

UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde

JÉSSICA SILVA DOS SANTOS

**IDENTIFICAÇÃO DE VARIANTES GÊNICAS DE BASE
ÚNICA NOS GENES *PARG* E *RSKI* E A AÇÃO
ANTITUMORAL DE EXTRATOS DE *SOPHORA JAPONICA*
NA VIA DE SINALIZAÇÃO NF- κ B EM LINHAGENS
CELULARES DE GLIOMAS DE ALTO GRAU**

Bragança Paulista
2023

JÉSSICA SILVA DOS SANTOS - R.A. 001201914950

IDENTIFICAÇÃO DE VARIANTES GÊNICAS DE BASE ÚNICA NOS GENES *PARG* E *RSKI* E A AÇÃO ANTITUMORAL DE EXTRATOS DE *SOPHORA JAPONICA* NA VIA DE SINALIZAÇÃO NF- κ B EM LINHAGENS CELULARES DE GLIOMAS DE ALTO GRAU

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco, como requisito para obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Ciências da Saúde –
Biologia Molecular de Tumores

Orientador: Profa. Dra. Manoela Marques Ortega

Bragança Paulista

2023

QZ 380
S235i

Santos, Jéssica Silva dos

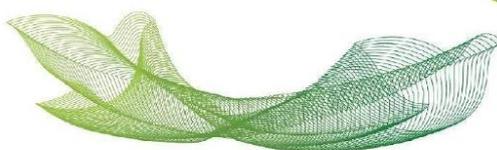
Identificação de variantes gênicas de base única nos genes PARG e RSK1 e a ação antitumoral de extratos de *Sophora japonica* na via de sinalização NF-kB em linhagens celulares de glioma de alto grau / Jéssica Silva dos Santos. – Bragança Paulista, 2023.

157 p.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco.

Orientação de: Manoela Marques Ortega.

1. Glioblastoma. 2. Gliomas. 3. NF-kB.
4. *Sophora japonica*. I. Ortega, Manoela Marques.
II. Título.



Educando
para a paz

SANTOS, Jéssica Silva dos. “Identificação de variantes gênicas de base única nos genes PARG e RSK1 e a ação antitumoral de extratos de Sophora Japonica na via de sinalização NF-kB em linhagens celulares de gliomas de alto grau”. Tese defendida e aprovada no programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em 31 de julho de 2023 pela Banca examinadora constituída pelos membros:

Profa. Dra. Manoela Marques Ortega - Orientadora e Presidente
Universidade São Francisco

Profa. Dra. Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz
Universidade Estadual de Campinas

Prof. Dr. Gustavo Jacob Lourenço
Universidade Estadual de Campinas

Prof. Dr. Lúcio Fábio Caldas Ferraz
Universidade São Francisco

Profa. Dra. Raquel de Cássia dos Santos
Universidade São Francisco

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Maria e Edmilson dos Santos, fundamentais na presente jornada, e por impulsionar-me sempre a caminhar mais um passo.

AGRADECIMENTOS

À Deus porque amou-me quando eu ainda era sua inimiga e encontrou-me quando eu estava perdida. A Ele sejam dados a glória, honra e poder para sempre!!

Aos meus pais, Maria dos Santos e Edmilson dos Santos, por nunca terem medido esforços para que eu alcançasse meus sonhos e objetivos.

À minha Orientadora Profa. Dra. Manoela Marques Ortega, por ser muito mais que uma orientadora, por sempre ter oferecido sua amizade, conhecimento e ajuda de forma generosa.

Ao Prof. Dr. Fernando Marson, por toda ajuda e auxílio prestado com as análises estatísticas.

Aos meus colegas de laboratório: Ana, André, Gabriel, Juliana, João, Larissa, Lucas e Renata por sempre compartilharem seus momentos de alegrias e dificuldades, por sempre estarem dispostos a ajudarem!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento: 88887.464813/2019-00.

À Dona Alice, sempre oferecendo uma palavra de incentivo e alegria de forma graciosa.

Ao Prof. Dr. Carlos Tadeu Parisi de Oliveira por conceder as amostras de tecido coletadas durante as cirurgias dos pacientes com glioblastoma e indivíduos controles inseridos no presente estudo.

Ao Prof. Dr. Luciano Souza Queiroz por conceder as amostras de tecido incluídas em blocos de parafina dos pacientes com glioblastoma inseridos no estudo, e por todo o auxílio nas análises das lâminas coradas com hematoxilina e eosina.

A coordenação e secretária da Pós-graduação por todo auxílio e suporte oferecidos durante o período do doutoramento.

Aos pacientes com glioblastoma que diariamente lutam para vencer a doença.

A todos, muito obrigada!!

“O correr da vida embrulha tudo. A vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem”.

RESUMO

O glioblastoma (GBM) é um tumor neurológico com prognóstico desfavorável devido a sua heterogeneidade molecular e portanto, os pacientes raramente respondem ao tratamento preconizado, justificando-se a busca por novas alternativas terapêuticas. O KPF modula a via NF- κ B, constitutivamente alterada no GBM. O objetivo do estudo foi validar os papéis dos diferentes genótipos das variantes de nucleotídeos únicas (SNVs) (rs76276169T>C) e (rs2229714G>A), localizadas na região 3'UTR dos genes *PARG* e *RSK1*, envolvidos na modulação da via NF- κ B. Em seguida, foi avaliado a eficácia antitumoral e inibitória da via NF- κ B pelo extrato rico no flavonoide kaempferol (KPF), obtido da flor de *Sophora japonica* antes (SJ) e depois (SJ-b) de uma reação de bioconversão. Os genótipos das referidas SNVs foram identificados pela RT-PCR em 101 amostras de DNAs de tecido tumoral de pacientes com GBM e 254 amostras de DNAs de sangue periférico de indivíduos saudáveis. As frequências dos genótipos selvagens (TT) (59,00 vs. 38,20, P -valor<0,001) e (GG) (61,50 vs. 32,50, P -valor<0,001) para as SNVs rs76276169 e rs2229714 foram maiores no grupo de pacientes que em controles com risco aumentado para o GBM [OR: 2,33 (IC95%:1,45-3,73) e [OR: 3,33 (IC95%:2,01-5,50). Ainda, as frequências dos alelos (T) (79,50 vs. 69,10, P -valor<0,001) e (G) (79,70 vs. 54,10, P -valor<0,001) foram aumentadas nos pacientes com risco significativo para a doença [OR:1,74 (IC95%:1,17-2,57) e [OR: 3,33 (IC95%:2,24-4,96), respectivamente. A ação dos extratos SJ e SJ-b foram avaliados utilizando as linhagens de astrocitoma grau III (NG-97) e de GBM (U251). O ensaio de viabilidade pelo método de MTT evidenciou viabilidade celular de 50% (IC50) de 800 μ M (SJ) e 600 μ M (SJ-b) para linhagem NG97, e 1800 μ M para linhagem U251 para ambos os extratos após 72h de exposição. Efeito sinérgico foi observado quando TMZ+SJ ou TMZ+SJ-b foram avaliados por MTT nas células de gliomas. Após 24h, ambos os extratos de SJ e SJ-b inibiram significativamente a migração e proliferação celular pelos ensaios de *Wound-healing* e de exclusão pelo corante azul tripan. Também foi observado indução a apoptose das células tumorais pelos ensaios de fragmentação de DNA e citometria de fluxo, especialmente na linhagem menos resistente à TMZ, NG-97. O ensaio de citometria também evidenciou parada do ciclo celular em S e G2/M nas linhagens estudadas, sendo mais significativo na célula U251, promovida pelos extratos. A expressão relativa de *MMP-9* também foi modulada negativamente nas células expostas aos extratos na presença ou não de 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) estimulador da migração. Ainda, os extratos inibiram significativamente a proliferação de células-tronco de glioma, após 24h pelo ensaio de formação de esferas. E os ensaios de qPCR e luciferase demonstraram que SJ e SJ-b inibiram a expressão relativa dos genes *TRAF6*, *IRAK2*, *IL-1 β* e *TNF- α* , indicando um efeito inibitório na via NF- κ B. Os resultados sugerem que o genótipo ancestral de ambas as SNVs contribuem para a suscetibilidade ao GBM. Além disso, foi observado que SJ e SJ-b apresentam efeito antitumoral em células de gliomas de alto grau pela inibição da proliferação celular, indução de apoptose e modulação da via NF- κ B.

Palavras-chave: Glioblastoma. Gliomas. NF- κ B. *Sophora japonica*.

ABSTRACT

Glioblastoma (GBM) is a neurological tumor with an unfavorable prognosis due to its molecular heterogeneity and, therefore, patients rarely respond to the recommended treatment, justifying the search for new therapeutic alternatives. KPF modulates the NF- κ B pathway, constitutively altered in GBM. The aim of the study was to validate the roles of different genotypes of single nucleotide variants (SNVs) (rs76276169T>C) and (rs2229714G>A), located in the 3'UTR region of the *PARG* and *RSK1* genes, involved in the modulation of the NF- κ B. Then, the antitumor and inhibitory efficacy of the NF- κ B pathway was evaluated by the extract rich in the flavonoid kaempferol (KPF), obtained from the *Sophora japonica* flower before (SJ) and after (SJ-b) a bioconversion reaction. The genotypes of these SNVs were identified by RT-PCR in 101 DNA samples from tumor tissue from patients with GBM and 254 DNA samples from peripheral blood from healthy individuals. Frequencies of wild-type (TT) (59.00 vs. 38.20, P-value<0.001) and (GG) (61.50 vs. 32.50, P-value <0.001) genotypes for SNVs rs76276169 and rs2229714 were higher in the group of patients than in controls at increased risk for GBM [OR: 2.33 (95% CI: 1.45-3.73) and [OR: 3.33 (95% CI: 2.01-5.50)]. Furthermore, the frequencies of alleles (T) (79.50 vs. 69.10, P-value<0.001) and (G) (79.70 vs. 54.10, P-value<0.001) were increased in patients with significant risk for the disease [OR:1.74 (95%CI:1.17-2.57) and [OR: 3.33 (95%CI:2.24-4.96), respectively. The action of SJ and SJ-b extracts were evaluated using grade III astrocytoma (NG-97) and GBM (U251) strains. The viability assay by the MTT method showed cell viability of 50% (IC₅₀) of 800 μ M (SJ) and 600 μ M (SJ-b) for NG97 strain, and 1800 μ M for U251 strain for both extracts after 72h of exposure. Synergistic effect was observed when TMZ+SJ or TMZ+SJ-b were evaluated by MTT in glioma cells. After 24h, both SJ and SJ-b extracts significantly inhibited cell migration and proliferation by Wound-healing and trypan blue dye exclusion assays. Induction of tumor cell apoptosis by DNA fragmentation and flow cytometry assays was also observed, especially in the less resistant strain to TMZ, NG-97. The cytometry assay also showed cell cycle arrest in S and G₂/M in the strains studied, being more significant in the U251 cell, promoted by the extracts. The relative expression of MMP-9 was also negatively modulated in cells exposed to the extracts in the presence or absence of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA), a migration stimulator. Furthermore, the extracts significantly inhibited the proliferation of glioma stem cells after 24h by the sphere formation assay. And qPCR and luciferase assays demonstrated that SJ and SJ-b inhibited the relative expression of the *TRAF6*, *IRAK2*, *IL-1 β* and *TNF- α* genes, indicating an inhibitory effect on the NF- κ B pathway. The results suggest that the ancestral genotype of both SNVs contribute to GBM susceptibility. Furthermore, it was observed that SJ and SJ-b have antitumor effects in high-grade glioma cells by inhibiting cell proliferation, inducing apoptosis and modulating the NF- κ B pathway.

Keywords: Glioblastoma. Glioma. NF- κ B. *Sophora japonica*.

LISTAS DE SÍMBOLOS

[+7/-10]	Ganho de cromossomo 7 e deleção do cromossomo 10
°C	Unidade de medida Graus <i>Celsius</i>
µL	Unidade de medida Microlitro
µM	Unidade de medida Micromolar
1p19q	Deleção combinada ou codeleção do braço curto do cromossomo 1 e do braço longo do cromossomo 19
3'UTR	Do Inglês <i>untranslated region</i>
5'dRp	Resíduo 5' fosfato-desoxirribose
AANN	Associação Americana de Enfermeiras na Neurociência
AFIP	Fascículo do Instituto de Patologia das Forças Armadas
AKT	Via de sinalização Serina/tronina quinase
TLB	Do Inglês <i>Tissue lysis buffer</i>
AP	Complexo proteico relacionado ao adaptador
AP1	Complexo proteico relacionado ao adaptador 1
ASCL1	Fator de transcrição bHLH da família de proteínas <i>achate scute 1</i>
ATRX	Gene remodelador da cromatina
AW1	Do Inglês <i>Wash Buffer 1</i>
Bad	Proteína agonista de morte celular associada a proteína Bcl2
BAX	Gene X regulador de apoptose associado a proteína Bcl2
BCL2-XL	Gene regulador de apoptose <i>BCL2</i>
BER	Via de reparo por excisão de base
BRAF	Proto-oncogene B-Raf serina/treonina quinase
CAAE	Certificado de Apresentação de Apreciação Ética
CCDN2	Gene ciclina D2 específica de G1/S
CD31	Molécula de adesão de células endoteliais e plaquetárias 1
CD44	Fator de transcrição 44
CDK4	Gene quinase dependente de ciclina 4
CDKN1A	Gene inibidor que quinase dependente de ciclina 1A
CDKN2A/B	Gene inibidor de quinase dependente de ciclina A/B
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CHI3L1	Proteína 1 semelhante à quitinase-3
CNS4	4ª Classificação dos tumores do Sistema Nervoso Central
CNS5	5ª Classificação dos tumores do Sistema Nervoso Central
CO₂	Dióxido de carbono
CQ	Controle de qualidade
Creb	Via reguladora de transcrição de ligação ao DNA CreB
c-Rel	Proteína do proto-oncogene REL, subunidade NF-kB
CTS	Células troncos semelhantes
DCX	Gene duplacortina
DLL3	Gene delta como ligante de Notch canônico 3
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
EFG	Proto-oncogene <i>MYB</i> , fator de transcrição

<i>EGFR</i>	Gene do receptor do fator de crescimento epidérmico
<i>ERBB3</i>	Gene tirosina quinase 3 do receptor erb-b2
Erk	Proteína quinase 1 ativada por mitógeno
Erk2	Proteína quinase 1 ativada por mitógeno
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
FAM	Fluorocromo FAM (corante azul)
FCM- UNICAMP	Faculdade de Ciências Médicas- Universidade Estadual de Campinas
<i>FGFb</i>	Gene Fator de crescimento de fibroblastos b
<i>GAPDH</i>	Gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
<i>GAS1</i>	Gene de parada de crescimento específico 1
GBM	Glioblastoma
<i>GFAP</i>	Gene proteína glial fibrilar ácida
GL-15	Linhagem celular de glioblastoma grau 4
<i>GLI2</i>	Gene Família GLI dedo de Zinco 2
H₂O	Símbolo químico da água
HDFa	Linhagem celular de fibroblastos dérmicos humanos adulto
HUSF	Hospital Universitário São Francisco na Providência de Deus
EHW	Equilíbrio de <i>Hardy-Weinberg</i>
IC95%	Intervalo de confiança de 95%
<i>IDH1</i>	Gene isocitrato desidrogenase 1
<i>IDH2</i>	Gene isocitrato desidrogenase 2
IκBα	Proteína alfa inibidora de NF-κB
IκBβ	Proteína beta inibidora de NF-κB
IL	Interleucina(s)
INCA	Instituto Nacional do Câncer
<i>ING1</i>	Gene inibidor do membro da família de crescimento 1
<i>IRAK2</i>	Gene quinase 2 associada ao receptor de interleucina 1
<i>KIAA1549</i>	Gene de nome KIAA1549
KPF	Kaempferol
KPS	Escala Karnofsky
KRAS	Proto-oncogene KRAS, GTPase
kV	Unidade de medida quilovolt
<i>LFNG</i>	Gene O-fucosilpeptídeo 3-beta-N-acetilglucosaminitransferase
LN229	Linhagem celular de glioblastoma grau 4
LPS	Lipopolissacarídeo
m²	Unidade de medida metro quadrado
Mapk	Proteína tipo quinase ativada por mitógeno
Mek	Proteína quinase quinase 7 ativada por mitógeno
<i>MERTK</i>	Proto-oncogene <i>MER</i> tirosina quinase
<i>MET</i>	Proto-oncogene <i>MET</i> , receptor de tirosina quinase
mg	Unidade de medida miligramas
<i>MGMT</i>	Gene O 6-metilguanina

mGy	Unidade de medida Miligray para radiação
miR	MicroRNA
mL	Unidade de medida mililitro
mM	Unidade de medida milimolar
MMP2	Gene matriz metalopeptidase 2
MMP3	Gene matriz metalopeptidase 3
MMP9	Gene matriz metalopeptidase 9
MN1	Proto-oncogene <i>MN1</i> regulador transcricional
MSK1	Gene antígeno identificado pelo anticorpo monoclonal AJ9
MSP	Gene da proteína específica do músculo
mTORC1	Via de sinalização Homólogo de Ras, ligação mTORC1
MTT	Método 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-di-fenil brometo de tetrazolina)
MYC	Proto-oncogene <i>MYC</i> fator de transcrição bHLH
NAD+	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NaSCN	Reagente Tiocianato de sódio
NF1	Gene Neurofibromina 1
NF-kB	Via de sinalização Fator nuclear Kappa B
NF-kB1	Proteína alfa inibidora de NF-kB
NF-kB2	Proteína beta inibidora de NF-kB
NG-97	Linhagem celular de Astrocitoma grau 3
nm	Unidade de medida Nanômetro
NOTCH3	Gene Receptor Notch 3
OLIG2	Gene fator de transcrição de oligodendrócitos
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	Do Inglês <i>Odds ration</i>
OVACAR-3	Linhagem celular de câncer de Ovário
PALLD	Gene paladina, proteína associada ao citoesqueleto
PAR	Polímero poli (ADP-ribose)
PARG	Gene poli (ADP-ribose) glicohidrolase
PARP1	Gene poli (ADP-ribose) polimerase 1
PARPs	Genes da família poli(ADP-ribose) polimerase
PBS	Reagente tampão fosfato salino
PCA	Análise de componentes principais
PDGFRA	Gene receptor do fator de crescimento de plaqueta alfa
pdsiCHECK 2	Proteína alfa-2-macroglobulina
pH	Unidade de medida potencial hidrogenômico
PI3K	Via de sinalização fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinase subunidade catalítica
POLβ	DNA polimerase beta
PRKCA	Proteína quinase C alfa
pRL Renilla	Vetor plasmidial Renilla luciferase

<i>PTEN</i>	Gene Fosfatase homólogo de tensina
qPCR-RT	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
<i>RAS</i>	Proto oncogene <i>RAS</i>
Rb	Via/gene retinoblastoma
Rel A	Subunidade NF-kB, proto-oncogene REL A
Rel B	Subunidade NF-kB, proto-oncogene REL B,
RISC	Complexo de silenciamento induzido por RNA
RNA	Ácido ribonucleico
RNA_m	RNA mensageiro
ROS	Espécie reativa de oxigênio
rpm	Unidade de medida rotação por minuto
<i>RPS6KA1</i>	Gene codificador da proteína ribossomal S6 quinase A1
<i>RSK1</i>	Gene codificador da proteína ribossomal S6 quinase A1
<i>RSK2</i>	Gene codificador da proteína ribossomal S6 quinase A3
<i>RSK3</i>	Gene codificador da proteína ribossomal S6 quinase A2
<i>RSK4</i>	Gene codificador da proteína ribossomal S6 quinase A6
RTK	Gene rotecina 2
SFB	Soro fetal bovino
<i>SHH</i>	DoInglês gene <i>sonic hedgehog signaling molecule</i>
SJ	Extrato vegetal de <i>Sopohora japonica</i>
SJ-b	Extrato vegetal de <i>Sophora japonica</i> biomodificado
<i>SMO</i>	Do Inglês gene <i>smoothened, frizzled class receptor</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SNV	Variante de nucleotídeo único
<i>SOX</i>	Gene sulfeto oxidase
STAT3	Via de sinalização transdutor de sinal e ativador de transcrição 3
T98G	Linhagem celular de glioblastoma grau 4
<i>TCF4</i>	Gene fator de transcrição 4
TCGA	Banco de dados - Atlas genômico do câncer
TCLE	Termo de consentimento livre esclarecido
<i>TERT</i>	Gene telomerase transcriptase reverse
<i>TIMP</i>	Gene inibidor de metalopeptidase TIMP 1
TMZ	Temozolamida
<i>TNF</i>	Gene fator de necrose tumoral
<i>TP53</i>	Gene proteína tumoral p53
<i>TRAF6</i>	Gene fator 6 associado ao receptor de TNF
<i>TSC1</i>	Gene subunidade complexa 1
<i>TSC2</i>	Gene subunidade complexa 2
TUS	Sinal útil total
U251	Linhagem de glioblastoma grau 4
U87MG	Linhagem celular de glioma maligno

UAs	Unidades arbitrárias
UICC	União para Controle Internacional do Câncer
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UV	Luz ultravioleta
VIC	Fluorocromo VIC (corante verde)
vs.	Versus
WNT	Do Inglês via de sinalização <i>Wingless and Int-1</i>
XPO5	Gene exportina 5
XRCC1	Do Inglês gene <i>X-ray repair cross complementing 1</i>
λ	Fator genômico lambda

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Alteração na classificação do astrocitoma <i>IDH</i> -mutante segundo a quinta edição da classificação para tumores do sistema nervoso central da Organização Mundial de Saúde.....	24
Figura 2	Representação esquemática da localização das variantes gênicas de base única (SNVs).....	33
Figura 3	Representação esquemática da atividade <i>Parg</i> no reparo de danos ao DNA.....	35
Figura 4	Representação esquemática da atividade <i>RSK1</i> na via de sinalização NF-kB.....	38
Figura 5	Representação esquemática do processo de identificação das SNVs rs76276169 e rs2229714, localizadas na região 3'UTR dos genes <i>PARG</i> e <i>RSK1</i>	44
Figura 6	Avaliação dos níveis de expressão relativa dos genes <i>PARG</i> e <i>RSK1</i> para os diferentes genótipos das SNVs rs76276169 e rs2229714 respectivamente.....	67
Figura 7	Representação gráfica da curva de sobrevivência de 101 pacientes com glioblastoma (GBM) considerando os diferentes genótipos das variantes gênicas de base única (SNVs) rs76276169 e rs2229714 nos genes <i>PARG</i> e <i>RSK1</i> , respectivamente.....	69
Figura 8	Representação gráfica da curva de sobrevivência de 101 pacientes com glioblastoma (GBM) considerando os diferentes genótipos das variantes gênicas de base única (SNVs) rs76276169 e rs2229714 nos genes <i>PARG</i> e <i>RSK1</i> respectivamente.....	70
Figura 9	Caracterização química dos extratos de <i>Sophora japonica</i> (SJ) e SJ biomodificada (SJ-b)	71
Figura 10	Caracterização química dos extratos de <i>Sophora japonica</i> antes (SJ) e após a reação de bioconversão (SJ-b)	74
Figura 11	Linhagem celular de fibroblastos dérmicos humano adulto, HDFa exposta aos extratos vegetais de <i>Sophora japonica</i> (SJ) ou <i>Sophora japonica</i> biomodificada (SJ-b)	75
Figura 12	Linhagem celular de glioma grau III (NG-97) exposta aos extratos vegetais de <i>Sophora japonica</i> (SJ) e <i>Sophora japonica</i> biomodificada (SJ-b)	76
Figura 13	Linhagem celular de Glioblastoma (U251) exposta aos extratos vegetais de <i>Sophora japonica</i> (SJ) e <i>Sophora japonica</i> biomodificado (SJ-b)	77
Figura 14	Linhagem celular de glioma grau III (NG-97) exposta ao Temozolamida (TMZ) ou em associação aos extratos vegetais de <i>Sophora japonica</i> (SJ) e <i>Sophora japonica</i> (SJ-b)	78
Figura 15	Linhagem celular de glioma grau IV (U251) exposta ao Temozolamida (TMZ) ou em associação aos extratos vegetais de <i>Sophora japonica</i> (SJ) e <i>Sophora japonica</i> (SJ-b)	79
Figura 16	Avaliação da migração celular da linhagem NG-97 exposta ao extrato vegetal da <i>Sophora japonica</i> (SJ) e <i>Sophora japonica</i> biomodificada (SJ-b)	812
Figura 17	Avaliação da migração celular da linhagem U251 exposta ao extrato vegetal da <i>Sophora japonica</i> (SJ) e <i>Sophora japonica</i> biomodificada SJ-b.....	82

Figura 18	Avaliação da migração celular através da modulação do gene <i>MMP9</i> pelos extratos de <i>Sophora japonica</i> (SJ) e <i>Sophora japonica</i> biomodificada (SJ-b) nas linhagens NG-97 e U251.....	84
Figura 19	Inibição da proliferação celular pelos extratos vegetais de <i>Sophora japonica</i> (SJ) e <i>Sophora japonica</i> biomodificada (SJ-b) nas linhagens celulares NG-97 e U251.....	85
Figura 20	Parada do ciclo celular pelos extratos vegetais de <i>Sophora japonica</i> (SJ) e <i>Sophora japonica</i> biomodificada (SJ-b) nas linhagens celulares NG-97 e U251.....	86
Figura 21	Fragmentação do DNA promovida pelos extratos vegetais de <i>Sophora japonica</i> antes e depois da biomodificação (SJ-b) nas linhagens celulares NG-97 e U251 pela eletroforese em gel de agarose.....	88
Figura 22	Extratos de <i>Sophora japonica</i> antes (SJ) e após a reação de bioconversão (SJ-b) parecem ter um efeito apoptótico em linhagens celulares NG-97 e U251.....	89
Figura 23	Inibição na formação de neuroesferas pelos extratos vegetais de <i>Sophora japonica</i> (SJ) e <i>Sophora japonica</i> biomodificado (SJ-b) na linhagem celular de glioma grau III.....	91
Figura 24	Inibição na formação de neuroesferas pelos extratos vegetais de <i>Sophora japonica</i> (SJ) e <i>Sophora japonica</i> biomodificado (SJ-b) na linhagem celular de glioblastoma.....	92
Figura 25	Efeito inibitório dos extratos vegetais de <i>Sophora japonica</i> (SJ) e <i>Sophora japonica</i> biomodificado (SJ-b) em genes pertencentes a via NF-κB.....	95
Figura 26	Efeito inibitório do extrato vegetal de <i>Sophora japonica</i> (SJ) e <i>Sophora japonica</i> biomodificado (SJ-b) na via NF-κB.....	96

