hipometilação geral do DNA. Estudos realizados com abordagens genômicas encontraram dificuldades em identificar o perfil de assinatura nos pacientes com sobrevida de longo prazo ^{49, 54}.

Apesar dos esforços científicos por encontrar biomarcadores preditivos, capazes de prever de forma eficaz a resposta terapêutica e prognóstico do paciente, nenhuma abordagem é hoje incluída na rotina clínica.

2. JUSTIFICATIVA

A temozolomida (TMZ) é um agente quimioterápico padrão no tratamento de pacientes com glioblastoma, no entanto a resposta a terapia é bastante heterogênea. Atualmente o único biomarcador de resposta ao tratamento com TMZ, é o perfil de metilação de *MGMT*, no entanto o seu papel preditivo é limitado, e não é preconizado para guiar o tratamento com TMZ.

Novos biomarcadores com maior precisão e acurácia são necessários para uma medicina personalizada efetiva no tratamento de pacientes com glioblastoma.

3. HIPÓTESE

Os tecidos tumorais apresentam diversos padrões de alterações moleculares; bem como de expressão gênica que podem ser utilizados para predizer o prognóstico. Além do *MGMT*, é possível que outras vias moleculares de reparo do DNA também estejam envolvidas com a resposta a terapia com TMZ em pacientes portadores de GBM.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Identificar o perfil gênico de resposta à temozolomida em pacientes com glioblastoma.

4.2 Objetivos específicos

1. Descrever as características clínicas e associadas ao prognóstico dos pacientes portadores de GBM do HCB incluídos no estudo.

2. Realizar avaliação do perfil de metilação *MGMT*, mutações de *TERT*, *ATRX* e *IDH1* R132H).

3. Avaliar a expressão de 180 genes envolvidos em vias moleculares associadas a danos e reparo de DNA (Painel *DNA Damage and Repair* - NanoString) nas amostras de pacientes portadores de GBM tratados com TMZ.

4. Correlacionar o perfil de expressão dos genes envolvidos em vias de danos e reparo do DNA com características associadas ao prognóstico dos pacientes e com a resposta ao tratamento com temozolomida.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo experimental, com coleta retrospectiva de dados.

5.2 Aspectos éticos

Este estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos e aprovado sob o número 1604/2018.

Por se tratar de material parafinado utilizado para diagnóstico, foi solicitado ao Comitê de Ética dessa instituição a dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE); tomando os devidos cuidados para assegurar o não esgotamento das amostras biológicas. É um estudo retrospectivo que oferece risco mínimo aos participantes, sendo o principal deles relacionado à quebra accidental de sigilo. No entanto, a equipe do estudo se comprometeu em adotar medidas para evitar que tal fato ocorra, e que as informações divulgadas, não identifiquem os participantes. Além disso, o estudo não traz benefícios diretos aos seus participantes, mas gera conhecimentos que possivelmente poderão beneficiar futuros pacientes diagnosticados com glioblastoma.

5.3 Critérios de inclusão

Todos os pacientes incluídos no estudo obedeceram aos seguintes critérios de elegibilidade:

1. Pacientes diagnosticados com glioblastoma, glioblastoma de pequenas células, glioblastoma de células gigantes e gliosarcoma tratados com radioterapia e temozolomida, divididos em dois grupos:

- Grupo de pacientes com boa resposta ao tratamento com temozolomida (acima da sobrevida mediana);

- Grupo de pacientes com resposta ruim ao mesmo tratamento (abaixo da sobrevida mediana);

2. Disponibilidade de material parafinado prévio a qualquer tratamento radioterápico ou quimioterápico, que esteja disponível no Serviço de Patologia do Hospital de Câncer de Barretos.

3. Disponibilidade de informações quanto à epidemiologia, evolução clínica e resposta ao tratamento nos prontuários arquivados no SAME das instituições envolvidas.

5.4 Critérios de exclusão

1. Material tumoral insuficiente ou indisponível para a realização dos testes moleculares.

2. Pacientes que não foram submetidos ao tratamento completo; ou seja, cirurgia, radioterapia e quimioterapia (TMZ).

3. Amostras com suspeita de outro subtipo histológico.

5.5 População de estudo

A triagem inicial de pacientes com diagnóstico de glioblastoma e tratados com TMZ foi realizada através do sistema informatizado em oncologia (SISONCO) do Hospital de Câncer de Barretos (HCB).

Foram selecionados 107 pacientes com diagnóstico de glioblastoma atendidos no HCB no período de 2005 a 2018. Os prontuários desses pacientes arquivados no setor de serviço de arquivo médico e estatístico (SAME) desta instituição foram avaliados para obtenção de informações quanto a evolução clínica e resposta ao tratamento retrospectivamente, de acordo com a ficha de coleta em anexo (Anexo I). Também foram coletadas informações sociodemográficas, número de identificação de blocos de parafina referente aos anatomopatológicos, tratamentos realizados e desfechos, totalizando 161 variáveis coletadas.

A histologia de todos os casos foi revista e confirmada por dois patologistas experientes em neuropatologia através de avaliação de hematoxilina-eosina (HE). O estudo contou também com a colaboração de um oncologista para avaliação das terapêuticas utilizadas.

Todas as informações registradas na ficha de coleta foram armazenadas no REDCap;

e posteriormente, exportadas para o programa SPSS for Windows, versão 23 para realização das análises.

Para a realização das análises de correlação entre a expressão dos genes de reparo do DNA e a sobrevida dos pacientes, os 91 GBM primário (GBM IDH^{WT}) foram divididos em 4 grupos (quartis) de acordo com a sobrevida global: Grupo 1) 2-10 meses; Grupo 2) 11-16 meses; Grupo 3) 17-24 meses; e Grupo 4) 25-83 meses (Figura 9).

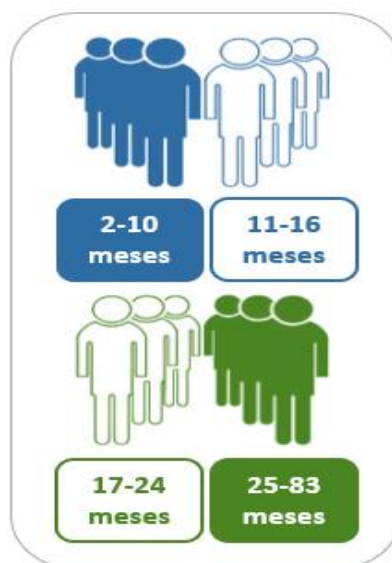


Figura 9 – Grupos de sobrevida.

5.6 Análise molecular

5.6.1 Análise da expressão proteica de ATRX e $IDH1$ R132H

A marcação imunoistoquímica foi realizada nas seções de 4 micrômetro FFPE, conforme descrito anteriormente, usando o kit de detecção *UltraView DAB IHQ (Roche)* para ATRX e o kit de detecção *OptiView DAB IHQ (Roche)* para $IDH1$. Resumidamente, a recuperação antigênica foi realizada usando tampão citrato (pH 6,0). A peroxidase endógena foi bloqueada com um reagente bloqueador H_2O_2 a 3%. As lâminas foram incubadas com o anticorpo primário ATRX anti-humano de coelho (Sigma HPA001906, diluição 1: 300) e anticorpo primário anti-humano $IDH1$ R132H de rato (Dianova, diluição 1:50) ambos por 32 minutos; depois, com um HRP Multimer universal que contém um coquetel de anticorpos marcados com HRP, seguido pela detecção com tetrahydroclorato de 3, 3'-diaminobenzidina e contrastado com hematoxilina, reidratação e montagem. A coloração nuclear de ATRX e a

coloração de *IDH1* foram avaliadas por neuropatologista. Os casos foram considerados como positivos para *IDH1* R132H quando a imunexpressão positiva era observada no citoplasma e núcleo das células neoplásicas. Todas as reações consideradas positivas eram acompanhadas de controles positivos externos previamente selecionados na mesma lâmina com imunexpressão também positiva. A maioria dos casos apresentava controle negativo interno representado pelo parênquima cerebral adjacente não neoplásico. As colorações citoplasmáticas de *IDH1* foram pontuadas como positivas (coloração em $\geq 50\%$ das células tumorais), positivo irregular/focal (coloração em 50% do tumor ou negativo (coloração em 0% das células tumorais) ⁸².

A avaliação imunohistoquímica de mutação para *ATRX* foi considerada como presente quando as células neoplásicas apresentavam perda de expressão nuclear. As células neoplásicas foram avaliadas com base na sua morfologia atípica. Da mesma forma, todas as reações consideradas como "perda de expressão nuclear" apresentavam controle externo previamente selecionado na mesma lâmina também exibindo perda de expressão nuclear. O controle negativo foi observado em todas as reações através da expressão mantida em células endoteliais de vasos da neoplasia e/ou de células não neoplásicas remanescentes em meio ou adjacente à neoplasia. As colorações nucleares de *ATRX* foram pontuadas como positivo (perda de coloração em $<10\%$ das células tumorais), negativo ou perda de expressão (perda de coloração em $>90\%$ das células tumorais) e inconclusivo (perda de coloração em 10-90% as células tumorais) ⁸³.

5.6.2 Extração de DNA de material parafinado

Baseado em coloração HE, as lâminas provenientes do bloco de parafina de cada tumor tiveram a área com maior concentração de células tumorais delimitada e assegurando a porcentagem de células tumorais $>80\%$ na área selecionada para isolamento do tecido tumoral.

A extração de DNA do tecido tumoral foi realizada a partir de 4 cortes de 10 micrômetros através do kit *QIAmp DNA Mini kit (Qiagen)* seguindo o protocolo do fabricante; sendo armazenado em freezer -20°C até o uso.

E todas as amostras foram submetidas à quantificação em *Nanodrop® ND-200 espectrofotômetro (ThermoScientific)*.

5.6.3 Análise de mutações de *TERT*

Após a extração de DNA citada anteriormente, as regiões *hotspots* c.-146:G>A e c.-124:G>A da região promotora do gene *TERT*, foram analisados por PCR seguido de sequenciamento (SANGER). Na reação de PCR para análise de mutações em *TERTp* foram usados os seguintes *primers* Fw: 5'- CAGCGCTGCCTGAAACTC-3' e Rw: 5'- AGTGGATTTCGCGGGCACAGA-3'; resultando em um produto de PCR com 235pb; as quais estão localizadas em chr5.hg19:g.1295228C>T e chr5.hg19:g.1295250C>T, correspondendo as mutações c.-146:G>A e c.-124:G>A respectivamente. A amplificação do DNA genômico (50 ng) foi realizada usando o kit *Multiplex PCR (Qiagen)* seguindo as recomendações do fabricante e usando Q solution. As reações de sequenciamento foram realizadas com o *ABI Prism BigDye Terminator kit (Life Technologies)* e os fragmentos foram sequenciados no *ABI prism 3500 xL Genetic Analyser (Life Technologies)*. Os fragmentos foram sequenciados primeiramente utilizando *primers forward*; e em alguns casos foram utilizados também *primers reverse* para confirmação de resultados. Posteriormente foi realizada a análise dos eletroferogramas utilizando o software *ChromasPro, versão 2.6.6 (Technelysium, Australia)*.

Entretanto, diversas amostras deram resultado inconclusivo no sequenciamento (SANGER) devido provavelmente a baixa concentração e qualidade do DNA. Para ultrapassar este obstáculo, a análise de mutação em *TERT* destas amostras foi realizado posteriormente pelo pirosequenciamento que utiliza um *amplicon* menor e sendo uma metodologia quantitativa apresenta também maior sensibilidade para a detecção de mutações.

Na reação de PCR, para realização da técnica de pirosequenciamento foram usados os seguintes *primers* Fw: 5'- GCGCTGCCTGAAACTCGCG-3' e Rw: 5'-CGTCCTGCCCTTACCT-3'; resultando em um produto de PCR com 162 pb, correspondendo as mesmas mutações no promotor do *TERT* citadas anteriormente. A amplificação do DNA genômico (150 ng) também foi realizada usando o kit *Multiplex PCR (Qiagen)*. O pirosequenciamento foi realizado no *PyroMark Q96 (Qiagen)* usando o primer Rw: 5'-CCCGCCCCGTCCCGA-3'. Para a preparação da amostra, 20 µl de produto de PCR foram misturados com estreptavidina-sepharose, seguidas de separação e lavagem com a ferramenta de preparação a vácuo (*Qiagen*). O ssDNA ligado a *bead* foi misturado com 38,4 µl do tampão de anelamento e 1,6 µl de primer de sequenciamento por poço. Os dados obtidos foram analisados pelo software *PyroMark Q96*. Para a análise, foi proposto o *cut off* de 5%.

5.6.4 Metilação de *MGMT*

O status de metilação do promotor *MGMT* foi determinado por pirosequenciamento. O DNA tumoral foi modificado pela conversão de bissulfito usando o *EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen)*; então o DNA convertido foi usado como molde de PCR. Para amplificação por PCR usando o *MGMT Pyro Kit (Qiagen)*, 200 ng de DNA modificado foram adicionados com 12,5 µl de PyroMark PCR Master Mix, 2,5 µl de CoralLoad, 1 µl de primer de PCR Mix *MGMT* e 4 µl de água para um volume final de 25 µl. O programa de ciclagem da PCR foi composto de uma etapa de ativação inicial a 95° C por 15 minutos, seguida de 42 ciclos de desnaturação a 95° C por 20 segundos, emparelhamento a 53° C por 30 segundos, extensão a 72° C por 20 segundos, concluindo com uma etapa final de extensão a 72° C por 5 minutos. Os produtos de PCR foram confirmados por eletroforese em gel de agarose. O pirosequenciamento foi realizado no *PyroMark Q24 (Qiagen)* usando reagentes e primers do kit *MGMT Pyro (Qiagen)*, como mencionado. Para a preparação da amostra, 10-20 µl de produto de PCR foram misturados com estreptavidina-sepharose, seguidas de separação e lavagem com a ferramenta de preparação a vácuo (Qiagen). O ssDNA ligado a *bead* foi misturado com 24,2 µl do tampão de anelamento e 0,8 µl de *MGMT* de primer de sequenciamento por poço, aquecido a 80° C por 2 minutos e subsequente resfriado à temperatura ambiente. Os dados obtidos foram analisados pelo software PyroMark Q24. A porcentagem de alelos metilados foi calculada como o valor médio da porcentagem de metilação obtida em cada CpG investigada e o *cut-off* foi de 10% de acordo com estudos anteriores^{57, 58}.

A estratificação foi <10% versus ≥10%. Controles positivos e negativos padronizados foram incluídos em cada execução; bem como, DNA genômico extraído de amostra de sangue periférico como controle negativo.

5.6.5 Extração de RNA total de material parafinado

Baseado em coloração HE, as lâminas provenientes do bloco de parafina de cada tumor tiveram a área com maior concentração de células tumorais delimitada e assegurando a porcentagem de células tumorais >80% na área selecionada para isolamento do tecido tumoral.

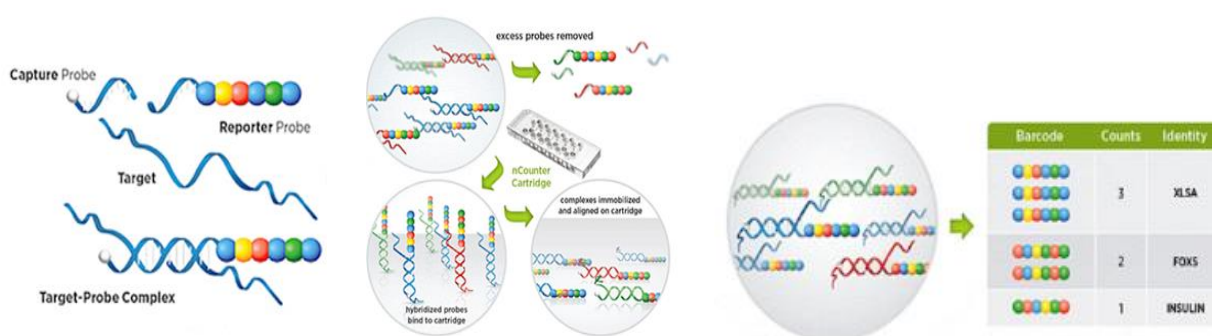
A partir de 4 cortes de 10 micrômetros de cada bloco, as áreas marcadas foram

macrodissecadas manualmente com agulha *BD Precision Glade* (1,20 x 40 mm) e transferidas para tubos de 1.5 ml. Toda a extração foi realizada de acordo com as recomendações do protocolo do kit *RNeasy Mini Kit (Qiagen)*; e então, armazenado em freezer -80°C até o momento do uso.

As amostras de RNA total foram submetidas à quantificação em *Qubit 2.0 Fluorometer*, usando o kit *Qubit RNA HS Assay (Thermo Fisher Scientific)* seguindo o protocolo do fabricante. A concentração das amostras de RNA foi obtida na escala de $\text{ng}/\mu\text{L}$ e a partir dessas concentrações as amostras foram diluídas a $20 \text{ ng}/\mu\text{L}$ de RNA total para uso na técnica a seguir.

5.6.6 Análise da expressão gênica das vias de reparo e danos no DNA pela plataforma nCounter – NanoString

O *NanoString* (NanoString Technologies, Seattle, WA, EUA) é um dispositivo automatizado que requer pouco tempo dispensado às atividades de bancada e pode processar até 12 amostras distintas simultaneamente. De acordo com o painel escolhido, pode-se avaliar a expressão gênica de dezenas e até 7 centenas de genes de interesse pela tecnologia *nCounter*[®] (NanoString Technologies). Este sistema captura e conta um código baseado em combinações de 4 cores (*color-code*), correspondendo cada combinação a um gene distinto (Figura 10).



Fonte: Modificado de <https://www.queensu.ca/rauhlab/services/nanostring-ncounter-analyzer>.

Figura 10 - Tecnologia nCounter[®] (NanoString).

É capaz de detectar fragmentos pequenos provenientes de amostras com alto grau

de degradação permitindo a análise de amostras com qualidade insatisfatória para outras plataformas de expressão gênica, tal como amostras de RNA provenientes de tecido parafinado.

A tecnologia *nCounter*[®] é extremamente sensível, sendo comparável à PCR em tempo real e mais sensível que o método de microarranjos. Além disso, esta tecnologia não requer amplificações, fazendo com que a validação por outro método seja dispensável, tornando a tecnologia *nCounter*[®] inovadora⁵⁵. Os painéis empregados por esta tecnologia podem ser customizados de acordo com as necessidades do grupo ou podem ser adquiridos no formato disponível pela empresa de acordo com a aplicação de cada um.

Adicionalmente, baseado no conhecimento entre genes das vias de reparo associados a resistência a temozolomida, é possível avaliar o painel de expressão destes genes envolvidos na quimioresistência pela tecnologia *nCounter Vantage™ RNA Panel for DNA Damage and Repair*, avaliando aqueles envolvidos na resistência ao tratamento com temozolomida.

O painel utilizado (tabela 3) para a análise destas amostras foi o *nCounter Vantage™ RNA Panel for DNA Damage and Repair (NanoString Technologies)* que consta de 180 genes relacionados ao dano do DNA e vias de reparo bem como 12 controles endógenos (*housekeeping*).

Tabela 3 - Painel utilizado para análise de expressão gênica. Este painel avalia a expressão de genes envolvidos no dano e vias de reparo do DNA.

Genes envolvidos no dano do DNA e vias de reparo	
Ciclo celular e sinalização celular	44
Excisão de bases (Base Excision Repair - BER)	29
Enzimas de reparo independente/polimerases	25
Excisão de nucleotídeos (Nucleotide Excision Repair - NER)	23
Reparo por recombinação homóloga	21
Apoptose	17
Anemia de Fanconi	14
Mismatch repair	13
Ativação checkpoint	12
Síntese translesão	7
Reparo não homólogo (Non-homologous End Joining - NHEJ)	5

Fonte: Tecnologia *nCounter* (NanoString)

A técnica foi realizada de acordo com as instruções do kit *nCounter Vantage™ RNA Panel for DNA Damage and Repair*. Adicionou-se 22 µL de água RNase-free no pool de cada uma das sondas (*probe A* e *probe B*). O master mix foi preparado usando 28 µL de *TagSet*, 70 µL do tampão de hibridização, 7 µL do pool diluído da sonda A, 7 µL do pool diluído da sonda B e 28 µL de água. Então, adicionou-se 10 µL do master mix em cada tubo e 5 µL (100ng) de RNA total; seguindo para a etapa de hibridização à 67° C por 23h e 15 minutos.