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1	Classificação dos astrocitomas em adultos.....	25
Tabela 2	Iniciadores - <i>SYBR green</i>	54
Tabela 3	Dados clínicos de 101 pacientes com glioblastoma e 254 indivíduos saudáveis, doadores de sangue periférico, considerando o sexo, a cor da pele e a idade.....	57
Tabela 4	Dados do tumor de 101 pacientes com glioblastoma, como a localização, pontuação de Karnofsky, tipos de tratamentos, recidiva e desfecho clínico.....	58
Tabela 5	Frequências dos genótipos da SNV rs76276169 identificados em 101 pacientes com glioblastoma e 254 indivíduos saudáveis, doadores de sangue periférico, inseridos no estudo.....	59
Tabela 6	Frequências dos genótipos da SNV rs2229714 nos 101 pacientes com glioblastoma e 254 amostras de indivíduos saudáveis inseridos no estudo.....	60
Tabela 7	Dados clínicos de 1.171 pacientes saudáveis idosos incluídos no grupo controle ABraOM.....	62
Tabela 8	Associação comparativa das variantes rs76276169 e rs 2229714 utilizando os grupos pacientes com glioblastoma e controle ABraOM.....	63
Tabela 9	Frequência dos diferentes genótipos da SNV rs76276169 no gene <i>PARG</i> em 101 pacientes com GBM de acordo com as características clínicas.....	64
Tabela 10	Frequência dos diferentes genótipos da SNV rs2229714 no gene <i>RSK1</i> em 101 pacientes com GBM de acordo com as características clínicas.....	65
Tabela 11	Expressão relativa dos genes <i>PARG</i> e <i>RSK1</i> em pacientes com GBM de acordo com os diferentes genótipos para as SNVs rs76276169 e rs2229714.	67
Tabela 12	Identificação de 26 compostos presentes no extrato de <i>Saphora japonica</i> após hidrólise enzimática.....	72
Tabela 13	Valores de significância do ensaio de migração celular apresentados de acordo com as concentrações de cada extrato para os diferentes tempos observados.....	80
Tabela 14	Expressão relativa do gene <i>MMP-9</i> para as linhagens NG-97 e U251 apresentadas para as diferentes condições avaliadas com desvio padrão e valores de significância.....	83
Tabela 15	Diferenças significativa da proliferação celular das células expostas aos extratos comparadas as células controles.....	85
Tabela 16	Percentual de células marcadas pelo intercalante de DNA iodeto de propídeo em cada fase do ciclo celular e os respectivos valores de significância.....	87
Tabela 17	Expressão gênica dos genes <i>TRAF6</i> , <i>IRAK2</i> , <i>TNFα</i> e <i>IL-1β</i> nas linhagens NG-97 e U251.....	94

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1. Incidência dos Tumores do Sistema Nervoso Central (SNC)	21
1.2. Incidência dos gliomas	21
1.3. Classificação dos tumores do SNC	22
1.4. Classificação dos astrocitomas	23
1.5. Aspectos clínico Glioblastoma (GBM)	25
1.6. Caracterização molecular do GBM	27
1.7. Células tronco semelhante (CTS)	29
1.8. MicroRNAs (miRNAs)	30
1.9. Variantes gênicas de base única (SNVs) em genes-alvo de miRs	31
1.10. Seleção das SNVs em genes-alvo de miRs no estudo	33
1.11. Associação do gene <i>PARG</i> com o GBM	34
1.12. Associação do gene <i>RSK1</i> com o GBM	36
1.13. <i>Sophora japonica</i> (SJ) e kaempferol (KPF)	38
1.14. Justificativa	40
2. OBJETIVOS	41
2.1. Objetivos Gerais	41
3. MATERIAI E MÉTODO	42
3.1. Aspectos éticos	42
3.2. Amostras de tecido tumoral, sangue periférico	42
3.3. Seleção das SNVs para o estudo	43
3.4. Determinação dos diferentes genótipos das SNVs rs76276169 e rs2229714	45
3.4.1. Extração das amostras de DNA a partir de fragmentos de tumor inseridos em bloco de parafina	45
3.4.2. Extração das amostras de DNA a partir de fragmentos de tumor cerebral fresco de pacientes com GBM	46
3.4.3. Identificação dos diferentes genótipos das SNVs selecionadas	46
3.5. Caracterização química da SJ	46
3.5.1 Extrato de <i>Sophora japonica</i>	47

3.5.2. Reação de bioconversão.....	47
3.5.3. Análise por espectrométrica de massa não direcionada por UHPLCQ-TOF-MSE.....	47
3.5.4. Quantificação de KPF aglicona.....	18
3.5.5. Processamento de dados MS, anotação de metabólitos e estatísticas....	48
3.6. Caracterização biológica dos extratos vegetais de SJ e SJ-B.....	49
3.6.1. Linhagens celulares.....	49
3.6.2. Avaliação do efeito dos extratos vegetais de SJ e SJ-b pelo ensaio de citotoxicidade.....	49
3.6.3. Avaliação da migração celular pelo método de <i>WH</i>	50
3.6.4. Avaliação da proliferação celular após exposição aos extratos vegetais de SF e SF-b.....	50
3.6.5. Avaliação do efeito dos extratos vegetais de SJ e SJ-b sobre a fragmentação ao DNA.....	51
3.6.6. Avaliação do efeito apoptótico e de parada do ciclo celular dos extratos vegetais de SJ e SJ-b por citometria de fluxo.....	51
3.6.7. Avaliação da capacidade de inibição de células tronco tumorais após exposição aos extratos vegetais de SF e SJ-b pelo ensaio de formação de neuroesferas.....	52
3.6.8. Ação inibitório dos extratos vegetais de SJ e SJ-b na via de sinalização NF-kB por meio do ensaio da luciferase.....	52
3.6.9. Avaliação dos genes <i>IRAK2</i> e <i>TRAF6</i> ; <i>IL1β</i> e <i>TNFα</i> responsáveis pela ativação da via NF-kB e MMP9, marcador de migração celular pela PCR quantitativa (qPCR).....	53
3.7. Análises de afinidade de ligação.....	54
3.8. Análises estatísticas.....	54
4. RESULTADOS.....	56
4.1. Amostras.....	56
4.2. Identificação dos diferentes genótipos da SNV rs76276169.....	59
4.3. Identificação dos diferentes genótipos da SNV rs2229714.....	60

4.4. Associação comparativa das SNVs rs76276169 e rs2229714 entre o grupo de pacientes com GBM e uma população controle do banco de dados ABraOM.....	61
4.5. Avaliação dos aspectos clínicos e do tumor para as SNVs rs76276169 e rs2229714.....	63
4.6. Afinidade de ligação entre os miR-491-3p e miR-663b aos genes <i>PARG</i> e <i>RSKI</i> respectivamente.....	66
4.7. Expressão relativa dos genes <i>PARG</i> e <i>RSKI</i> nos pacientes de com GBM de acordo com os diferentes genótipos para as SNVs rs76276169 e rs2229714.....	66
4.8. Probabilidade de Sobrevida dos pacientes com GBM de acordo com os genótipos das SNVs rs76276169 T>C e rs2229714 G>A.....	68
4.9. Caracterização química dos extratos de SJ e SJ-b.....	70
4.10. Caracterização biológica do extrato vegetal de SJ e SJ-b.....	74
4.10.1. Comparação do efeito citotóxico do extrato vegetal de SJ e SJ-b em linhagem celular não tumoral.....	74
4.10.2. Comparação do efeito antitumoral dos extratos vegetais de SJ e SJ-b nas linhagens celulares de gliomas de alto grau.....	75
4.10.3. Efeito antitumoral do extrato de SJ ou SJ-b em associação com TMZ nas linhagens celulares de gliomas de alto grau.....	77
4.10.4. Avaliação da migração celular pelo método de <i>WH</i> nas linhagens celulares de gliomas de alto grau.....	80
4.10.5. Avaliação da proliferação celular das linhagens de gliomas de alto grau expostas aos extratos vegetais de SJ e SJ-b.....	84
4.10.6. Avaliação do efeito apoptótico do extrato vegetal de SJ e SJ-b nas linhagens de gliomas de alto grau.....	87
4.10.7. Avaliação da capacidade de inibição de CTS promovida pelos extratos vegetais de SJ e SJ-b.....	90
4.10.8. Ação inibitório dos extratos vegetais de SJ e SJ-b em genes envolvidos com a via de sinalização NF-kB.....	93

4.10.9. Ação inibitório dos extratos vegetais de SJ e SJ-b na via de sinalização NF-KB.....	96
5. DISCUSSÃO.....	97
6. CONCLUSÃO.....	106
7. HIGHLIGHTS.....	107
8. LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....	108
9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	109
9. ANEXOS E APÊNDICES.....	123

1. INTRODUÇÃO

1.1. Incidência dos Tumores do Sistema Nervoso Central (SNC)

Os tumores do SNC correspondem a aproximadamente 2% de todas as neoplasias (WORLD CANCER REPORT, 2014; FERLAY et al, 2019). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que entre os anos de 2020 - 2025 ocorrerão 336.000 novos casos de tumores no SNC no mundo (GLOBOCAN, 2020). Nos Estados Unidos da América (EUA), a Sociedade Americana do Câncer estimou cerca de 24.530 tumores malignos do SNC para o ano de 2021 (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2021). No Brasil, estimou-se 11.100 novos casos de tumores do SNC para o triênio 2020-2022 (INCA, 2020). Ainda, a incidência do câncer do SNC no Brasil é maior na região Sudeste com cerca de 4.550 casos em 2020 (INCA, 2020). Além disso, os tumores do SNC são responsáveis por altas taxas de morbidade e mortalidade, sendo que se espera que dos 336.000 casos diagnosticados mundialmente, 277.000 irão evoluir para o óbito (GLOBOCAN, 2020).

1.2. Incidência dos gliomas

Os gliomas são os tumores cerebrais malignos primários mais comuns em adultos, correspondendo a aproximadamente 70% dos casos de tumores cerebrais (MIRANDA-FILHO et al 2017). São divididos em três subtipos de acordo com as características histopatológicas em astrocitomas, oligodendrogliomas e ependimomas (LOUIS et al., 2016). Podem acometer qualquer parte do SNC, principalmente o cérebro, a partir de alterações moleculares nas células da glia (OSTROM et al, 2013). A incidência dos gliomas varia globalmente, entre 4,67 e 5,73 por 100.000 indivíduos (LARJAVAARA et al 2007; GOUSIAS et al 2009). Por serem pouco responsivos ao tratamento estabelecido e comumente diagnosticados em estágios avançados, os pacientes apresentam uma baixa sobrevida, em torno de 5 anos após o diagnóstico (OSTROM et al 2014). Além disso, dentre os gliomas, os astrocitomas são os tumores mais frequentes, constituindo cerca de 30% dos casos, sendo a incidência principalmente após os 50 anos de idade. Ainda, o glioblastoma (GBM), o mais frequente e maligno dos astrocitomas, apresenta uma incidência média de 5-7 casos por 100.000 indivíduos e, apesar de inúmeros avanços no diagnóstico e tratamento desses tumores, seu prognóstico permanece ainda bastante limitado com média de sobrevivência entre 10 e 15 meses após o diagnóstico, sendo que apenas 0,05% a 4,7% dos pacientes sobrevivem até 5 anos após o diagnóstico (PHILIPS, 2018).

1.3. Classificação dos tumores do SNC

Organizações como a União Internacional contra o Câncer (UICC., 1965), o Atlas de Histologia de Tumores Cerebrais (ZULCH., 1971), o Atlas de Patologia Neurocirúrgica (ZULCH., 1975) e o Fascículo do Instituto Americano de Patologia das Forças Armadas (AFIP) (KERNOHAN e SAYRE., 1952) trabalharam na tentativa de estabelecer uma nomenclatura para a classificação dos tumores do SNC internacionalmente aceita; entretanto, com reconhecimento limitado (KERNOHAN e SAYRE., 1952). Em 1979, a OMS publicou pela primeira vez o sistema de classificação *WHO System* (“blue books”), abrangendo todos os tumores do SNC. Desde então, várias revisões foram publicadas e reconhecidas internacionalmente (ZULCH, 1979; KLEIHUES; BURGER; SCHEITHAUER, 1993; KLEIHUES e CAVENEE, 2002; LOUIS et al., 2007; LOUIS et al., 2016; LOUIS et al., 2021). A classificação da OMS dos tumores do SNC foi fortemente influenciada pelos avanços anteriormente alcançados pela AFIP (SCHEITHAUER., 2009).

A OMS baseia-se em características histopatológicas para a classificação dos tumores do SNC, contudo desde a 4ª edição em 2016, parâmetros moleculares foram também inseridos e na 5ª edição em 2021, estes parâmetros foram elevados acima das características histopatológicas (GAILLARD., 2022). Além disso, a abordagem atual gera uma classificação bastante heterogênea uma vez que, alguns tumores pouco elucidados molecularmente, ainda permanecem sendo classificados de acordo com características histológicas. Desta forma, a 5ª edição enfatiza a importância do diagnóstico integrado, histológico e molecular combinados (LOUIS et al., 2021), conforme apresentado no anexo 1.

A 5ª edição categoriza os tumores do SNC em 20 grandes áreas (Anexo 2), e atribui uma classificação clinicopatológica entre 1 a 4, considerando-se a história natural esperada para cada tipo. Esta classificação foi estabelecida quando havia poucas terapias eficazes disponíveis. Atualmente, as terapias empregadas quase sempre influenciam a sobrevida global, não sendo possível utilizar a história natural para cada tipo de tumor, tornando em grande parte dos casos, os graus atribuídos para os tumores do SNC, pouco representativos (LOUIS et al., 2021). A 5ª edição questiona a atribuição de graus para cada tipo de tumor, uma vez que, pacientes com tumores localizados em regiões menos críticas e com disponibilidade a terapias possivelmente eficazes, ainda que possuam uma classificação clinicopatológica desfavorável, podem apresentar bom prognóstico. Assim, pacientes com diagnóstico de meduloblastoma com a via WNT ativa possui classificação clinicopatológica grau 4; entretanto, se tratado, quase todos os pacientes apresentam sobrevida a longo prazo, e melhor prognóstico comparado a todos os

demais meduloblastomas também classificados como grau 4 (LOUIS et al.,2021).

1.4.Classificação dos astrocitomas

A 4ª edição de classificação dos tumores do SNC considerava os astrocitomas em astrocitoma pilocítico (grau 1), astrocitoma difuso (grau 2), astrocitoma anaplásico (grau 3) e glioblastoma (GBM) (grau 4), sendo este último dividido em GBM primário e secundário, dependendo da ausência ou presença de mutação *missense*, uma mutação pontual em um único nucleotídeo com conseqüente mudança em um aminoácido na proteína decorrente, no éxon 4 dos genes isocitrato desidrogenase 1 e 2 (*IDH1* e *IDH2*), mais especificamente nos códons 132 e 172, respectivamente. Os casos de GBM com ausência de mutação em um dos genes *IDH* representavam 90% dos casos e eram classificados como GBM primário *IDH* selvagem; os casos com presença de mutação em um dos genes *IDH* eram classificados como GBM secundário *IDH* mutante e representavam 10% dos casos de GBM (LOUIS et al., 2016).

A 5ª edição sobrepõe o genótipo em relação ao fenótipo histológico nos casos em que o fenótipo histológico e o genótipo não são concordantes. Assim, fenótipo histológico de astrocitoma difuso e gene *ATRX* selvagem e codeleção 1p19q, o genótipo se sobrepõem ao fenótipo e o diagnóstico na verdade é de oligodendroglioma. Outra importante alteração a ser ressaltada é que os tumores antes conhecidos como astrocitoma anaplásico ou GBM secundário, agora estão sob um único diagnóstico, ou seja, astrocitoma difuso *IDH*-mutante, com base na presença de mutação no gene *IDH* e na ausência de codeleção 1p19q, o qual se presente modifica o diagnóstico para oligodendroglioma. Além disso, o astrocitoma difuso *IDH*-mutante pode ser classificado em graus 2, 3 ou 4 a depender das características histológicas e moleculares. Desta forma, a presença de deleção homozigótica no gene *CDKN2A/B*, a qual resulta em pior prognóstico, classifica o tumor como grau 4, mesmo nos casos com ausência de proliferação microvascular e necrose (LOUIS et al., 2021) (**Figura 1**).

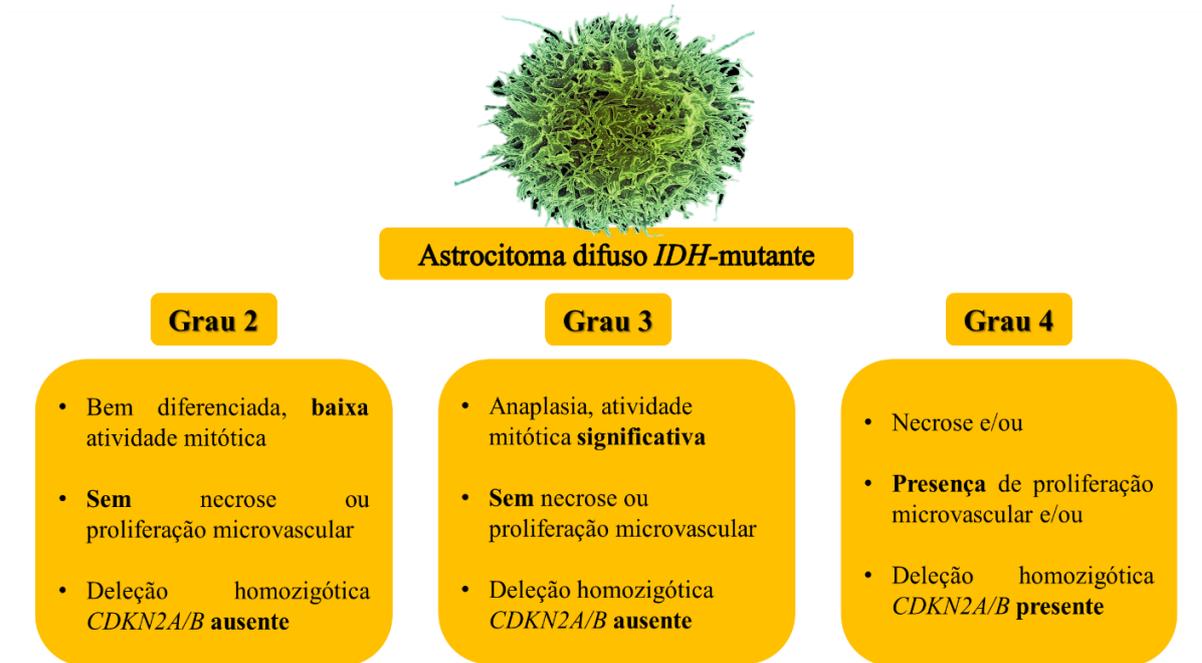


Figura 1 Alteração na classificação do astrocitoma *IDH*-mutante segundo a quinta edição da classificação para tumores do sistema nervoso central da Organização Mundial de Saúde. Principais características histopatológicas determinantes para a classificação do astrocitoma difuso *IDH*-mutante em graus 2, 3 ou 4. A deleção homozigótica de *CDKN2A/B* é fator determinante para a classificação do astrocitoma difuso *IDH*-mutante em grau 4, uma vez que, há sobreposição do genótipo em relação ao fenótipo histológico. **Fonte:** Informações retiradas de LOUIS et al., 2021.

O tumor astrocítico difuso *IDH*-selvagem, em adultos, sem características histológicas de GBM, mas com um ou mais de três parâmetros genéticos como a mutação no gene promotor *TERT*, a amplificação do gene *EGFR* ou ganho do cromossomo 7, juntamente com o ganho de um cromossomo 7 e deleção completa do cromossomo 10 concomitantes [+7/-10], de acordo com a 5ª edição devem ser classificados como GBM (LOUIS et al, 2021). Ainda a OMS reconhece três variantes de GBM, o GBM de células gigantes, o gliossarcoma e o GBM epitelióide; porém, não estabelece diagnóstico diferenciado para cada variante (LOUIS et al., 2016; LOUIS et al 2021; GAILLARD et al 2022). A Tabela 1 apresenta a atual nomenclatura e classificação clinicopatológicas dos astrocitomas segundo a 5ª edição da classificação dos tumores do SNC.

Tabela 1 Classificação dos astrocitomas de acordo com os critérios histopatológicos e moleculares estabelecidos na quinta edição da classificação dos tumores do sistema nervoso central da organização mundial da saúde.

Classificação dos astrocitomas em adultos		
Astrocitomas difuso de alto grau	Genes alterados*	Graus 1 a 4
Astrocitoma, <i>IDH</i> -mutante	<i>IDH1, IDH2, ATRX, TP53, CDKN2A/B</i>	2, 3 ou 4
Glioblastoma, <i>IDH</i> -selvagem	<i>IDH</i> -selvagem, <i>TERT, EGFR</i> , ganho do cromossomo 7, deleção do cromossomo 10	4
Gliomas astrocíticos circunscritos	Genes alterados*	Graus 1 a 4
Astrocitoma pilocítico	<i>KIAA1549-BRAF, BRAF, NF1</i>	1
Astrocitoma de alto grau com características pilóides	<i>BRAF, NF1, ATRX, CDKN2A/B</i> (metiloma)	Não atribuído
Xantastrocitoma pleomórfico	<i>BRAF, CDKN2A/B</i>	2 ou 3
Astrocitoma subependimário de células gigantes	<i>TSC1, TSC2</i>	1
Glioma cordoide	<i>PRKCA</i>	2
Astroblastoma, <i>MNI</i> - alterado	<i>MNI</i>	Não atribuído

*Mutações, deleções ou alterações na metilação (metiloma) nos genes citados. Adaptado de LOUIS et al., 2021

1.5.Aspectos clínicos do Glioblastoma (GBM)

O GBM é um tumor primário extremamente agressivo que acomete principalmente o cérebro e mais de 60% dos casos ocorrem em um dos lobos cerebrais, sendo 25% no lobo frontal, 20% no lobo temporal, 13% no lobo parietal e 3% no lobo occipital. Em casos raros o GBM também pode acometer tronco cerebral, cerebelo e medula espinal (AANN, 2014). Comumente acomete indivíduos acima dos 64 anos, e possui uma sutil prevalência no sexo masculino comparado ao sexo feminino [1,60:1,00]. Além disso, estudos demonstraram que a incidência do GBM é maior em caucasianos do que em outras etnias (ELLOR; PAGANO-YOUNG; AVGEROPOULOS, 2014; OSTROM et al., 2018). Ostrom e colaboradores (2018) analisaram dados de pacientes diagnosticados com GBM entre os anos 2000 e 2014 na população americana e observaram que a taxa média anual de incidência do GBM foi maior em caucasianos (4,70) comparadas a todas as demais etnias avaliadas no estudo, ou seja, hispânicos (3,34), pretos (2,24), asiáticos (2,00) e indígenas americanos (1,88).

Embora amplamente estudado, principalmente nos últimos anos, a etiologia do GBM ainda permanece obscura; desta forma, a radiação ionizante é o único fator de risco ambiental comprovadamente associado ao aumento do risco para o desenvolvimento de GBM. Um estudo retrospectivo avaliou dados de mais de 350.000 pacientes submetidos a tomografia computadorizada em idade inferior a 22 anos, e evidenciou que doses cumulativas de radiação

de 60mGy podem triplicar o risco de desenvolvimento de tumores cerebrais (PAUWELS; BOURGUIGNON., 2012; PEARCE et al., 2012; ELLOR; PAGANO-YOUNG; AVGEROPOULOS, 2014). Outros fatores ambientais como exposição ao cloreto de vinil, pesticidas, fumo e refino de petróleo foram abordados como possíveis fatores para o desenvolvimento de gliomas de alto grau, contudo as associações foram inconclusivas (ALIFIERIS e TRAFALIS, 2015). O fator hereditário também apresentou uma associação para o desenvolvimento de gliomas. Doenças genéticas como a neurofibromatose 1 e 2, a esclerose tuberosa, a síndrome de Li-Fraumeni, o retinoblastoma e a síndrome de Turcot podem contribuir para o desenvolvimento de gliomas de alto grau; entretanto, estes pacientes representam menos de 1% dos casos (ELLOR; PAGANO-YOUNG; AVGEROPOULOS, 2014).

A sintomatologia do paciente com GBM também é variável, uma vez que está intimamente relacionada ao tamanho da massa tumoral, localização e o comprometimento de estruturas anatômicas (YOUNG et al., 2015). Ainda assim, grande parte dos pacientes apresentam sintomas como cefaleia, déficits neurológicos focais ou progressivo, e em quase 25% dos casos, os pacientes apresentam ao menos uma crise convulsiva (PERRY et al., 2006; SCHIFF et al., 2015).