Ao término da etapa de hibridização, transferiu-se as amostras para a estação de preparação automatizada (*PrepStation*) para a purificação e preparação dos cartuchos (*nCounter® Cartridge*) durante 3 horas. E por fim, os cartuchos contendo os complexos imobilizados e alinhados foram transferidos para o *nCounter Digital Analyzer (NanoString Technologies)*.

5.7 Análises de Bioinformática

Os resultados gerados pelo sistema *nCounter® (NanoString Technologies)* e captados pelo *nCounter® Digital Analyzer* foram convertidos em dados numéricos pelo programa *nSolver Analysis Software v2.6® (NanoString Technologies)*.

Para corrigir as variáveis experimentais entre as amostras, como diferenças na eficiência de hibridização, ligação ou purificação os valores obtidos pelo NanoString foram normalizados; onde é feita a multiplicação dos valores de contagem das moléculas por um fator de normalização, que é calculado pela média dos valores dos controles dividido pela soma de cada amostra.

Os arquivos obtidos em formato RCC foram importados para o *software* matemático e estatístico R e convertidos em uma matriz de expressão de dados brutos.

Para avaliar o controle de qualidade, avaliou-se a dispersão dos dados pela relação Média *versus* desvio padrão de todas as *probes*, incluindo controles positivos e negativos; cálculo do coeficiente de variação (CV) das amostras; avaliação dos efeitos de *batch* entre as amostras, e entre cartuchos por meio de regressão linear; relação entre a proporção de *probes* não detectadas pela média das amostras nos dados brutos.

A estimativa de conteúdo de RNA foi avaliada pela relação entre genes *housekeepings* pelos genes de maior expressão nos dados brutos. A inspeção dos controles positivos e

negativos por meio da relação entre as contagens observadas em log2 pela concentração esperada em log2 de fM.

Para as análises estatísticas foi utilizado o método Teste T de student e Anova, considerando-se os níveis de significância de $p < 0,001$ e $p < 0,05$ e Fold change de 1,5, por meio do pacote *multtest* (<http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/multtest.html>). E para a construção dos *heatmaps* foi utilizado o pacote *ComplexHeatmaps* (<http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/ComplexHeatmap.html>). Para as análises de enriquecimento foi utilizado o método GSEA (*gene set enrichment analysis*) (<https://www.gsea-msigdb.org/gsea/index.jsp>) utilizando $p < 0,05$ e FDR < 25%, conforme recomendado pelos autores. O dado de entrada correspondente aos *gene sets* foi customizado, ou seja, os 11 processos de reparo do painel da Nanostring utilizado (*Independent Repair Enzymes/Polymerases, Base Excision Repair, Homologous Recombination, Mismatch Repair, Nucleotide Excision Repair, Fanconi Anemia, Translesion Synthesis, Non-homologous End Joining, Checkpoint Activation, Apoptosis, Cell Cycle and Signaling*).

5.8 Análise Estatística

A amostra foi caracterizada através de tabelas de frequências para as variáveis qualitativas e usando medidas de tendência central (média, mediana) e de dispersão (desvio padrão, mínimo e máximo) para as quantitativas.

Para verificar a associação univariada entre os marcadores moleculares e das características dos pacientes (sociodemográficas e clínicas) e a resposta ao tratamento foram utilizados testes Qui-quadrado ou Exato de Fisher e Man-Whitney. Para verificar a associação conjunta (multivariada) foi utilizada a Regressão Logística Binária, tendo como desfecho a resposta ao tratamento, através da qual estimamos a Odds Ratio (OR).

A sobrevida global (desfecho=óbito) foi estimada pelo método de Kaplan-Meier onde o tempo foi contado desde o diagnóstico histológico até o óbito ou última informação. Para associar a sobrevida com as características dos pacientes, resposta ao tratamento e os marcadores moleculares aplicamos o Teste Log-rank e posteriormente foi ajustado o Modelo de Regressão de Cox para verificar a associação conjunta e estimar a *Hazard Ratio (HR)*.

A Regressão de Cox foi realizada primeiramente em uma análise univariada nos genes diferencialmente expressos apresentados nas análises de bioinformática para verificar a associação deles com a resposta, através da qual estimamos a *Hazard Ratio (HR)*. E então, a análise multivariada foi realizada por meio da Regressão de Cox empregando o método *forward*, para verificar a associação da expressão com o desfecho.

O nível de significância adotado foi o valor de 5% e as análises foram realizadas no software IBM SPSS v.23. Todos os dados clínicos e moleculares foram depositados no Gerenciador Eletrônico de Captura de Dados para Pesquisa (RedCap, do inglês *Research Electronic Data Capture*; (<https://projectredcap.org/>)).

6. RESULTADOS

Foram analisadas 107 amostras de pacientes diagnosticados com glioblastoma submetidos a tratamento com radioterapia e temozolomida (tabela 4).

Para GBM *IDH*^{WT}, a média de idade ao diagnóstico foi de 54,7 anos e mediana de 54,8 anos; variando de 29 a 75 e desvio padrão de 10,9. O sexo masculino apresentou maior frequência (56,0%). A cor branca foi a mais frequente (80,2%); 42,9% foram classificados com ECOG 0 e 58,2% com KPS maior que 70%. Por se tratar de coleta retrospectiva de dados, não encontramos informações quanto ao ECOG e KPS em 36,2%. Quanto ao tipo de ressecção, 61,5% foi parcial, 31,9% completa, 1,1% biópsia e 5,5% não encontramos informação devido à ressecção prévia a data de admissão. O subtipo histológico mais frequente foi o GBM clássico 96,7%. Foram submetidos à apenas uma cirurgia 75,8% dos pacientes. O tratamento concomitante foi realizado em 63,7% dos pacientes; 56,0% foram submetidos à mais de 6 ciclos de TMZ e 97,8% foram tratados com apenas uma radioterapia. O desfecho de 80,2% foi óbito por câncer; e dos pacientes que vieram a óbito por outras causas 11,0% apresentavam doença ativa.

Para GBM *IDH*^{MUT}, a média de idade ao diagnóstico foi de 43,7 anos e mediana de 44,0 anos; variando de 25 a 60 e desvio padrão de 10,5. O sexo foi 50% masculino e 50% feminino. A cor branca foi a mais frequente (56,3%); 50% foram classificados com ECOG 0 e 68,8% com KPS maior que 70%. Por se tratar de coleta retrospectiva de dados, não encontramos informações quanto ao ECOG e KPS em 31,3%. Quanto ao tipo de ressecção, 56,3% foi parcial, 31,3% completa e 12,5% biópsia. O subtipo histológico mais frequente foi o GBM clássico 81,3%. Foram submetidos à apenas uma cirurgia 75,0% dos pacientes. O tratamento concomitante foi realizado em 68,8% dos pacientes; 87,5% foram submetidos à mais de 6 ciclos de TMZ e 75,0% foram tratados com apenas uma radioterapia. O desfecho de 62,5% foi óbito por câncer e 37,5% estão vivos com doença até o momento.

Tabela 4 - Dados demográficos e clínico-patológicos de pacientes portadores de Glioblastoma coletados pela análise de prontuários no Serviço de Arquivos Médicos e Estatística do Hospital de Câncer de Barretos (SAME).

		GBM <i>IDH</i> ^{WT} (N=91)		GBM <i>IDH</i> ^{MUT} (N=16)	
		N	%	N	%
Idade ao diagnóstico	Média	54,7	-	43,7	-
	Mediana	54,8	-	44,0	-
	Mínimo-Máximo	29,4-75,5	-	25,8-60,7	-
	Desvio padrão	10,9	-	10,5	-
Gênero	Feminino	40	44,0%	8	50,0%
	Masculino	51	56,0%	8	50,0%
Cor	Indefinido	5	5,5%	1	6,3%
	Branco	73	80,2%	9	56,3%
	Pardo	13	14,3%	5	31,3%
	Negro	0	0%	1	6,3%
ECOG pré-operatório	0	39	42,9%	8	50,0%
	1	15	16,5%	3	18,8%
	2	4	4,4%	0	0%
	Ignorado	33	36,2%	5	31,3%
KPS pré-operatório	≤70	5	5,5%	0	0%
	>70	53	58,2%	11	68,8%
	Ignorado	33	36,2%	5	31,3%
Tipo 1ª cirurgia	Biópsia	1	1,1%	2	12,5%
	Parcial	56	61,5%	9	56,3%
	Completa	29	31,9%	5	31,3%
	Ignorado	5	5,5%	0	0%
Subtipo histológico	GBM clássico	88	96,7%	13	81,3%
	GBM células gigantes	3	3,3%	2	12,5%
	GBM de pequenas células	0	0%	1	6,3%

Continua na próxima página

Tabela 4 - Dados demográficos e clínico-patológicos de pacientes portadores de Glioblastoma coletados pela análise de prontuários no Serviço de Arquivos Médicos e Estatística do Hospital de Câncer de Barretos (SAME) – Continuação.

		GBM <i>IDH</i> ^{WT} (N=91)		GBM <i>IDH</i> ^{MUT} (N=16)	
		N	%	N	%
Realizou a 2ª cirurgia	Não	69	75,8%	12	75,0%
	Sim	22	24,2%	4	25,0%
QT Concomitante	Não	33	36,3%	5	31,3%
	Sim	58	63,7%	11	68,8%
Realizou ≥ 6 ciclos TMZ	Não	40	44,0%	2	12,5%
	Sim	51	56,0%	14	87,5%
Radioterapia 2	Não	89	97,8%	12	75,0%
	Sim	2	2,2%	4	25,0%
Desfecho	Vivo com doença	8	8,8%	6	37,5%
	Óbito por câncer	73	80,2%	10	62,5%
	Óbito por outras causas com doença ativa	10	11,0%	0	0%

N: Número.

Os resultados moleculares serão divididos em três etapas, com a finalidade de responder aos objetivos específicos descritos no item 4.2.

6.1 Perfil molecular

Para realizar a classificação molecular foi avaliado o status de expressão de *ATRX* e *IDH1* R132H, metilação *MGMT*, e mutações de *TERT*.

6.1.1 Análise da expressão proteica de *IDH1* R132H e *ATRX*

Na análise de expressão proteica de *IDH1* R132H realizada por imunohistoquímica a expressão foi conclusiva em todos os 107 casos. Observamos expressão positiva em 14,9% (16/107) das amostras e 85,1% (91/107) com expressão negativa ou perda de expressão (Tabela 5 e Figura 11).

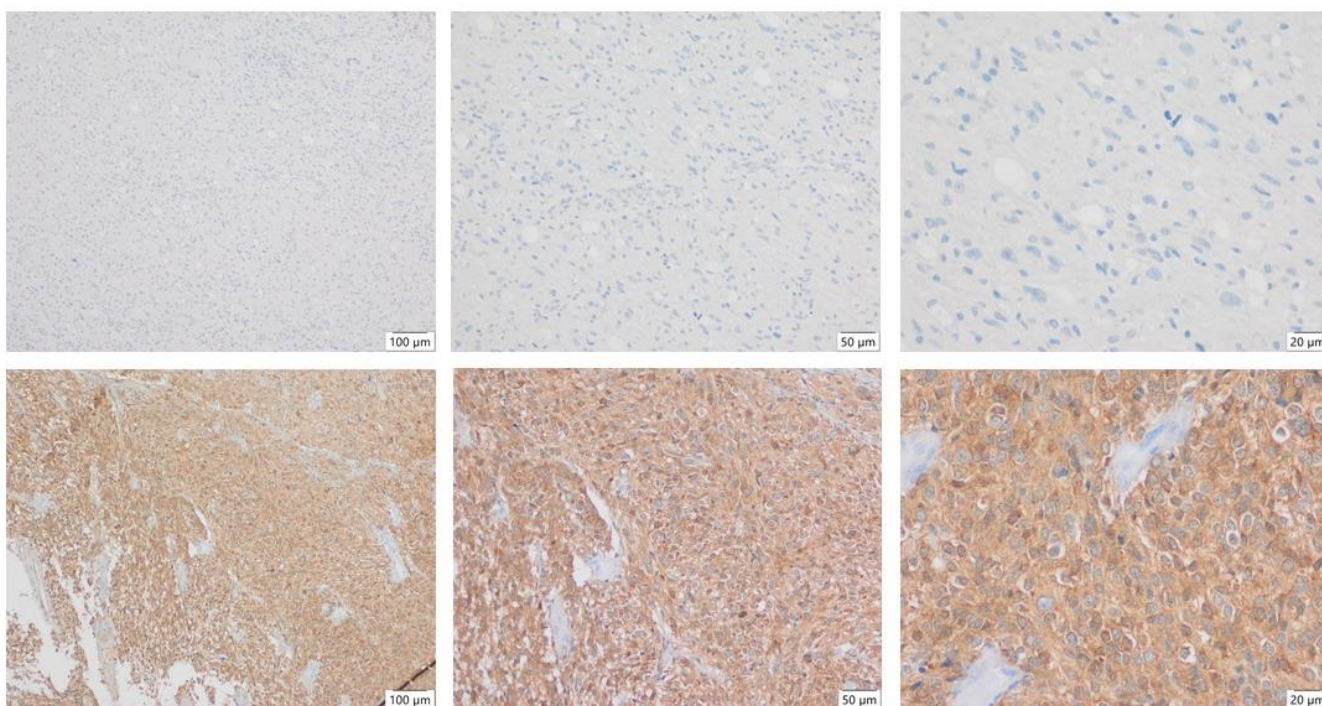


Figura 11 - Imunohistoquímica para expressão proteica de *IDH1* R132H. **A)** Amostra com expressão negativa (DAB e HE, 100x). **B)** Amostra com expressão negativa (DAB e HE, 200X). **C)** Amostra com expressão negativa (DAB e HE, 400X). **D)** Amostra positiva (DAB e HE, 100X). **E)** Amostra positiva (DAB e HE, 200X). **F)** Amostra positiva (DAB e HE, 400X).

Tabela 5 - Resultados da expressão proteica de IDH1.

	Expressão	Porcentagem (N)
IDH1 R132H	Positivo	14,9% (16)
	Negativo	85,1% (91)

N: número.

Na análise de expressão proteica de ATRX realizada por imunohistoquímica, a expressão foi inconclusiva em apenas um caso. Nos casos conclusivos, a expressão foi positiva em 85,8% (91/106) das amostras e 14,1% (15/106) com expressão negativa ou perda de expressão (Tabela 6 e Figura 12).

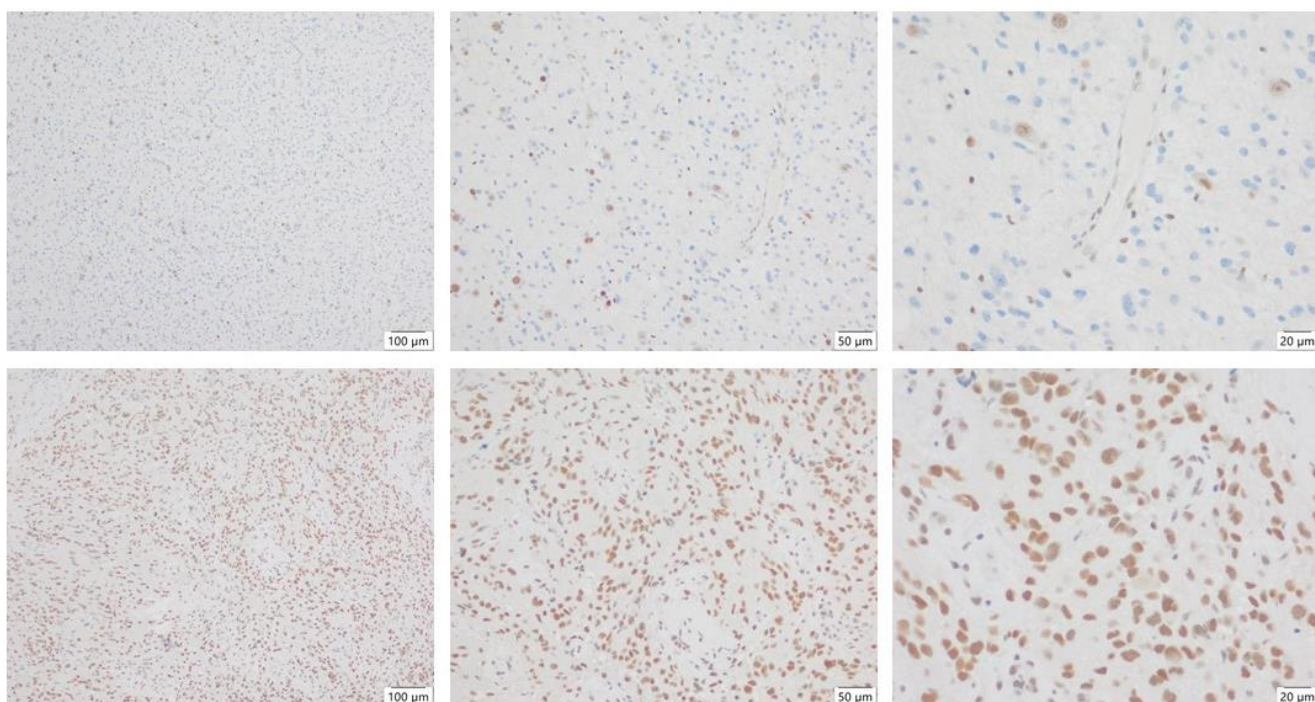


Figura 12 - Imunohistoquímica para expressão proteica de ATRX. **A)** Amostra com expressão negativa (DAB e HE, 100x). **B)** Amostra com expressão negativa (DAB e HE, 200X). **C)** Amostra com expressão negativa (DAB e HE, 400X). **D)** Amostra positiva (DAB e HE, 100X). **E)** Amostra positiva (DAB e HE, 200X). **F)** Amostra positiva (DAB e HE, 400X).

Tabela 6 - Resultados da expressão proteica de ATRX.

	Expressão	Porcentagem (N)
ATRX	Positivo	85,8% (91)
	Negativo	14,1% (15)

N: número.

Com base na expressão de IDH1, e seguindo a classificação dos tumores do CNS de 2016⁴, 91 (85%) foram classificados como glioblastomas primários (IDH selvagem - IDH^{WT}) e 16 (15%) casos como glioblastomas secundários (IDH mutado - IDH^{MUT}). A perda de expressão de ATRX foi encontrada em 6,6% (6/91) dos GBMs IDH^{WT} e 56,2% (9/16) dos GBMs IDH^{MUT} .

A sobrevida global mediana estimada por Kaplan-Meier de todos os pacientes incluindo GBMs primários e secundários, foi de 17 meses, variando de 02 a 83 meses. Entretanto, a sobrevida global mediana de GBM primário foi de 16 meses (IC 95% 14,3-17,6), variando de 02 a 83 meses; e de GBM secundário foi de 35 meses (IC 95% 12,1-57,8), variando de 10 a 76 meses, ($P=0,001$), (Figura 13). No teste Qui-quadrado, ao associar GBM primário e secundário com os grupos de resposta boa e ruim, 25,5% dos secundários eram do grupo de boa resposta; talvez o inverso dos primários em que 96,2% eram do grupo de resposta ruim ($P=0,002$).

A sobrevida global também foi maior em pacientes que apresentaram expressão negativa ou perda de expressão de ATRX quando comparados aos que apresentaram expressão positiva ($P = 0,012$).

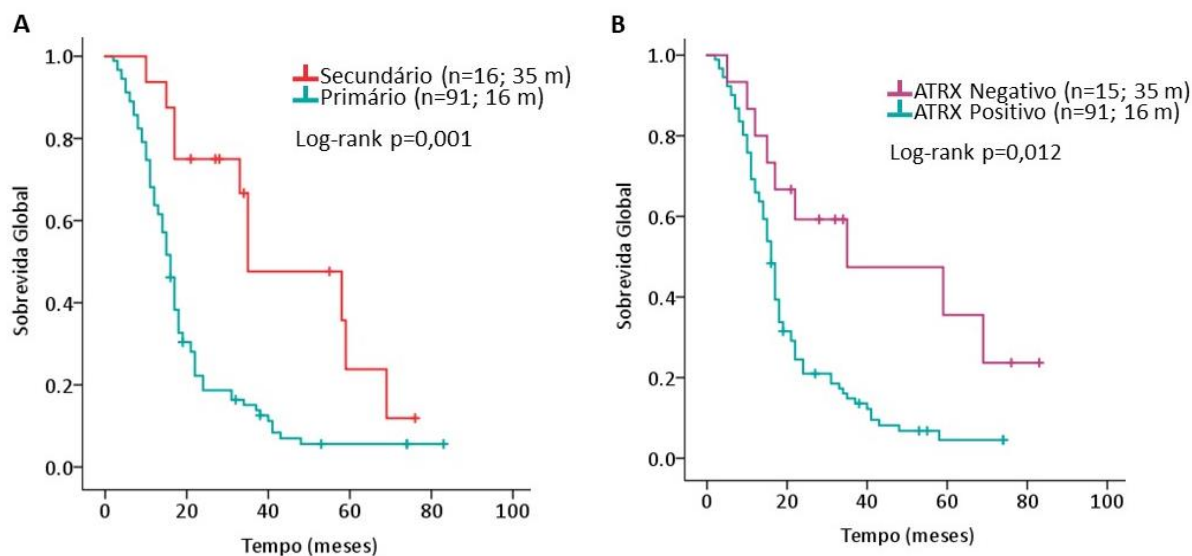


Figura 13 - Kaplan-Meier – **A**) Curvas de sobrevida global em meses segundo tipo de doença. **B**) Curvas de sobrevida global em meses segundo a expressão de ATRX.

6.1.2 Análise da metilação do *MGMT*

Na análise de metilação no promotor do gene *MGMT*, o status de metilação foi inconclusivo em 33 casos devido à baixa qualidade e quantidade de DNA obtido das amostras. Nos casos conclusivos, a metilação foi encontrada em 59,4% (44/74) das amostras e 40,5% (30/74) não apresentaram metilação (Tabela 7 e Figura 15A). Pirogramas de casos exibindo a região promotora metilada e não metilada estão representados na figura 14.

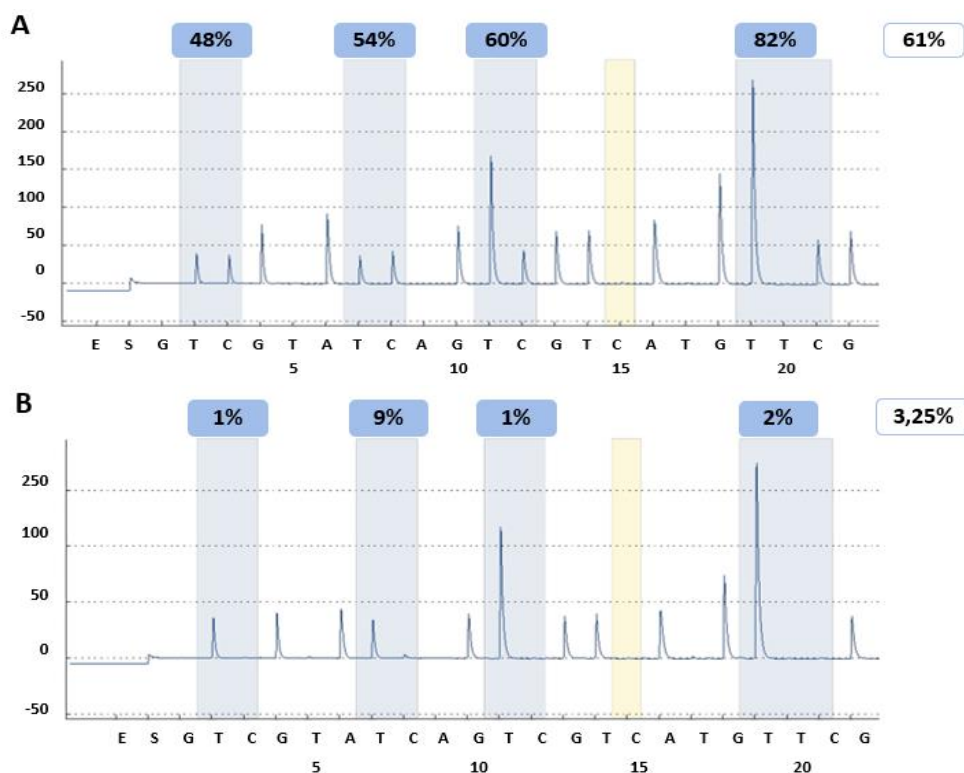


Figura 14 - Pirogramas representativos da análise de metilação no gene MGMT em GBM. Sequência analisada: YGAYGTTYGTAGGTTTTYGT. **A)** MGMTp metilado. **B)** MGMTp sem a metilação.

Tabela 7 - Resultados da metilação de MGMT.

	Categoria	Porcentagem (N)
MGMT	Metilado	59,4% (44)
	Não Metilado	40,5% (30)

N: Número.

Pelo teste de Kruskal Wallis analisamos diferenças de níveis de metilação nas CpGs para verificar se alguma apresentava níveis maiores ou menores de metilação em relação as outras; porém, não houve significância ($p=0,211$) (Figura 15B).

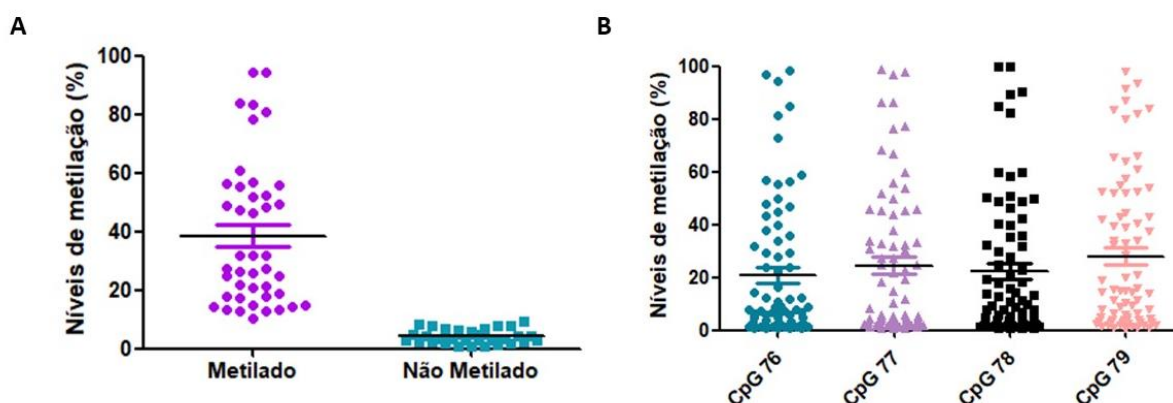


Figura 15 - Metilação no promotor de *MGMT*. **A)** Distribuição dos níveis de metilação no promotor de *MGMT* nos casos metilados ($\geq 10\%$ metilação) e casos não metilados ($< 10\%$ metilação). **B)** Porcentagem de alelos metilados em cada CpG investigada (média).

A metilação no promotor de *MGMT* foi identificada em 54,0% (33/61) dos GBMs *IDH*^{WT} e 62,5% (10/16) dos GBMs *IDH*^{MUT}.

6.1.3 Análise de mutações em *TERT*

Na análise de mutação no promotor do gene *TERT*, o status de mutação foi inconclusivo em 39 casos. Nos casos conclusivos, mutações foram encontradas em 71,0% (48/68) (Tabela 8, Figuras 16 e 17). Mutações no promotor de *TERT* foram observadas em 70,5% (48/68) de GBMs *IDH*^{WT} e em nenhum (0%) dos 8 GBMs *IDH*^{MUT} conclusivos.

Tabela 8 - Resultados da mutação de *TERT*.

	Categoria	Porcentagem (N)
<i>TERT</i>	Mutado	71,0% (48)
	<i>Wild-type</i>	29,0% (20)

N: Número.

Das amostras com mutações, 32 foram na região -124bp_G>A e 16 mutações foram na região -146bp_G>A.

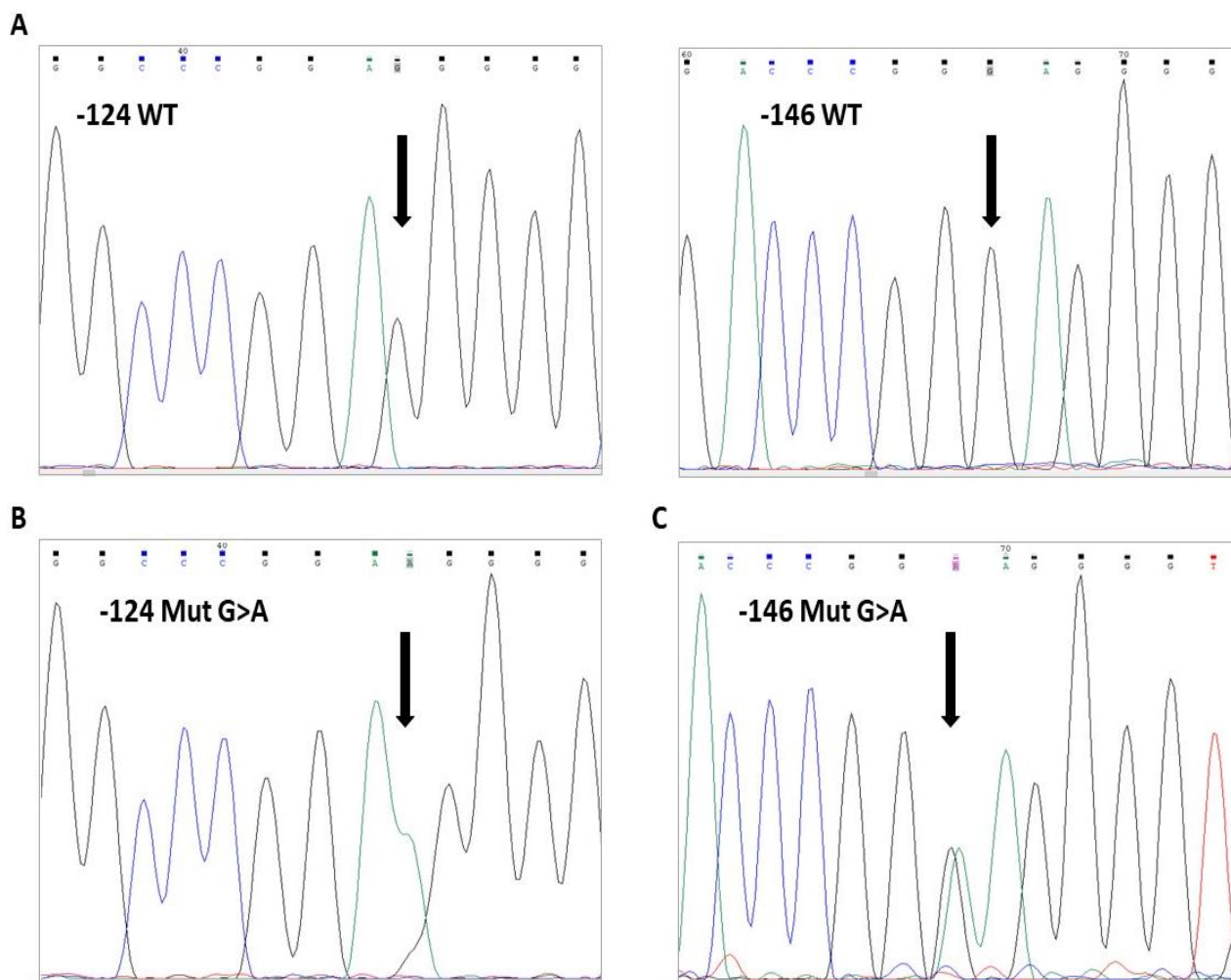


Figura 16 - Eletroferogramas representativos do Sequenciamento (Sanger). **A)** Amostra TERTp^{WT}; **B)** Amostra com mutação em c.-124: G>A; **C)** Amostra com mutação em c.-146: G>A.

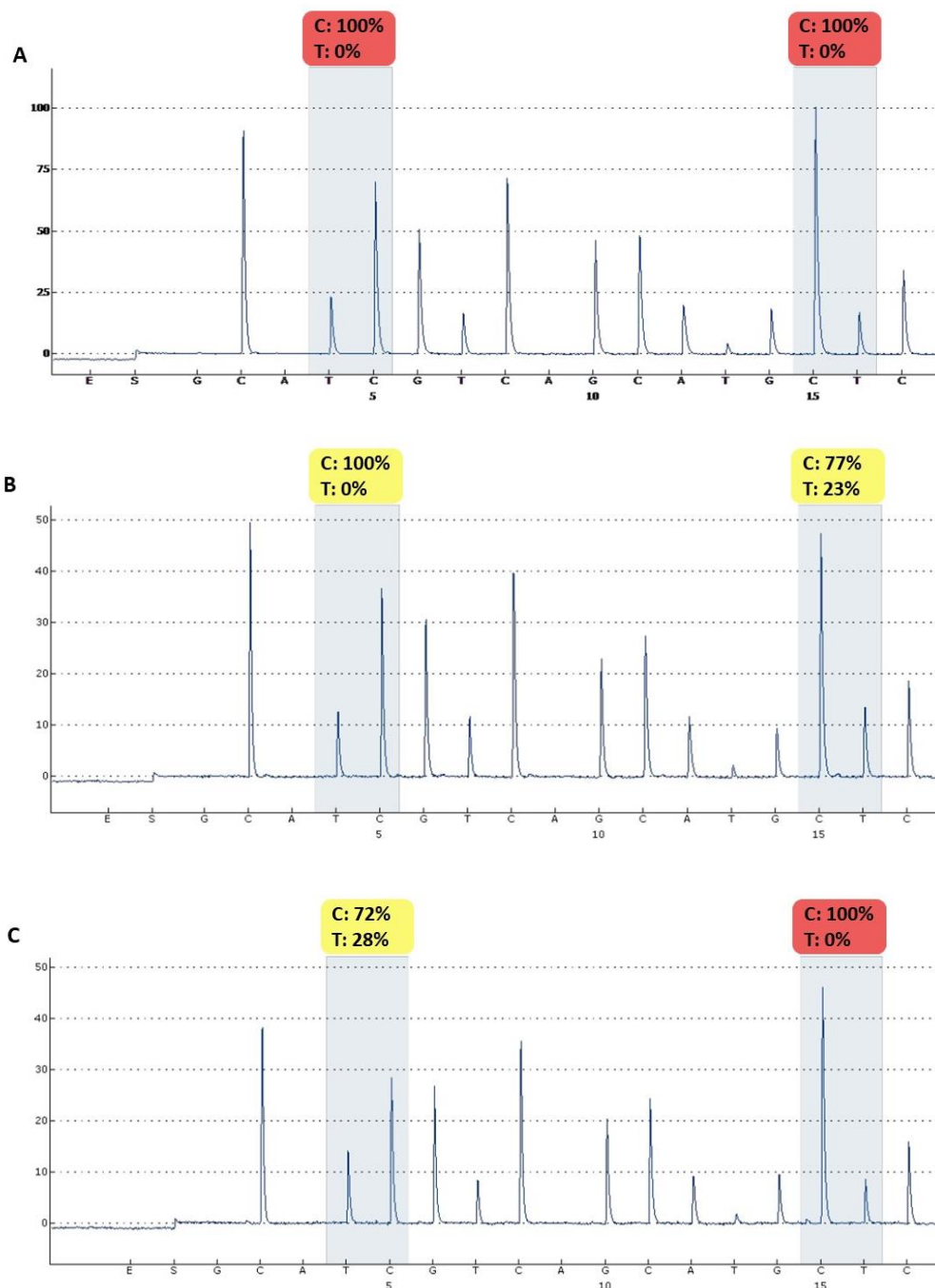


Figura 17 - Pirogramas representativos do Sequenciamento. **A)** Amostra TERTp^{WT}; **B)** Amostra com mutação em c.-124: G>A; **C)** Amostra com mutação em c.-146: G>A.

6.2 Análise da expressão em genes de danos e vias de reparo em GBM

A análise de expressão do painel de 180 genes de vias de reparo foi possível nas 107 amostras. Na figura 18, observamos algumas características como o sexo, status de ATRX, status de metilação de *MGMT* e o subtipo clínico. Entretanto, a comparação entre GBM primário e

secundário não evidenciou um perfil claro de genes que diferencia os dois subgrupos clínicos.

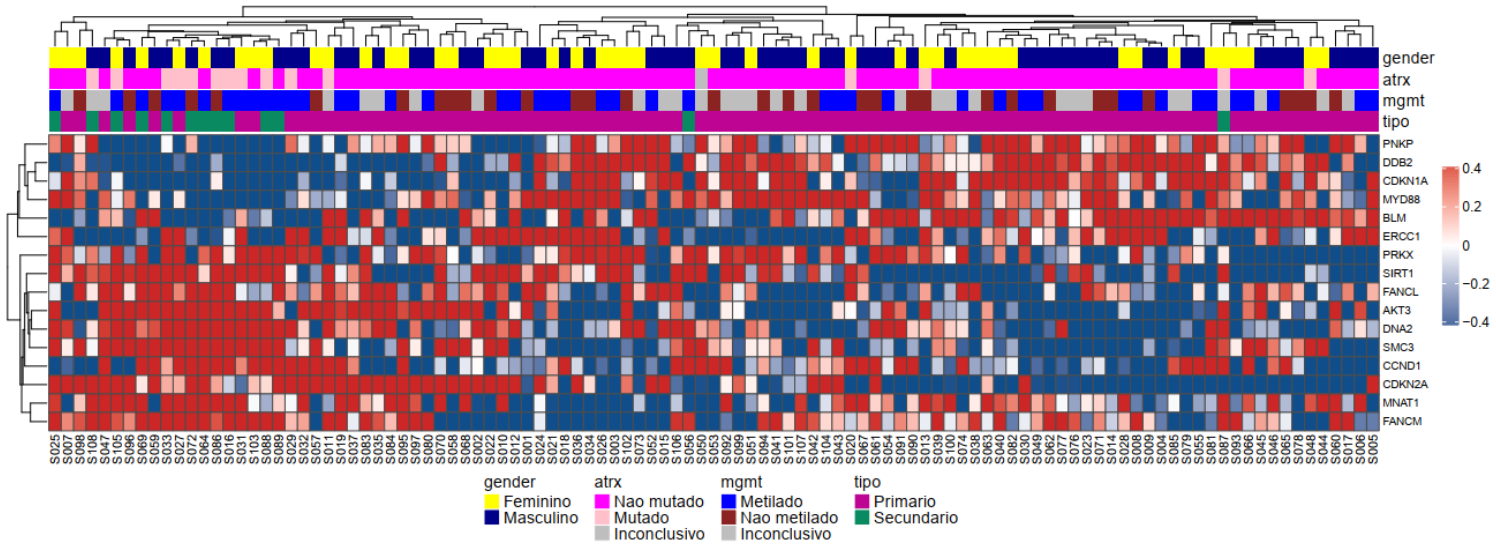


Figura 18 - Heatmap - expressão diferencial entre GBM primário e GBM secundário.

Em seguida avaliamos como os mecanismos de reparo encontram-se enriquecidos, ou seja, com um grupo de genes co-regulados nos diferentes intervalos de tempo avaliados. Essa avaliação global é importante pois trata-se de um painel com genes que compõem processos bem definidos, então é possível saber quais processo encontram-se representados nos diferentes grupos. Além disso, mesmo genes que não se encontram diferencialmente expressos ou com um *fold-change* alto, pode apresentar um *score* relevante dentro do contexto de uma via de reparo em particular.