A abordagem terapêutica preconizada para o tratamento do GBM, conhecido como regime *Stupp*, consiste em ressecção cirúrgica máxima seguida de um esquema de radioterapia (RT) em doses fracionadas de 1,8 a 2mGy/dia, totalizando uma dose de 60mGy, associada ao uso de 75mg/m² do quimioterápico Temozolomida (TMZ) durante 6 semanas consecutivas (5 dias por semana). Após este primeiro ciclo de tratamento, é realizada uma pausa de 1 mês e se inicia mais 6 ciclos (1 ciclo por mês) de tratamento apenas com o TMZ numa dose de 150mg/m² por 5 dias consecutivos, seguido por uma pausa de 23 dias. Se o paciente tiver uma boa aceitação ao tratamento, a dose pode ser aumentada para 200mg/m² até o restante da terapia (STUPP et al 2005). É comum na prática clínica prolongar o número de ciclos da TMZ por até 12 ou 18 ciclos; entretanto, não há dados suficientes que evidencie uma melhora na sobrevida dos pacientes submetidos a este regime de prolongamento (JOHNSON et al., 2015). Ainda assim, cerca de 70% dos pacientes irão apresentar recidiva da doença dentro de um ano (STUPP et al., 2005). Vale ressaltar que o regime *Stupp* é pouco utilizado em pacientes com idade superior a 70 anos (MINNITI; LOMBARDI; PAOLINI, 2019). Na verdade, quanto maior a idade do paciente e comorbidades associadas, mais incerto é o tratamento (MINNITI; LOMBARDI; PAOLINI, 2019).

1.6. Caracterização molecular do GBM

O GBM é um tumor heterogêneo que abriga muitas alterações genéticas, o que resulta em um perfil molecular complexo. Assim, a determinação do perfil molecular do GBM é incentivada pela OMS para um diagnóstico preciso e um melhor entendimento da doença (LOUIS et al., 2016; LOUIS et al., 2021). Um marcador molecular importante é o perfil de metilação da região promotora do gene *MGMT*, o qual é responsável por traduzir uma proteína de reparo por excisão de base. Esta proteína é capaz de ligar-se a O6-metil-guanina (OHC₃) gerada após a alquilação do átomo de oxigênio da guanina, promovendo reparo de erros no DNA (CHEN et al., 2013). Cerca de 55% dos pacientes com GBM apresentam hipometilação da região promotora do gene *MGMT*, resultando em resistência a TMZ devido a promoção do reparo a erros no DNA nas células tumorais pelo excesso de proteína Mgmt ligadas a OHC₃ nestes casos (KAINA et al., 2007 ZHANG; STEVENS; BRADSHAW, 2012).

A presença de mutações na região promotora do gene *TERT* também é outro importante marcador molecular. Cerca de 75% dos pacientes com GBM apresentam mutações na região promotora deste gene, o que resulta no aumento da atividade da telomerase, promovendo assim a manutenção dos telômeros nas células tumorais, contribuindo para a proliferação celular, invasão e resistência a apoptose (ZHOU et al., 2014).

Considerando a heterogeneidade do GBM, a rede de pesquisa Atlas do Genoma do Câncer (TCGA) utilizou 206 amostras teciduais de pacientes com GBM para estabelecer um perfil detalhado das alterações moleculares. O estudo evidenciou que a maioria dos pacientes apresentam anormalidades funcionais nas vias RTK/RAS/PI3K (88%), p53 (87%) e Rb (78%), essenciais para a patogênese do GBM (TCGA, 2008). A partir deste estudo, o TCGA criou um sistema de classificação para o GBM considerando o seu perfil molecular, no qual o GBM poderia ser agrupado em 4 subtipos denominados clássico, mesenquimal, neural e proneural (VERHAAK et al., 2010). Entretanto, um aprimoramento das análises sugeriu que o subtipo neural, é na verdade o resultado de contaminação de tecido não maligno nas amostras de GBM (BRENNAN; VERHAAK; MCKENNA, 2013; WANG et al., 2017). Desta forma, os subtipos foram revalidados em clássico, mesenquimal e proneural/neural (TEO et al., 2019). Ainda, apesar da classificação molecular acima ser amplamente aceita, não é considerada definitiva, uma vez que, mais de um subtipo pode estar presente no mesmo tumor (SOTTORIVA et al., 2013).

Conforme exposto, as principais características moleculares do GBM de subtipo clássico

é a amplificação do cromossomo 7 associado a deleção do cromossomo 10 em todos os casos de GBM clássico. Amplificação do gene *EGFR* responsável pelo crescimento e sobrevivência das células tumorais foi observada em 97% dos casos de GBM deste subtipo (VERHAAK et al., 2010). Em quase 100% dos casos de GBM clássico houve a ausência de mutação no gene *TP53*. Além disso, mais de 50% dos casos de GBM clássico apresentam deleção do gene supressor tumoral *CDKN2A*, alterações na via supressora tumoral Rb (mutação nos genes *RBI*, *CDK4* e *CCDN2*) e a superexpressão das vias de sinalização Notch (mutações nos genes *NOTCH3*, *FAG1* e *LFNG*), responsável principalmente pela resistência terapêutica no GBM e a proliferação de células pluripotentes tumorais (VERHAAK et al., 2010; TEO et al., 2019; BAZZONI e BENTIVEGNA., 2019), além da via Sonic hedgehog (SHH) (mutações no gene *SMO*, *GAS1* e *GLI2*), responsável principalmente pela proliferação das células neoplásicas pelo estímulo da angiogênese (VERHAAK et al., 2010; TEO et al., 2019).

O subtipo molecular mesenquimal é caracterizado por apresentar em mais de 50% dos casos alguma anormalidade no gene supressor tumoral *NF1*; além disso, cerca de 42% dos casos de GBM mesenquimal apresentam mutações concomitantes nos genes *NF1* e *PTEN*, resultando em maior atividade da via Ras/Mapk e rápida progressão da doença. Outra característica marcante do GBM mesenquimal é a ativação das vias Tnf e Nf-kb responsáveis por conferir um aumento do infiltrado inflamatório na massa tumoral e a presença de necrose (VERHAAK et al., 2010; TEO et al., 2019). Além disso, o subtipo mesenquimal apresenta expressão de marcadores mesenquimais *CHI3L1* e *MET* em combinação com expressão de marcadores astrocíticos *CD44* e *MERTK*, os quais estão presentes em tumores desdiferenciados e transdiferenciados ou seja, tumores que apresentam um processo de transição epitélio-mesenquimal, o que resulta em um alto nível de plasticidade fenotípica do tumor (VERHAAK et al., 2010; KRASNAPOLSKI; TODARO; DE KIER, 2011; TEO et al., 2019). Esta característica confere às células tumorais um aumento da motilidade e capacidade invasiva o que resulta em uma rápida progressão do tumor e resistência à TMZ. Dentre os subtipos moleculares do GBM, o mesenquimal é o de pior prognóstico (KRASNAPOLSKI; TODARO; DE KIER, 2011).

O subtipo molecular proneural/neural não é considerado o de pior prognóstico; entretanto, apresenta a capacidade de se transformar no subtipo mesenquimal (VERHAAK et al., 2010). Sua principal característica molecular é a amplificação do gene *PDGFRA* presente em 35% dos casos, resultando na ativação da via de sinalização Akt, crucial para a progressão e malignidade do GBM. A amplificação de *PDGFRA* associada a alta expressão deste gene é encontrada

apenas nos tumores deste subtipo. Além disso, mais de 50% dos casos de GBM proneural/neural apresentam mutação no gene *TP53* e ganho do cromossomo 7 associado a deleção do cromossomo 10. Ainda, este subtipo apresenta a superexpressão do gene *OLIG2*, responsável por regular negativamente o supressor tumoral *CDKN1A* resultando em um aumento da proliferação das células tumorais. Alterações em genes responsáveis pelo desenvolvimento proneural, como *SOX*, *DCX*, *DLL3*, *ASCL1* e *TCF4*, também foram encontradas em amostras de GBM deste subtipo (VERHAAK et al., 2010; TEO et al., 2019).

1.7.Células-tronco semelhantes (CTS)

O GBM também apresenta uma subpopulação de células tumorais com propriedades semelhantes às células-tronco conhecidas como células-tronco semelhantes (CTS). As CTS possuem capacidade de auto renovação, invasão, são quimio- e radio-resistentes e possuem a capacidade de reiniciar ou recidivar o tumor após remoção. Ainda, as CTS podem ser encontradas em locais específicos dentro do tumor, conhecidos como nichos. O tumor apresenta ao menos três nichos que são funcionalmente distintos chamados de perivascular, núcleo hipóxico/necrótico e frente invasiva. Dependendo do nível de progressão e invasão do tumor e do nicho em que estas células se encontram, as CTS podem se diferenciar em células especializadas de acordo com a necessidade do tumor, e ao mesmo tempo manter sua característica pluripotente (SINGH et al., 2004; BAO et al., 2006; CALABRESE et al., 2007; CHEN et al., 2012; LATHIA et al., 2015; PRAGER et al., 2020). As CTS presentes no nicho perivascular ou próximo aos vasos sanguíneos, são células com maior capacidade proliferativa e de auto-renovação, o que contribui para a progressão do tumor, recidiva da doença e formação de novos vasos sanguíneos por meio de sinalização célula-célula. As CTS localizadas no núcleo hipóxico/necrótico, são células envolvidas na formação de novos vasos sanguíneos e diferenciação em células com características endoteliais. Um estudo com camundongos xenoenxertados evidenciou que parte das CTS presentes no tumor foram capazes de se diferenciar em células endoteliais e comporem parte da vasculatura tumoral no camundongo. As células diferenciadas permaneceram com as alterações moleculares das CTS e expressão de um marcador de membrana plasmática endotelial humano (CD31), sugerindo que parte das CTS se diferenciaram em células endoteliais (RICCI-VITIANI et al., 2010). Ainda, as CTS podem desenvolver características mesenquimais induzindo a migração e invasão das células tumorais (TEJERO et al., 2019; VELÁSQUEZ et al., 2019). Por fim, as CTS localizadas na frente invasiva utilizam-se de vasos sanguíneos presentes no parênquima saudável para se disseminar e infiltrar, exacerbando ainda mais a característica invasiva do GBM, sendo que as CTS são o

principal fator de malignidade e progressão da doença (ROSÍŃSKA e GAVARD, 2021).

1.8. MicroRNAs (miRs)

Os miRs são pequenas moléculas de RNAs não codificantes com cerca de 18 a 25 nucleotídeos (RAMZAN; VICKERS; MITHEN, 2021; KUMAR et al., 2021). Mais da metade de todos os miRs identificados são processados a partir de íntrons e poucos a partir de éxons (O'BRIEN et al., 2018). Resumidamente, a biogênese dos miRs inicia-se no núcleo a partir da transcrição de moléculas de miRs primários (pri-miRs) pela RNA polimerase II; estes pri-miRs formam estruturas secundárias de segmentos de RNAs com bases complementares que se pareiam, sendo que nas regiões de bases não complementares, observa-se a formação de *stem loop* ou alças. Em seguida, estas moléculas são clivadas pela RNase III (Drosha) em miRs precursores (pré-miRs), os quais são exportados para o citoplasma pelo complexo exportina 5 (XPO5), onde são removidas as estruturas de *stem loop* pela endonuclease RNase III (Dicer) gerando enfim uma molécula de miR ainda dupla fita (DENLI et al., 2004; HAN et al., 2004; OKADA et al., 2009; ALARCON et al., 2015). Esta molécula de RNA dúplice é incorporado ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), no qual as duas fitas de RNA são separadas, sendo que uma das fitas permanece associada ao complexo RISC, gerando assim o miR maduro, enquanto a outra será degradada (SUN e TSAO, 2008; SCHMITTGEN, 2008). Após este processo os miRs junto ao complexo RISC são capazes de interagirem com a 3'UTR dos RNAs mensageiros (RNAm) alvos através de uma região conhecida como *seed sequence* constituída por 7-8 nucleotídeos complementares ao RNAm alvo, inibindo assim a tradução do mesmo (Ha & Kim, 2014). O RNAm alvo inibido pelo miR se acumula em compartimentos, conhecidos como corpos de processamento, estes compartimentos são ricos em enzimas capazes de induzir a degradação do RNAm; entretanto, nem todos os transcritos sofrem degradação pois alguns RNAm são apenas estocados temporariamente nestes compartimentos (LIU, 2008; HILL e TRAN, 2021). Das diferentes formas que os miRs podem controlar a tradução, este é o principal mecanismo desempenhado pelos miRs (LIU, 2008; HILL e TRAN, 2021).

Em nível pós transcricional os miRs são importantes reguladores da expressão gênica, responsáveis por ajustar a diferenciação, proliferação e sobrevivência celulares em condições fisiológicas e patológicas (SALIMINEJAD et al., 2019). Estima-se que os miRs regulam cerca de um terço dos genes codificadores de proteína, levando a redução da tradução de proteína (SALIMINEJAD et al., 2019). Uma família de miRs pode ter como alvo mais de 400 RNAm e 60% de todos os RNAm são regulados por miRs (PLOTKIN e WALLACE, 2021).

Nas últimas décadas diversos estudos demonstraram que os miRs se encontram desregulados em cânceres humanos, contribuindo para o surgimento e evolução da doença. Um estudo avaliou o perfil de 217 miRs em amostras humanas de tecido tumoral de diferentes tipos de cânceres em comparação com amostras de tecido normal, e observaram que o nível de expressão dos miRs estavam suprimidos nas células tumorais quando comparadas a células normais (CALIN et al., 2002; LU et al., 2005).

Desta forma, foi observado que o miR-491 é comumente co-deletado com *CDKN2A* em pacientes com GBM. Funcionalmente, a superexpressão do miR-491 em camundongos xenoenxertados, inibiu proliferação das células tumorais de glioma e prejudicou a propagação das CTS, prolongando a sobrevivência dos animais. Além disso, foi descrito que miR 491-3p inibiu a invasão celular através da modulação dos genes *IGFBP2* e *CDK6*, e o miR 491-5p por meio da modulação dos genes *EGFR*, *CDK6* e *Bcl-xL*, sendo assim, considerado um miR supressor tumoral ao utilizar ambas as formas maduras (miR 491-3p e miR 491-5p), podendo controlar de forma coordenada a proliferação, invasão, e propagação de células CTS (LI et al., 2015).

1.9. Variantes gênicas de base única (SNVs) em genes-alvo de miRs

Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), atualmente nomeados de SNVs (VIHINEN, 2015), é a variação de uma única base nitrogenada na sequência de DNA, cuja frequência na população é obrigatoriamente de pelo menos 1% (BROOKES, 1999). Essas variações pontuais podem ser encontradas em regiões codificadoras de DNA (éxons), em regiões não codificadoras (íntrons e regiões UTRs) ou em regiões codificadoras de miRs (NORTHCOTT et al., 2009). Desta forma, quando as SNVs se localizam em éxons podem alterar a expressão gênica ou causar a tradução de uma proteína ineficaz. Quando se localizam em miRs, podem alterar a expressão dos mesmos ou da modulação ao seu gene-alvo (NORTHCOTT et al., 2009).

Não há estudos de SNVs localizadas na região 3'-UTR de miRs em tumores cerebrais; entretanto, estudos em outros tumores demonstraram alteração funcional relacionada ao genótipo. Assim, o genótipo variante (GG) da SNV rs1071738 (C>G) em pacientes portadores de câncer de mama metastático, localizada na região 3'UTR do gene *PALLD* foi responsável por impedir a regulação deste gene, o qual é responsável por codificar uma proteína do citoesqueleto de actina e alvo-predito de miR-96 e miR-182. Para melhor compreensão do efeito desta SNV no câncer de mama, o plasmídeo psiCHECK-2 contendo o alelo variante (G) foi transfectado em linhagens de células de mama, sendo observado um aumento na migração

e invasão das células tumorais *in vitro* (GILAM et al., 2016).

Um outro estudo associou o risco ao câncer gástrico em pacientes portadores do genótipo variante (TT) da SNV rs3202538 (G>T) localizada na região 3'UTR do oncogene *ERBB3*, responsável por codificar um membro da família de receptores do fator de crescimento epidérmico (Egfr) de tirosina quinase e alvo-predito de miR-204 e miR-211. Os pacientes portadores do genótipo variante (TT) apresentaram uma superexpressão do gene *ERBB3* pela diminuição da afinidade de ligação do mesmo com miR-204 e miR211 e maior risco para o desenvolvimento de câncer gástrico. Também, foi observado que os pacientes portadores do genótipo (TT) apresentaram massa tumoral maior e com células pouco diferenciadas e menor sobrevida comparado com aqueles pacientes portadores dos genótipos (GG) ou (GT) (SHI et al., 2017).

Um estudo recente em mulheres sauditas com câncer de mama demonstrou que o genótipo selvagem (TT) da SNV rs2229714 (T>G) localizada na 3'UTR do gene *RSK1*, responsável por mediar mecanismos de crescimento celular, proliferação e apoptose, foi associado com suscetibilidade à câncer de mama três vezes mais quando comparado às pacientes portadoras dos genótipos heterozigoto (TG) e variante (GG) (SHAREEFI et al., 2020).

Ainda, um estudo na população chinesa associou o risco ao GBM em pacientes portadores do genótipo (GG) da SNV rs11558961 (C>G), localizada na 3'UTR do gene *GFAP*, responsável por codificar uma das principais proteínas de filamento intermediário de astrócitos maduros e alvo do miR-139. O estudo evidenciou por meio do ensaio da luciferase que o alelo variante (G) inibiu a atividade da luciferase em quase 31% em comparação ao alelo selvagem (C) que reduziu a atividade em aproximadamente 8%, sugerindo desta forma que o alelo variante (G) afetou a ligação de miR-139 a 3'UTR do gene *GFAP*. Ainda os pacientes portadores do alelo variante (G) apresentaram uma regulação negativa da expressão de *GFAP* e redução na suscetibilidade ao GBM, comparado aos pacientes portadores do alelo selvagem (C). O estudo também evidenciou através de cultura primária de pacientes portadores dos genótipos (CC), (CG) e (GG) que as células contendo o genótipo (GG) apresentaram uma taxa apoptótica maior, quando exposta ao quimioterápico Imatinib, que as células com os genótipos (CG) ou (CC). O estudo sugeriu o genótipo variante (GG) como fator de proteção genético (WANG et al 2018).

1.10. Seleção das SNVs em genes-alvo de miRs no estudo

Recentemente, nosso grupo identificou SNVs localizadas na região 3'UTR de genes-alvo de miRs, associadas à risco para desenvolver o GBM (SANTOS, 2019), por meio da genotipagem em larga escala com microarranjos de DNA. No presente estudo, o objetivo foi caracterizar os papéis dos genótipos para as duas SNVs mais relevantes selecionadas pela genotipagem em larga escala. Assim, as SNVs selecionadas foram g.51026856T>C (rs76276169) e g.26900708 G>A (rs2229714), ambas localizadas na região 3'UTR dos genes *PARG* e *RPS6K1* (seed sequence), alvos de miR-491-3p e miR-663b, respectivamente (Figura 2).

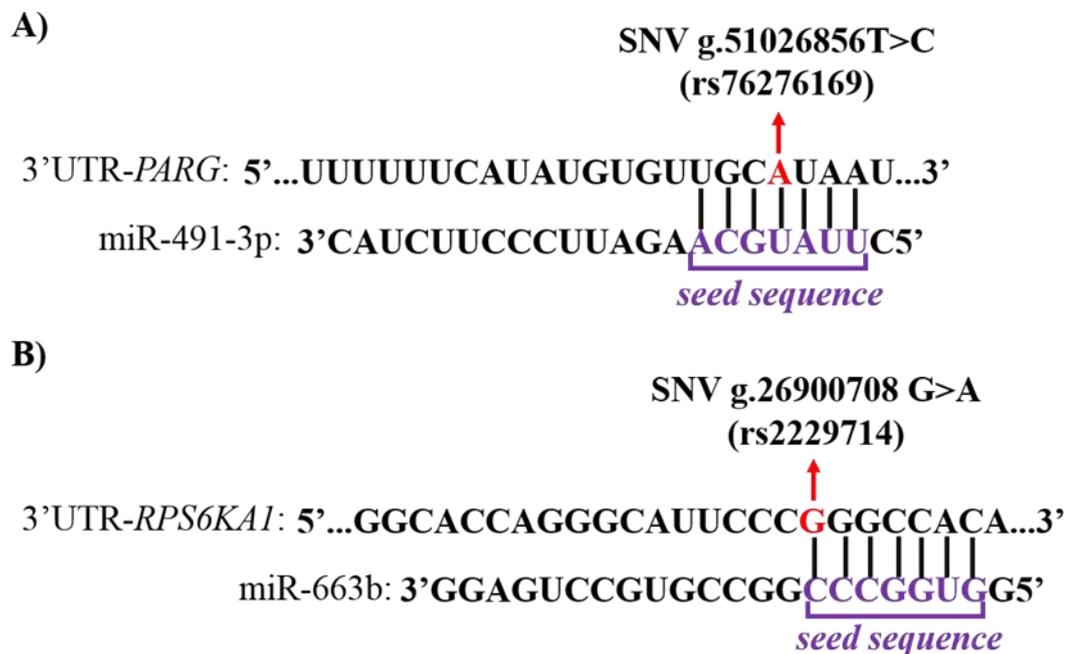


Figura 2. Representação esquemática da localização das variantes gênicas de base única (SNVs). As SNVs g.51026856 T>C (rs76276169) e g.26900708 G>A (rs2229714), nas posições 530 e 16 das regiões 3'UTR dos genes *PARG* e *RPS6K1* referentes à sequência de ligação (*seed sequence*) do hsa-miR-491-3p e miR-663b. Sequências retiradas de targetscan.org e adaptadas pelo autor.

As SNVs rs76276169 e rs2229714 selecionadas foram associadas de forma significativa ao risco para o GBM [OR: 4,86 (IC95%: 2,19-10,75); *P*-valor= 9,07x10⁻⁰⁵] e [OR: 9,43(IC95%: 2,86-31,08); *P*-valor=0,0002], respectivamente, após as análises da genotipagem em larga escala com microarranjos de DNA. No presente estudo, as referidas SNVs foram caracterizadas em um estudo caso-controle.

1.11. Associação do gene *PARG* com o GBM

A proteína poli (ADP-ribose) glicosilase é codificada pelo gene (*PARG*) com múltiplas isoformas localizadas em diferentes compartimentos celulares. A isoforma maior de 111kDa localiza-se no núcleo e as isoformas de 102kDa e 99kDa encontram-se no citoplasma celular. As isoformas menores de 60kDa e 55kDa localizam-se nas mitocôndrias (WHATCOTT et al., 2009). O gene *PARG* está envolvido em diversos processos celulares, como modificação de histonas (AUBIN et al., 1982), diferenciação (FARZANEH et al., 1982; PEKALA e MOSS, 1983), morte celular (SIMS et al., 1983), regulação transcricional (SLATTERY et al., 1983) e reparo de erros no DNA/estabilidade do genoma (HARRISION et al., 2020). Na verdade, recentemente foi bem estabelecido na literatura que a proteína Parg é essencial no processo de reparo a danos no DNA (SLADE et al., 2020; NICOLAI et al., 2021; LI et al., 2022). Mortusewicz e colaboradores (2011) evidenciaram que todas as isoformas de *PARG*, exceto as menores, podem ser recrutadas para os locais de erros no DNA.

O polímero poli (ADP-ribose) (PAR) é sintetizado nos locais de danos ao DNA pela família de enzimas poli (ADP-ribose) polimerase (*PARP*) utilizando o dinucleótido de nicotinamida e adenina (NAD⁺). Entre as *PARPs* a principal isoforma produtora de PAR é *PARP1*, cuja proteína traduzida é responsável por desencadear o relaxamento local da cromatina e recrutar fatores de reparos com afinidade por PAR, como *XRCC1* (LAN et al., 2004). A proteína Parg, por sua vez, age como uma enzima catalisadora, responsável por hidrolisar PAR levando-o à degradação após o recrutamento dos fatores de reparo. A ausência ou inibição de Parg resultou em um aumento do nível de PARilação (ligação dos fatores de reparo ao polímero PAR) impedindo a conclusão do processo de reparo, além de inibir Parp1 reconhecer novos danos na molécula de DNA (SLADE et al., 2020) (Figura 3).