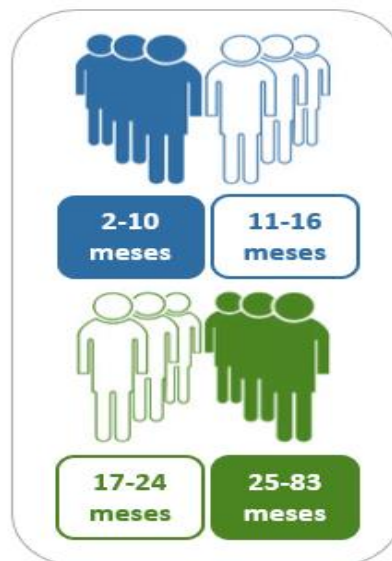


Figura 9 – Grupos de sobrevida.

Nessa primeira etapa foram utilizadas todas as amostras (tanto de pacientes com GBM primário quanto secundário) e encontra-se representado nas tabelas 9 e 10.

Tabela 9 - Processos de reparo de DNA enriquecidos que se encontraram induzidos nos diferentes intervalos de sobrevida após tratamento com temozolomida.

	Processos	Genes	P-valor	FDR
Induzidos	2-10 meses	BASE EXCISION REPAIR <i>NEIL1, UNG, NEIL2, CCNO, TDG, POLD4, PARP3, POLD1, POLE2, LIG1, POLD3</i>	0,000	0,007
	11-16 meses	-	-	-
	17-24 meses	ANEMIA FANCONI <i>FANCB, FAN1, FANCL, FANCA</i>	0,037	0,149
	25-83 meses	NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR <i>ERCC6, ERCC5, ERCC3, ERCC8, ERCC2, ERCC1, ERCC4, POLR2J</i>	0,005	0,042
		FANCONI ANEMIA <i>FAN1, FANCC, FANCB, FANCM, FANCA, FANCG, FANCE</i>	0,027	0,083

FDR: False discovery rate.

Tabela 10 - Processos de reparo de DNA enriquecidos que se encontraram reprimidos nos diferentes intervalos de sobrevida após tratamento com temozolomida.

	Processos	Genes	P-valor	FDR
Reprimidos	2-10 meses	FANCONI ANEMIA <i>FANCL, FANCM, FANCC, FAN1, FANCB, FANCA</i>	0,000	0,003
		NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR <i>ERCC1, ERCC4, ERCC3, ERCC2, ERCC8, ERCC5, ERCC6</i>	0,016	0,020
	11-16 meses	-	-	-
	17-24 meses	APOPTOSIS <i>TP53BP1, NFKB1, MYD88, ATM, CASP8, PTEN, PRKX, BCL2L1, NLRP2, SLFN11</i>	0,020	0,089
		CELL CYCLE AND SIGNALING <i>CHEK1, WEE1, SUMO3, RMI2, PTEN, MYC, CCND, CDKN1A, RRM2B, UBB, SLFN11, NKX3-1, CDK7</i>	0,038	0,213
25-83 meses	BASE EXCISION REPAIR <i>SMUG1, APEX2, NEIL1, TDG, UNG, POLE2, POLD, CCNO, PCNA</i>	0,005	0,027	

FDR: False discovery rate.

É possível observar que no intervalo de 2-10 meses existe o processo de excisão de bases de DNA mas encontra-se reprimido, e com aumento do processo de reparo por excisão de nucleotídeo e anemia de Fanconi. Tais processos representam exatamente o oposto no maior intervalo de sobrevivência do estudo (25-83 meses). Além disso, o processo de anemia de Fanconi também encontra-se significativo (induzido) no intervalo de 17-24 meses. Os genes do grupo central ("core") do processo de excisão de bases e de anemia de Fanconi são os mesmos em sua maioria. No entanto, são diferentes quando se trata do processo de excisão de nucleotídeos, conforme mostrado nas figuras 19, 20 e 21.

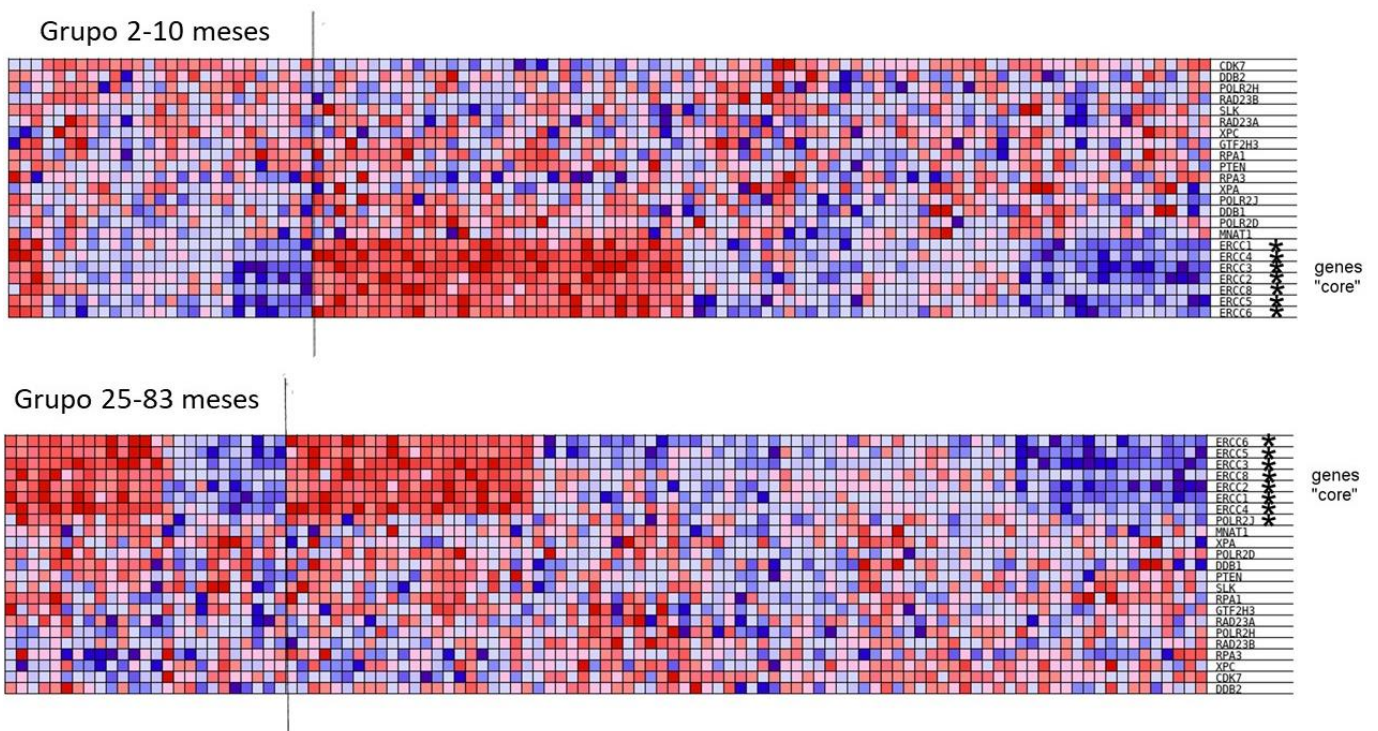
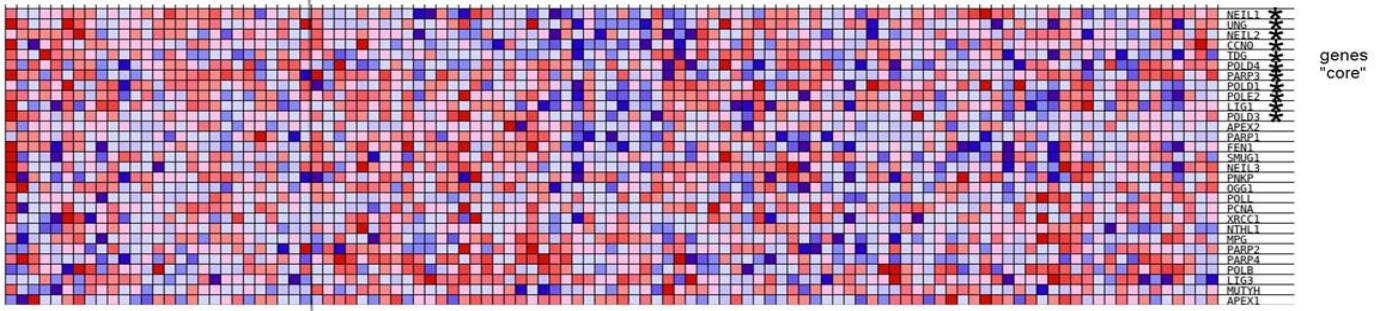


Figura 19 - Análise de enriquecimento para o processo de reparo de excisão de nucleotídeos. Os genes significativos nesse processo encontram-se destacados com asterisco.

Grupo 2-10 meses



Grupo 25-83 meses

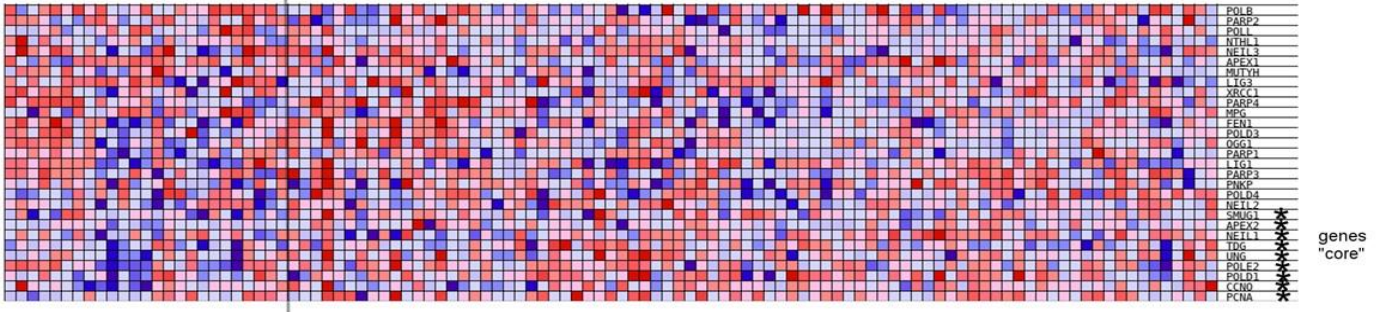
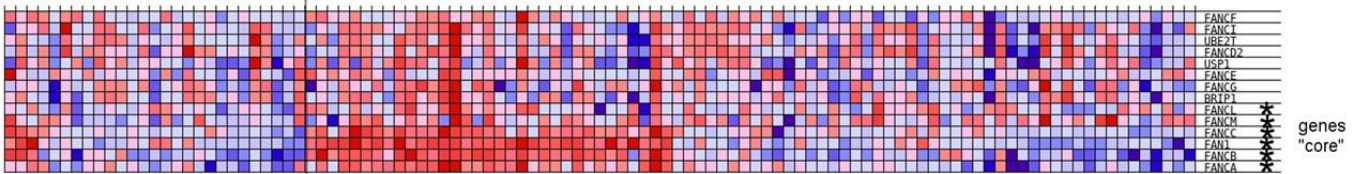
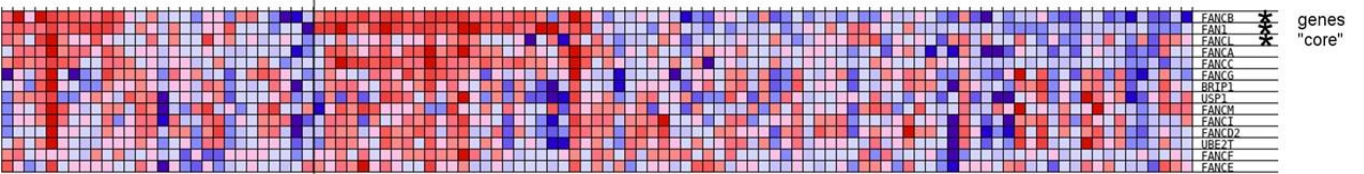


Figura 20 - Análise de enriquecimento para o processo de reparo de excisão de bases. Os genes significativos nesse processo encontram-se destacados com asterisco.

Grupo 2-10 meses



Grupo 17-24 meses



Grupo 25-83 meses

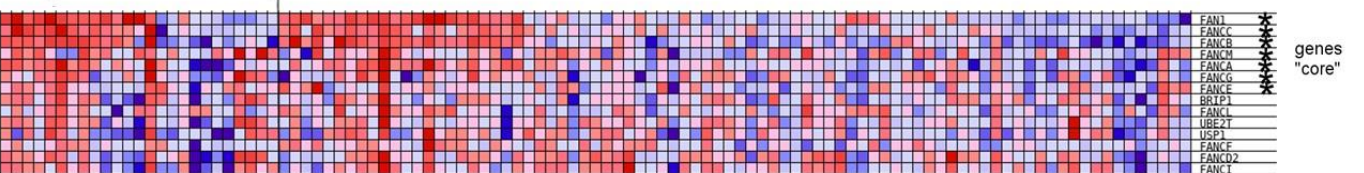


Figura 21 - Análise de enriquecimento para o processo de anemia de Fanconi. Os genes significativos nesse processo encontram-se destacados com asterisco.

6.3 Análise da expressão em genes de danos e vias de reparo e impacto clínico-patológico em GBM IDH^{WT}

A caracterização global mostrou-se similar quando avaliados somente pacientes com GBM primário. Entretanto, após a classificação global, prosseguimos as análises de genes diferencialmente expressos apenas com as amostras de GBM primário (IDH^{WT}); já que estes apresentam pior prognóstico. Ao avaliar o perfil gênico de genes de dano e reparo de DNA, 20 genes foram diferencialmente expressos. De acordo com as figuras 22 e 23, os pacientes foram divididos em sobrevida de longo e curto prazo; bem como, de acordo com os períodos de sobrevida.

No grupo de 2-10, a sobrevida mediana foi de 7 meses (IC 95% 5,1-8,8), no grupo de 11-16 foi de 14 meses (IC 95% 12,3-15,6), de 17-24 foi de 19 meses (IC 95% 17,6-20,3), e no grupo de 25-83 meses foi de 41 meses (IC 95% 39,2-42,7), ($P < 0,001$). Observamos também que pacientes com sobrevida de longo prazo tendem a não expressar os genes *CDK7*, *MGMT*, *NEIL1*. Na figura 22 observamos os genes diferencialmente expressos em relação à sobrevida.

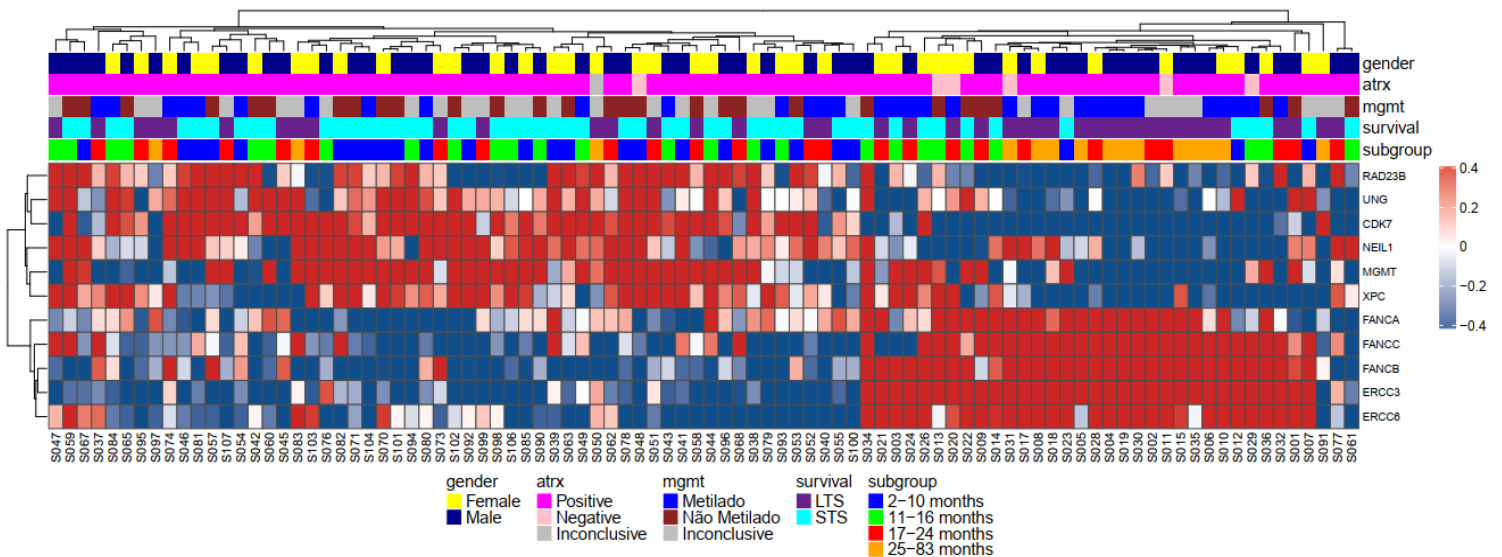


Figura 22 - Heatmap dos transcritos diferencialmente expressos entre pacientes com alta sobrevida em relação aos pacientes com baixa sobrevida, com nível de significância de $p = 0,01$ e Fold-change $\geq 1,5$.

Também analisamos somente os grupos extremos de 2-10 meses e 25-83 meses de sobrevida (Figura 23).

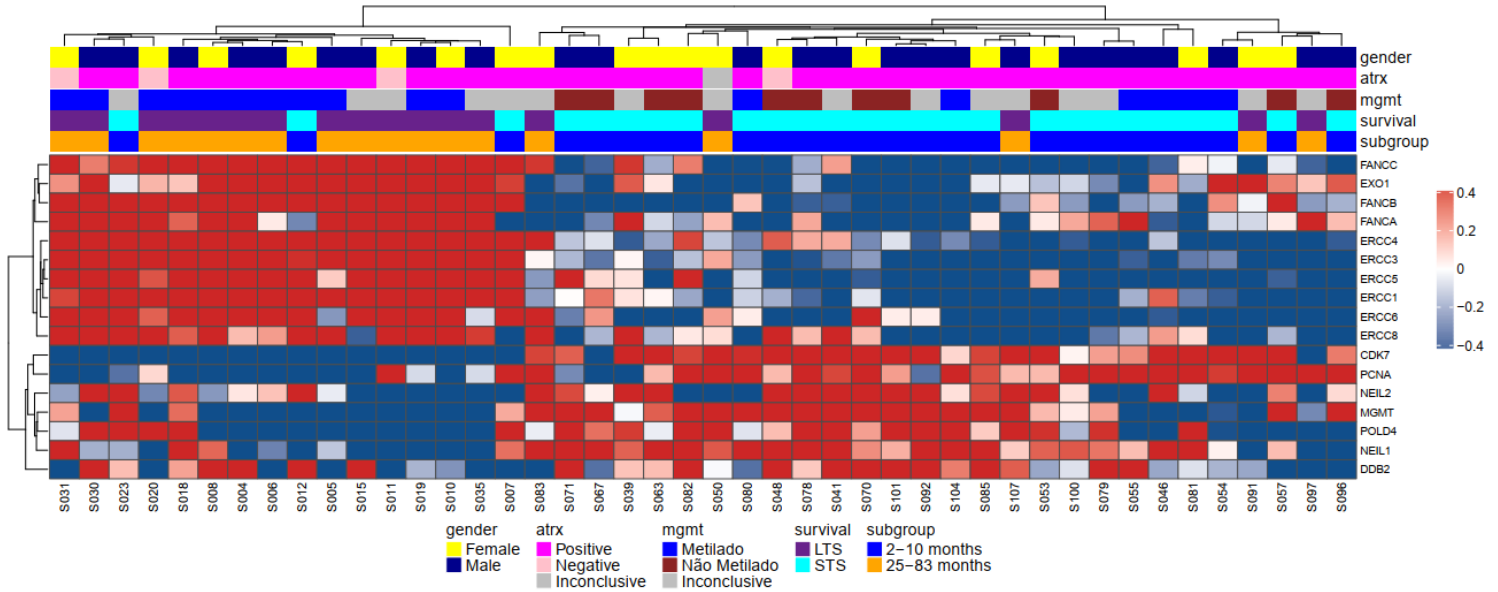


Figura 23 - Heatmap dos transcritos diferencialmente expressos entre pacientes com sobrevidas de 2-10 e 25-82 meses, com nível de significância de $p = 0,05$ e Fold-change $\geq 1,5$.

O gene *MPG* (APNG), parte do sistema de reparo por excisão de base (BER), que repara os adutos de N^3 -metiladenina e N^7 -metilguanina formados por agentes alquilantes, tem sido associado em estudos a resposta à TMZ⁶⁶. Então, avaliamos a expressão do *MPG* na nossa série, e não encontramos diferenças entre os grupos de melhor e pior sobrevida (Figura 24).

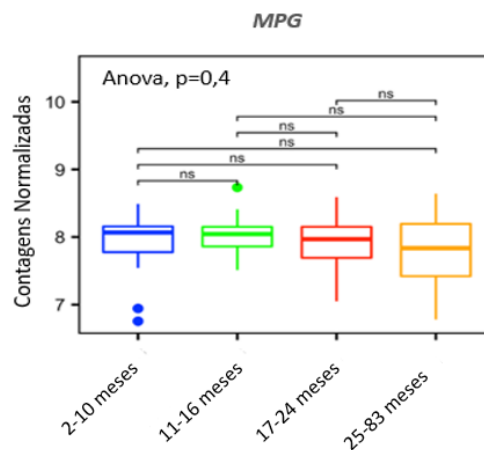


Figura 24 - Teste anova para analisar a expressão do gene *MPG* nos quatro grupos de sobrevida.

Avaliamos ainda os níveis de expressão do gene *MGMT* e encontramos diferenças significativas entre os grupos de 11-16 meses em comparação com os grupos de 17-24 meses e de 25-82 meses; bem como quando comparados os grupos de 17-24 meses com o de 25-82 meses (Anova, $p < 0,001$).

Relativamente ao gene *CDK7*, encontramos diferenças significativas quando comparados os grupos de 2-10 meses com os de 17-24 meses e 25-82 meses; bem como ao comparar os grupos de 11-16 meses com o de 17-24 meses (Anova, $p = 0,002$), (Figura 25).

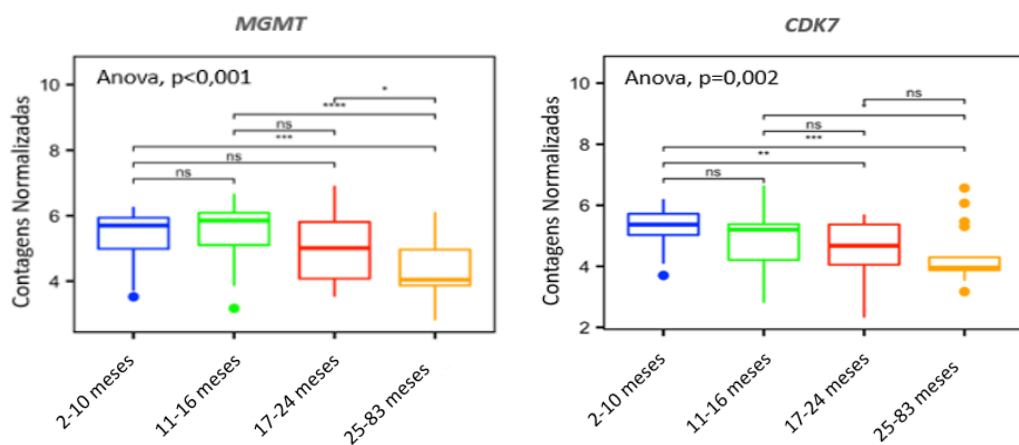


Figura 25 - Teste Anova para analisar a expressão diferencial dos genes *MGMT* e *CDK7* nos quatro grupos de sobrevivência.

Ao analisar a correlação entre as médias de metilação e a expressão do gene *MGMT* usando o teste de Spearman, encontramos uma correlação média (-0,506), ($p < 0,0001$); ou seja, quanto maior a média de metilação, menor a expressão de *MGMT*. E no teste T também encontramos significância na correlação ($p < 0,0001$), (Figura 26).

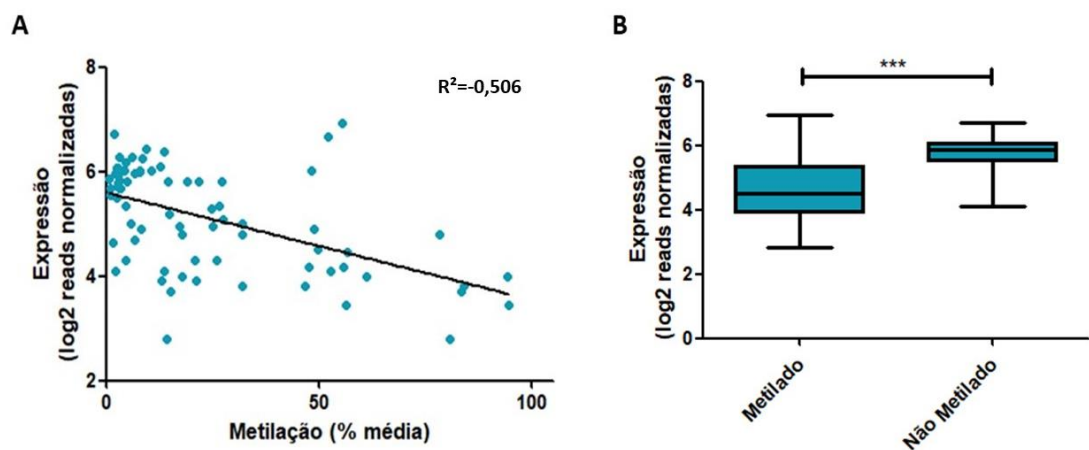


Figura 26 - Gráfico de dispersão da expressão x metilação do gene *MGMT*.

6.4 Impacto clínico e molecular na sobrevida dos pacientes

A idade mediana dos GBM IDH^{WT} foi de 54 anos para o grupo de resposta ruim e 55 anos para o grupo de resposta boa. Houve maior prevalência do gênero masculino (Resposta Ruim: 54% masculino/46% feminino, Resposta Boa: 58,5% masculino/41,5% feminino). Observou-se também maior proporção de brancos em ambos os grupos (Resposta Ruim: 84% brancos, Resposta Boa: 75,6% brancos). Nas escalas ECOG, foram classificados como 0 44% no grupo de resposta ruim e 41,5% no grupo de resposta boa. No grupo de resposta ruim, 76% dos pacientes foram submetidos à ressecção parcial. No grupo de resposta boa, 46,3% foram submetidos à ressecção completa. O subtipo histológico mais frequente em ambos os grupos foi GBM clássico. Quanto à 2ª ressecção cirúrgica, 80% dos pacientes não foram submetidos no grupo de resposta ruim, enquanto 20% dos pacientes foram reoperados. E no grupo de resposta boa, 70,7% não foram reoperados. Sessenta e seis por cento dos pacientes no grupo de resposta ruim foram submetidos ao tratamento concomitante e 34% não. Já no grupo de resposta boa, 61% fez concomitância e 39% não. A quantidade de ciclos de TMZ também foi associada significativamente à resposta; ou seja, 78% dos pacientes com resposta boa fizeram 6 ciclos ou mais de TMZ. Dos pacientes que foram submetidos a mais de uma radioterapia, apenas 2% era do grupo de resposta ruim e 2,4% do grupo de boa resposta. Quanto ao desfecho, 88% foram a óbito por câncer no grupo de resposta ruim, enquanto 70,7% foram a óbito por câncer no grupo de resposta boa (Tabela 11).

Tabela 11 - Dados demográficos e clínico-patológicos de pacientes portadores de glioblastoma primário tratados com temozolomida associados à sobrevida.

N=91		Resposta Ruim (SG ≤16 meses)	Resposta Boa (SG >16 meses)	P-valor
Idade		54,69 (29-75)	55,34 (31-73)	P=0,592***
Gênero	Feminino	23 (46,0%)	17 (41,5%)	P= 0,678**
	Masculino	27 (54,0%)	24 (58,5%)	
Cor	Indefinido	2 (4,0%)	3 (7,3%)	P= 0,654*
	Branco	42 (84,0%)	31 (75,6%)	
	Pardo	6 (12,0%)	7 (17,1%)	
ECOG pré operatório	0	22 (44,0%)	17 (41,5%)	P=0,904*
	1	7 (14,0%)	8 (19,5%)	
	2	2 (4,0%)	2 (4,9%)	
	Ignorado	19 (38,0%)	14 (34,1%)	
Tipo 1ª cirurgia	Biópsia	0 (0,0%)	1 (2,4%)	P=0,016*
	Parcial	38 (76,0%)	18 (43,9%)	
	Completa	10 (20,0%)	19 (46,3%)	
	Ignorado	2 (4,0%)	3 (7,3%)	
Subtipo histológico	GBM clássico	48 (96,0%)	40 (97,6%)	P=0,678**
	GBM células gigantes	2 (4,0%)	1 (2,4%)	
Realizou a 2ª cirurgia	Não	40 (80,0%)	29 (70,7%)	P=0,304**
	Sim	10 (20,0%)	12 (29,3%)	
QT Concomitante	Não	17 (34,0%)	16 (39,0%)	P=0,620**
	Sim	33 (66,0%)	25 (61,0%)	
Realizou mais de 6 ciclos TMZ	Não	31 (62,0%)	9 (22,0%)	P<0,001**
	Sim	19 (38,0%)	32 (78,0%)	

Continua na próxima página

Tabela 11 - Dados demográficos e clínico-patológicos de pacientes portadores de glioblastoma primário tratados com temozolomida associados à sobrevida.

N=91		Resposta Ruim (SG ≤16 meses)	Resposta Boa (SG >16 meses)	P-valor
Radioterapia 2	Não	49 (98,0%)	40 (97,6%)	P=0,887*
	Sim	1 (2,0%)	1 (2,4%)	
Status	Vivo com doença	1 (2,0%)	7 (17,1%)	P= 0,032*
	Óbito por câncer	44 (88,0%)	29 (70,7%)	
	Óbito por outras causas com doença ativa	5 (10,0%)	5 (12,2%)	

Testes Estatísticos: Teste Log-rank (Sobrevida Global); * Teste exato de Fisher, ** Qui-quadrado, *** Teste U de Mann-Whitney.

A sobrevida global foi de 30,1% aos 2 anos, 20,3% aos 3 anos, 12,8% aos 4 anos e 8,2% aos 5 anos com TMZ. O tipo de ressecção tumoral da 1ª cirurgia influenciou na sobrevida global, ($P=0,036$). A mediana de sobrevida dos pacientes em meses foi de 13 (IC 95% 10,2-15,7), 17 meses no paciente submetido a biópsia e 21 (IC 95% 16,7-25,2) para os pacientes submetidos a ressecção completa (Figura 27A). Também observamos melhor sobrevida em pacientes tratados com 6 ou mais ciclos de TMZ (mediana: 18 meses, IC95% 16,0-19,9) em comparação com aqueles tratados com menos de 6 ciclos (mediana: 10 meses, IC95% 7,9-12,0), ($P<0,001$), (Figura 27B).

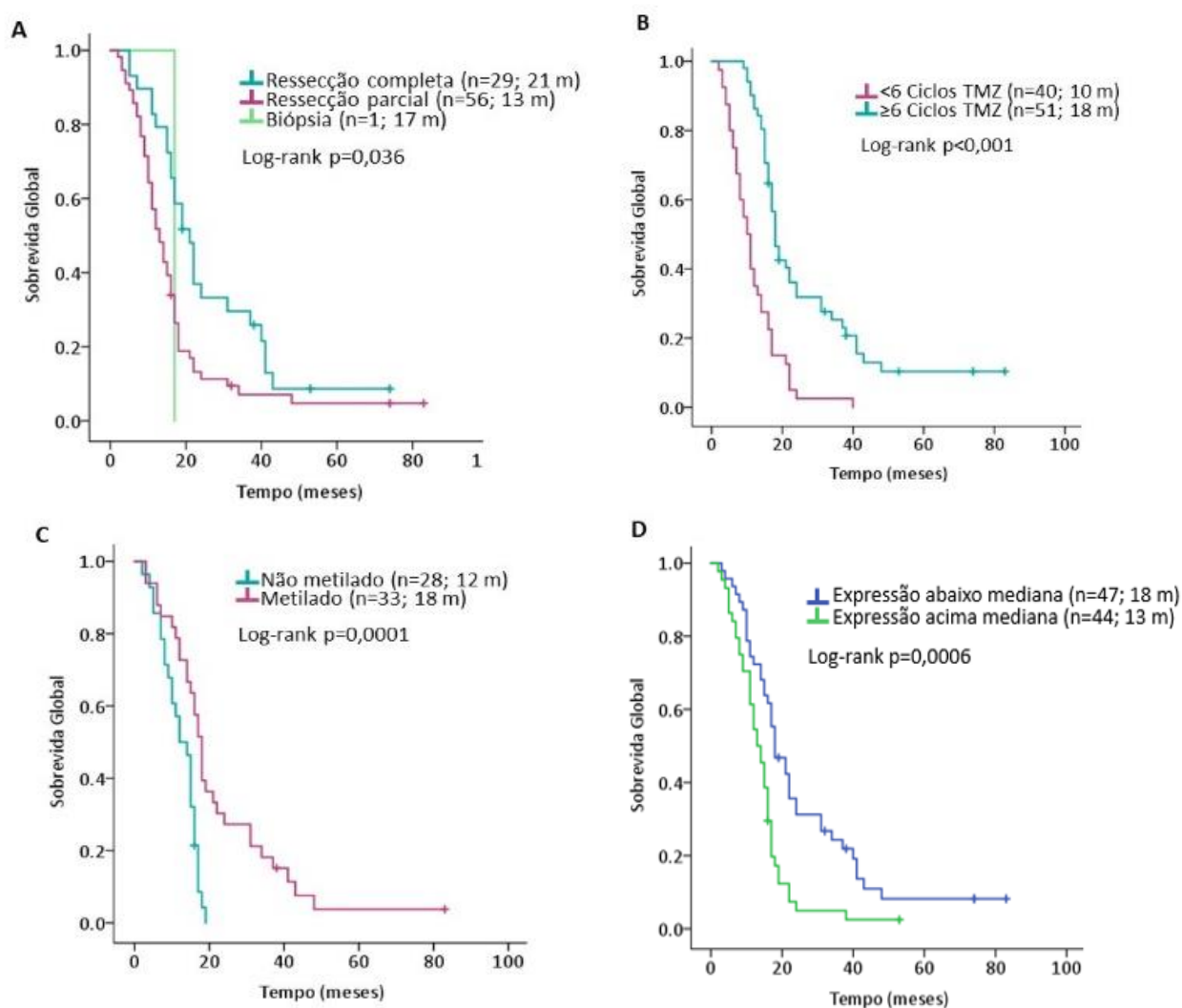


Figura 27 - Kaplan-Meier – **A)** Curvas de sobrevida global em meses segundo tipo da 1ª cirurgia. **B)** Curvas de sobrevida global em meses segundo a quantidade de ciclos de TMZ. **C)** Curvas de sobrevida global em meses segundo a metilação de MGMT. **D)** Curvas de sobrevida global em meses segundo a expressão de mRNA de *MGMT*.

Como esperado, a metilação no promotor de *MGMT* foi significativamente associada a sobrevida global ($P=0,0001$). A mediana de sobrevida dos pacientes em meses foi de 12 (IC 95% 9,0-14,9) e 18 (IC 95% 16,1-19,8) para os pacientes com o promotor do gene *MGMT* não metilado e metilado, respectivamente (Figura 27C). A expressão de *MGMT* também foi significativamente associada a sobrevida global ($P=0,0006$). A mediana de sobrevida em meses foi de 13 (IC 95% 10,4-15,6) e 18 (IC 95% 13,6-22,4) nos pacientes com expressão acima e abaixo da mediana, respectivamente (Figura 27D). Pacientes que apresentaram mutações no promotor de *TERT* (mediana: 16 meses, IC 95% 14,2-17,7) tiveram melhor sobrevida ao comparar com aqueles mutados (mediana: 15 meses, IC 95% 11,7-18,2), ($P=0,173$), no entanto, não são estatisticamente significativo (Figura 28).

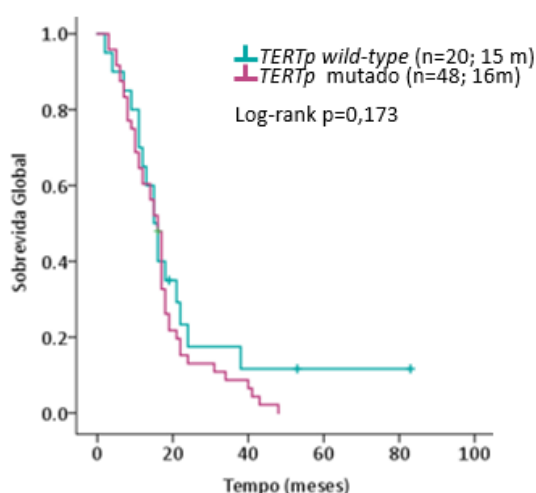


Figura 28 - Kaplan-Meier – Curvas de sobrevida global em meses segundo a mutação no promotor de *TERT*.

Na sobrevida livre de progressão, a probabilidade de progredir em um 1 ano foi de 34,2%, em 3 anos foi 11,5%. A mediana foi de 9 meses (IC 95% 8,2-10,8). Em relação aos grupos de resposta, a mediana foi de 7 meses (IC 95% 6,8-8,2) no grupo de resposta ruim e 14 meses (IC 95% 9,4-19,5) no grupo de resposta boa, ($p<0,00001$), (Figura 29A). Também observamos uma sobrevida livre de progressão maior nos pacientes que apresentaram metilação do promotor de *MGMT*; a mediana foi de 7 meses (IC 95% 5,8-8,9) e 12 meses nos metilados (IC 95% 9,9-14,1), ($p=0,002$) (Figura 29B).

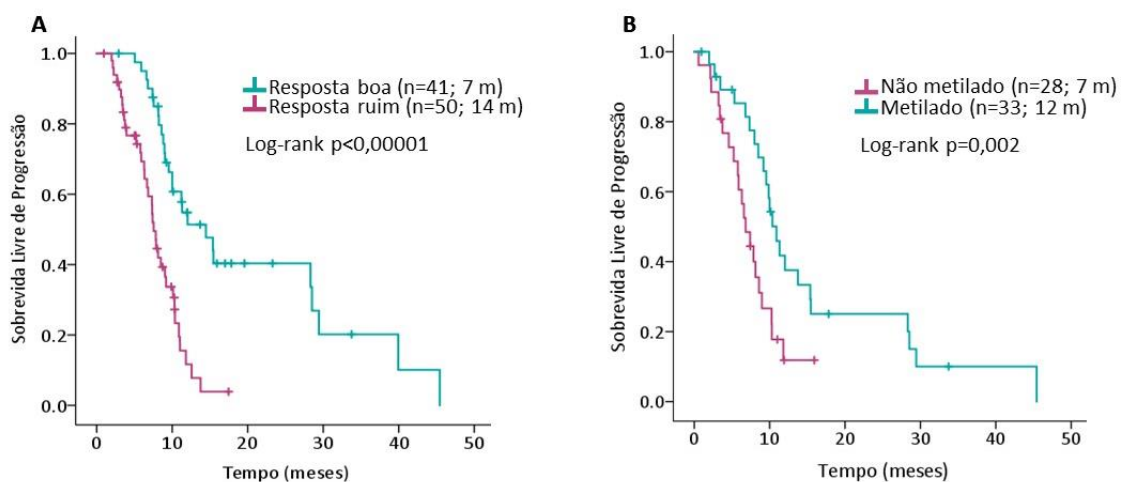


Figura 29 - Kaplan-Meier – **A)** Curvas de sobrevida livre de progressão segundo o tipo de resposta. **B)** Curvas de sobrevida livre de progressão em meses segundo a metilação de *MGMT*.

Os genes apresentados no *heatmaps* foram testados individualmente por Regressão de Cox e associados a sobrevida global em uma análise univariada (Tabela 12).