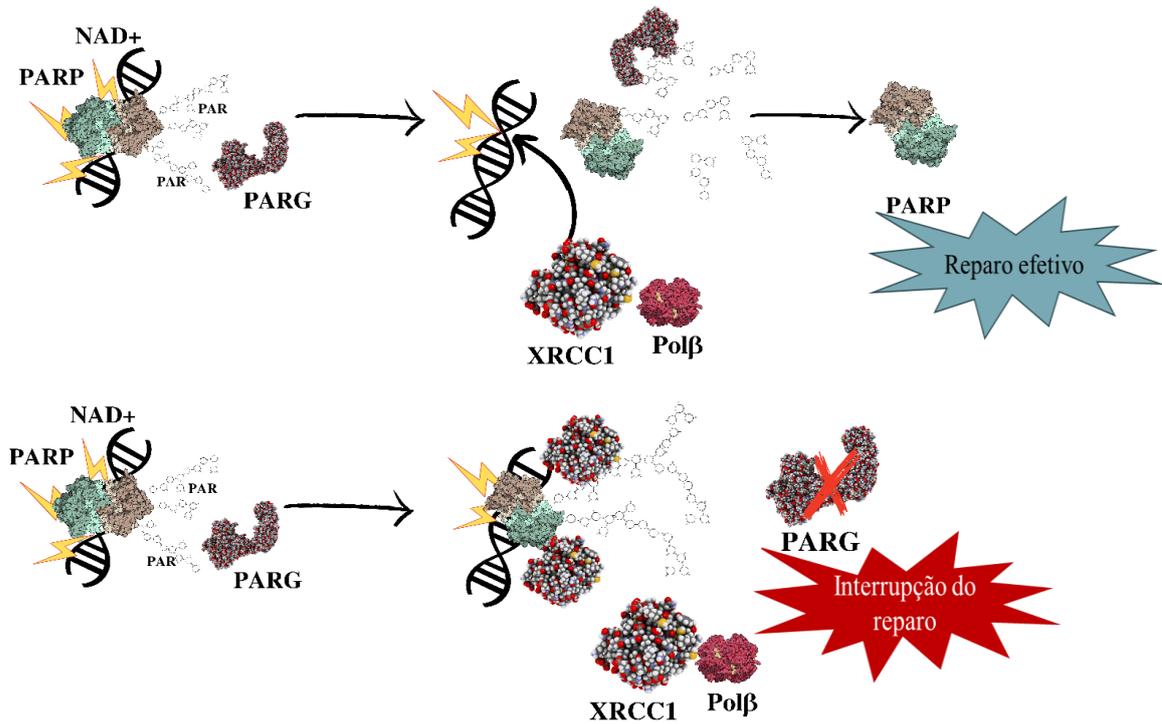


Figura 3 Representação esquemática da atividade Parg no reparo de danos ao DNA. Parg se liga ao local de dano no DNA e promove o relaxamento da cromatina e na presença do dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NAD⁺) sintetiza polímero poli (ADP-ribose) (PAR). Em seguida Parg é recrutada e age como uma enzima catalisadora, clivando PAR e permitindo assim o recrutamento de outras proteínas de reparo como Xrcc1 DNA polimerase β (Polβ). A inativação ou inibição de Parg resulta no acúmulo exacerbado de PAR resultou em um aumento do nível de PARilação, impedindo a conclusão do processo de reparo. Figura do próprio autor (www.canva.com) com informações retiradas de TENTORI et al., 2005; GOGOLA et al., 2018; SLADE et al., 2020 e LI et al., 2022.

No GBM, o gene *PARG* participa da via de reparo por excisão de base (BER), a qual é responsável pelo reparo de quase todos os erros ao DNA causados pelo TMZ, pela metilação na posição N7 da guanina (70%) e metilação na posição adenina N3 (10%) (SOBOL, 2009; TANG et al 2011). O reparo induzido pela via BER inicia com a ação da proteína Mpg, a qual produz um sítio de reconhecimento para remoção das bases danificadas pela N-metil purina DNA glicosilase (AP) que será hidrolisado pela endonuclease AP1 (Ape1), resultando na incisão da fita de DNA danificada e na formação de um grupo 3'OH e 5'desoxi-ribose fosfato (5'dRP) no intervalo do reparo. A Parp1 juntamente com Parp2 reconhecem a incisão da fita e por meio da síntese de PAR facilitam o recrutamento de proteínas que serviram como suporte à Xrcc1 e DNA polimerase β (Polβ). A Pol β irá hidrolisar a porção 5'dRP e inserir um único nucleotídeo, dessa forma o complexo de DNA ligase IIIα e Xrcc1 realiza a ligação e conclui o processo de reparo (SVILAR et al.,2011).

Estudos evidenciaram que a inibição de *PARG* em linhagens de células humanas de melanoma maligno e gliomas foi responsável por causar uma sensibilização das células ao quimioterápico TMZ. As células com inibição de *PARG* apresentaram apoptose mais precocemente que as células com expressão normal de *PARG*, tornando o gene *PARG* um alvo terapêutico interessante (TENTORI et al., 2005; GOGOLA et al., 2018). Li e colaboradores (2022) evidenciaram em linhagens de células de GBM que a administração do precursor de NAD⁺ ribosídeo dihidro nicotinamida (NRH), aumentou o nível de NAD⁺ celular, e em combinação com um inibidor de *PARG* (iPARG) na presença de TMZ resultou em maior citotoxicidade para as células tumorais ao TMZ. A combinação NRH + iPARG resultou em um hiper acúmulo de PAR, alterando assim a dinâmica de funcionamento da via de reparo BER e causando sensibilidade das células de GBM ao TMZ. Além disso, o estudo evidenciou que o crescimento das células tumorais foi fortemente suprimido, mesmo nas células que apresentaram a proteína de reparo Mgmt ativa.

É importante ressaltar que a ação de Parg está intimamente ligada à atividade de Parp(s) e, portanto, sua ação não impacta apenas na funcionalidade de vias de reparo. Um estudo recente em linhagens celulares de câncer de próstata evidenciou que a regulação positiva de *PARG* foi capaz de inibir o potencial de malignidade das células tumorais e inibir a expressão de oncogenes no câncer de próstata. O estudo defendeu que a produção de ramificações longas do polímero PAR por Parp1 é altamente carregada negativamente, o que promove seu desprendimento e torna o DNA mais acessível a fatores regulatórios, principalmente de genes dependentes da sinalização de PAR (KARPOVA et al., 2022). Ainda, o estudo demonstrou que a superexpressão de *PARG* foi capaz de inibir a expressão de genes envolvidos com as vias oncogênicas NF-κB, IL6/STAT3, KRAS e MYC inibindo assim a progressão do câncer de próstata (KARPOVA et al., 2022).

1.12. Associação do gene *RSK1* com o GBM

O gene *RPS6K1* também conhecido como *RSK1* traduz um dos membros (Rsk1) da família de proteínas com dois domínios de quinase (Rsk1, Rsk2, Rsk3 e Rsk4) (FRODIN e GAMMELTOFT, 1999; ANJUM e BLENIS, 2008). As proteínas Rsk são responsáveis por mediar mecanismos de crescimento celular, proliferação e apoptose além de estarem envolvidas em diversas vias de progressão tumoral. Lara et al (2011) evidenciaram que Rsk1, diferente das demais isoformas, possui a capacidade de promover a diferenciação, migração, metástase e sobrevivência das células tumorais em células cancerígenas de pulmão.

No GBM, Rsk1 está envolvida em vias de sinalização importantes para a progressão do GBM como MAPK, ERK, CREB e NF- κ B (KHEIRALLAH et al.,2013; GHODA et al 1997; BOHUSLV et al., 2004; XU et al., 2006.), induzindo a proliferação celular, diferenciação e sobrevivência das células tumorais (KHEIRALLAH et al.,2013). Estudos evidenciaram que a fosforilação de Creb e a proteína pró-apoptótica Bad pela Rsk1 é um importante mecanismo de indução a proliferação e anti-apoptótico das células tumorais de GBM (SHI et al., 2012; CHENG et al., 2016). Ainda, estudos demonstraram que Rsk1 também pode fosforilar as proteínas inibitórias de NF- κ B (I κ B α , I κ B β) e o heterodímero p65 levando a ativação da via NF- κ B e resultando em sobrevivência, adesão e invasão das células tumorais de gliomas GBM (GHODA et al 1997; BOHUSLV et al., 2004; XU et al., 2006).

A via de sinalização NF- κ B consiste em uma família de cinco fatores de transcrição conservados evolutivamente: p65 (RelA), RelB, c-Rel, NF- κ B1 (p105/p50) e o NF- κ B2 (p100/p52). Essas proteínas formam vários homodímeros e heterodímeros e são mantidas inativas por associação citoplasmática com proteínas inibitórias, tais como I κ B α , I κ B β e I κ B ϵ (JOST & RULAND, 2007). O fator NF- κ B exerce um importante papel na regulação da expressão de vários genes envolvidos no crescimento, diferenciação, desenvolvimento, apoptose e inflamação. No GBM esta via se encontra continuamente ativa, regulando o aumento da expressão de genes anti-apoptóticos, tais como *BCL2-XL*, *BAX*, *ING1* e *TIMP*, além de fatores de sobrevivência, adesão e invasão celulares (BRASSESCO, 2013).

A forma mais comum de ativação da via NF- κ B é pela via canônica ou também conhecida como clássica, normalmente ativada por citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias as quais irão induzir a ativação do complexo I κ B quinase e fosforilar I κ B α , causando ubiquitinação e degradação de I κ B α e liberando o heterodímero p50 e p65, os quais migram para o núcleo e ligam-se na região promotora de genes-alvo ativando a transcrição dos mesmos (JOST e RULAND, 2007; SMITH et al., 2008; GUPTA et al., 2010; ZHENG et al.,2011). Bohuslav et al. (2004) descreveram um mecanismo de ativação de NF- κ B por intermédio de p53 utilizando fibroblastos embrionários de murinos. Assim, o gene *P53* foi responsável por estimular a ativação de *RSK1* levando a fosforilação da serina 536 de p65 no núcleo, resultando na diminuição da afinidade entre I κ B α e p65 e liberando o heterodímero p50 e p65 que se ligara na região promotora de genes alvo. Além disso, outros estudos evidenciaram que Rsk1 pode fosforilar o terminal N de I κ B α da serina 32 e I κ B β das serinas 19 e 23, induzindo-os à degradação e migração do fator NF- κ B para o núcleo (Figura 4) (GHODA et al 1997;

BOHUSLV et al., 2004; XU et al., 2006).

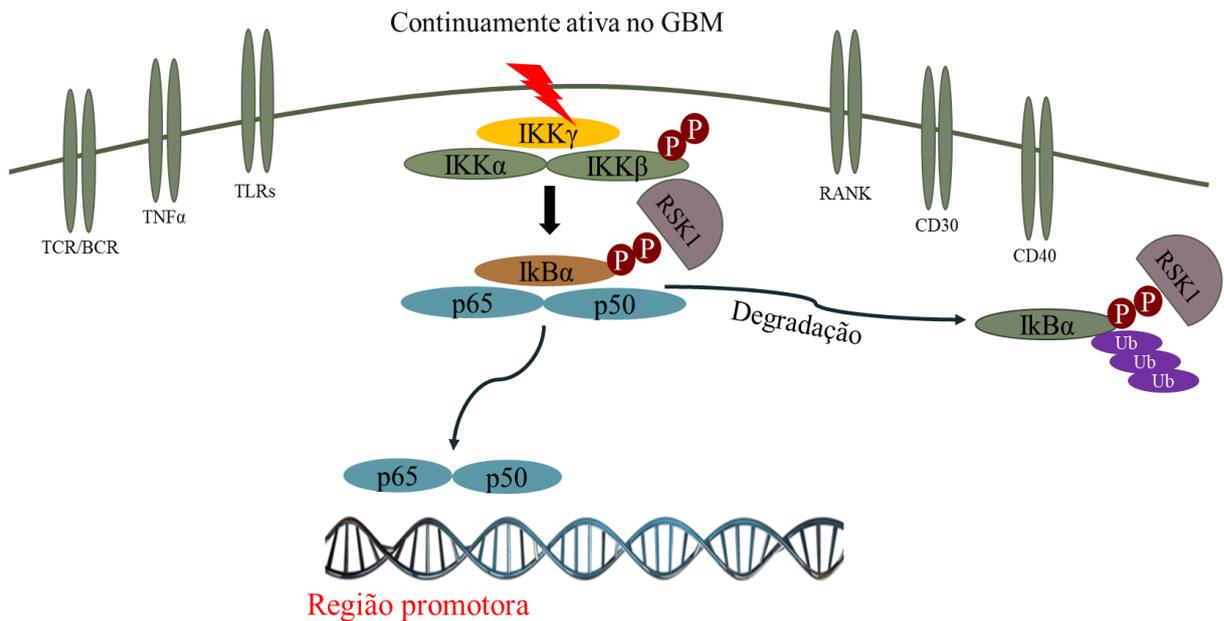


Figura 4 Representação esquemática da atividade *RSK1* na via de sinalização NF- κ B. NF- κ B é ativada por meio de citocinas pró-inflamatórias resultando na fosforilação e ubiquitinação de I κ B α liberando assim o dímero p65 e p50 que irão migrar para o núcleo e se ligar na região promotora de genes envolvidos na migração, sobrevivência celular e resistência a apoptose das células tumorais. *RSK1* por sua vez, atua na fosforilação de I κ B α induzindo assim a degradação de I κ B α gerando maior atividade da via NF- κ B e progressão da doença. Figura do próprio autor (www.canva.com) com informações retiradas de BOHUSLV et al., 2004 e XU et al., 2006.

1.13. *Sophora japonica* (SJ)

A SJ é popularmente conhecida como acácia-do-Japão, uma planta nativa da China e muito popular na Europa e Japão, constituída por mais de 153 compostos químicos (Apêndice 1), os quais podem ser isolados de suas folhas, ramos, botões, flores e pericarpos. Os principais compostos isolados da planta foram flavonas, tetraglicosídeos, isoflavonas, tetraglicosídeos de isoflavonas, glicosídeos triterpênicos, fosfolipídeos, alcalóides, aminoácidos e polissacarídeos (DENESI et al., 2014; HE et al., 2016; KUMAR et al., 2016). Os compostos isolados ou o extrato bruto da planta exibem propriedades farmacológicas importantes como atividade antiviral e antibacteriana, efeitos cardiovasculares, ação antiinflamatória e antioxidante, efeitos antiosteoporóticos, hemostático e antiateroscleróticos e mais recentemente, ação antitumoral (YU et al., 2012; CHAN et al., 2010; SANTOS et al., 2021). Entre os compostos isolados, a quercetina, a rutina, a isorhamnetina, a genisteína, o soforicosídeo e o KPF são os principais compostos biologicamente ativos (LIN et al., 2011; YU

et al., 2012; CHAN et al., 2010; SANTOS et al., 2021). O KPF, um flavonoide encontrado em diversas outras plantas como a *Ginkgo biloba*, a *Tilia* spp, a *Equisetum* spp, e a *Moringa oleifera* (CALDERÓN-MONTAÑO et al., 2011) e em brócolis, repolho, couve, feijão, escarola, alho-poró, tomate, morangos e uvas, é conhecido por sua ação antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral (LUO et al., 2008).

O KPF foi responsável pela indução de apoptose das células da linhagem de câncer de ovário (OVCAR-3) (RAMOS, 2007) e apresentou-se menos tóxico para as células normais em comparação com os medicamentos quimioterápicos padrões (ZHANG et al., 2008).

Outro estudo avaliou a ação do KPF na inibição da carcinogênese induzida por luz ultravioleta na pele de camundongos, sendo que o KPF apresentou um efeito quimioprotetor pela inibição dos genes *RSK2* e *MSK1*, envolvidos na progressão tumoral e supressão da atividade da via de sinalização NF-kB (GHODA et al 1997; BOHUSLV et al., 2004).

No GBM um estudo realizado nas linhagens celulares U87MG, T98G e LN229 evidenciou que o KPF aumentou o acúmulo intracelular de doxorubicina reduzindo o efluxo da droga e resultando na exacerbação dos danos induzidos pela doxorubicina através da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), o que potencializou o efeito tóxico da doxorubicina (SHARMA et al., 2007).

Além disso, outros compostos presentes no extrato de SJ também foram relatados como moduladores da via NF-kB, como a quercetina, isorhamnetina e daidzeína dentre os principais deles (LIU et al., 2016; YANG et al., 2013; CHEKALINA et al., 2018).

Assim como o KPF, a quercetina tem sido amplamente estudada quanto a sua ação em diferentes condições patológicas. Chen e colaboradores (2020) demonstraram em um estudo *in-vitro* com células endoteliais da veia umbilical humana, que a quercetina foi capaz de inibir a inflamação bloqueando a via de sinalização NF-kB, mesmo quando estimulada pela citocina pró-inflamatória TNF α . Um outro estudo clínico com pacientes portadores de doença arterial coronariana evidenciou que os pacientes que fizeram a ingestão de 120mg/dia de quercetina apresentaram níveis reduzidos no soro das citocinas, TNF- α , interleucina (IL)-1 β (IL-1 β) e IL-10 e redução dos níveis de mRNA de I κ B α , indicando diminuição da atividade transcricional de NF-kB (CHEKALINA et al., 2018).

Du e colaboradores (2020) evidenciaram em linhagem de carcinoma pulmonar de células não pequenas (A549), que a isorhamnetina aumentou significativamente a incidência de apoptose induzida por radiação através da supressão de NF-kB e indução do aumento dos níveis

da IL13 anti-inflamatória com consequente aumento da radiosensibilidade. GUO e colaboradores (2020) também demonstraram que a daidzeína também reduziu os níveis de IL6 e IL8 pró-inflamatórias e a ativação de p53-NF- κ B na linhagem celular A549.

No presente estudo, o extrato vegetal de SJ comercial, abundante em KPF glicosilado, foi submetido a um processo de hidrólise enzimática com as enzimas hesperidinaase e β -galactosidase tornando-se abundante em aglicona (extrato SJ-b). Ambos os extratos SJ e SJ-b foram avaliados em linhagens celulares de gliomas de alto grau e em células não-tumorais de fibroblasto dérmico. Em nosso conhecimento, não há estudos demonstrando a ação do extrato SJ em linhagens celulares de GBM ou estudos comparativos entre os extratos SJ e SJ-b.

1.14. Justificativa

Conforme exposto, o GBM é uma doença molecularmente heterogênea e apesar das diversas alterações genéticas conhecidas como associadas à doença, há poucos estudos correlacionando SNVs em genes-alvo de miRs como fatores de risco. Além disso, a via de sinalização NF- κ B está constantemente ativa na doença, acarretando a transcrição de vários genes responsáveis pela estimulação da invasão celular, resistência à radioterapia, manutenção das CTS e sobrevivência das células tumorais no GBM. Desta forma, a identificação de marcadores moleculares e terapias alvo à mecanismos moleculares envolvidos com a progressão da doença como NF- κ B, podem contribuir para um melhor prognóstico dos pacientes com GBM.

2. OBJETIVOS

Caracterizar as SNVs rs76276169 e rs2229714 localizadas em região 3'UTR dos genes *PARG* e *RSK1*, envolvidos na modulação da via de sinalização NF-kB em pacientes com GBM. Avaliar o efeito antitumoral dos extratos SJ e SJ-b em linhagens celulares de gliomas de alto grau.

2.1. Objetivos Gerais

- ✓ Identificar os diferentes genótipos das SNVs rs76276169 e rs2229714 nos genes *PARG* e *RSK1*, respectivamente, por meio da RT-PCR;
- ✓ Avaliar se os diferentes genótipos das SNVs rs76276169 e rs2229714 influenciam o risco de ocorrência do GBM, bem como nos aspectos clínicos (idade, sexo, cor da pele Karnofsky e localização primária,) e sobrevida global dos pacientes.
- ✓ Analisar os efeitos citotóxicos, antiproliferativos, anti-migratório e apoptótico nas linhagens celulares NG-97 e U251, expostas à ação dos extratos vegetais de SJ e SJ-b pelos ensaios de MTT, proliferação, migração celular (*wound-healing* - WH), citometria de fluxo e qPCR;
- ✓ Avaliar o efeito sinérgico dos extratos em comparação a diferentes concentrações de TMZ em combinação com extrato de SJ ou SJ-b.
- ✓ Elucidar a capacidade de inibição dos extratos vegetais da SJ e SJ-b nas CTS por meio do ensaio de formação de esferas.
- ✓ Analisar a capacidade de modulação dos extratos vegetais da SJ e SJ-b aos genes (*IRAK2*, *TRAF6*, *IL-1 β* e *TNF α* .), envolvidos na ativação da via de sinalização NF-kB por meio da qPCR, se os extratos são capazes de inibir a via NF-kB por meio do ensaio da luciferase.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1.Aspectos éticos

O projeto foi avaliado pelo comitê de ética (CEP) em pesquisa da Universidade São Francisco, tendo sido aprovado (CAEE# 29122720.7.0000.5514) (Anexo 4). Vale comentar que 61 amostras de DNA, extraídas a partir de tecido tumoral incluídos em blocos de parafina de pacientes com GBM, 20 amostras de DNA, extraídas a partir de tecido tumoral fresco de pacientes com GBM e 182 amostras de DNA, extraídas a partir de sangue periférico de indivíduos saudáveis, foram utilizadas em estudos anteriores (CAEE# 491500.15.7.0000.5514 e CAEE# 45723615.0.0000.5514) (Anexos 5 e 6) e foram também utilizadas no presente estudo, com aprovação do CEP.

3.2.Amostras de tecido tumoral e sangue periférico

Um total de 65 amostras de DNA extraídas a partir de tecido tumoral foram incluídas em bloco de parafina obtidas de pacientes com GBM, atendidos no ambulatório de Oncologia Clínica do Hospital das Clínicas da UNICAMP, foram incluídas no presente estudo do período de outubro de 2002 a dezembro de 2017. Os fragmentos de tumor foram obtidos após ressecção cirúrgica para o tratamento desses pacientes e incluídos em blocos de parafina para o diagnóstico anatomopatológico. Os blocos contendo fragmentos de tumor inseridos em parafina estão sob responsabilidade do Prof. Dr. Luciano de Souza Queiroz, do Departamento de Anatomia Patológica da FCM-UNICAMP.

Ainda, um total de 36 amostras de DNA extraídas a partir de tecidos tumorais frescos foram obtidos de pacientes com GBM, atendidos no Hospital da Universidade São Franciscana Providência de Deus (HUSF), Bragança Paulista, SP, pelo Prof. Dr. Carlos Tadeu Parisi de Oliveira, foram inseridas no estudo, após assinaturas dos TCLEs (Anexo 7). Foram coletados pequenos fragmentos de tumor obtidos após ressecção cirúrgica, realizada para diagnóstico e tratamento da doença. O fragmento separado foi armazenado em RNAlater (Ambiom, Vilnius, Lituânia) a -80°C até o momento da extração.

Finalmente, foram também inseridos no presente estudo um total de 254 amostras de DNA coletadas a partir de leucócitos de sangue periférico de doadores recrutados no Hemonúcleo Regional de Bragança Paulista, SP, após assinatura do TCLE (Anexo 8).

Um segundo grupo controle de 1.171 indivíduos idosos de uma amostra censitária da cidade de São Paulo, com dados genômicos depositados no banco de dados ABraOM (Arquivo Online das Mutações Brasileiras), foi utilizado para este estudo, sendo esta uma amostra

representativa da população brasileira. O banco de dados genômico ABraOM armazena informações de 77.236.632 variantes disponíveis para análises (NASLAVSKY et al., 2017).

3.3. Seleção das SNVs para o estudo

Em um estudo anterior, foram identificados 5.336 SNVs localizadas na região 3'UTR de genes-alvo de miRs, associadas à suscetibilidade ao GBM (SANTOS, 2019) por meio da genotipagem em larga escala com microarranjos de DNA (*Axiom® miRNA Target Site Genotyping Array, Affymetrix*), utilizando-se 33 amostras de DNA a partir de tecido tumoral de pacientes com GBM e 61 amostras de DNAs a partir de pequenos fragmentos de tecidos de região cortical não eloquente de indivíduos controles. Assim, após serem processadas no equipamento, as amostras passaram por testes de qualidade utilizando o *software Axiom Analysis Suite*, e aquelas que apresentaram taxa de confiabilidade da genotipagem inferior a 0,82 e taxa de heterozigizidade maior que 40% ou classificação de sexo diferente da real de cada indivíduo, foram excluídas das subseqüentes avaliações. Considerando os parâmetros de qualidades acima, foram identificadas 24.752 SNVs prováveis de estarem associadas ao risco para o GBM. Em seguida, as amostras foram submetidas à regressão logística multivariável considerando a idade e ancestralidade e 5.336 SNVs foram identificadas como associadas ao risco para o GBM. As SNVs g.51026856T>C (rs76276169) e g.26900708 G>A (rs2229714) localizadas na região 3'UTR dos genes *PARG* e *RSK1*, os quais foram identificados como genes-alvo de miR-491-3p e miR-663b, e selecionadas dentre as 10 SNVs com maior suscetibilidade ao GBM (Figura 2).