Tabela 12 - Análise univariada dos genes diferencialmente expressos.

Genes	RR	p-Valor	IC95%
<i>NEIL2</i>	1.54	0.007	1.12-2.12
<i>POLD4</i>	1.54	0.001	1.20-1.98
<i>CDK7</i>	1.51	0.001	1.18-1.92
<i>MGMT</i>	1.49	0.0002	1.20-1.86
<i>DDB2</i>	1.39	0.005	1.10-1.75
<i>NEIL1</i>	1.28	0.046	1.00-1.64
<i>PCNA</i>	1.24	0.073	0.98-1.58
<i>EXO1</i>	0.88	0.026	0.78-0.98
<i>ERCC4</i>	0.83	0.027	0.71-0.98
<i>ERCC1</i>	0.82	0.064	0.67-1.01
<i>FANCA</i>	0.78	0.009	0.65-0.94
<i>ERCC5</i>	0.76	0.011	0.62-0.94
<i>FANCB</i>	0.76	0.005	0.64-0.92
<i>ERCC8</i>	0.73	0.025	0.56-0.96
<i>FANCC</i>	0.73	0.002	0.60-0.88
<i>ERCC3</i>	0.71	0.002	0.57-0.88
<i>ERCC6</i>	0.70	0.0004	0.57-0.85

RR: Risco relativo.

Os genes que apresentaram risco relativo >1 , foram considerados fatores de risco; ou seja, esses genes tiveram alta expressão nos pacientes com pior prognóstico. Todavia, os genes que apresentaram risco relativo <1 , foram considerados fatores de proteção; ou seja, esses genes tiveram alta expressão nos pacientes com melhor prognóstico.

Após a análise univariada, os genes candidatos foram testados pelo método *forward* em uma análise multivariada resultando em 3 genes significativamente diferencialmente expressos. Estes foram *ERCC6* (RR=0,72; P=0,002) com alta expressão nos pacientes de melhor sobrevida, *DDB2* (RR = 1,32; P=0,022) e *MGMT* (RR=1,47; P=0,001) com alta expressão nos pacientes de pior sobrevida, (Tabela 13).

Tabela 13 - Análise multivariada dos genes diferencialmente expressos associados a sobrevida global.

Genes	RR	p-Valor	IC95%
<i>MGMT</i>	1.47	0.001	1.17-1.83
<i>DDB2</i>	1.32	0.022	1.04-1.68
<i>ERCC6</i>	0.72	0.002	0.59-0.88

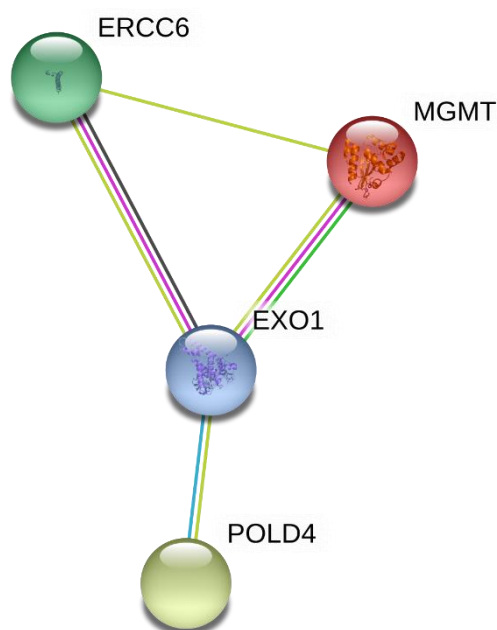
RR: Risco relativo.

E por fim, realizamos uma análise multivariada método *backward* (Tabela 14) associando as características clínico patológicas, moleculares e os genes que foram significativos nas análises univariadas.

Observamos as principais características significativas na Regressão de Cox multivariada. A ressecção parcial foi significativa ($P=0,0003$), (RR=0.36). Pacientes que foram tratados com 6 ciclos ou mais de TMZ apresentaram significância ($P=0,011$), (RR=0.41). O gene *ERCC6* continuou significativo na multivariada ($P=0,001$), (RR=0.63). Dessa forma, essas variáveis se apresentaram como fatores de proteção pelos valores de risco relativo. Os genes *EXO1*, *MGMT* e *POLD4* continuaram significativos na análise multivariada respectivamente ($P=0,013$, RR=1.31), ($P=0,010$, RR=1.55) e ($P<0,0001$, RR=2.23).

Tabela 14 - Análise multivariada.

		RR	P-valor	IC95%
Tipo 1ª cirurgia	Biópsia	REF		
	Parcial	0.36	P=0,0003	0.21-0.63
	Completa	1.66	P=0,63	0.20-13.69
Fez ≥6 ciclos TMZ	Não	REF		
	Sim	0.41	P=0,011	0.21-0.820
Mutação em <i>TERTp</i>	<i>Wild-type</i>	REF		
	Mutado	1.97	P=0,076	0.93-4.17
<i>ERCC6</i>		0.63	P=0,001	0.48-0.83
<i>EXO1</i>		1.31	P=0,013	1.05-1.63
<i>MGMT</i>		1.55	P=0,010	1.11-2.17
<i>POLD4</i>		2.23	P<0,0001	1.48-3.35

**Figura 30** - String – das interações proteicas.

Na figura 30, observamos as interações proteína-proteína transcritas pelos genes significativos na análise multivariada. Em roxo são interações conhecidas determinadas experimentalmente. Em amarelo, *textmining* (mineração de dados). Em preto, co-expressão. Verde, interações previstas – *gene neighborhood* (vizinhança). Azul, são interações conhecidas de bancos de dados.

7.DISSCUSSÃO

A classificação atual dos glioblastomas baseia-se em exames histopatológicos e moleculares, nomeadamente IDH1 e ATRX, e utilização de outros marcadores com potencial prognóstico, tais como *MGMT* e *TERT*.

No presente estudo, analisando 107 glioblastomas, encontramos de que 85% deles seriam GBM primários baseados na ausência de expressão de IDH1. Esta frequência está de acordo com a literatura mundial, onde GBM primários são a grande maioria, aproximadamente 90%⁴. A perda de expressão de ATRX foi encontrada em 6,6% (6/91) dos GBMs *IDH*^{WT} e 56,2% (9/16) dos GBMs *IDH*^{MUT}. Ebrahimi *et al* (2016), encontrou a perda de expressão nuclear de ATRX em GBM primário (GBMs *IDH*^{WT}) foi de 11% e 53% dos GBMs secundários (GBMs *IDH*^{MUT})²⁹. Em nosso estudo, observamos a frequência de 2,3% (2/67) de perda de expressão em ATRX nos tumores *IDH*^{WT}-*TERT**p*^{WT}. Contudo, não foi possível obter o status do promotor de *TERT* em todas as amostras devido a dificuldades na amplificação por se tratar de amostras provenientes de material parafinado. Sendo assim, a frequência foi estimada apenas nas amostras conclusivas para *IDH1* e *TERT*. Em outro estudo, foi observada uma frequência de 22% de perda de expressão nuclear em ATRX nos GBMs classificados como *IDH*^{WT}-*TERT**p*^{WT}¹⁵.

No presente estudo, observamos uma frequência de mutações de *TERT* em 70,5% (48/68) de GBMs *IDH*^{WT} e 0% (0/8) de GBMs *IDH*^{MUT}. Também encontramos a frequência de 29,4% (20/68) de *IDH*^{WT}-*TERT**p*^{WT}. Aproximadamente 20% dos GBMs são conhecidos como *IDH*^{WT}-*TERT**p*^{WT}; ou seja, não apresentam mutações nos biomarcadores mais usados, segundo Diplas *et al* (2018)¹⁵. A mutação no promotor de *TERT* ocorre em aproximadamente 72% nos GBMs *IDH*^{WT}^{4, 59}; o que mostra que nossos dados corroboram com a literatura.

A metilação no promotor de *MGMT* foi identificada em 54,0% (33/61) dos GBMs *IDH*^{WT} e 62,5% (10/16) dos GBMs *IDH*^{MUT}. A mutação em *IDH* geralmente está ligada a metilação de *MGMT* provavelmente devido à competição de TET2 dependente de α -cetogluturato pelo oncometabólito 2'-hidroxiglutarato; resultando em uma hipermetilação global do genoma. E a metilação no promotor de *MGMT* é encontrada em aproximadamente 40% dos GBMs *IDH*^{WT}. Christians *et al* (2019), encontrou a frequência de metilação nas amostras de GBM *IDH*^{WT} de 32%⁶⁰. Radke *et al* (2019), encontrou a metilação em 51% dos GBMs *IDH*^{WT}⁶¹.

A rotina de neuropatologia usa tecido proveniente de material fixado em formalina e embocado em parafina (FFPE), sendo conhecida a degradação de DNA e RNA associado ao processo de fixação em algumas amostras, impedindo a realização de metodologias moleculares. Nas análises de mutações em *TERT*, 68 (63,5%) amostras foram conclusivas e a metilação de *MGMT* foi conclusiva em 74 (69,2%) amostras. Por outro lado, 100% das amostras foram conclusivos para expressão gênica (tecnologia *nCounter*), confirmando a robustez e sensibilidade da técnica, mesmo em material degradado como FFPE corroborando com o estudo de Veldman-Jones *et al* (2015)^{55, 65}.

O principal objetivo deste trabalho foi encontrar uma assinatura gênica associado com a sobrevida de pacientes com glioblastoma tratados com temozolomida. Encontramos um conjunto de 17 genes (*NEIL2*, *OLD4*, *CDK7*, *MGMT*, *DDB2*, *NEIL1*, *PCNA*, *EXO1*, *ERCC4*, *ERCC1*, *FANCA*, *ERCC5*, *FANCB*, *ERCC8*, *FANCC*, *ERCC3*, *ERCC6*) cuja expressão estava significativamente distinta em pacientes com resposta boa em comparação com resposta ruim.

Um desses genes foi o *CDK7*, que apresentou níveis mais altos de expressão em pacientes com sobrevida de curto prazo. Na análise de expressão diferencial do gene nos quatro grupos de sobrevida, encontramos significância entre o grupo de 2-10 meses quando comparado com os grupos de 17-24 meses e de 25-83 meses ($p=0,002$). *CDK7* é responsável por fosforilar RNA polimerase II para iniciar a transcrição e desempenha papel ativo na pausa proximal do promotor. É descrito com alta expressão em GBM quando comparados com tecidos cerebrais normais e gliomas de baixo grau. A alta expressão de *CDK7* foi correlacionada com pior prognóstico em GBM e glioma⁵³. Meng *et al* (2018), descreve *CDK7* como um marcador prognóstico e possível alvo terapêutico; pois sua alta expressão prediz pior prognóstico, e testes realizados com o inibidor de *CDK7*, o THZ1 confirma a eficácia terapêutica *in vitro* e *in vivo*⁶². Kun *et al* (2017) reportou que a alteração na expressão de alguns genes de reparo do DNA pode ser a razão de diferentes taxas de sobrevida, e os genes *CDK7* e *DDB2* foram descritos como genes potenciais *drivers*⁴⁰, corroborando com nossos achados, pois observamos alta expressão de *CDK7* e *DDB2* nos pacientes com menor sobrevida.

Dos 17 genes diferencialmente expressos, somente 4 (*ERCC6*, *EXO1*, *MGMT* e *POLD4*) se mantiveram significativos após análise multivariada considerando todas as condições clínicas e moleculares.

Encontramos alta expressão do gene *ERCC6* nos pacientes de melhor sobrevida. Berntsson e colaboradores (2011) identificaram uma associação entre o SNP rs4253079 mapeado no gene *ERCC6* e maior sobrevida global de pacientes com gliomas de baixo grau e anaplásicos ⁶³. A enzima de reparo codificada por *ERCC6* é importante no reparo por excisão de nucleotídeo acoplada à transcrição ⁷⁷. Dabholkar e colaboradores não encontraram concordância entre a expressão do mRNA entre tecidos malignos e não malignos ⁷⁸. No entanto, novos estudos são necessários a fim de compreender melhor o impacto de *ERCC6* no glioblastoma.

Relativamente ao gene *EXO1*, verificamos que a sua expressão aumentada estava significativamente associada a pacientes com maior sobrevida. Entretanto, na análise multivariada observamos este gene como um fator de risco para o óbito. Este gene sintetiza a exonuclease humana 1 atuante na progressão do ponto de verificação e outras vias de reparo envolvidas na redução do estresse de replicação do DNA como o reparo de incompatibilidade (MMR), síntese de DNA de translesão (TLS), reparo por excisão de nucleotídeo (NER), quebra de dupla fita (DSBR). Sua atividade contribui para vários processos de reparo de DNA; porém, ainda não está claro se o bom ou mau funcionamento relaciona-se com o desenvolvimento do câncer ⁷⁴. Sousa *et al* (2017) observou que ao silenciar o *EXO1* nas células T98G, o reparo ao dano no DNA foi mais rápido e os níveis de proliferação maiores; indicando que sua redução favoreceu a restauração da quebra de dupla fita (DSBR) ⁷⁶.

Encontramos também altos níveis de mRNA do gene *POLD4* em pacientes com menor sobrevida. *POLD4* sintetiza a polimerase δ principal responsável pela cópia do modelo de cadeia atrasada ⁷⁹. Entretanto, são escassos os relatos na literatura de alterações deste gene em neoplasias. Em câncer de pulmão, os genes do ciclo celular e ponto de verificação geralmente mostram aumento na expressão do mRNA, mas Huang e colaboradores encontraram níveis reduzidos de mRNA de *POLD4* no câncer de pulmão de pequenas células ⁸⁰. Também encontramos no atlas de proteínas humanas uma das menores medianas de expressão de RNA de *POLD4* em GBM quando comparado com outros tipos tumorais; sendo a maior mediana em adenocarcinoma ductal pancreático ⁸¹.

Relativamente ao *MGMT*, é amplamente conhecido que a metilação no promotor correlaciona-se de forma consistente com sobrevidas globais mais longas; sugerindo seu uso como preditor de resposta ao tratamento com agentes alquilantes, como a TMZ ^{38, 37, 38, 67, 68},

⁷⁵. Encontramos correlação inversa entre a metilação e a expressão do gene *MGMT*; o que sugere a concordância entre as técnicas. Entretanto, devido ao tipo de amostra utilizado e a necessidade de amplificação para o pirosequenciamento, a plataforma nCounter pode ser uma boa opção de análise da expressão de *MGMT* de forma reprodutível; assim como analisar o conjunto de genes preditivos em uma única corrida.

A sobrevida global mediana de todos os pacientes incluindo GBMs primários e secundários foi de 17 meses, a mesma encontrada por Carter e colaboradores ⁷². Pacientes que foram submetidos 6 ciclos ou mais de TMZ apresentaram melhor sobrevida em nosso estudo (Sobrevida global: 21,0 meses, IC 95% 16,5-24,4 vs 11,0 meses, IC 95% 8,9-13,0, $P < 0,0001$). Quan *et al* (2019) também observou melhor sobrevida nestes pacientes e concluiu que a administração prolongada demonstrou benefícios na sobrevida mediana (Sobrevida global: 47,0 meses, IC 95% 20,0-73,9 vs 20,6 meses, IC 95% 17,9-23,2, $P = 0,014$) ⁶⁴. A mediana de sobrevida dos pacientes segundo a metilação de *MGMT* foi de 12 e 18 meses para os pacientes com o promotor do gene *MGMT* não metilado e metilado, respectivamente. Stupp e colaboradores (2009), encontrou medianas de 12,6 e 23,4 meses em *MGMT* não metilado e metilado, respectivamente ¹¹. Todos os pacientes são acompanhados até o desfecho. Então até o momento, temos 8 pacientes vivos.

Apesar de ser descrito que a alta expressão de *MPG* se correlaciona com a pior sobrevida global ⁴⁸, no nosso presente estudo não encontramos essa associação.

Nossos resultados poderão ser validados em uma nova coorte ou modelos *in vitro* usando o modelo de resistência à TMZ. Lee (2016) ao comparar linhagens sensíveis e resistentes à TMZ, a TMZ suprimiu a atividade da telomerase nas linhagens sensíveis (U87 e U373); porém, não na linhagem resistente (T98G). A linhagem resistente (T98G) expressa altos níveis de *MGMT*, mas a linhagem sensível (U87) expressa baixos níveis devido a metilação parcial do promotor ⁴⁸.

Concluindo, realizamos com sucesso a classificação tumoral hoje preconizada pela OMS para pacientes com GBM. A metilação de *MGMT* se mostrou um preditor significativo da sobrevida em pacientes tratados com TMZ. Encontramos uma assinatura genética de 4 genes, significativamente associados com a sobrevida de pacientes com GBM primários, tratados com temozolomida.

8. CONCLUSÃO

O glioblastoma (GBM) é o tumor primário mais mortal do sistema nervoso central, com alta heterogeneidade molecular e clínica; apesar do tratamento intensivo poucos pacientes respondem bem às terapias.

No presente trabalho realizamos a classificação tumoral hoje preconizada pela OMS para uma série de pacientes com glioblastoma tratados com temozolomida. Verificamos que *IDH1* e *ATRX* estão associados ao melhor prognóstico.

O gene *MGMT* se mostrou um preditor significativo das sobrevidas global e livre de progressão, sugerindo seu uso como um fator de resposta ao tratamento com TMZ. Não encontramos impacto significativo do gene *TERT* nas sobrevidas.

Através de uma abordagem transcriptômica inovadora conseguimos identificar um conjunto de 17 genes (*CDK7, DDB2, ERCC1, ERCC3, ERCC4, ERCC5, ERCC6, ERCC8, EXO1, FANCA, FANCB, FANCC, MGMT, NEIL1, NEIL2, PCNA e POLD4*) capazes de distinguir os pacientes com melhor e pior prognóstico nessa população de estudo. Em análise multivariada, encontramos que os genes *ERCC6, EXO1, MGMT e POLD4* são marcadores independentes de sobrevida em glioblastoma tratados com temozolomida.

REFERÊNCIAS

1. GLOBOCAN. <http://qco.iarc.fr>. 2018.
2. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. *Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil*. José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância., editor. **Rio de Janeiro: INCA**; 2019. 41 p.
3. Barnholtz-Sloan JS, Ostrom QT, Cote D. *Epidemiology of Brain Tumors*. **Neurol Clin**. 2018: 395-419.
4. Louis DNO, H. Wiestler, O.D.Cavenee, W.K. *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System*. 4 ed. Bosman FT, Jaffe ES, Lakhani SR, Ohgaki H, editors. Lyon 2016.
5. Omuro A, DeAngelis LM. *Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review*. **JAMA**. 2013; 310(17):1842-50.
6. Milano MT, Okunieff P, Donatello RS, Mohile NA, Sul J, Walter KA, et al. *Patterns and timing of recurrence after temozolomide-based chemoradiation for glioblastoma*. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**. 2010 Nov 15;78(4):1147-55.
7. Olmez I, Love S, Xiao A, Manigat L, Randolph P, McKenna BD, et al. *Targeting the mesenchymal subtype in glioblastoma and other cancers via inhibition of diacylglycerol kinase alpha*. **Neuro Oncol**. 2017 Jun 29;192-202.
8. Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, Vecchione-Koval T, Wolinsky Y et al. CBTRUS Statistical Report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010-2014. **Neuro Oncol**. 2017.
9. Zhang H, Gao S. *Temozolomide/PLGA microparticles and antitumor activity against glioma C6 cancer cells in vitro*. **Int J Pharm**. 2007 Feb 01;329(1-2):122-8.