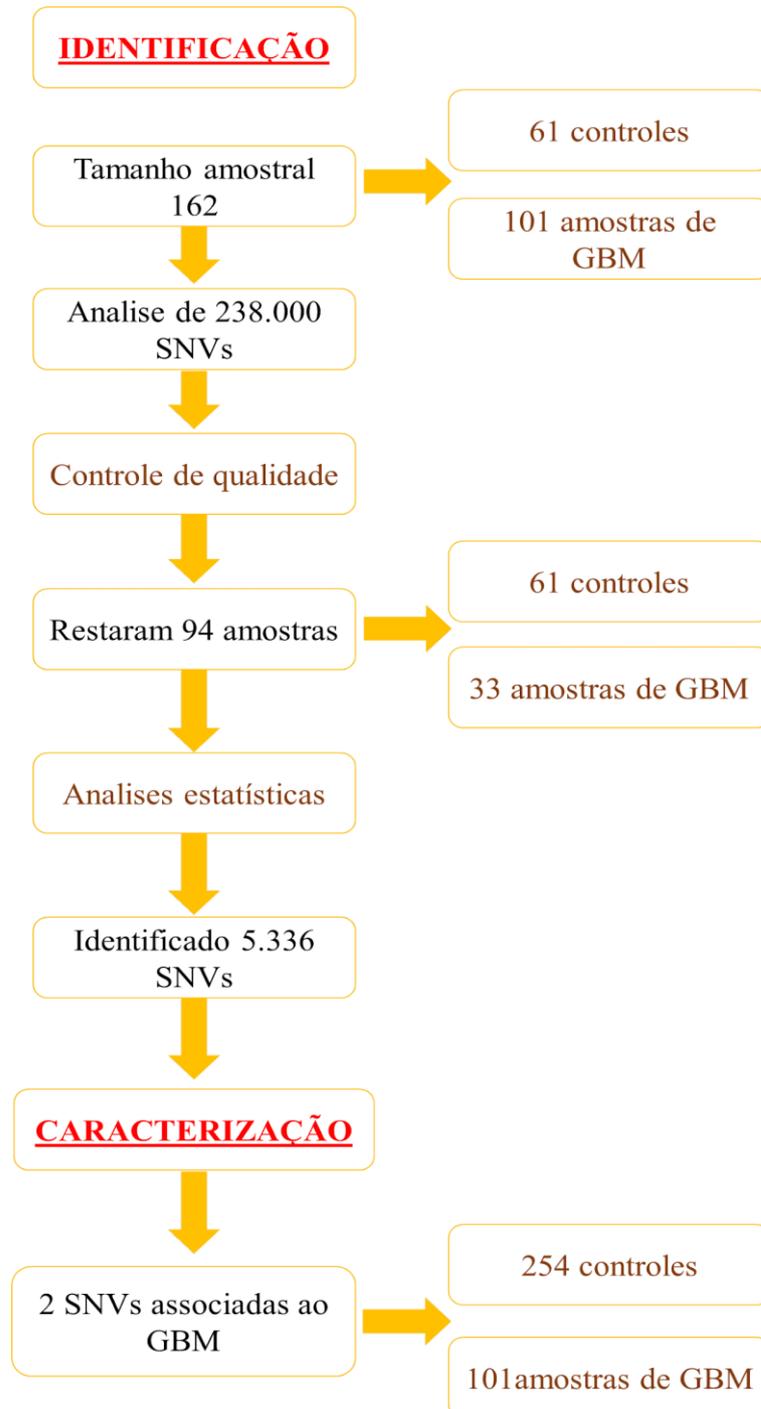


Figura 5: Representação esquemática do processo de identificação das SNVs rs76276169 e rs2229714, localizadas na região 3'UTR dos genes *PARG* e *RSKI*. Inicialmente 238.000 SNVs localizadas em miRs e genes-alvo de miRs foram avaliadas pelo *Axiom® miRNA Target Site* em 162 amostras de GBM e controles. Entretanto, após análises considerando os parâmetros de qualidades, apenas 94 das 162 amostras foram consideradas adequadas para prosseguirem no estudo. Posteriormente após as análises estatísticas multivariada ajustadas para idade e ancestralidade, 5.336 SNVs foram fortemente associadas ao risco para o GBM, sendo que as SNVs rs76216169 e rs2229714 estavam entre as com maior associação ao risco à doença. Figura elaborada pelo autor.

3.4.Determinação dos diferentes genótipos das SNVs rs76276169 e rs2229714

3.4.1. Extração das amostras de DNA a partir de fragmentos de tumor inseridos em bloco de parafina

A extração do DNA a partir de tecidos tumorais preservados em parafina foi baseada em Bees et al. (2006) e no protocolo disponível no endereço eletrônico www.agilent.com/chem/dnaapplications, utilizando o conjunto de reagentes *Qiagen DNeasy Blood & Tissue* (Qiagen, Hilden, Mettmann, Alemanha), com modificações.

Para a remoção da parafina, foram utilizados 800 µL de uma solução tampão fosfato-salino (PBS) 1X e 40 µL Tween 20 10%. As amostras foram aquecidas a 90°C com agitação de 450 rotações por minuto (rpm) por 10 minutos. Após, foi realizada uma centrifugação de 10.000 x g por 15 minutos. As amostras foram mantidas em gelo e a remoção da parafina sobrenadante foi realizada com o auxílio de uma ponteira p1000. Em seguida o tecido livre de parafina foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL e foi adicionado 1 mL de etanol 100% gelado. Após centrifugação a 10.000 x g por 5 minutos, o etanol foi cuidadosamente removido, adicionado 400 µL de tiocianato de sódio (NaSCN a 1 M), seguida de homogeneização em agitador tipo vórtex e incubação a 450 rpm por 17 h a 37°C. Após, os tubos foram centrifugados a 10.000 x g por 20 minutos. Em seguida, foi descartado o sobrenadante cuidadosamente e adicionados 400 µL de PBS 1x.

Para o processo de digestão do tecido foram adicionados 40 µL de proteinase K em 360 µL de tampão ALT (Qiagen) e uma nova incubação em agitação de 900 rpm por 17 h a 55°C foi realizada. Após, os tubos foram centrifugados a 6.000 x g por 1 minuto e 20 µL de RNase a 20 mg/mL (Ambion, Vilnius, Lituânia) foram adicionados, seguida de agitação em vortex e incubado à temperatura ambiente por 2 minutos.

Para a purificação das amostras, 400 µL do tampão AL (Qiagen) foram adicionados seguida de incubação a 70°C por 10 minutos. Em seguida foi adicionado 440 µL de etanol 100%. Cada amostra foi transferida para uma coluna *DNase MiniSpin* (Qiagen) e inseridas em um tubo coletor *Collection Tube* (Qiagen). As amostras foram centrifugadas a 6.000 x g por 2 minutos e o tubo coletor com o sobrenadante foi descartado. Logo após, 500 µl do tampão AW1 (Qiagen) foi adicionado em cada coluna e uma nova centrifugação foi realizada. Uma segunda purificação da coluna foi realizada adicionando 500 µL de etanol 80% e centrifugação a 20.000 x g por 3 minutos. As colunas foram inseridas em um novo tubo tipo eppendorf de 1,5 mL e adicionado 30-50 µL de água livre de nucleases (Sigma, São Paulo, SP, Brasil). Finalmente,

após incubação de 5 minutos a temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g por 5 minutos.

As amostras de DNA foram submetidas à análise da concentração e pureza por leitura de absorvância em 260 nm (UV - concentração do DNA em $\text{ng}/\mu\text{L} = \text{Abs} \times 100 \times 50 \mu\text{g}/\text{mL}$) e em 280 nm (quantificação de proteínas) no espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Estados Unidos). O DNA foi mantido em freezer -20°C .

3.4.2. Extração das amostras de DNA a partir de fragmentos de tumor cerebral fresco de pacientes com GBM

Para a obtenção das amostras de DNA dos tecidos neoplásicos frescos e tecidos cerebrais normais, o protocolo utilizado foi o mesmo descrito anteriormente para amostras incluídas em parafina com modificações no processo de digestão do tecido, o qual foram utilizados 180 μL do tampão ALT (Qiagen) e 20 μL de proteinase K 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Ambion) e incubação com agitação a 900 rpm por 2 horas ou até a lise completa do tecido a 55°C .

3.4.3. Identificação dos diferentes genótipos das SNVs selecionadas

Os diferentes genótipos (homozigoto ancestral, heterozigoto e homozigoto variante) das SNVs rs76276169 e rs2229714, foram obtidos por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real (RT-PCR) utilizando os ensaios para genotipagem *TaqMan* (Applied Biosystems, Estados Unidos). A RT-PCR foi realizada utilizando os aparelhos 7300 Real-Time PCR system (Applied Biosystems) ou 7500 *Fast Real Time PCR* (Applied Biosystems) com cerca de 400 ng de DNA, 0,5 μL de *SNP Genotyping Assay Mix* 1x (contendo dois pares de sondas e dois fluorocromos detectores - FAM[®] e VIC[®]), 5 μL de *TaqMan[®] Universal PCR Master Mix* 1x (contendo a Taq DNA polimerase, desoxirribonucleotídeos (dNTPs) e solução tampão com componentes otimizadores da reação) e água estéril para um volume final de 10 μL . As condições de amplificação consistiram na ativação inicial da *AmpliTaq Gold* a 95°C por 10 minutos, seguidos de 45 ciclos de incubação a 92°C por 15 segundos e a 60°C por 1 minuto. Controles negativos (água estéril) foram utilizados em todas as reações de genotipagem.

3.5. Caracterização química da SJ

Os extratos vegetais de SJ e SJ-b, ambos liofilizados, foram obtidos pela Profa. Dra. Patrícia de Oliveira Carvalho, Laboratório de Farmacologia Geral e Clínica, Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da USF.

3.5.1. Extrato de *Sophora japonica*

O pó das flores de *Sophora japonica* foi adquirido da *Lab Nutrition* (Hangzhou, província de Zhejiang, China), que antes da reação de bioconversão foi chamada de SJ. De acordo com o fornecedor, as flores frescas foram obtidas de árvores nativas (cidade de Zhaohe, Nanyang, província de Henan, China) e depois secas em estufa Binder (Neckarsulm, Baden-Württemberg, Alemanha) a 50°C por 6 horas. As amostras secas foram trituradas em pó com um pulverizador Wuyi Haina Electric Co., Ltda., (Jinhua, província de Zhejiang, China) e peneiradas através de uma tela de 100 *mesh*.

3.5.2. Reação de bioconversão

A reação de bioconversão foi realizada em tubos de vidro com tampa de rosca em agitação (130 rpm) a temperatura controlada (40°C) utilizando 10 ml de tampão acetato pH 5,0 e 0,35g de extrato de SJ. Para iniciar a reação de hidrólise, 1 ml de solução de mistura de enzimas preparada em tampão acetato 0,1 M pH 5,0 foi adicionada à mistura de reação. A mistura enzimática utilizada continha partes iguais de cada uma das enzimas (hesperidinase e β -galactosidase) até uma concentração final de 0,02 mg/mL (Franco et al, 2020). Alíquotas foram removidas em 4, 6 e 8 horas de reação. Após 8 horas de incubação as reações foram interrompidas por fervura por 20 min e as amostras brutas foram liofilizadas e armazenadas em geladeira.

3.5.3. Análise por espectrométrica de massa não direcionada por UHPLCQ-TOF-MSE

Os extratos secos, ou biomodificados foram reconstituídos com metanol:água 1:1 (v/v) até uma concentração final de 10 μ g/mL antes da análise por (LC-MS). Os extratos bruto e modificado nos tempos de 4, 6 e 8 horas de conversão foram analisados em triplicata. Os dados foram adquiridos usando um cromatógrafo líquido ACQUITY FTN acoplado a um espectrômetro de massa XEVO-G2XS QTOF (Waters, Milford, MA, EUA) usando o software MassLynx 4.1 (FRANCO et al., 2020). Resumidamente, foi utilizada uma coluna ACQUITY UPLC® BEH C18 (2,1 x 50 mm 1,7 μ m, Waters) e a fase móvel consistiu de água (A) e acetonitrila (B) com vazão de 0,40 ml/min-1 com gradiente linear (em % B): 0–8,0 min: 5%; 8,0–8,5: 95%; 8,5–8,6 min: 5%; (com mais 1,6 min para reequilíbrio da coluna), resultando em um método de análise de 10 min. Os volumes de injeção foram de 0,5 e 2,0 μ l para o modo positivo e negativo, respectivamente. O forno da coluna foi mantido a 45°C. Para a fonte de ionização por eletrospray, os parâmetros foram definidos da seguinte forma para o modo

positivo e negativo: tensão capilar de 2,5 kV, cone de amostragem de 40.000, temperatura da fonte de 150°C, temperatura de dissolução de 450°C, fluxo de gás do cone de 50 L.h⁻¹, e vazão de gás de dissolução de 600 L.h⁻¹. A faixa de varredura de aquisição foi de 100 a 1000 Da no centroide, e as análises usaram uma abordagem de aquisição independente de dados (MSE). Leucina encefalina (peso molecular = 555,62; 200 pg.µl⁻¹ em 1:1 ACN: solução H₂O) foi usada como massa de bloqueio para medições de massa precisas e uma solução de formato de sódio 0,5 mM foi usada para calibração do instrumento. As amostras foram analisadas aleatoriamente para observar a variação biológica e minimizar o viés instrumental. Para monitorar a estabilidade do sistema, amostras de controle de qualidade foram injetadas 15 vezes antes do início do lote e inseridas após quatro injeções (STEUER et al., 2019).

3.5.4. Quantificação de KPF aglicona

As soluções estoques padrão foram preparadas dissolvendo 1 mg de KPF em 1 ml de metanol. As curvas de calibração dos padrões KPF (1 - 20µm.mL⁻¹) foram plotadas com a área do pico (eixo Y) versus concentrações padrão (eixo X). As equações de regressão linear foram $y = 9545,1x + 163,7$ (R² = 0,9998).

3.5.5. Processamento de dados MS, anotação de metabólitos e estatísticas

Os dados brutos de LC-MS foram processados com o *software Progenesis QI* (Waters) para detecção de pico, alinhamento, integração, deconvolução, filtragem de dados e identificação putativa baseada em MSE de compostos. As seguintes bases de dados foram usadas para esta identificação: Biblioteca de Rede Molecular Social de Produtos Naturais Globais (GNPS), Biblioteca de Produtos Naturais Vanya/Fiehn, Base de Dados Espectrais RIKEN MSn para Fitoquímicos (ReSpec), Biblioteca de Plantas *Bruker Sumner MetaboBASE* (MetaboBASE), Anotação de Metaboloma Especializado em Plantas (RIKEN PlaSMA). Todas as bases de dados foram acessadas através do endereço eletrônico *MassBank of North America* (MoNA, 2020) com os seguintes parâmetros de busca: erro de massa precursor 15 ppm, tolerância de fragmento 50 ppm. Também foram realizadas fragmentações teóricas (PLUMB, et al. 2006). Padrão de fragmentação, precisão de massa e correspondência de similaridade de isótopos foram considerados para a identificação putativa das moléculas. A anotação de compostos foi classificada de acordo com a *Metabolômica Standards Initiative* (MSI) (SCHRIMPE-RUTLEDGE et al., 2016), onde os íons com algum nível de correspondência com o banco de dados MS/MS atingiram o nível 2, enquanto os compostos supostamente identificados pela massa exata atingiram o nível 3. As características também foram filtradas

com base em seu desvio padrão relativo (RSD) em amostras de CQ. Apenas características com menos de 25% de RSD em amostras de QC foram consideradas. Os dados filtrados foram transformados em raiz cúbica e normalizados usando a escala de Pareto antes de realizar as estatísticas. As análises estatísticas *Multivariate Empirical Bayes Approach – MEBA*, *Main Component Analysis (PCA)* e *Pattern Search* foram realizadas usando a plataforma MetaboAnalyst 4.0 (CHONG et al, 2019) para encontrar diferenças significativas ao lado da modificação enzimática.

3.6. Caracterização biológica dos extratos vegetais de SJ e SJ-B

3.6.1. Linhagens celulares

A linhagem celular de astrocitoma grau III (NG-97) foi gentilmente doada pelo Prof. Dr. Marcelo Lancelotti, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brasil. As linhagens celulares de glioblastoma (U251MG) e fibroblasto dérmico normal de humano adulto (HDFa), foram doadas pela Dra. Adriana da Silva Santos Duarte do Hemocentro, UNICAMP. As células foram mantidas em meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute Medium* (RPMI)-1640, ou meio *Dulbecco's Modified Eagle's* (DMEM) com alto teor de glicose (Vitrocell, Campinas, São Paulo, Brasil) suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% penicilina/estreptomicina (P/S) (Vitrocell, Campinas, São Paulo, Brasil) a 37°C e uma atmosfera de 5% CO₂.

Em todos os experimentos os extratos SJ e SJ-b foram dissolvidos em 0,8% de Dimetilsofóxido (DMSO) (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil) e posteriormente diluído em meio de cultura RPMI-1640 ou DMEM completo. O TMZ foi diluído diretamente em meio de cultura RPMI-1640 ou DMEM com 10% SFB e 1% P/S. Todos os experimentos foram realizados com células até a sétima passagem após o descongelamento.

3.6.2. Avaliação do efeito dos extratos vegetais de SJ e SJ-b pelo ensaio de citotoxicidade

Para a avaliação de citotoxicidade com as linhagens celulares acima, foi realizado o ensaio de redução do anel de tetrazólio ou 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT). Cerca de $0,2 \times 10^4$ células/poço foram plaqueadas em um volume de 100 µL de meio de cultura DMEM em triplicata em placas de 96-poços. Após 24h, o meio de cultura foi removido e as células foram expostas por diferentes períodos [24, 48, 72 horas (h)] com diferentes concentrações de extratos de SJ ou SJ-b. As concentrações utilizadas no estudo, para ambos os extratos, foram determinadas considerando apenas a massa molar do

Kaempferol (KPF) (286,23g/mol). Uma triplicata para cada linhagem contendo apenas meio de cultura foi utilizada como controle. Após o tratamento, as linhagens de células foram incubadas com 0,2 µg/µL de MTT (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA) durante 4h a 37°C. Os cristais de formazan foram dissolvidos em 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) e a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 540 nm (Epoch, Santa Clara, Califórnia, EUA). Os valores de IC50 obtidos neste ensaio foram utilizados em todos os outros experimentos propostos no estudo.

Também foi realizado pelo MTT a avaliação de citotoxicidade das linhagens celulares utilizando diferentes concentrações de TMZ (25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 350, 550, 1000, 1750 e 2000 µM) em combinação com extrato de SJ (NG-97: 800 µM; U251: 1800 µM) ou extrato de SJ-b (NG-97: 600 µM; U251: 1800 µM), por 24, 48 e 72 h). As concentrações de TMZ escolhidas foram baseadas nas doses utilizadas para o tratamento dos pacientes com GBM (BAKER et al., 1999; ROSSO et al., 2009; D'ALESSANDRO et al., 2016; PAZHOUHI et al., 2018). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.6.3. Avaliação da migração celular pelo método de WH

Para investigar o efeito dos extratos vegetais de SJ e SJ-b na capacidade de migração com as linhagens selecionadas para o estudo, as células foram plaqueadas ($1,0 \times 10^6$ células/poço e 2 mL de meio DMEM) em placas de cultura de 6 poços e deixadas até atingir a confluência durante 24 h. Com uma ponteira de 200 µL foi feita uma ranhura na monocamada celular. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e cultivadas com ou sem exposição aos extratos de SJ (800 µM: NG-97 e 1800 µM: U251) ou SJ-b (600 µM: NG-97 e 1800 µM: U251). As células foram fotografadas após diferentes tempos de exposição (0, 24, 48 e 72 h), o programa computacional *ImageJ* (Institutos Nacionais de Saúde, Bethesda, MD, EUA) foi utilizado para medir a área das ranhuras fotografadas sob um microscópio invertido (Axio Vert. A1 ZEISS). A distância do fechamento das ranhuras foi examinada após os tempos determinados acima utilizando o programa *ImageJ*.

3.6.4. Avaliação da proliferação celular após exposição aos extratos vegetais de SF e SF-b

Cerca de $0,4 \times 10^6$ células/poço em 1 mL de meio DMEM (NG-97 e U251) foram plaqueadas em triplicata em uma placa de 24-poços e cultivadas durante 24 horas com meio de cultura DMEM enriquecido com glicose suplementado com 10% SFB e 1% P/S à 37°C e 5% de CO₂. Posteriormente, as células foram expostas ou não aos extratos de SJ (800 µM: NG-97 e 1800 µM: U251) ou SJ-b (600 µM: NG-97 e 1800 µM: U251). O experimento foi realizado

em triplicata e as células não expostas aos compostos foram utilizadas como controles. Durante 4 dias seguidos, as células foram coletadas utilizando solução tripsina com EDTA 250 mg/L (Vitrocell, Campinas, SP, Brasil), e submetidas a contagem do número de células viáveis em câmara de Neubauer em microscópio invertido (Axio Vert. A1 ZEISS), utilizando o corante azul de Trypan (Millipore) em uma diluição de 0,4% em PBS 1x. As células coradas em azul foram excluídas da contagem.

3.6.5. Avaliação do efeito dos extratos vegetais de SJ e SJ-b sobre a fragmentação ao DNA

Cerca de 1×10^6 células/poço em 2 mL de meio de cultura DMEM das linhagens NG-97 e U251 foram cultivadas em placas de 6 poços por 24h, em seguida. As células foram expostas aos extratos vegetais de SJ (NG-97: 600, 800 e 1000 μ M; U251: 1600, 1800 e 2000 μ M) ou SJ-b (NG-97: 200, 400 e 600 μ M; U251: 1600, 1800 e 2000 μ M) por 72h). Em seguida as células foram coletadas utilizando solução tripsina com EDTA 250 mg/L (Vitrocell, Campinas, SP, Brasil) em cada tempo especificado e os DNAs isolados com fenol-clorofórmio-isoamílico (BARNETT & LARSON, 2012). Cerca de 1000 ng de cada DNA foram submetidos à eletroforese utilizando tampão de corrida TBE 0,5x (Tris base, borato e EDTA) em uma corrente de aproximadamente de 100V/50A por 1 h em gel de agarose 1,5%. As bandas de DNA foram visualizadas com 1 μ L brometo de etídio (10mg/mL) (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia EUA) sob iluminação ultravioleta em transiluminador (ULTRA LUM – Berlim, Connecticut, EUA).

3.6.6. Avaliação do efeito apoptótico e da parada do ciclo celular dos extratos vegetais de SJ e SJ-b por citometria de fluxo

Para os ensaios de citometria de fluxo para avaliar apoptose e ciclo celular, cerca de 1×10^4 células/poço das linhagens NG-97 e U251 foram semeadas em placas de 12 poços e cultivadas por 24h. Em seguida, as células foram expostas aos extratos SJ (NG-97: 800 μ M; U251: 1800 μ M) ou SJ-b (NG-97: 600 μ M; U251: 1800 μ M) por 72h. Para o ensaio de apoptose as células foram coletadas em 2mL de PBS 1x e posteriormente centrifugadas a 1500 rpm por 5 min, e o sobrenadante descartado. Novamente as células foram lavadas com PBS 1x e 100 μ L da suspensão foi transferido para uma placa de 96-poços e adicionado 100 μ L do reagente *Guava Nexin Reagent* e incubado por 20 minutos antes da leitura. Para a análise de ciclo celular, após as lavagens com PBS 1x, as células foram fixadas em etanol 70% e mantidas a 4°C por 120h, em seguida as células foram centrifugadas e o etanol desprezado e adicionado

200µL do reagente *Guava Cell Cycle Reagent* (Milipore - Bilerica, MA, EUA), e as células foram transferidas para uma placa de 96 poços e incubadas por 20 min antes da leitura. Todas as leituras foram feitas no citômetro Millipore *Guava Easy Cyte 5HT Benchtop Flow Cytometer*.

3.6.7. Avaliação da capacidade de inibição de células tronco tumorais após exposição aos extratos vegetais de SJ e SJ-b pelo ensaio de formação de neuroesferas

Cerca de 5×10^5 células/poço das linhagens celulares NG-97 e U251 em 2 mL de meio DMEM, foram semeadas em placas de 6 poços revestidas com 2% de poli (2-hidroxietil metacrilato) (poli-HEMA, Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) para evitar adesão celular, em duplicata. As neuroesferas foram formadas utilizando meio de cultura basal NS-A suplementado com N2 (Stem Cell, Vancouver, Canadá) e 20 ng/mL do fator de crescimento epidérmico (EFG) e do fator de crescimento fibroblástico básico (FGFb) (Peprotech, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) em um período de 4 dias a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Após, as neuroesferas foram expostas aos extratos vegetais de SJ (800 µM: NG-97; 1800 µM:U251) ou SJ-b (600 µM: NG-97; 1800 µM: U251) por 72h. As neuroesferas foram monitoradas em microscópio invertido (Axio Vert. A1 ZEISS) e todas as neuroesferas foram contadas e fotografadas após exposição com os extratos estudados nos tempos de 0, 24, 48 e 72 h.

3.6.8. Ação inibitório dos extratos vegetais de SJ e SJ-b na via de sinalização NF-kB por meio do ensaio da luciferase

A linhagem celular NG-97 foi cultivada e $0,5 \times 10^5$ células/poço foram plaqueadas em placas de 12 poços em 1mL por poço de meio de cultura RPMI-1640 com 10% de SFB e 1% P/S por 24 horas. Em seguida as células foram transfectada com 10 ng do vetor NF-kB-Luciferase (subunidade p65) e 2 ng do vetor controle pRL-Renilla com o reagente Lipofectamine® 2000 (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA). Oito horas após a transfecção, o meio de cultura foi removido e as células foram expostas ao lipopolissacarídeo (LPS; 10µg/ml) mais 2% de SFB, ou ao extrato de SJ (NG-97: 800 µM; U251: 1800 µM) ou ainda ao extrato de SJ-b (NG-97: 600 µM; U251: 1800 µM) e incubadas por mais 40 h. A atividade de luciferase foi avaliada nas células transfectadas com o vetor promotor de NF-kB utilizando o conjunto de reagentes *Dual-Luciferase* (Promega, Madison, Wisconsin, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A luminescência foi medida com o luminômetro de microplacas

GloMax™ 96 (Promega Madison, Wisconsin, EUA). Três transfecções independentes foram realizadas para cada composto, em triplicata.

3.6.9. Avaliação dos genes *TRAF6*, *IRAK2*; *IL-1 β* e *TNF α* , responsáveis pela ativação da via NF- κ B e *MMP-9*, marcador de migração celular pela PCR quantitativa (qPCR)

Amostras de RNA total foram obtidas após exposição das células NG-97 e U251 aos extratos vegetais de SJ (800 μ M: NG-97 e 1800 μ M: U251) ou SJ-b (600 μ M: NG-97 e 1800 μ M: U251) por 72 h. Ainda, para avaliar a capacidade dos extratos em modular o gene *MMP9* envolvido na migração e invasão das células tumorais, as células foram expostas a 50ng/mL do reagente 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) concomitante ao extratos SJ (800 μ M: NG-97 e 1800 μ M: U251) ou SJ-b (600 μ M: NG-97 e 1800 μ M: U251) por 72 h. TPA é um ativador da família de proteínas quinase C (PKC), um amplo grupo de quinases serina/treonina, as quais modulam a proliferação, diferenciação e migração celular (Mochly-Rosen et al., 2012; Fogh et al., 2012). Os RNAs foram isolados com o reagente TRizol (Ambion, Carlsbad, Califórnia, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante e submetido a reação de transcriptase reverse com os reagentes *TaqMan Transcriptase Reverse* (Thermo Fisher, Carlsbad, Califórnia EUA). As reações de qPCR foram realizadas para avaliar a expressão dos genes *TRAF6* e *IRAK2*, *IL-1 β* , *TNF α* e *MMP9* com os reagentes *Master Mix PowerUp SYBR® Green* (Applied Biosystems, Austin, Texas, EUA). Todas as quantificações foram realizadas em triplicata e normalizadas para o endógeno *GAPDH*. A quantificação relativa dos genes foi determinada pelo método $\Delta\Delta$ Ct. As sondas usadas para a qPCR estão listadas na Tabela 2.