10. Soeda A, Hara A, Kunisada T, Yoshimura S, Iwama T, Park DM. *The evidence of glioblastoma heterogeneity.* **Sci Rep.** 2015 Jan 27;5:7979.
11. Stupp, R, Hegi, ME, Mason, WP, Bent, MJVD, Taphoorn, MJB, Janzer, RC, et al. *Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial.* **Lancet Oncol.** 2009; 10: 459-66.
12. Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, et al. *Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis.* **Cancer Cell.** 2006 Mar;9(3):157-73.
13. Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, et al. *Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1.* **Cancer Cell.** 2010 Jan 19;17(1):98-110.
14. Norohe DS, Poulsen HS, Lassen U. *Hallmarks of glioblastoma: a systematic review.* **ESMO Open.** 2016;1(6):e000144.
15. Diplas, BH, He, X, Brosnan-Cashman, JA, Liu, H, Chen, LH, Wang, Z, et al. *The genomic landscape of TERT promoter wildtype-IDH wildtype glioblastoma.* **Nature communications.** 2018;9:2087.
16. Fan, HC, Chen, CM, Chi, CS, Tsai, JD, Chiang, KL, Chang, YK, et al. *Targeting telomerase and ATRX/DAXX inducing tumor senescence and apoptosis in the malignant glioma.* **Int. J. Mol. Sci.** 2019.
17. Berger, SL, Sassone-Corsi, P. *Metabolic Signaling to Chromatin.* **Cold Spring Harb Perspect Biol.** 2016;8:a019463
18. Otani R, Uzuka T, Ueki K. *Classification of adult diffuse gliomas by molecular markers-a*

short review with historical footnote. Jpn J Clin Oncol. 2017 Jan;47(1):2-6.

19. Mack SC, Hubert CG, Miller TE, Taylor MD, Rich JN. *An epigenetic gateway to brain tumor cell identity. Nat Neurosci.* 2016 Jan; 19(1):10-19.

20. Nobusawa S, Watanabe T, Kleihues P, Ohgaki H. *IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas. Clin Cancer Res.* 2009 Oct 01;15(19):6002-7.

21. Arita H, Narita Y, Fukushima S, Tateishi K, Matsushita Y, Yoshida A, et al. *Upregulating mutations in the TERT promoter commonly occur in adult malignant gliomas and are strongly associated with total 1p19q loss. Acta Neuropathol.* 2013 Aug;126(2):267-76.

22. Horn S, Figl A, Rachakonda PS, Fischer C, Sucker A, Gast A, et al. *TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. Science.* 2013 Feb 22;339(6122):959-61.

23. Batista R, Cruvinel-Carlioni A, Vinagre J, Peixoto J, Catarino TA, Campanella NC, et al. *The prognostic impact of TERT promoter mutations in glioblastomas is modified by the rs2853669 single nucleotide polymorphism. Int J Cancer.* 2016 Jul 15;139(2):414-23.

24. Chiba K, Johnson JZ, Vogan JM, Wagner T, Boyle JM, Hockemeyer D. *Cancer-associated TERT promoter mutations abrogate telomerase silencing. Elife.* 2015 Jul 21;4.

25. Lee Y, Koh J, Kim SI, Won JK, Park CK, Choi SH, et al. *The frequency and prognostic effect of TERT promoter mutation in diffuse gliomas. Acta Neuropathol Commun.* 2017 Aug 29;5(1):62.

26. Jiao Y, Killela PJ, Reitman ZJ, Rasheed AB, Heaphy CM, de Wilde RF, et al. *Frequent ATRX, CIC, FUBP1 and IDH1 mutations refine the classification of malignant gliomas. Oncotarget.* 2012 Jul;3(7):709-22.

27. Schwartzenuber J, Korshunov A, Liu XY, Jones DT, Pfaff E, Jacob K, et al. *Driver mutations*

in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. **Nature.** 2012 Jan 29;482(7384):226-31.

28. Wu G, Diaz AK, Paugh BS, Rankin SL, Ju B, Li Y, et al. *The genomic landscape of diffuse intrinsic pontine glioma and pediatric non-brainstem high-grade glioma.* **Nat Genet.** 2014 May;46(5):444-50.

29. Ebrahimi A, Skardelly M, Bonzheim I, Ott I, Muhleisen H, Eckert F, et al. *ATRX immunostaining predicts IDH and H3F3A status in gliomas.* **Acta Neuropathol Commun.** 2016 Jun 16;4(1):60.

30. Nandakumar P, Mansouri A, Das S. *The Role of ATRX in Glioma Biology.* **Front Oncol.** 2017;7:236.

31. Cai J, Chen J, Zhang W, Yang P, Zhang C, Li M, et al. *Loss of ATRX, associated with DNA methylation pattern of chromosome end, impacted biological behaviors of astrocytic tumors.* **Oncotarget.** 2015 Jul 20;6(20):18105-15.

32. Weller, M, Bent, MVD, Tonn, JC, Stupp, R, Preusser, M, Cohen-Jonathan-Moyal, E, et al. *European Association for Neuro-Oncology (EANO) guideline on the diagnosis and treatment of adult astrocytic and oligodendroglial gliomas.* **The lancet.** 2017.e315-e329.

33. Pegg AE. *Repair of O(6)-alkylguanine by alkyltransferases.* **Mutat Res.** 2000 Apr;462(2-3):83-100.

34. Wick W, Weller M, van den Bent M, Sanson M, Weiler M, von Deimling A, et al. *MGMT testing--the challenges for biomarker-based glioma treatment.* **Nat Rev Neurol.** 2014 Jul;10(7):372-85.

35. Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG. *Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia.* **Cancer Res.** 1999 Feb 15;59(4):793-7.

36. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, et al. *Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents.* **N Engl J Med.** 2000 Nov 09;343(19):1350-4.
37. Hegi ME, Diserens AC, Godard S, Dietrich PY, Regli L, Ostermann S, et al. *Clinical trial substantiates the predictive value of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide.* **Clin Cancer Res.** 2004 Mar 15;10(6):1871-4.
38. Daniel P, Sabri S, Chaddad A, Meehan B, Jean-Claude B, Rak J, Abdulkarim BS. *Temozolomide induced hypermutation in glioma: Evolutionary mechanisms and therapeutic opportunities.* **Frontiers in Oncology.** Fev; 2019.
39. Lapointe S, Perry A, Butowski NA. *Primary brain tumors in adults.* **The Lancet.** 2018.
40. Kun S, Duan Q, Liu G, Lu JM. *Prognostic value of DNA repair genes based on stratification of glioblastomas.* **Oncotarget.** 2017.
41. Zhang J, Stevens MF, Bradshaw TD. *Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance.* **Curr Mol Pharmacol.** 2012 Jan;5(1):102-14.
42. Fu D, Calvo JA, Samson LD. *Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents.* **Nat Rev Cancer.** 2012 Jan 12;12(2):104-20.
43. Messaoudi K, Clavreul A, Lagarce F. *Toward an effective strategy in glioblastoma treatment. Part I: resistance mechanisms and strategies to overcome resistance of glioblastoma to temozolomide.* **Drug Discov Today.** 2015 Jul;20(7):899-905.
44. Munoz-Gamez JA, Lopez Viota J, Barrientos A, Carazo A, Sanjuan-Nunez L, Quiles-Perez R, et al. *Synergistic cytotoxicity of the poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor ABT-888 and temozolomide in dual-drug targeted magnetic nanoparticles.* **Liver Int.** 2015 Apr;35(4):1430-

41.

45. Kaina B, Christmann M. *DNA repair personalized brain cancer therapy with temozolomide and nitrosoureas*. **DNA Repair**. 2019.

46. Michaelsen, SR, Urup, T, Olsen, LR, Broholm, H, Lassen, U, Poulsen, HS. *Molecular profiling of short-term and long-term surviving patients identifies CD34 mRNA level as prognostic for glioblastoma survival*. **Journal of Neuro-Oncology**. 2018.

47. Hwang, T, Mathios, D, McDonald, KL, Daris, I, Park, SH, Burger, PC, et al. *Integrative analysis of DNA methylation suggests down-regulation of oncogenic pathways and reduced somatic mutation rates in survival outliers of glioblastoma*. **Acta Neuropathologica Communications**. 2019;7:5.

48. Lee SY. *Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme*. **ScienceDirect**. 2016.

49. Peng S, Dhruv H, Armstrong B, Salhia B, Legendre C, et al. *Integrated genomic analysis of survival outliers in glioblastoma*. **Neuro Oncol**. 2017; 19(6):833-844.

50. Christmann M, Kaina B. *Epigenetic regulation of DNA repair genes and implications for tumor therapy*. **Mutation Research**. 2019; 15-28.

51. Aldape K, Zadeh G, Mansouri S, Reifenberger G, Deimling AV. *Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers*. **Acta Neuropathol**. 2015.

52. Lanzetta G, Minniti G. *Treatment of glioblastoma in elderly patients: an overview of current treatments and future perspective*. **Tumori Journal**. 2010.

53. Meng W, Wang J, Wang B, Liu F, Li M et al. *CDK7 inhibition is a novel therapeutic strategy against GBM both in vitro and in vivo*. **Cancer Manag. Res**. 2018.

54. Lu J, Cowperthwaite MC, Burnett MG, Shpak M. *Molecular predictors of long-term*

survival in glioblastoma multiforme patients. PLOS one. 2016.

55. Geiss GK, Bumgarner RE, Birditt B, Dahl T, Dowidar N, Dunaway DL, et al. *Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. Nat Biotechnol.* 2008 Mar;26(3):317-25.

56. Geisenberger C, Mock A, Warta R, Rapp C, Schwager C, et al. *Molecular profiling of long-term survivors identifies a subgroup of glioblastoma characterized by chromosome 19/20 co-gain. Acta Neuropathol.* 2015; 130:419–434.

57. Zhao H, Wang S, Song C, Zha Y, Li L. *The prognostic value of MGMT promoter status by pyrosequencing assay for glioblastoma patients' survival: a meta-analysis. World Journal of Surg. Oncology.* 2016.

58. Gurrieri L, Carlo ED, Gerratana L, Maglio GD, Macerelli M et al. *MGMT pyrosequencing-based cut-off methylation level and clinical outcome in patients with glioblastoma multiforme. Future Oncology.* 2018.

59. Kim HS, Kwon MJ, Song JH, Kim ES, Kim HY et al. *Clinical implications of TERT promoter mutation on IDH mutation and MGMT promoter methylation in diffuse gliomas. Pathology – Research and Practice.* 2018.

60. Christians A, Adel-Horowski A, Banan R, Lehmann U, Bartels S, et al. *The prognostic role of IDH mutations in homogeneously treated patients with anaplastic astrocytomas and glioblastomas. Acta Neuropathol.* 2019.

61. Radke J, Koch A, Pritsch F, Schumann E, Misch M, et al. *Predictive MGMT status in a homogeneous cohort of IDH wildtype glioblastoma patients. Acta Neuropathol.* 2019.

62. Meng W, Wang J, Wang B, Liu F, Li M et al. *CDK7 inhibition is a novel therapeutic strategy against GBM both in vitro and in vivo. Cancer Management and Research.* 2018.

63. Berntsson SG, Wibom C., Sjöström S., Henriksson R., Brännström T *et al.* *Analysis of DNA repair gene polymorphisms and survival in low-grade and anaplastic gliomas.* **Journal of Neuro-Oncology**, 2011.
64. Quan R, Zhang H, Li Z, Li X. *Survival Analysis of patients with glioblastoma treated by long-term administration of temozolomide.* **Medicine**. 2020.
65. Veldman-Jones MH, Brant R, Rooney C, Geh C, Emery H *et al.* *Evaluating robustness and sensitivity of the nanostring technologies nCounter platform to enable multiplexed gene expression analysis of clinical samples.* **Cancer Research**. 2015.
66. Fosmark S, Hellwege S, Dahlrot RH, Jensen KL, Derand H *et al.* *APNG as a prognostic marker in patients with glioblastoma.* **Plos One**. 2017.
67. Kim YS, Kim SH, Cho J, *et al.* *MGMT gene promoter methylation as a potent prognostic factor in glioblastoma treated with temozolomide-based chemoradiotherapy: a single institution study.* **Int J Radiat Oncol Biol Phys**. 2011; 84(3): 661–667.
68. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, *et al.* *MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma.* **N Engl J Med**. 2005; 352: 997–1003.
69. Luo SS, Liao XW, Zhu XD. *Prognostic value of excision repair cross complementing mRNA expression in gastric cancer.* **Biomed Res Int**. 2018.
70. Simon, G. R., Sharma, S., Cantor, A., Smith, P., & Bepler, G. *ERCC1 expression is a predictor of survival in resected patients with Non-small cell lung cancer.* **Chest**, 2005, 127(3), 978–983.
71. Kayaselçuk F., Zorludemir S., Gümürdülü D., Zeren H., & Erman T. *PCNA and KI-67 in central nervous system tumors: correlation with the histological type and grade.* **Journal of Neuro-Oncology**, 2002, 57(2), 115–121.

72. Carter TC, Medina-Flores R, Lawler BE. *Glioblastoma treatment with temozolomide and bevacizumab and overall survival in a rural tertiary healthcare practice*. **Biomed. Res. Int.** 2018.
73. Batash R, Asna N, Schaffer P, Francis N, Schaffer M. *Glioblastoma multiforme, diagnosis and treatment; recent literature review*. **Curr. Med. Chem.** 2017, 3002-3009.
74. Keijzers G, Bakula D, Petr MA, Madsen NGK, Teklu A et al. *Human exonuclease 1 (EXO1) regulatory functions in DNA replication with putative roles in cancer*. **Int. J. Mol.Sci.** 2018.
75. Brennan CW, Verhaak RGW, McKenna A, et al. *The somatic genomic landscape of glioblastoma*. **Cell.** 2013; 155: 462–477.
76. De Sousa, JF, Torrieri, R., Serafim, RB, Di Cristofaro, LFM, Escanfella et al. *Expression signatures of DNA repair genes correlate with survival prognosis of astrocytoma patients*. **Tumor Biology**, 2017.
77. ERCC6 ERCC excision repair 6, chromatin remodeling factor. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2074>. Acesso em: 30/03/2020.
78. Dabholkar MD, Berger MS, Vionnet JA, Overton L, Thompson C. *Comparative analyses of relative ERCC3 and ERCC6 mRNA levels in gliomas and adjacent non-neoplastic brain*. **Mol. Carcinog.** 1996.
79. Garg P. & Burgers PMJ. *DNA polymerases that propagate the eukaryotic DNA replication fork*. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, 2005.
80. Huang QM, Tomida S, Masuda Y, Arima C, Cao K et al. *Regulation of DNA polymerase POLD4 influences genomic instability in lung cancer*. **Mol. And Cellular Pathobiology.** 2010.
81. POLD4. Disponível em: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000175482-POLD4/pathology>. Acesso em: 30/03/2020.

82. Joseph NM, Phillips J, Dahiya S, Felicella MM, Tihan T, Brat DJ, Perry A. *Diagnostic implications of IDH1-R132H and OLIG2 expression patterns in rare and challenging glioblastoma variants.* **Modern Pathology.** 2013.

83. Ikemura M, Shibahara J, Mukasa A, Takayanagi S, Aihara K, Saito N, Aburatani H, Fukayama M. *Utility of ATRX immunohistochemistry in diagnosis of adult diffuse gliomas.* 2016.

ANEXOS

Anexo A – Ficha de coleta.

SCREENING			
1	ID		1
2	PES ID		2
3	CID 71.9 (Tumor do Sistema Nervoso Central)?	0- Não; 1- Sim	3
4	Histologia é Glioblastoma Grau IV?	0- Não; 1- Sim	4
5	Tipo de doença	0- Secundária 1- Primária; 99- Ignorado	5
6	Realizou cirurgia?	0- Não; 1- Sim	6
7	Radioterapia	0- Não; 1- Sim	7
8	Quimioterapia	0- Não; 1- Sim	8
9	Tratou com temozolomida (em alguma linha)?	0- Não; 1- Sim	9
10	Número de ciclos	Número	10
11	Data de nascimento	DD/MM/AAAA	11 __/__/____
12	Data do primeiro atendimento no HCB	DD/MM/AAAA	12 __/__/____
13	Idade na admissão		13
14	Tem tumor no departamento de patologia?	0- Não; 1- Sim	14
15	Tem tumor no biobanco?	0- Não; 1- Sim	15
16	Cálculo elegibilidade		16
17	Participante é elegível		17
18	Participante não é elegível		18
FICHA DE COLETA DE DADOS DE TUMORES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL			
19	Nome		19
20	Gênero	0- Feminino ;1- Masculino	20
21	Registro hospitalar - Barretos	99- Ignorado	21
22	Naturalidade - Cidade	99- Ignorado	22
23	Naturalidade - Estado	99- Ignorado	23
24	Procedência - Cidade	99- Ignorado	24
25	Procedência - Estado	99- Ignorado	25
26	Cor	0- Indefinido; 1- Branco; 2- Negro; 3- Amarelo; 4- Pardo; 5- Indígena; 6- Cafuzo	26
27	Grau de Instrução	0- Indefinido; 1- Analfabeto; 2- Primeiro grau incompleto; 3- Primeiro grau completo; 4- Segundo grau incompleto; 5- Segundo grau completo; 6- Superior incompleto; 7- Superior completo; 8- Pós graduação incompleto; 9- Pós graduação completo	27
28	Telefone 1	(_) _____; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	28
29	Telefone 2	(_) _____; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	29

TRATAMENTO ANTES DO HCB			
30	Radioterapia	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	30
31	Quimioterapia	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	31
32	Cirurgia	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	32
33	Tipo de cirurgia	1- Biopsia; 2- Ressecção completa; 3- Ressecção parcial; 99- Ignorado	33
34	Data da cirurgia	DD/MM/AAAA	34 _/ _/ _
PRIMEIRA CONSULTA			
35	Data do diagnóstico	DD/MM/AAAA	35 _/ _/ _
36	Tamanho da neoplasia ao diagnóstico	Descrever	36
37	KPS pré OP	10 – 100%; 99- Ignorado	37
38	ECOG pré OP	0 - 4; 99- Ignorado	38
39	Localização	1- Frontal; 2- Temporal; 3- Parietal; 4- Occipital; 5- Diencefalo; 6- Cerebelo; 7- Tronco cerebral; 8- Multicêntrico; 9- Multifocal; 10- Outro; 99- Ignorado	39
40	Se outra localização, qual?	Descrever	40
CIRURGIA			
1ª CIRURGIA			
41	1ª cirurgia	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	41
42	Foi realizada no HCB?	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	42
43	Data da 1ª cirurgia	DD/MM/AAAA	43 _/ _/ _
44	Tipo da 1ª cirurgia	1- Biopsia; 2- Ressecção completa; 3- Ressecção parcial; 99- Ignorado	44
45	AP	0- Não; 1- Sim	45
46	Número do AP (1)	Descrever	46
47	Número do AP (2)	Descrever	47
48	Número do AP (3)	Descrever	48
49	Subtipo histológico 1- Glioblastoma (clássico, ou sem especificações); 2- Glioblastoma de pequenas células; 3- Glioblastoma com componente primitivo neuronal; 4- Glioblastoma de células granulares; 5- Glioblastoma metaplásico; 6- Glioblastoma de células gigantes; 7- Gliossarcoma; 8- Glioblastoma epitelióide; 99- Ignorado		49
50	KPS pós OP 1ª cirurgia	10 – 100%; 99- Ignorado	50
51	ECOG pós OP 1ª cirurgia	0-4; 99- Ignorado	51
2ª CIRURGIA			
52	2ª cirurgia	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	52
53	Data da 2ª cirurgia	DD/MM/AAAA	53 _/ _/ _
54	Tipo da 2ª cirurgia	1- Biopsia; 2- Ressecção completa; 3- Ressecção parcial; 99- Ignorado	54
55	AP	0- Não; 1- Sim	55

56	Número do AP (1)	Descrever	56
57	Número do AP (2)	Descrever	57
58	Número do AP (3)	Descrever	58
59	Status da Lesão	1- Radionecrose; 2- Doença ativa; 3- Doença inativa; 99- Ignorado	59
60	KPS pós OP 2ª cirurgia	10 – 100%; 99- Ignorado	60
61	ECOG pós OP 2ª cirurgia	0-4; 99- Ignorado	61
3ª CIRURGIA			
62	3ª cirurgia	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	62
63	Data da 3ª cirurgia	DD/MM/AAAA	63 _/ _/ _ _
64	Tipo da 3ª cirurgia	1- Biopsia; 2- Ressecção completa; 3- Ressecção parcial; 99- Ignorado	64
65	AP	0- Não; 1- Sim	65
66	Número do AP (1)	Descrever	66
67	Número do AP (2)	Descrever	67
68	Número do AP (3)	Descrever	68
69	Status da Lesão	1- Radionecrose; 2- Doença ativa; 3- Doença inativa; 99- Ignorado	69
70	KPS pós OP 2ª cirurgia	10 – 100%; 99- Ignorado	70
71	ECOG pós OP 3ª cirurgia	1-4; 99- Ignorado	71
QUIMIOTERAPIA			
QUIMIOTERAPIA 1			
72	Quimioterapia (1)	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	72
73	Finalidade QT (1)	0- Paliativa; 1- Curativa; 99- Ignorado	73
74	Tipo da QT (1)	0- Não concomitante; 1- Concomitante; 99- Ignorado	74
75	Medicamento prescrito	1-Temozolomida; 2- Vincristina; 3- Bevacizumab; 4- Carboplatina; 5- Carmustina; 6- Cisplatina; 7- Irinotecano; 8- Lomustina; 9- Procarbazina; 10- Outro	75
76	Se outro medicamento, qual?	Descrever	76
77	Resposta do tratamento	1- Resposta radiológica completa (>75%); 2- Resposta radiológica parcial (<75%); 3- doença estável; 4- Progressão; 5- pseudoprogredão; 99- Ignorado	77
78	Data do início da QT (1)	DD/MM/AAAA	78 _/ _/ _ _
79	Data de término da QT (1)	DD/MM/AAAA	79 _/ _/ _ _
80	Número de ciclos (1)	Número	80
81	Motivo para término no tratamento:	1- Completou protocolo; 2- Toxicidade inaceitável; 3- Abandono de tratamento; 4- Outros; 99- Ignorado	81
82	Se outro motivo, qual?	Descrever	82
83	Recidiva	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	83

84	Data da recidiva	DD/MM/AAAA	84	__/__/____
85	Progressão da doença	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	85	
86	Data da progressão	DD/MM/AAAA	86	__/__/____
QUIMIOTERAPIA 2				
87	Quimioterapia (2)	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	87	
88	Finalidade QT (2)	0- Paliativa; 1- Curativa; 99- Ignorado	88	
89	Tipo da QT (2)	0- Não concomitante; 1- Concomitante; 99- Ignorado	89	
90	Medicamento prescrito	1-Temozolomida; 2- Vincristina; 3- Bevacizumab; 4- Carboplatina; 5- Carmustina; 6- Cisplatina; 7- Irinotecano; 8- Lomustina; 9- Procarbазina; 10- Outro	90	
91	Se outro medicamento, qual?	Descrever	91	
92	Resposta do tratamento	1- Resposta radiológica completa (>75%); 2- Resposta radiológica parcial (<75%); 3- doença estável; 4- Progressão; 5- pseudoprogessão; 99- Ignorado	92	
93	Data do início da QT (2)	DD/MM/AAAA	93	__/__/____
94	Data de término da QT (2)	DD/MM/AAAA	94	__/__/____
95	Número de ciclos (2)	Número	95	
96	Motivo para término no tratamento:	1- Completou protocolo; 2- Toxicidade inaceitável; 3- Abandono de tratamento; 4- Outros; 99- Ignorado	96	
97	Se outro motivo, qual?	Descrever	97	
98	Recidiva	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	98	
99	Data da recidiva	DD/MM/AAAA	99	__/__/____
100	Progressão da doença	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	100	
101	Data da progressão	DD/MM/AAAA	101	__/__/____
QUIMIOTERAPIA 3				
102	Quimioterapia (3)	0-Não; 1- Sim; 99- Ignorado	102	
103	Finalidade QT (3)	0- Paliativa; 1- Curativa; 99- Ignorado	103	
104	Tipo da QT (3)	0- Não concomitante; 1- Concomitante; 99- Ignorado	104	
105	Medicamento prescrito	1-Temozolomida; 2- Vincristina; 3- Bevacizumab; 4- Carboplatina; 5- Carmustina; 6- Cisplatina; 7- Irinotecano; 8- Lomustina; 9- Procarbазina; 10- Outro	105	
106	Se outro medicamento, qual?	Descrever	106	
107	Resposta do tratamento	1- Resposta radiológica completa (>75%); 2- Resposta radiológica parcial (<75%); 3- doença estável; 4- Progressão; 5- pseudoprogessão; 99- Ignorado	107	
108	Data do início da QT (3)	DD/MM/AAAA	108	__/__/____
109	Data de término da QT (3)	DD/MM/AAAA	109	__/__/____
110	Número de ciclos (3)	Número	110	

111	Motivo para término no tratamento: 1- Completou protocolo; 2- Toxicidade inaceitável; 3- Abandono de tratamento; 4- Outros; 99- Ignorado	111	
112	Se outro motivo, qual?	112	Descrever
113	Recidiva	113	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado
114	Data da recidiva	114	DD/MM/AAAA _/ _/ _
115	Progressão da doença	115	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado
116	Data da progressão	116	DD/MM/AAAA _/ _/ _
QUIMIOTERAPIA 4			
117	Quimioterapia (4)	117	0-Não; 1- Sim; 99- Ignorado
118	Finalidade QT (4)	118	0- Paliativa; 1- Curativa; 99- Ignorado
119	Tipo da QT (4)	119	0- Não concomitante; 1- Concomitante; 99- Ignorado
120	Medicamento prescrito 1-Temozolomida; 2- Vincristina; 3- Bevacizumab; 4- Carboplatina; 5- Carmustina; 6- Cisplatina; 7- Irinotecano; 8- Lomustina; 9- Procarbazona; 10- Outro	120	
121	Se outro medicamento, qual?	121	Descrever
122	Resposta do tratamento 2- Resposta radiológica completa (>75%); 2- Resposta radiológica parcial (<75%); 3- doença estável; 4- Progressão; 5- pseudoprogredão; 99- Ignorado	122	
123	Data do início da QT (4)	123	DD/MM/AAAA _/ _/ _
124	Data de término da QT (4)	124	DD/MM/AAAA _/ _/ _
125	Número de ciclos (4)	125	Número
126	Motivo para término no tratamento: 1- Completou protocolo; 2- Toxicidade inaceitável; 3- Abandono de tratamento; 4- Outros; 99- Ignorado	126	
127	Se outro motivo, qual?	127	Descrever
128	Recidiva	128	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado
129	Data da recidiva	129	DD/MM/AAAA _/ _/ _
130	Progressão da doença	130	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado
131	Data da progressão	131	DD/MM/AAAA _/ _/ _
RADIOTERAPIA			
RADIOTERAPIA 1			
132	Radioterapia (1)	132	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado
133	Data do início RT (1)	133	DD/MM/AAAA _/ _/ _
134	Data do término RT (1)	134	DD/MM/AAAA _/ _/ _
135	Dose (1)	135	Em Gy
136	Número de frações (1):	136	Número
RADIOTERAPIA 2			
137	Radioterapia (2)	137	

		0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	
138	Data do início RT (2)	DD/MM/AAAA	138 <u> </u> / <u> </u> / <u> </u>
139	Data do término RT (2)	DD/MM/AAAA	139 <u> </u> / <u> </u> / <u> </u>
140	Dose (2)	Em Gy	140
141	Número de frações (2):	Número	141
RADIOTERAPIA 3			
142	Radioterapia (3)	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	142
143	Data do início RT (3)	DD/MM/AAAA	143 <u> </u> / <u> </u> / <u> </u>
144	Data do término RT (3)	DD/MM/AAAA	144 <u> </u> / <u> </u> / <u> </u>
145	Dose (3)	Em Gy	145
146	Número de frações (3):	Número	146
DESFECHOS			
147	Data da última informação	DD/MM/AAAA	147 <u> </u> / <u> </u> / <u> </u>
148	Status	1- Vivo sem doença; 2- Vivo com doença; 3- Vivo SOE; 4- Óbito por câncer; 5- Óbito por outras causas sem doença ativa; 6- Óbito por outras causas com doença ativa	148
149	Data de óbito	DD/MM/AAAA	149 <u> </u> / <u> </u> / <u> </u>
150	Se óbito por outras causas, detalhar:	Descrever	150
151	Abandono (em vigência QT)	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	151
AVALIAÇÃO MOLECULAR			
152	Metilação em MGMT	0- Não metilado; 1- Metilado; 2- Inconclusivo; 99- Ignorado	152
153	Status de ATRX	0- Não mutado; 1- Mutado; 2- Inconclusivo; 99- Ignorado	153
154	Mutação de IDH1	0- Não mutado; 1- Mutado; 2- Inconclusivo; 99- Ignorado	154
155	Tipo de mutação IDH1	Descrever	155
156	Mutação de IDH2	0- Não mutado; 1- Mutado; 2- Inconclusivo; 99- Ignorado	156
157	Tipo de mutação em IDH2	Descrever	157
158	Mutação de TERTp	0- Não mutado; 1- Mutado; 2- Inconclusivo; 99- Ignorado	158
159	Tipo de mutação em TERTp	Descrever	159
160	TERTp SNP (rs2853669)	0- Não; 1- Sim; 2- Inconclusivo; 99- Ignorado	160
161	Co-deleção de 1p/19q	0- Ausência de co-deleção; 1- Presença de co-deleção; 2- Inconclusivo; 99- Ignorado	161

Anexo B – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Identificação de biomarcadores preditivos da resposta ao tratamento com temozolomida no glioblastoma.

Pesquisador: Rui Manuel Vieira Reis

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 91223918.1.0000.5437

Instituição Proponente: Fundação Pio XII

Patrocinador Principal: Fundação Pio XII

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.742.043

Considerações Finais a critério do CEP:

O Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Pio XII – Hospital do Amor de Barretos de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/2012 e na Norma Operacional Nº 001/2013 do CNS, manifesta -se pela APROVAÇÃO do projeto de pesquisa proposto.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita apreciação da CONEP:

Não

BARRETOS, 28 de Junho de 2018

Assinado por:
Macon Fernando Zanon da Silva
 (Coordenador)

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331
Bairro: Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400
UF: SP **Município:** BARRETOS
Telefone: (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-6600 **E-mail:** cep@hcancerbarretos.com.br

Anexo C – Lista de genes do painel *nCounter Vantage™ RNA Panel for DNA Damage and Repair*.

Official Symbol	Accession	Prev Symbol
ABL1	NM_005157.3	ABL, JTK7, c-ABL, p150
AKT3	NM_005465.4	
ALKBH2	NM_001001655.2	
ALKBH3	NM_139178.3	
APC	NM_000038.3	
APEX1	NM_001641.2	APEX, APE, REF1, HAP1, APX, APEN, REF-1, APE-1
APEX2	NM_014481.2	
ATM	NM_138292.3	ATA, ATDC, ATC, ATD, TEL1, TELO1
ATR	NM_001184.2	
ATRIP	NM_130384.1	
AURKA	NM_003600.2	STK15, STK6, BTAK, AurA, STK7, ARK1, PPP1R47, AIK
BCL2	NM_000657.2	
BCL2L1	NM_138578.1	
BLM	NM_000057.2	
BRCA1	NM_007305.2	
BRCA2	NM_000059.3	FANCD1, FACD, FANCD, FAD, FAD1, BRCC2
BRIP1	NM_032043.1	
BUB1B	NM_001211.4	
CASP8	NM_001228.4	
CCND1	NM_053056.2	BCL1, D11S287E, PRAD1, U21B31
CCND2	NM_001759.2	
CCND3	NM_001760.2	
CCNO	NM_021147.3	CCNU, UDG2, FLJ22422, UNG2
CDK7	NM_001799.2	
CDKN1A	NM_000389.2	CDKN1, P21, CIP1, WAF1, SDI1, CAP20, p21CIP1,
CDKN1B	NM_004064.2	
CDKN2A	NM_000077.3	CDKN2, MLM, CDK4I, p16, INK4a, MTS1, CMM2, ARF,
CDKN2C	NM_001262.2	
CHEK1	NM_001114121.1	
CHEK2	NM_007194.3	RAD53, CDS1, CHK2, HuCds1, PP1425, bA444G7
CREBBP	NM_001079846.1	RSTS, RTS, CBP, KAT3A
CRY1	NM_004075.3	
DDB1	NM_001923.3	
DDB2	NM_000107.1	
DNA2	NM_001080449.2	DNA2L, KIAA0083
EGFR	NM_201282.1	ERBB, ERBB1
ERCC1	NM_001983.3	
ERCC2	NM_000400.2	XPD, MAG, EM9, MGC102762, MGC126218,
ERCC3	NM_000122.1	
ERCC4	NM_005236.2	XPF, RAD1, FANCC
ERCC5	NM_000123.2	
ERCC6	NM_000124.2	CKN2, CSB, RAD26, ARMD5

ERCC8	NM_000082.3	CKN1, CSA
EXO1	NM_006027.3	
FAN1	NM_001146094.1	
FANCA	NM_000135.2	FACA, FANCH, FAA, FA-H, FAH
FANCB	NM_152633.2	
FANCC	NM_000136.2	FACC, FAC, FA3
FANCD2	NM_033084.3	FACD, FANCD, FAD, FA-D2
FANCE	NM_021922.2	FACE, FAE
FANCF	NM_022725.2	
FANCG	NM_004629.1	XRCC9, FAG
FANCI	NM_001113378.1	KIAA1794, FLJ10719
FANCL	NM_001114636.1	PHF9, FLJ10335, FAAP43, Pog
FANCM	NM_020937.2	KIAA1596, FAAP250
FEN1	NM_004111.4	RAD2, FEN-1, MF1
GEN1	NM_182625.3	
GTF2H3	NM_001516.3	
H2AFX	NM_002105.2	
HDAC1	NM_004964.2	RPD3L1, HD1, GON-10
HDAC2	NM_001527.1	
HLTF	NM_139048.2	SNF2L3, SMARCA3, HIP116A, HLTF1, RNF80
HUS1	NM_004507.2	
KRAS	NM_004985.3	KRAS2, KRAS1
LIG1	NM_000234.1	
LIG3	NM_002311.3	
LIG4	NM_002312.3	
MAD2L2	NM_001127325.1	
MDC1	NM_014641.2	
MGMT	NM_002412.3	
MLH1	NM_000249.2	COCA2, HNPCC, FCC2, HNPCC2
MLH3	NM_014381.2	
MNAT1	NM_002431.2	
MPG	NM_001015052.1	
MRE11A	NM_005591.3	MRE11, ATLD
MSH2	NM_000251.1	COCA1, HNPCC, HNPCC1
MSH3	NM_002439.2	
MSH4	NM_002440.3	
MSH5	NM_172165.2	
MSH6	NM_000179.1	
MUTYH	NM_012222.2	
MYC	NM_002467.3	
MYD88	NM_002468.3	
NBN	NM_001024688.1	NBS, NBS1, ATV, AT-V2, AT-V1
NEIL1	NM_024608.2	
NEIL2	NM_145043.2	
NEIL3	NM_018248.2	
NFKB1	NM_003998.2	

NKX3-1	NR_046072.1	NKX3A, NKX3.1, BAPX2
NLRP2	NM_017852.1	NALP2, FLJ20510, PYPAF2, NBS1, PAN1, CLR19.9
NTHL1	NM_002528.5	
OGG1	NM_002542.5	
PARP1	NM_001618.3	PPOL, ADPRT, PARP
PARP2	NM_005484.3	
PARP3	NM_005485.4	ADPRTL3, ADPRT3, IRT1, hPARP-3, pADPRT-3
PARP4	NM_006437.3	ADPRTL1, VAULT3, p193, VPARP, VWA5C
PCNA	NM_002592.2	
PIK3CA	NM_006218.2	
PIK3CB	NM_006219.1	
PIK3R1	NM_181504.2	
PMS1	NM_000534.4	
PMS2	NM_000535.5	PMSL2, H_DJ0042M02.9, HNPCC4
PNKP	NM_007254.2	
POLB	NM_002690.1	
POLD1	NM_002691.2	POLD, CDC2
POLD3	NM_006591.2	
POLD4	NM_021173.2	
POLE	NM_006231.3	
POLE2	NM_002692.2	
POLE4	NM_019896.2	
POLI	NM_007195.2	
POLK	NM_016218.2	DINB1, POLQ, DINP
POLL	NM_001174085.1	
POLM	NM_013284.3	
POLQ	NM_199420.3	
POLR2D	NM_004805.3	
POLR2H	NM_001278698.1	
POLR2J	NM_006234.4	
PRKACB	NM_182948.2	
PRKDC	NM_006904.6	HYRC, HYRC1, DNPK1, p350, DNAPK, XRCC7
PRKX	NM_005044.1	
PTEN	NM_000314.4	BZS, MHAM, MMAC1, TEP1, PTEN1
RAD1	NM_133377.2	
RAD17	NM_133338.1	
RAD18	NM_020165.2	
RAD21	NM_006265.2	
RAD23A	NM_005053.2	
RAD23B	NM_002874.3	
RAD50	NM_005732.2	
RAD51	NM_133487.2	RAD51A, RECA, HsRad51, HsT16930, BRCC5
RAD51B	NM_002877.5	RAD51L1, REC2, hREC2, R51H2
RAD51C	NM_002876.2	
RAD51D	NM_002878.3	RAD51L3, R51H3, Trad, HsTRAD
RAD52	NM_134424.2	

RAD54L	NM_003579.2	
RAD9A	NM_004584.2	
RB1	NM_000321.1	OSRC, RB
RECQL	NM_032941.2	
RECQL5	NM_004259.6	
REV1	NM_016316.2	
RFC1	NM_001204747.1	
RFC3	NM_002915.3	
RFC4	NM_181573.2	
RMI1	NM_024945.2	C9orf76, FLJ12888, BLAP75
RMI2	NM_152308.1	C16orf75, MGC24665, BLAP18
RPA1	NM_002945.3	
RPA3	NM_002947.3	
RPS27A	NM_002954.5	
RRM2B	NM_015713.3	
SIRT1	NM_012238.4	
SLFN11	NM_001104587.1	
SLK	NM_014720.2	
SLX4	NM_032444.2	BTBD12, KIAA1784, KIAA1987, FANCP
SMAD4	NM_005359.3	MADH4, DPC4
SMARCA4	NM_003072.3	SNF2L4, hSNF2b, BRG1, BAF190, SNF2, SWI2
SMC1A	NM_006306.2	SMC1L1, DXS423E, KIAA0178, SB1.8, Smcb
SMC3	NM_005445.3	CSPG6, HCAP, BAM, SMC3L1, bamacan
SMUG1	NM_001243789.1	
SUMO3	NM_006936.2	SMT3H1, SMT3A
TDG	NM_003211.4	
TIPIN	NM_017858.2	
TOP3A	NM_004618.3	
TOP3B	NM_003935.4	
TP53	NM_000546.2	
TP53BP1	NM_001141980.1	
TREX1	NM_016381.3	AGS1, DRN3
UBB	NM_018955.2	
UBE2T	NM_014176.3	
UNG	NM_003362.3	DGU, UDG, UNG1, UNG2, HIGM4
USP1	NM_003368.4	
WEE1	NM_003390.3	
WRN	NM_000553.4	
XPA	NM_000380.3	
XPC	NM_004628.3	
XRCC1	NM_006297.2	
XRCC2	NM_005431.1	
XRCC3	NM_001100119.1	
XRCC4	NM_003401.3	
XRCC5	NM_021141.3	
XRCC6	NM_001469.3	G22P1, D22S731, D22S671, KU70, ML8

Internal Reference Genes

CC2D1B	NM_032449.2	
COG7	NM_153603.3	
EDC3	NM_001142443.1	YJDC, LSM16, FLJ21128, hYjeF_N2-15q23, YJEFN2
GPATCH3	NM_022078.2	GPATC3, FLJ12455
HDAC3	NM_003883.2	
MTMR14	NM_022485.3	C3orf29, FLJ22405, FLJ90311, hJumpy, hEDTP
NUBP1	NM_001278506.1	NBP1, NBP35
PRPF38A	NM_032864.3	
SAP130	NM_024545.3	
SF3A3	NM_006802.2	
TLK2	NM_006852.2	
ZC3H14	NM_001160103.1	

© 2015 NanoString Technologies