Tabela 2: Sequências sense e antisense dos iniciadores utilizados nas reações em cadeia da polimerase quantitativas.

Iniciadores - SYBR green		
<i>GAPDH</i>	Sense:	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC
	Antisense:	CCACTTGATTTTGGAGGGAT
<i>TRAF6</i>	Sense:	CCCAATTCCATGCACATTCAG
	Antisense:	GTTTGAGCGTTATACCCGACT
<i>IRAK2</i>	Sense:	TGGCAAATGGTTCCTACAG
	Antisense:	CATCCACAGCAACGTCAAGA
<i>IL-1β</i>	Sense:	AAAGACATACTCCAAACCTTTCCA
	Antisense:	CGCCTTACAATAATTTCTGTGTTGG
<i>TNFα</i>	Sense:	ACACTGGCTCGTGTGACAAGG
	Antisense:	CGGCTAATACACTCCAAGGC
<i>MMP9</i>	Sense:	CACTGTCCACCCCTCAGAGC
	Antisense:	GCCACTTGTCGGCGATAAGG

3.7. Análises de afinidade de ligação

Análises de afinidade de ligação preditivas entre os alelos (T) e (C) da SNV rs76276169 e alelos (G) e (A) da SNV rs2229714 (localizadas em região 3'UTR (*seed sequence*) dos genes *PARG* e *RSK1*) e miR-491-3p e miR-663b, foram realizadas utilizando os endereços eletrônicos <https://www.big.r.medisin.ntnu.no/mirsnpscore/> e <https://bibiserv.cebitec.uni-bielefeld.de/rnahybrid>.

3.8. Análises estatísticas

Considerando a heterogeneidade da população brasileira composta por indígenas, imigrantes da Europa, Ásia e África (GIOLO et al., 2012), o cálculo do tamanho amostral foi realizado com base na frequência dos diferentes genótipos das SNVs rs76276169 em *PARG* e rs2229714 em *RSK1*, em indivíduos saudáveis de diferentes populações étnicas, utilizando as normas definidas por Beilguelman (BEILGUELMAN, 1995; BEILGUELMAN, 2002). As diferenças das características clínicas e frequências dos genótipos para as SNVs estudadas foram calculadas pelo Teste qui-quadrado (X^2) (para variáveis categóricas) ou Teste-T (para variáveis contínuas). O equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foi detectado por ferramentas analíticas no endereço eletrônico <https://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>. A significância estatística da diferença entre os grupos foi calculada por meio dos testes Fisher ou X^2 . A determinação dos riscos foi determinada pela razão das chances (OR) com intervalo de confiança de 95% (IC95%), ajustadas para sexo, cor da pele e idade. Por fim, a probabilidade de sobrevida foi calculada utilizando o teste Log-rank (Mantel-Cox).

Os dados obtidos pelos ensaios biológicos nas linhagens celulares de GBM, NG-97 e U251, encontram-se em distribuição normal e foram apresentados com média \pm desvio padrão e os valores de significância foram obtidos através do Teste-T. Para indicar uma diferença estatística significativa, foi considerado $P < 0,05$. Os testes foram conduzidos utilizando o programa *SPSS.21* (SPSS Incorporation, Chicago, Illinois, EUA).

4. RESULTADOS

4.1. Amostras

O tamanho amostral ideal para a identificação dos diferentes genótipos para a SNV rs76276169 foi aproximadamente 1660 e para a SNV rs2229714, cerca de 1000 pacientes com GBM. Entretanto, estima-se que a frequência deste tumor é de aproximadamente 5 para cada 100 mil adultos por ano (PHILIPS, 2018) e, portanto, por serem tumores relativamente raros e serem diagnosticados tardiamente, o número ideal de amostras para estudos é inviabilizado. Nos apêndices 2 e 3 estão apresentadas as frequências dos diferentes genótipos em diferentes etnias, para as SNVs estudadas e para a determinação do tamanho amostral.

Os dados clínicos de 101 pacientes com GBM incluídos no estudo, foram coletados nos prontuários médicos, considerando as seguintes variáveis: data da cirurgia, data do diagnóstico, sexo, idade, cor da pele, localização do tumor, recidiva da doença, realização de quimioterapia e/ou RT e data do óbito ou última consulta (Apêndices 4 e 5). Foram também coletadas informações de 254 indivíduos saudáveis (controles) como sexo, idade e cor da pele (Apêndice 6).

A idade média ao diagnóstico dos pacientes com GBM inseridos no estudo foi de $56,55 \pm 12,24$ e dos indivíduos controles, doadores de sangue periférico, foi de $40,87 \pm 14,60$. A diferença significativa observada entre os grupos (P -valor $< 0,001$) é um fator limitante em nosso estudo. O GBM acomete majoritariamente indivíduos com idade superior a 50 anos, contrastando com a idade inferior a 50 anos, normalmente observada entre indivíduos doadores de sangue periférico.

Observou-se prevalência da doença ligeiramente maior em pacientes do sexo masculino [58 (58,60%)] em comparação com pacientes do sexo feminino [41 (41,40%)]. Entretanto, o sexo não foi um fator relevante para a suscetibilidade ao GBM [OR(IC95%): 0,85 (0,53-1,37), P -valor=0,55]. No grupo de indivíduos controles saudáveis, doadores de sangue periférico, também se observou ligeiro predomínio do sexo masculino [139 (54,70%)] em comparação com indivíduos do sexo feminino [115 (45,30%)].

Também, observou-se um predomínio de pacientes autodeclarados brancos [90 (92,80%)] em comparação à pacientes amarelos [1 (1,00%)], pretos [1 (1,00%)] e pardos [5 (5,20%)]. A cor da pele também não foi um fator associado ao risco para desenvolver GBM [OR(IC95%): 1,40 (0,59-3,36), P -valor=0,72]. Ainda, o grupo de indivíduos saudáveis, doadores de sangue,

apresentou prevalência de indivíduos brancos [229 (90,20%)] em comparação com indivíduos amarelos [3 (1,20%)], pretos [13 (5,10%)] e pardos [9 (3,50%)].

Na Tabela 3 estão apresentados os principais dados clínicos nos grupos de pacientes com GBM e os indivíduos saudáveis controles.

Tabela 3. Dados clínicos de 101 pacientes com glioblastoma e 254 indivíduos saudáveis, doadores de sangue periférico, considerando o sexo, a cor da pele e a idade.

Grupos	Glioblastoma (n = 101)	Controles (n = 254)	P	OR	IC95%
Sexo*					
Feminino	41 (41,40)	115 (45,30)	0,55	0,85	0,53-1,37
Masculino	58 (58,60)	139 (54,70)		1	Ref.
Sem informação	2				
Cor da pele**					
Branco	90 (92,80)	229 (90,20)	0,73	1,40	0,586-3,360
Amarela	1 (1,00)	3 (1,20)		1	Ref.
Preto	1 (1,00)	9 (3,50)		1	Ref.
Pardo	5 (5,20)	13 (5,10)		1	Ref.
Sem informação	4				
Idade (anos)***					
Média das idades	56,55 ± 12,24	40,87 ± 14,60	<0,001	-	-
Mediana das idades	58 (49,00-67,00)	40 (30,00-49,00)			

*, A análise estatística foi realizada pelo teste chi-quadrado; **, A análise estatística foi realizada pelo teste Exato de Fisher; ***, A análise estatística foi realizada pelo teste de Mann-Whitney. OR, razão das chances; IC95%, intervalo de confiança de 95%; Ref., referência. Na análise foi considerado um valor de erro alpha de 0,05. Os valores de P que foram significativos estão apresentados em negrito. Os dados categóricos estão apresentados como frequência absoluta (frequência relativa). Os dados numéricos estão apresentados como média ± desvio padrão; mediana (percentil 25 a percentil 75).

Em relação aos dados do tumor, foi observado predomínio da doença localizada no lobo frontal [26 (27,10%)], seguido pelo lobo temporal [22 (22,90%)], parietal [18 (18,80%)] e occipital [3 (3,10%)]. Além disso, 26 (27,10%) pacientes apresentaram tumores localizados em mais de um lobo (multilobar). A escala Karnofsky (KPS), que determina o nível de inaptidão ou deficiência funcional do paciente, 75 (74,30%) pacientes apresentaram uma pontuação \geq 70% e 21 (20,80%), pontuação inferior a 70%, ao diagnóstico. A maioria dos pacientes conseguiram realizar atividade diárias, como cuidados pessoais com algum nível de esforço e limitação, mas sem a necessidade de assistência e cuidados especiais. Após a cirurgia para retirada do tumor, 61 (63,50%) pacientes foram submetidos a tratamento com quimioterapia (TMZ) e/ou RT, de acordo com as limitações clínicas de cada paciente. Dos 61 pacientes que receberam algum tipo de tratamento, 6 (9,80%) receberam apenas TMZ, 50 (82,0%) receberam TMZ associado a doses fracionadas de RT (2mGy) e 5 (8,20%) receberam apenas as doses

fracionadas de RT. Apenas 35 (36,50%) pacientes não receberam nenhum tratamento, pois não apresentaram condições clínicas suficientes para a realização de algum tipo de tratamento. Ainda, 28 (27,70%) pacientes apresentaram recidiva da doença no período de um ano e 91 (91,90%) evoluíram à óbito em um tempo médio de aproximadamente 8 meses ($8,53 \pm 10,38$), considerando a data do último segmento (01/09/2022)

Na Tabela 4 estão apresentados os dados do tumor dos pacientes com GBM inseridos no estudo.

Tabela 4. Dados do tumor de 101 pacientes com glioblastoma, como a localização, pontuação de Karnofsky, tipos de tratamentos, recidiva e desfecho clínico.

Localização do tumor	Glioblastoma (Nº = 101)	
	Nº (%)	
Frontal	26	(27,10)
Temporal	22	(22,90)
Parietal	18	(18,80)
Occipital	3	(3,10)
Giro cíngulo	1	(1,00)
Multilobar	26	(27,10)
Sem informação	5	
Karnofsky		
≥ 70%	75	(74,26)
< 70%	21	(20,79)
Sem informação	5	(4,95)
Tratamentos		
Realizou algum tratamento	61	(60,40)
Não realizou nenhum tratamento	35	(34,65)
Sem informação	5	(4,95)
Tipos de tratamento		
Quimioterapia (TMZ)	6	(9,80)
TMZ + RT	50	(82,00)
RT	5	(8,20)
Recidiva		
Recidiva em um ano	28	(27,70)
Sem recidiva da doença	73	(72,30)
Desfecho clínico (01/09/2022)		
Vivos	8	(7,90)
Óbitos	93	(92,10)

TMZ: temozolamida; RT: radioterapia.

4.2. Identificação dos diferentes genótipos da SNV rs76276169

As amostras controles e pacientes com GBM apresentaram-se em desequilíbrio de HW para a SNV 76276169 ($X^2=6,64$, $P=0,04$; $X^2=6,95$, $P=0,03$, respectivamente). Após a genotipagem das 101 amostras de DNA de pacientes com GBM e 254 amostras de DNA de doadores de sangue (grupo controle), o genótipo variante (CC) não foi identificado. A frequência do genótipo selvagem (TT) foi maior no grupo de pacientes que no grupo controle [59,00% versus (vs.) 38,20%, P -valor<0,001] e risco aumentado, aproximadamente duas vezes, para desenvolver o GBM [OR(IC95%): 2,33 (1,45-3,73)]. Assim, foi observado que a frequência do alelo (T) foi maior no grupo de pacientes (79,50% vs. 69,10%, P -valor<0,001), apresentando risco significativamente aumentado [OR(IC95%): 1,74 (1,17-2,57), P -valor<0,001] (Tabela 5).

Tabela 5. Frequências dos genótipos da SNV rs76276169 identificados em 101 pacientes com glioblastoma e 254 indivíduos saudáveis, doadores de sangue periférico, inseridos no estudo.

Variante genética	Glioblastoma (n= 101)	Controle (n= 254)	<i>P</i>	OR	IC95%
rs76276169					
Genótipo*					
TT	59 (59,00)	97 (38,20)	<0,001	2,33	1,45-3,73
TC	41 (41,00)	157 (61,80)		1	Ref.
Não identificados	1	-			
Alelo*					
T	159 (79,50)	351 (69,10)	<0,001	1,74	1,17-2,57
C	41 (20,50)	157 (30,90)		1	Ref.

*, A análise estatística foi realizada pelo teste chi-quadrado; OR, razão das chances; IC95%, intervalo de confiança de 95%; Ref, referência. Na análise foi considerado um valor de erro alpha de 0,05. Os valores de P que foram significativos estão apresentados em negrito. Os dados categóricos estão apresentados como frequência absoluta (frequência relativa). Não identificado, não foi possível amplificar a amostra de DNA.

As distribuições dos diferentes genótipos da SNV rs76276169 dos 101 pacientes com GBM e 254 indivíduos saudáveis inseridos no estudo estão apresentadas nos Apêndices 4, 5 e 6), respectivamente.

4.3. Identificação dos diferentes genótipos da SNV rs2229714

As amostras dos controles e pacientes com GBM apresentaram-se em EHW para a SNV 2229714 ($X^2=1,30$, $P=0,52$; $X^2=1,35$; P -valor=0,50, respectivamente). Após a genotipagem das 101 amostras de DNA de pacientes com GBM e 254 amostras de indivíduos controles, a frequência do genótipo selvagem (GG) foi maior no grupo de pacientes que no grupo controle (61,50% vs. 32,50%; P -valor <0,001) com associação a risco para a doença em quase três vezes mais [OR(IC95%): 3,33 (2,01-5,50)]. A frequência do alelo (G) também foi significativamente maior no grupo de pacientes (79,70% vs. 54,10%) e associado a risco para o GBM [OR(IC95%): 3,33 (2,24-4,95) P -valor <0,001]. A frequência do genótipo heterozigoto (GA) foi significativamente maior no grupo controle em comparação ao grupo de pacientes (66,20% vs. 36,30%), apresentando-se de maneira significativa como fator de proteção contra a doença [OR(IC95%): 0,29 (0,17-0,48), P -valor <0,001]. Não houve diferença significativa na frequência do genótipo variante (AA) entre os grupos pacientes e controles (2,20% vs. 1,30%, P -valor=0,99) (Tabela 6).

Tabela 6. Frequências dos genótipos da SNV rs2229714 nos 101 pacientes com glioblastoma e 254 amostras de indivíduos saudáveis inseridos no estudo.

Variante genética	Glioblastoma (n= 101)	Controles (n= 254)	<i>P</i>	OR	IC95%
rs2229714					
Genótipo**					
GG	56 (61,50)	76 (32,50)		1	Ref.
GA	33 (36,30)	155 (66,20)	<0,001	0,29	0,17-0,48
AA	2 (2,20)	3 (1,30)	0,999	0,91	0,07-8,17
Não identificados	10	30			
GG	56 (61,5)	76 (32,50)	<0,001	3,33	2,01-5,50
AA+GA	35 (38,50)	158 (67,50)		1	Ref.
Alelo*					
G	145 (79,70)	307 (54,10)	<0,001	3,33	2,24-4,96
A	37 (20,30)	261 (45,90)		1	Ref.

*, A análise estatística foi realizada pelo teste chi-quadrado; **, A análise estatística foi realizada pelo teste Exato de Fisher. OR, razão das chances; IC95%, intervalo de confiança de 95%; Ref, referência. Na análise foi considerado um valor de erro alpha de 0,05. Os valores de *P* que foram significativos estão apresentados em negrito. Os dados categóricos estão apresentados como frequência absoluta (frequência relativa). Não identificado, não foi possível amplificar a amostra de DNA.

As distribuições dos diferentes genótipos da SNV rs2229714 para os 101 pacientes e 254 controles inseridos no estudo estão apresentadas nos Apêndices 4, 5 e 6 respectivamente.

4.4. Associação comparativa das SNVs rs76276169 e rs2229714 entre o grupo de pacientes com GBM e uma população controle do banco de dados ABraOM

As amostras controles e pacientes com GBM apresentaram-se em desequilíbrio de HW para a SNV 76276169, provavelmente devido a não identificação do genótipo homozigoto variante na amostra da população estudada. Desta forma, as amostras de pacientes foram comparadas com as amostras controle do banco de dados ABraOM, as quais se encontraram em EHW para as SNVs rs76276169 ($X^2=0,04$, P -valor= 0,82) rs2229714 ($X^2= 0,10$; P -valor= 0,10). As variáveis clínicas (idade, sexo, cor da pele e idade média, estão apresentados na tabela 7).

Para a SNV rs76276169 no *PARG*, o genótipo selvagem (TT) foi significativamente maior no grupo controle (59,00% vs. 92,23%; P -valor <0,001) apresentando-se como fator de proteção para doença [OR(IC95%): 0,12 (0,78-0,20)]. Assim também, a frequência do alelo (T) foi significativamente maior no controle (79,50% vs. 96,07%; P -valor <0,001) associado a proteção à doença [OR(IC95%): 0,15 (0,11-0,24)] (Tabela 8). Para a SNV 2229714 no *RSK1*, o genótipo selvagem (GG) foi significativamente maior no grupo controle (61,50% vs 79,50% P -valor <0,001) apresentando-se como fator de proteção [OR(IC95%): 0,32 (0,21-0,48)]. Diferentemente, o genótipo heterozigoto (GA) foi mais frequente no grupo de pacientes (36,26% vs 79,50% P -valor <0,001) associado ao risco para o GBM [OR(IC95%): 2,41 (1,53-3,79)]. Assim também, o alelo (A) foi mais frequente nos pacientes com GBM (30,32% vs 10,76% p -valor <0,001) associado ao risco para doença [OR(IC95%): 2,12 (1,44-3,11)] (Tabela 8).

Tabela 7. Dados clínicos de 1.171 indivíduos saudáveis idosos, apresentados de acordo com o sexo, cor da pele e idade média e frequência dos diferentes genótipos para as SNVs, incluídos no grupo controle ABraOM.

Variáveis		N	%
Sexo	Masculino	427	36,46
	Feminino	744	63,54
Cor da pele	Branco	680	58,07
	Negros	75	6,40
	Pardos	330	28,18
	Asiáticos	32	2,73
	Indígenas (Nativo Americano)	3	0,26
	SI	51	8,5
SNV rs76276169	Genótipo TT	1.079	92,14
	Genótipo TC	90	7,69
	Genótipo CC	2	0,17
SNV rs2229714	Genótipo GG	931	79,50
	Genótipo GA	228	19,47
	Genótipo AA	12	1,02
Idade Média		71,86 ±7,94	

SI: Sem informação

Tabela 8. Associação comparativa das variantes rs76276169 e rs 2229714 utilizando os grupos pacientes com glioblastoma e controle ABraOM.

Variante genética	Glioblastoma (n = 101)	ABraOM (n = 1171)	<i>P</i>	OR	IC95%
rs76276169					
Genótipo*					
TT	59 (59,00)	1080 (92,23)	<0,001	0,121	0,078-0,191
TC	41 (41,00)	90 (76,86)		1	Ref
CC	0	1 (0,09)		1	Ref
Não identificados	1				
Alelo*					
T	159 (79,50)	2250 (96,07)	<0,001	0,159	0,106-0,237
C	41 (20,50)	92 (3,93)		1	Ref
rs2229714					
Genótipo**					
GG	56 (61,54)	931 (79,50)		1	Ref
GA	33 (36,26)	228 (19,47)	<0,001	2,406	1,528-3,788
AA	2 (2,19)	12 (1,02)	0,385	2,766	0,294-12,890
Não identificado	10				
GG	56 (61,54)	931 (79,50)	<0,001	0,321	0,211-0,487
AA+GA	35 (38,46)	240 (20,50)		1	Ref
Alelo*					
G	145 (79,68)	2090 (89,24)		1	Ref
A	37 (20,32)	252 (10,76)	<0,001	2,116	(1,442-3,107)

A análise estatística foi realizada pelo teste chi-quadrado; **, A análise estatística foi realizada pelo teste Exato de Fisher. OR, razão das chances; IC95%, intervalo de confiança de 95%; Ref, referência. Na análise foi considerado um valor de erro alpha de 0,05. Os valores de *P* que foram significativos estão apresentados em negrito. Os dados categóricos estão apresentados como frequência absoluta (frequência relativa). Não identificado, não foi possível amplificar a amostra de DNA

4.5.Avaliação dos aspectos clínicos e do tumor para as SNVs rs76276169 e rs2229714

A distribuição dos diferentes genótipos das SNVs rs76276169 e rs2229714 foram avaliadas de acordo com os dados clínicos (idade ao diagnóstico, sexo, cor da pele, KPS) e aspectos do tumor (localização, recidiva e tipos de tratamentos). Os resultados demonstraram que a maioria dos pacientes que realizaram quimioterapia com TMZ eram portadores do genótipo selvagem (TT) para a SNV rs76276169, contrastando de forma significativa (*P*-valor=0,015) com os pacientes que realizaram RT associada ao TMZ ou somente RT. Para os

demais aspectos clínicos e do tumor não foi observado diferenças significativas na distribuição dos diferentes genótipos para as SNVs (Tabelas 9 e 10).

Tabela 9 Frequência dos diferentes genótipos da SNV rs76276169 no gene *PARG* em 101 pacientes com GBM de acordo com as características clínicas.

Marcadores	rs76276169		P
	TC	TT	
Idade (anos)	57 ± 11,93; 57 (40-66)	56,21 ± 12,53 57 (48-67)	0,948***
Karnofsky	0,81 ± 0,14 0,80 (0,70-0,90)	0,75 ± 0,21 0,80 (0,60-0,90)	0,358***
Localização do tumor			
Frontal	9 (22,00)	17 (30,90)	0,900**
Fronto-parietal	1 (2,40)	1 (1,80)	
Fronto-temporal	0 (0,00)	1 (1,80)	
Fronto-temporal-parietal	1 (2,40)	2 (3,60)	
Giro cíngulo	1 (2,40)	0 (0,00)	
Occipital	2 (4,90)	1 (1,80)	
Parietal	8 (19,50)	10 (18,20)	
Sobreposto	8 (19,50)	12 (21,80)	
Temporal	11 (26,80)	11 (20,00)	
Recidiva			
Sim	9 (22,0)	19 (33,3)	0,261*
Não	32 (78,0)	38 (66,7)	
Tratamento			
Não	27 (65,90)	34 (61,80)	0,831*
Sim	14 (34,10)	21 (38,20)	
Tipos de tratamento			
TMZ	5 (18,50)	1 (2,90)	0,015**
TMZ + RT	22 (81,50)	28 (82,40)	
RT	0 (0,00)	5 (14,70)	

*, A análise estatística foi realizada pelo teste chi-quadrado; **, A análise estatística foi realizada pelo teste Exato de Fisher; ***, A análise estatística foi realizada pelo teste de Mann-Whitney; a, para os valores da população completa não removemos os dados dos pacientes para os quais os genótipos não foram identificados. TMZ, Temozolamida; RT, radioterapia. Na análise foi considerado um valor de erro alpha de 0,05. Os valores de P que foram significativos estão apresentados em negrito. Os dados categóricos estão apresentados como frequência absoluta (frequência relativa). Os dados numéricos estão apresentados como média ± desvio padrão; mediana (percentil 25 a percentil 75).

Tabela 10 Frequência dos diferentes genótipos da SNV rs2229714 no gene *RSK1* em 101 pacientes com GBM de acordo com as características clínicas.

Marcadores	rs2229714			<i>P</i>
	AA	GA	GG	
Idade (anos)	44 ± 18,40 44 (31,00-NA)	57±12,30 62 (48-67)	57,3±11,70 56 (50-67)	0,472**
Karnofsky	80 ± 0,28 80 (60-NA)	77 ± 0,15; 80 (70-90)	78 ± 0,19; 80 (63-90)	0,672**
Localização do tumor				
Frontal	1 (50,00)	7 (21,90)	14 (26,90)	0,529*
Fronto-parietal	0 (0,00)	1 (3,10)	1 (1,90)	
Fronto-temporal	0 (0,00)	1 (3,10)	0 (0,00)	
Fronto-temporal-parietal	0 (0,00)	2 (6,30)	1 (1,90)	
Giro cíngulo	0 (0,00)	1 (3,10)	0 (0,00)	
Occipital	0 (0,00)	2 (6,30)	1 (1,90)	
Parietal	0 (0,00)	3 (9,40)	13 (25,00)	
Sobreposto	0 (0,00)	7 (21,90)	11 (21,20)	
Temporal	1 (50,00)	8 (25,00)	11 (21,20)	
Recidiva				
Sim	1 (50,00)	10 (31,30)	14 (25,50)	0,569*
Não	1 (50,00)	22 (68,80)	41 (74,50)	
Tratamento				
Sim	2 (100,00)	21 (65,60)	32 (61,50)	0,758*
Não	0 (0,00)	11 (34,40)	20 (38,50)	
Tipos de tratamento				
TMZ	0 (0,00)	4 (19,00)	2 (6,30)	0,236*
TMZ + RT	2 (100,00)	14 (66,70)	29 (90,60)	
RT	0 (0,00)	3 (14,30)	1 (3,10)	

*, A análise estatística foi realizada pelo teste chi-quadrado; **, A análise estatística foi realizada pelo teste

Exato de Fisher; ***, A análise estatística foi realizada pelo teste de Mann-Whitney; a, para os valores da população completa não removemos os dados dos pacientes para os quais os genótipos foram identificados.

TMZ, Temozolamida; RT, radioterapia. Na análise foi considerado um valor de erro alpha de 0,05. Os valores de P que foram significativos estão apresentados em negrito. Os dados categóricos estão apresentados como frequência absoluta (frequência relativa). Os dados numéricos estão apresentados como média ± desvio padrão; mediana (percentil 25 a percentil 75).

4.6. Afinidade de ligação entre os miR-491-3p e miR-663b aos genes *PARG* e *RSKI* respectivamente

Energicamente, ligações entre rs76276169 e miR-491-3p (5'UGC[A]UAAU3' – 8mer) apresentou uma energia livre mínima (MFE) de 18,2 kcal/mol e (5'UGC[G]UAAU3' – 8mer) de 17,8 kcal/mol, indicando que não há diferença significativa na hibridização do miR-491-3p ao gene *PARG* na presença dos alelos A ou G. Da mesma maneira, a ligação entre rs2229714 e o miR-663b (5'[G]GGCCACA3' – 8mer) apresentou um MFE de 21,0 kcal/mol e (5'[C]GGCCACA3' – 8mer) de 17,0 kcal/mol, evidenciando uma melhor hibridização do miR-663b ao gene *RSKI* na presença do alelo G comparado ao alelo C, nos sugerindo uma maior modulação do miR-663b ao gene *RSKI* na presença do alelo G.

4.7. Expressão relativa dos genes *PARG* e *RSKI* nos pacientes de com GBM de acordo com os diferentes genótipos para as SNVs rs76276169 e rs2229714

A expressão relativa dos genes *PARG* e *RSKI* em amostras de tecido tumoral fresco de pacientes com GBM foram avaliadas, e os valores de média, desvio padrão e *P*-valor, estão apresentados na Tabela 11, considerando os diferentes genótipos para as SNVs rs76276169 e 2229714. Foram analisadas 30 amostras de GBM, sendo que para a SNV rs76276169, e foram do genótipo selvagem (TT) e 6 do genótipo heterozigoto (TC); para a SNV rs2229714, 8 amostras foram do genótipo selvagem (GG), 7 do genótipo heterozigoto (GA) e 2 do genótipo variantes (AA).

Considerando a expressão relativa de *PARG*, a média dos níveis de mRNA foi significativamente aumentada nos pacientes portadores do genótipo heterozigoto (TC) comparados aos pacientes portadores do genótipo selvagem (TT) (5,07 vs 1,29, *P*-valor= 0,01). Ainda, a média de expressão relativa de *RSKI* para os pacientes portadores do genótipo recessivo (AA) foi menor comparado aos pacientes portadores do genótipo selvagem (GG) (0,28 vs 1,05 *P*-valor= 0,05) ou heterozigoto (GA) (0,28 vs 1,01 *P*-valor= 0,92) (Figura 6).

Tabela 11 Média das expressões relativas dos genes *PARG* e *RSKI* em pacientes com glioblastoma de acordo com os diferentes genótipos para as SNVs rs76276169 e rs2229714.

NG-97				
		Média	Desvio Padrão (DP)	P-valor
<i>PARG</i>				
	TT	1,29	0,99	Ref.
	TC	5,07	2,77	0,01
<i>RSKI</i>				
	GG	1,05	0,39	Ref.
	GA	1,01	0,70	0,92
	AA	0,28	0,24	0,05

Os dados estão apresentados com média \pm desvio padrão e os valores de significância foram obtidos através do Teste-T. Valor de $P < 0,05$ evidencia diferença estatística significativa

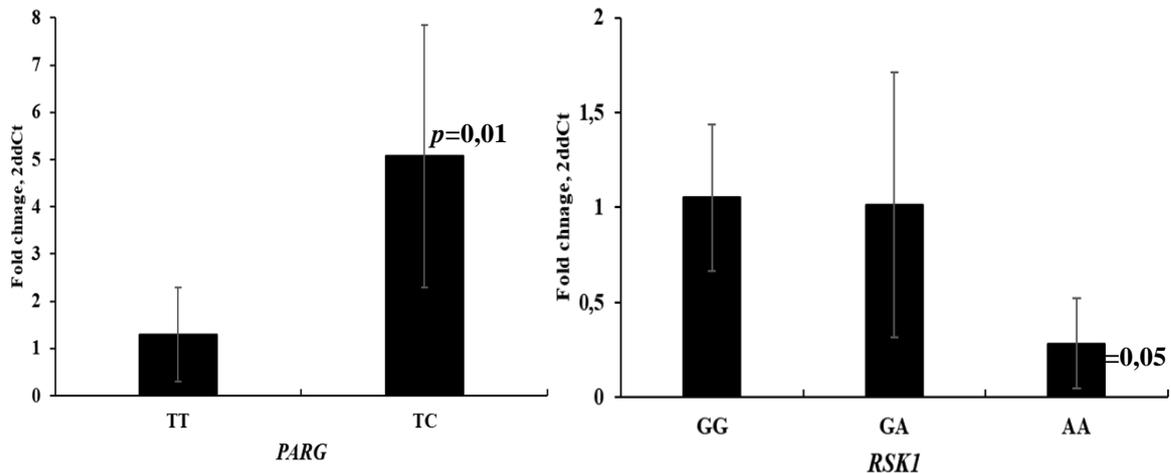


Figura 6 Avaliação dos níveis de expressão relativa dos genes *PARG* e *RSKI* para os diferentes genótipos das SNVs rs76276169 e rs2229714, respectivamente. **A)** A média da expressão relativa do gene *PARG* em pacientes com glioblastoma (GBM) portadores do genótipo heterozigoto (TC) foi significativamente aumentada (P -valor= 0,01) comparado aos pacientes portadores do genótipo selvagem (TT). **B)** A média da expressão relativa do gene *RSKI* em pacientes com GBM portadores do genótipo (AA), foi significativamente menor (P -valor= 0,05) comparado aos genótipos selvagem (GG) e heterozigoto (GA). Os dados estão apresentados com média \pm desvio padrão e os valores de significância foram obtidos através do Teste-T. Valor de $P < 0,05$ evidencia diferença estatística significativa.

4.8. Probabilidade de Sobrevida dos pacientes com GBM de acordo com os genótipos das SNVs rs76276169 T>C e rs2229714 G>A

Foram obtidos dados como data de diagnóstico e data do óbito ou último acompanhamento médico dos 101 pacientes com GBM inseridos no estudo para a análise de sobrevida. O tempo médio de seguimento foi de $11 \pm 14,3$ meses e as análises foram realizadas em junho de 2023. Na referida data da análise, nove pacientes estavam vivos e 92 evoluíram para óbito devido a doença.

Assim, 50% dos pacientes portadores do genótipo selvagem (TT) e do genótipo heterozigoto (TC) para a SNV rs76276169 evoluíram para óbito aos 9 e 6 meses respectivamente após o diagnóstico. Dentre os pacientes portadores do genótipo selvagem (GG) para SNV rs2229714, 50% evoluíram para óbito aos 8 meses e os pacientes portadores dos genótipos heterozigoto (GA) ou variante (AA), aos 10 meses após o diagnóstico. Na análise multivariada de Cox não houve diferença estatística significativa no prognóstico dos pacientes com GBM associado aos diferentes genótipos [Risco relativo (HR) 1,02 (0,62-1,68) P -valor=0,94] e [HR 1,09 (0,64 -1,84) P -valor=0,75] para as SNVs rs76276169 e rs2229714 respectivamente (Figura 7).

Ainda, a sobrevida livre de recidiva foi calculada considerando os diferentes genótipos das SNVs estudadas e não foi observado associação na probabilidade de recidiva da doença e os genótipos da SNV rs76276169 [HR 2,03 (0,88 - 4,71) P -valor=0,09] e da SNV rs2229714 [HR 0,86 (0,34 -2,16) P -valor=0,74] (Figura 8).

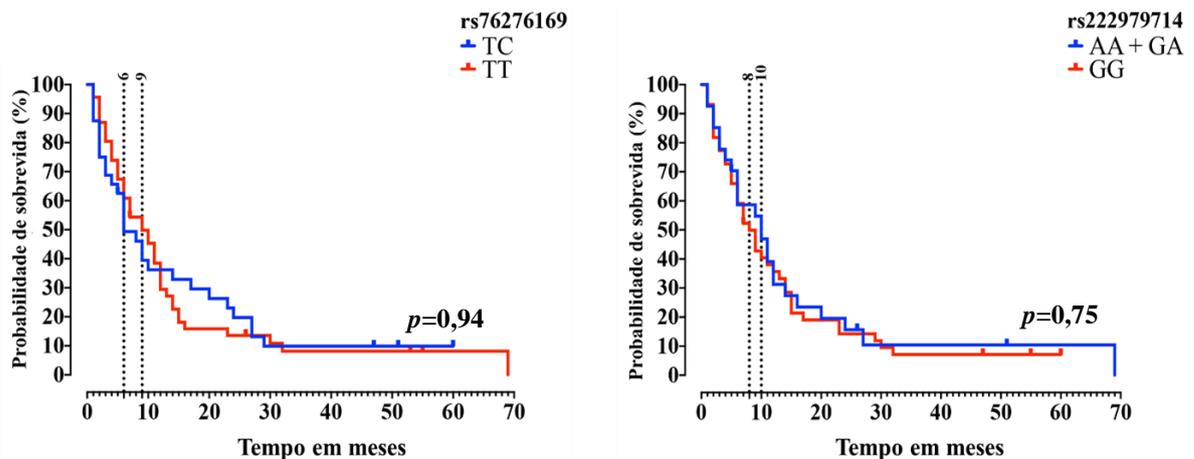


Figura 7 Representação gráfica da curva de sobrevida de 101 pacientes com glioblastoma (GBM) considerando os diferentes genótipos das variantes gênicas de base única (SNVs) rs76276169 e rs2229714 nos genes *PARG* e *RSKI*, respectivamente. **A)** Probabilidade de sobrevida dos pacientes com GBM para a SNV rs76276169. A linha em vermelho representa os pacientes portadores do genótipo selvagem (TT) e em azul os pacientes portadores do genótipo heterozigoto (TC). As linhas tracejadas 6 e 9 representam o tempo em que 50% dos pacientes evoluíram para óbito de acordo com os genótipos (TC) e (TT) respectivamente. Não houve associação estatística significativa dos diferentes genótipos ao tempo de sobrevida dos pacientes com GBM. **B)** Probabilidade de sobrevida dos pacientes com GBM para a SNV rs2229714. A linha em vermelho representa os pacientes portadores do genótipo selvagem (GG) e em azul os pacientes portadores do genótipo heterozigoto (GA) mais pacientes portadores do genótipo variante (AA). As linhas tracejadas 8 e 10 representam o tempo em que 50% dos pacientes evoluíram para óbito de acordo com os genótipos (AA+GA) e (GG), respectivamente. Não houve associação estatística significativa dos diferentes genótipos ao tempo de sobrevida dos pacientes com GBM. As análises de sobrevida foram realizadas utilizando o teste estatístico log-rank

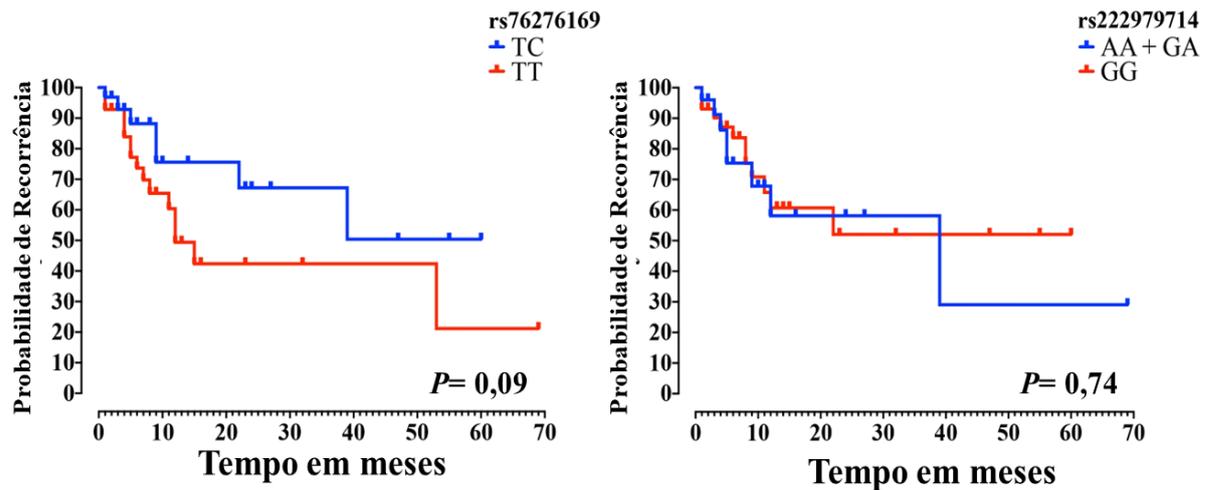


Figura 8 Representação gráfica da curva de sobrevida livre de recidiva de 101 pacientes com glioblastoma (GBM) considerando os diferentes genótipos das variantes gênica de base única (SNVs) rs76276169 e rs2229714 nos genes *PARG* e *RSKI*, respectivamente. **A)** Probabilidade de recorrência da doença em pacientes com GBM para a SNV rs76276169. A linha vermelha representa a probabilidade de recorrência da doença nos pacientes portadores do genótipo selvagem (TT) e em azul os pacientes portadores do genótipo heterozigoto (TC). Não houve associação estatística significativa dos diferentes genótipos em relação à recorrência do GBM. **B)** Probabilidade de recorrência da doença em pacientes com GBM para a SNV rs2229714. A linha vermelha representa a probabilidade de recorrência da doença nos pacientes portadores do genótipo selvagem (GG) e em azul os pacientes portadores do genótipo heterozigoto (GA ou AA). Não houve associação estatística significativa dos diferentes genótipos em relação à recorrência do GBM.

4.9. Caracterização química dos extratos de SJ e SJ-b

Inicialmente, os gráficos de pontuação do sinal utilizável total (TUS) e da análise de componentes principais (PCA) foram usados para avaliar os dados e a integridade. Os gráficos TUS e PCA, que representam o número total de regiões de características moleculares plotadas contra a ordem de injeção, são mostrados nas Figuras 9A e 9B, respectivamente. A distribuição de pontos ilustra que, em contraste com as amostras testes (pontos azuis), as amostras controles de qualidade (QC) foram notavelmente estáveis ao longo da análise (pontos vermelhos). O gráfico demonstra as pontuações de PCA de dados obtidos de três réplicas de amostras de testes em 4, 6 e 8 horas de reação. As réplicas analíticas das amostras de QC enriquecidas foram agrupadas no centro do gráfico de pontuação do PCA e demonstraram baixa variabilidade instrumental e alta qualidade analítica.

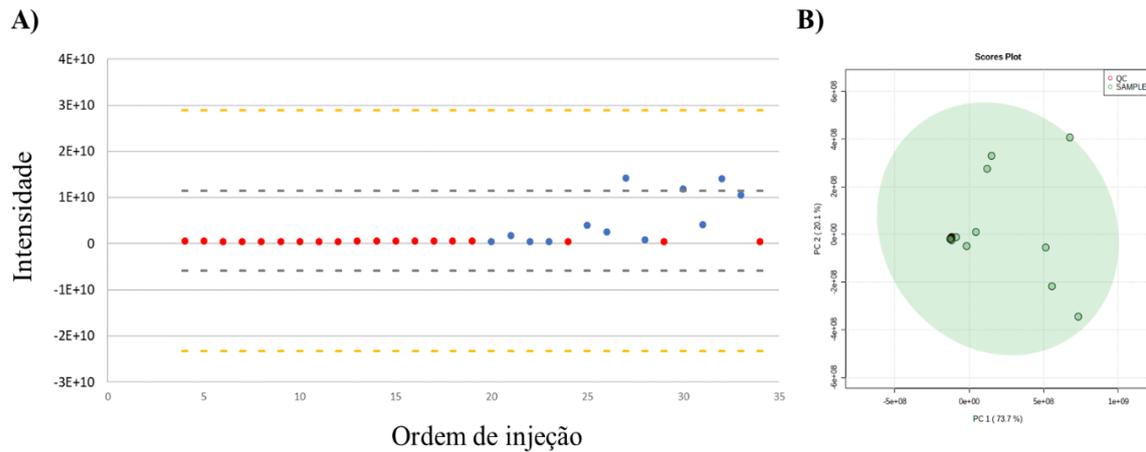


Figura 9 Caracterização química dos extratos de *Sophora japonica* (SJ) e SJ biomodificada (SJ-b). **A)** Variação na composição química dos extratos durante a análise por UPLC-QTOF-MSE (A) Sinal Útil Total (TUS). **B)** Gráficos de pontuação PCA de amostras de controle de qualidade (QC) (pontos vermelhos) e amostras de teste (pontos verdes).

Na Tabela 12 estão apresentados 26 compostos identificados por UHPLC-Q-TOF-MSE que foram alterados com hidrólise enzimática. A maioria desses flavonóides identificados estava presente como derivados de glicosídeos que eram formas conjugadas de açúcar. A ligação glicosídica está normalmente localizada na posição 3 ou 7, e a unidade de carboidrato é geralmente de ramnose, glicose e galactose. Mais complexos oligossacarídeos de KPF (Kaempferol-3-Galactoside-6"-Rhamnoside-3"-Rhamnoside, Kaempferol-3-O-glucoside-3"-ramnosídeo, Kaempferol-3-O-ramnosídeo-7-O -ramnosídeo e Kaempferol 3-O-soforosídeo) e outros glicosídeos de quercetina foram significativamente reduzidos após 8h de hidrólise enzimática. Além disso, algumas agliconas como KPF, apigenina, daidzeína e quercetina tendem a aumentar devido à hidrólise enzimática.

Tabela 12 Identificação de 26 compostos presentes no extrato de *Saphora japonica* após hidrólise enzimática

Continua

	Características	Identificação	Fórmula	Adducts	Modo ionizante	Tendência
1	2.04_595.1563m/z	<i>Quercetina-3,7-O-α-L-dirhamnosídeo</i>	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	M+H	+	<i>DOWN</i>
2	2.16_741.2171m/z	<i>Kaempferol-3-Galactosídeo-6''-Rhamnosídeo-3'''-Rhamnosídeo^a</i>	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₉	M+H	+	<i>DOWN</i>
3	2.35_595.1632m/z	<i>Kaempferol-3-O-glucosídeo-3''-rhamnosídeo^{b,c**}</i>	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	M+H	+	<i>DOWN</i>
4	2.39_615.1052m/z	<i>Kaempferol-3-O-rhamnosídeo-7-O-rhamnosídeo^b</i>	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	M+K-2H	-	<i>DOWN</i>
5	2.44_609.1464m/z	<i>Kaempferol 3-O-sophorosídeo^{d*}</i>	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	M-H	-	<i>DOWN</i>
6	2.46_255.0672m/z	<i>Daidzeína</i>	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	M+H-2H ₂ O	+	<i>UP</i>
7	2.53_755.2084m/z	<i>Quercetina-3-O-α-L-rhamnopyranosil(1-2)-β-D-glucopyranosil-7-O-α-L-rhamnopyranosil</i>	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀	M-H	-	<i>DOWN</i>
8	2.54_477.0638m/z	<i>Quercetina 3-glucuronídeo</i>	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃	M-H	-	<i>DOWN</i>
9	2.55_473.1010m/z	<i>flavanomareína</i>	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	M+Na	+	<i>UP</i>
10	2.75_299.0516m/z	<i>Isorhamnetina</i>	C ₁₄ H ₁₂ O ₆	M+Na	+	<i>UP</i>
11	2.77_455.0965m/z	<i>Genisteína 7-O-glucosídeo</i>	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	M+Na	+	<i>UP</i>
12	3.22_359.0732m/z	<i>5-ácido cafeilquínicos</i>	C ₁₆ H ₁₆ O ₈	M+Na	+	<i>UP</i>
13	3.27_431.0949m/z	<i>Kaempferol 3-O-galactosídeo^a</i>	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	M+H-H ₂ O	+	<i>DOWN</i>
14	3.30_370.0882m/z	<i>Galocatequina</i>	C ₁₆ H ₁₇ N ₃ O ₄ S	M+Na	+	<i>UP</i>
15	3.36_391.0328m/z	<i>Ácido clorogênico</i>	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	M-H	-	<i>UP</i>
16	3.36_407.0710m/z	<i>Galato de epicatequina</i>	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀	M+H-2H ₂ O	+	<i>UP</i>
17	3.37_433.1128m/z	<i>Kaempferol-3-O-rhamnosídeo^a</i>	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	M+H	+	<i>DOWN</i>
18	3.44_431.0935m/z	<i>Kaempferol 3-glucosídeo^a</i>	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₀	M+H	+	<i>UP</i>

Tabela 12 Identificação de 26 compostos presentes no extrato de *Saphora japonica* após hidrólise enzimática

						<i>Conclusão</i>
19	3.70_270.0504n	<i>Apigenina</i>	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	M+H- H ₂ O	+	<i>UP</i>
20	3.71_271.0948m/z	<i>Medicarpine</i>	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	M+H	+	<i>UP</i>
21	3.87_317.0649m/z	<i>Quercetina 4'-metil eter</i> (<i>Tamarixetina</i>)	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	M+H	+	<i>UP</i>
22	4.50_609.1555m/z	<i>Rutina</i> ^{**}	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	M-H	-	<i>DOWN</i>
23	4.17_495.1275m/z	<i>Catequina</i>	C ₂₄ H ₂₄ O ₁₀	M+Na	+	<i>UP</i>
24	4.83_271.0577m/z	<i>Genisteina</i>	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	M+H	+	<i>UP</i>
25	5.74_302.0400n	<i>Quercetina</i>	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	M+H- H ₂ O	+	<i>UP</i>
26	6.51_285.0409m/z	<i>Kaempferol</i>	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	M-H	-	<i>UP</i>

^a também identificado no modo negativo; ^b MSI nível 3; ^c ou Kaempferol-3-O-galactosídeo-7-O-ramnosídeo; ^d *p*-valor obtido após análise estatística Pattern-Hunter. Para todas as comparações, *P*-valor < 0,05, exceto para * em que *P* valor < 0,1 e ** *P* valor < 0,5.

Embora o extrato biomodificado contenha uma variedade de outros flavonóides em menores quantidades, conforme mostrado na tabela acima, sua composição química é composta principalmente por KPF (aproximadamente 65%), sendo 43% como KPF aglicona (pico iv) e 21% como KPF-O -glicosídeo (pico i), além de rutina (pico ii) e quercetina (pico iii) (Figura 10A). Os compostos que apresentaram menos de 1% das abundâncias foram retirados para o cálculo.

O espectro de massa mostra as abundâncias relativas dos íons no eixo y: KPF aglicona (a, m/z 287.055), bem como seus outros análogos glicosilados que variam de Kaempferol-3-O-ramnosídeo (b, m/z 433.113), com uma porção glicosil, para os complexos mais KPF-3-O-glicosídeo-3"-ramnosídeo (c, m/z 595.163) e KPF -3-Galactosídeo-6"-Rhamnosídeo-3"' - Rhamnosídeo (d, m/z 741.216) (Figura 10B).

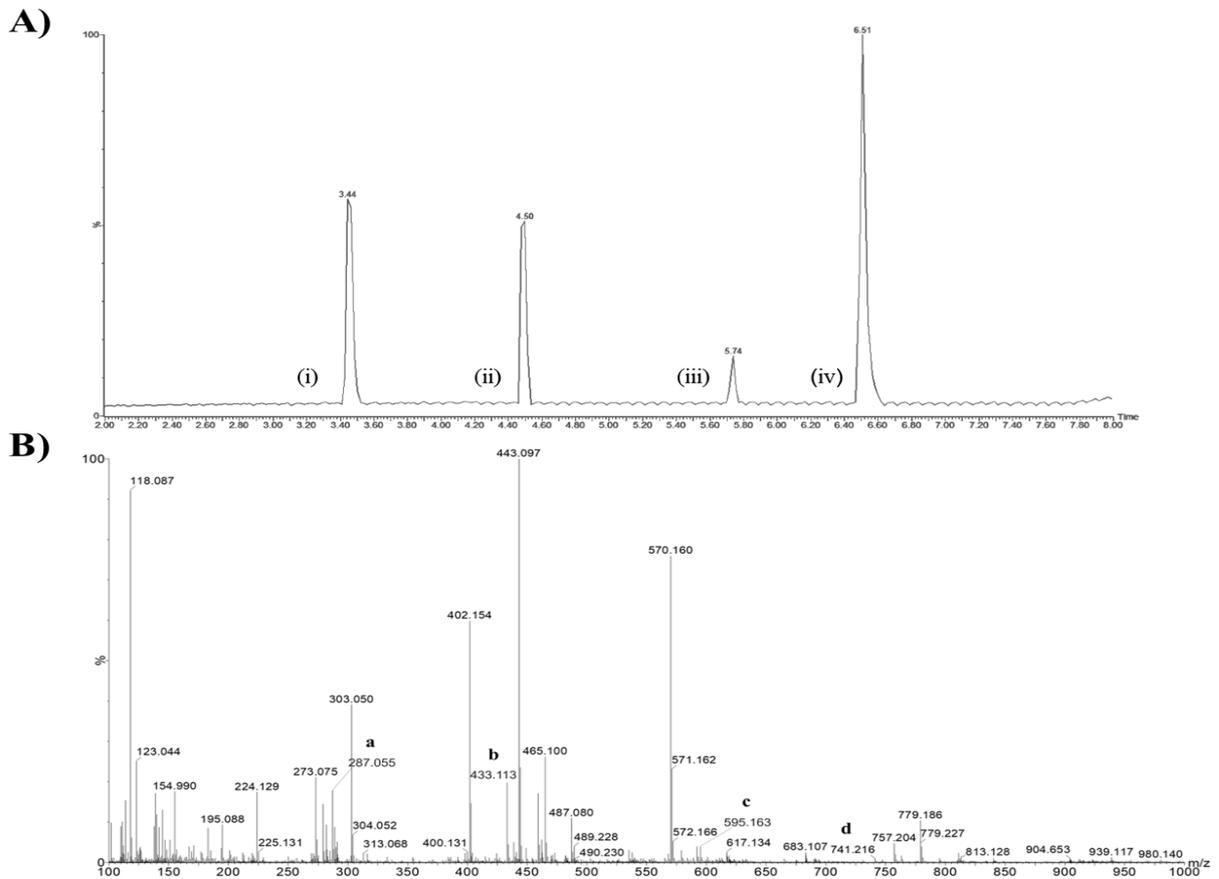


Figura 10. Caracterização química dos extratos de *Sophora japonica* antes (SJ) e após a reação de bioconversão (SJ-b). A) Cromatograma dos compostos majoritários do extrato de *Sophora japonica* após a reação enzimática. Picos: KPF-O-glicosídeo (i), Rutina (ii), Quercetina (iii) e KPF aglicona (iv). B) Espectro de massa e estruturas químicas da aglicona KPF (a, m/z 287,055); Kaempferol-3-O-ramnosídeo (b, m/z 433,113), KPF-3-O-glicosídeo-3"-ramnosídeo (c, m/z 595,163) e KPF -3-Galactoside-6"-Rhamnosídeo- 3"-Rhamnoside (d, m/z 741.216).

4.10 Caracterização biológica do extrato vegetal de SJ e SJ-b

4.10.1. Comparação do efeito citotóxico do extrato vegetal de SJ e SJ-b em linhagem celular não tumoral

Para avaliar se os extratos vegetais de SJ e SJ-b apresentam ação citotóxica em células não tumorais, foi realizado o ensaio MTT com a linhagem celular de fibroblasto dérmico, HDFa. O extrato de SJ foi avaliado em três tempos de exposição (24, 48 e 72h), utilizando diferentes concentrações seriadas (0, 20, 50, 150, 250, 350, e 500 μ M), sendo observado evidente redução na viabilidade celular principalmente na concentração de 250 μ M após 72h de exposição; embora, as células apresentaram viabilidade celular acima de 60% em todos os tempos e concentrações avaliados (Figura 11A). Os mesmos tempos e concentrações citados acima foram utilizados para a avaliação do extrato de SJ-b, sendo observado evidente redução

da viabilidade celular nas concentrações entre 20-250 μM , após 72h de exposição. As células apresentaram viabilidade celular acima de 50% em todos os tempos e concentrações avaliadas (Figura 11B). Resumidamente, não foi observado declínio significativo da viabilidade celular em uma linhagem celular não tumoral exposta aos extratos de SJ e SJ-b.

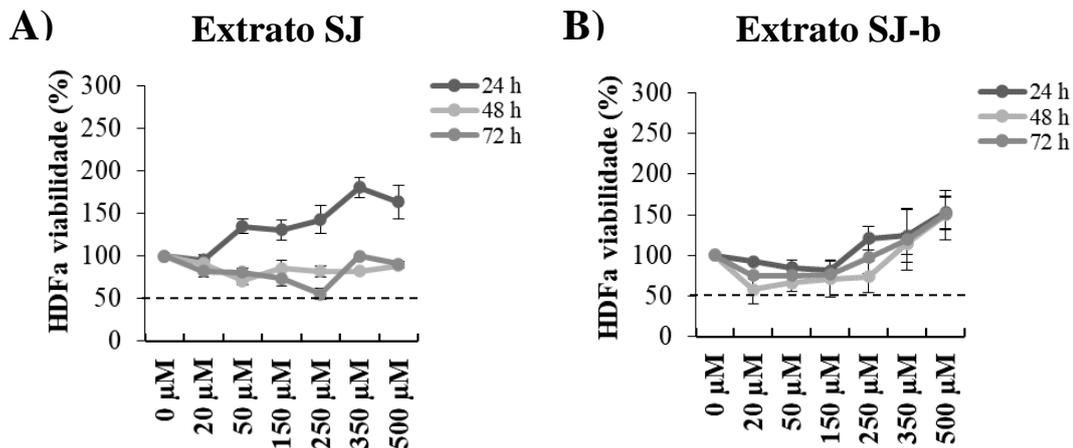


Figura 11 Linhagem celular de fibroblastos dérmicos humano adulto, HDFa exposta aos extratos vegetais de *Sophora japonica* (SJ) ou *Sophora japonica* biomodificada (SJ-b). **A)** HDFa expostas com 20, 50, 150, 250, 350 e 500 μM de extrato vegetal de SJ por 24, 48 e 72 horas. **B)** HDFa exposta ao extrato de SJ-b nas mesmas concentrações e tempos utilizados para avaliar o efeito citotóxico da SJ. A concentração de 0 μM indicam as células controles não expostas aos extratos. Os valores de viabilidade estão apresentados com média \pm desvio padrão para cada concentração avaliada.

4.10.2. Comparação do efeito antitumoral dos extratos vegetais de SJ e SJ-b nas linhagens celulares de gliomas de alto grau

Para avaliar o efeito citotóxico dos extratos vegetais de SJ e SJ-b, as linhagens celulares NG-97 e U251 foram expostas a diferentes concentrações (0, 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800 e 2000 μM) e tempos (24, 48 e 72 h) dos referidos compostos. Alterações morfológicas sugestivas de apoptose, como a diminuição do volume celular e a perda da característica de aderência e do aspecto fusiforme, tornando-se arredondadas, foram observadas nas células expostas aos extratos de SJ ou SJ-b nas concentrações acima de 600 μM , após 48 h de exposição (Figuras 12A e 12B e Figuras 13A e 13B).

Após 72 h de exposição foi observado uma redução significativa da viabilidade celular em ambas as linhagens expostas aos extratos vegetais de SJ ou SJ-b. Assim, a concentração inibitória de 50% (IC50) observada nas células NG-97 expostas aos extratos de SJ ou SJ-b

foram de 800 μM (Figura 12C) e 600 μM (Figura 12D), respectivamente. Entretanto, a IC50 observada nas células U251 expostas a SJ ou SJ-b foi de 1800 μM para ambos os extratos (Figuras 13C e 13D). As concentrações IC50 identificadas pelo ensaio MTT foram utilizadas em todos os outros experimentos propostos.

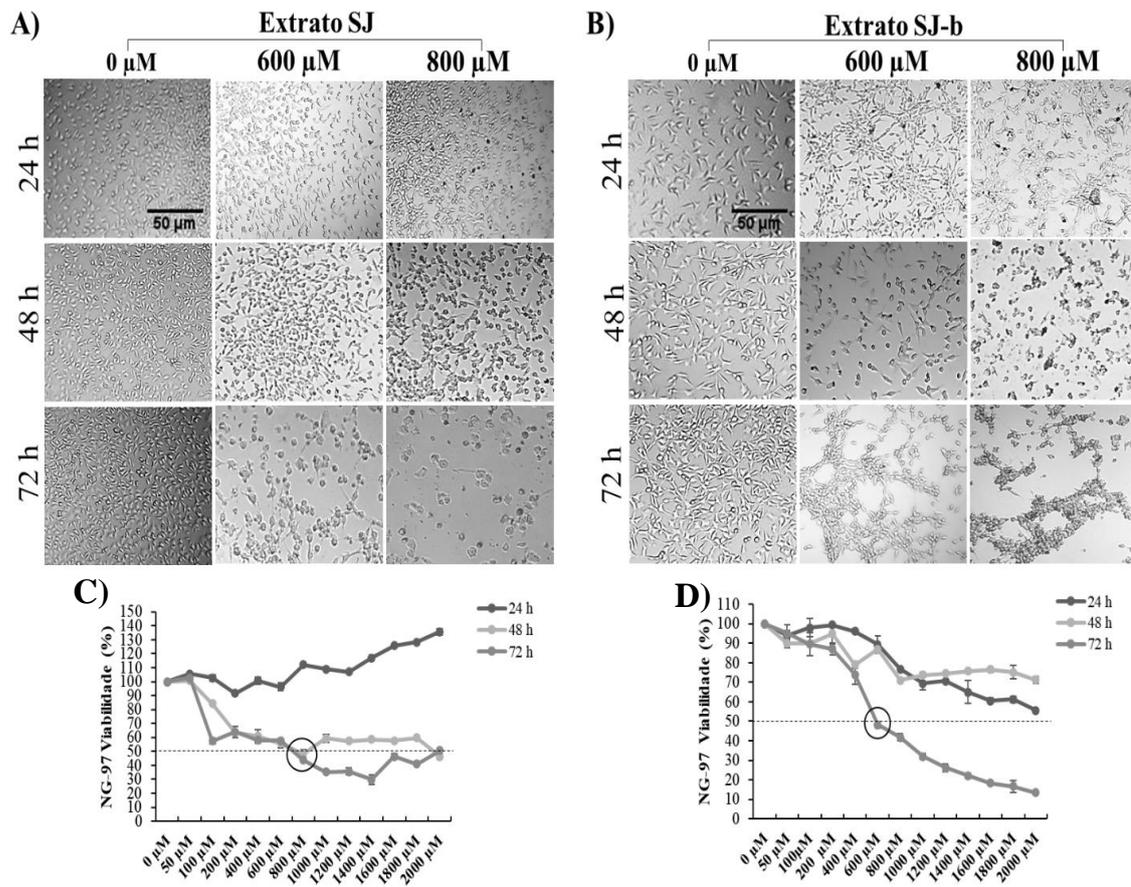


Figura 12: Linhagem celular de glioma grau III (NG-97) exposta aos extratos vegetais de *Sophora japonica* (SJ) e *Sophora japonica* biomodificada (SJ-b). **A)** Alterações morfológicas observadas na linhagem NG-97 exposta ao extrato vegetal de SJ nas concentrações de 600 μM e 800 μM por 24, 48 e 72 horas. **B)** Alterações morfológicas observadas na linhagem NG-97 exposta ao SJ-b nas concentrações de 600 μM e 800 μM por 24, 48 e 72 horas. **C)** NG-97 exposta a diferentes concentrações seriadas (50-2000 μM) de extrato vegetal de SJ por 24, 48 e 72 horas. **D)** NG-97 exposta ao extrato vegetal de SF-b, nas mesmas concentrações e tempos utilizados para avaliar a citotoxicidade da SF. A concentração de 0 μM indica células controles não expostas aos extratos e o valor da escala apresentada aplica-se para todas as fotos representativas da figura. Os valores de viabilidade estão apresentados com média \pm desvio padrão para cada concentração avaliada.

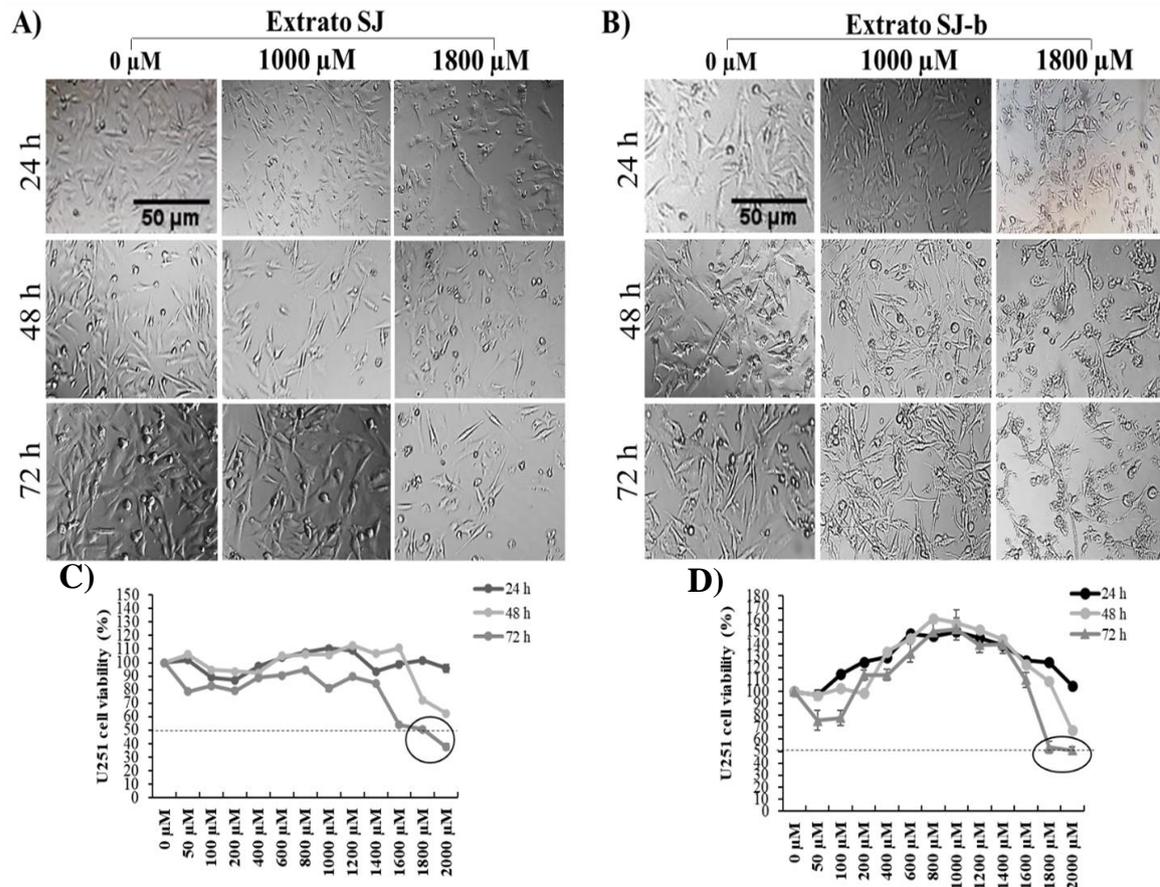


Figura 13: Linhagem celular de Glioblastoma (U251) exposta aos extratos vegetais de *Sophora japonica* (SJ) e *Sophora japonica* biomodificada (SJ-b). A) Alterações morfológicas observadas na linhagem U251 exposta ao extrato vegetal de SJ nas concentrações de 1000 e 1800 µM por 24, 48 e 72 horas. B) Alterações morfológicas observadas na linhagem U251 exposta ao extrato vegetal de SJ-b nas concentrações de 1000 e 1800 µM por 24, 48 e 72 horas. C) U251 exposta a diferentes concentrações seriadas do de SJ (50-2000 µM) por 24, 48 e 72 horas. D) U251 exposta a diferentes concentrações seriadas do extrato de SJ-b (50-2000 µM) por 24, 48 e 72. A concentração de 0 µM indica células controles não expostas aos extratos e o valor da escala apresentada aplica-se para todas as fotos representativas da figura. Os valores de viabilidade estão apresentados com média ± desvio padrão para cada concentração avaliada.

4.10.3. Efeito antitumoral do extrato de SJ ou SJ-b em associação com TMZ nas linhagens celulares de gliomas de alto grau

As linhagens celulares NG-97 e U251 foram expostas a ação isolada do TMZ em diferentes concentrações, entre 25 µM a 2000 µM, por 24, 48 e 72 h e em associação com 800 µM de extrato vegetal de SJ (NG-97), 600 µM de SJ-b (NG-97) ou 1800 µM de SJ ou SJ-b (U251). Alterações morfológicas, sugestivas de morte celular, foram observadas nas células expostas ao TMZ apenas acima de 1000 µM. Entretanto, alterações morfológicas sugestivas

de apoptose, foram observadas nas células expostas às concentrações acima de 350 μM de TMZ associado aos extratos vegetais de SJ ou SJ-b (Figuras 12A e 13A), indicando sinergismo entre TMZ e os compostos avaliados. Ainda, um efeito mais evidente foi observado nas células expostas ao extrato de SJ-b em comparação com o extrato de SJ.

Redução significativa da viabilidade celular nas concentrações acima de 350 μM de TMZ nos tempos de 48 e 72 h (Figuras 14B e 14C; Figuras 15B e 15C). Em contraste, NG-97 e U251 expostas a TMZ em associação com os extratos de SJ ou SJ-b, apresentaram significativo efeito citotóxico a partir da concentração de 25 μM de TMZ por 48 e 72 h (Figura 14 D, E, F e G e Figura 15 D, E, F e G). É possível também observar uma ação sinérgica mais evidente entre TMZ e o extrato de SJ-b.

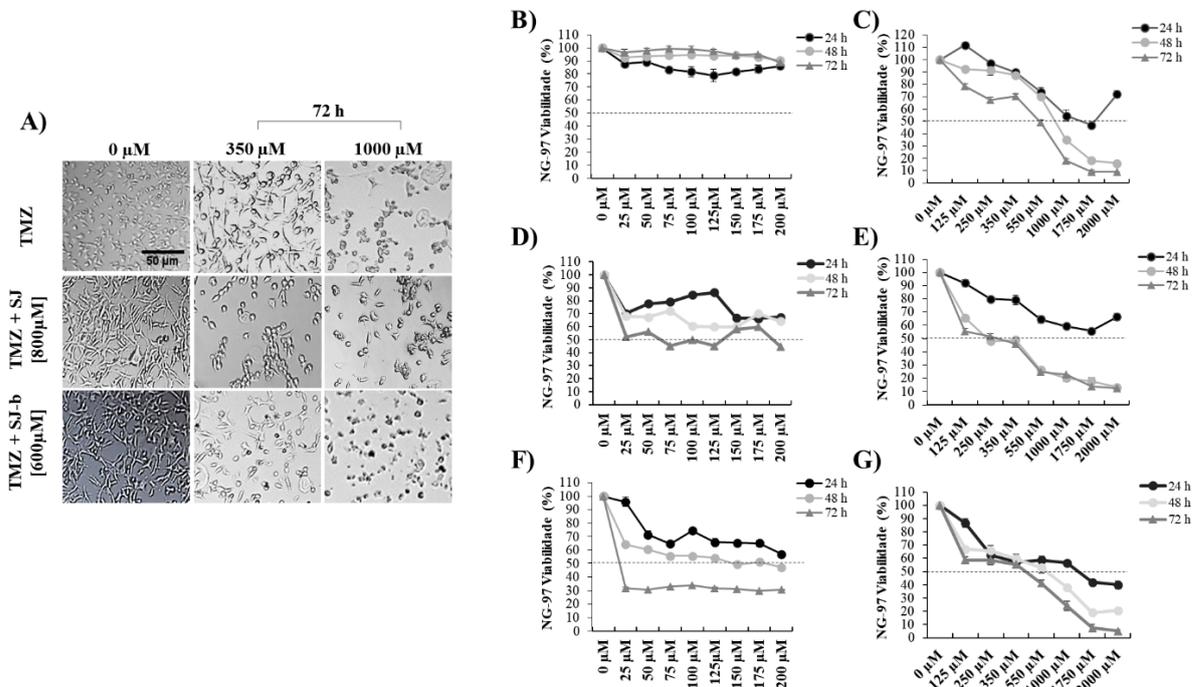


Figura 14: Linhagem celular de glioma grau III (NG-97) exposta ao Temozolamida (TMZ) ou em associação aos extratos de *Sophora japonica* (SJ) e *Sophora japonica* biomodificada (SJ-b). **A)** Alterações morfológicas observadas nas células NG-97 expostas com 350 e 1000 μM de TMZ; TMZ+800 μM de extrato de SJ; TMZ+600 μM de extrato de SJ-b expostas por 72 h. **B)** NG-97 exposta a baixas concentrações de TMZ (25-200 μM) por 24, 48, e 72 h. **C)** NG-97 exposta a altas concentrações de TMZ (250-2000 μM) de TMZ por 24, 48, e 72 h. **D)** NG-97 exposta às baixas concentrações de TMZ (25-200 μM) associadas a 800 μM de extrato de SJ por 24, 48 e 72h. **E)** NG-97 exposta às altas concentrações de TMZ (250-2000 μM) associadas a 800 μM de extrato de SJ por 24, 48 e 72h. **F)** NG-97 exposta às baixas concentrações de TMZ (25-200 μM) associadas a 600 μM de extrato de SJ-b por 24, 48 e 72h. **G)** NG-97 exposta às altas concentrações de TMZ (250-2000 μM) associadas a 600 μM de extrato de SJ-b por 24, 48 e 72h. A concentração de 0 μM indica células controles não expostas aos extratos e o valor da escala apresentada aplica-se para todas as fotos representativas da figura. Os

valores de viabilidade estão apresentados com média \pm desvio padrão para cada concentração avaliada.

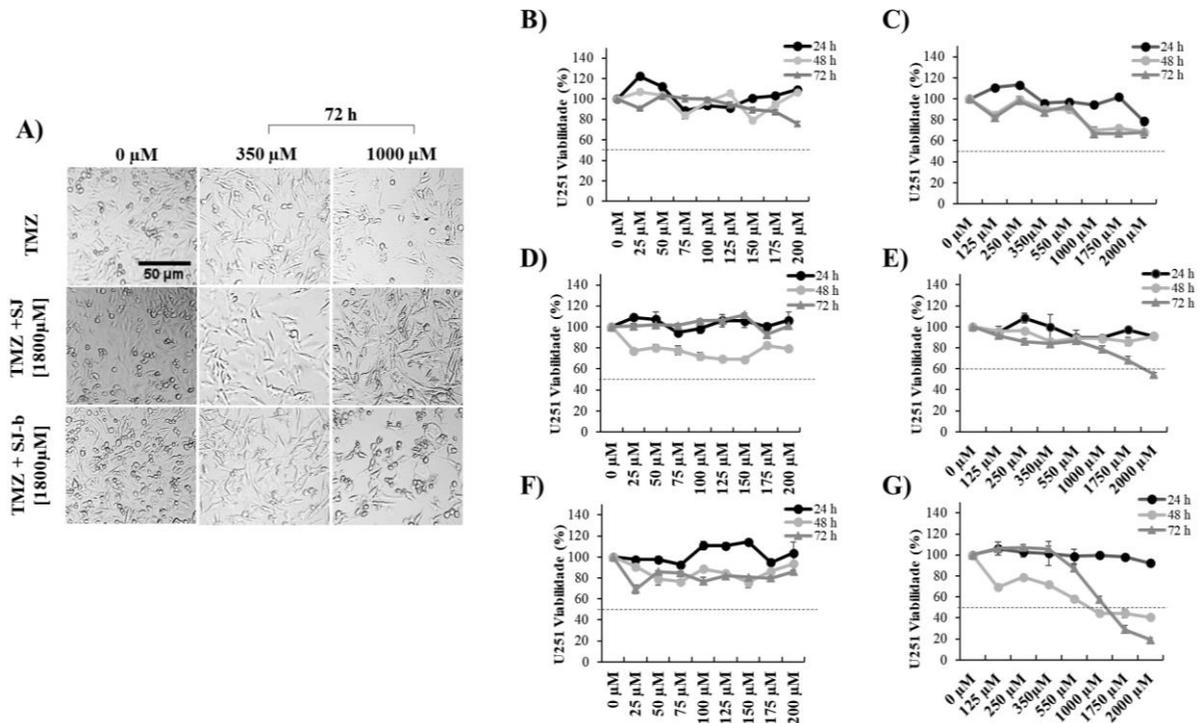


Figura 15: Linhagem celular de glioma grau IV (U251) exposta ao Temozolamida (TMZ) ou em associação aos extratos vegetais de *Sophora japonica* (SJ) e *Sophora japonica* (SJ-b). A) Alterações morfológicas observadas nas células U251 expostas com 350 e 1000 μ M de TMZ; TMZ+800 μ M de extrato de SJ; TMZ+600 μ M de extrato de SJ-b expostas por 72 h. B) U251 exposta a baixas concentrações de TMZ (25-200 μ M) por 24, 48, e 72 h C) U251 exposta a altas concentrações de TMZ (250-2000 μ M) de TMZ por 24, 48, e 72 h. D) U251 exposta às baixas concentrações de TMZ (25-200 μ M) associadas a 1800 μ M de extrato de SJ por 24, 48 e 72h. E) U251 exposta às altas concentrações de TMZ (250-2000 μ M) associadas a 1800 μ M de extrato de SJ por 24, 48 e 72h. F) U251 exposta às baixas concentrações de TMZ (25-200 μ M) associadas a 1800 μ M de extrato de SJ-b por 24, 48 e 72h. G) NG-97 exposta às altas concentrações de TMZ (250-2000 μ M) associadas a 1800 μ M de extrato de SJ-b por 24, 48 e 72h. A concentração de 0 μ M indica células controles não expostas aos extratos e o valor da escala apresentada aplica-se para todas as fotos representativas da figura. Os valores de viabilidade estão apresentados com média \pm desvio padrão para cada concentração avaliada.

4.10.4. Avaliação da migração celular pelo método de WH nas linhagens celulares de gliomas de alto grau

A capacidade migratória das linhagens celulares NG-97 e U251 expostas aos extratos foram avaliadas pelo ensaio de WH. Observou-se que as células expostas aos extratos SJ ou SJ-b apresentaram uma inibição significativa da capacidade de migração, impedindo assim o fechamento da ranhura na monocamada celular durante um período de 72h, diferente das células controles não expostas aos extratos, as quais migraram e promoveram o fechamento completo da ranhura neste mesmo período (Figuras 16 e 17). Os valores de significância do ensaio de migração celular estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 Valores de *P*-valor do ensaio de migração celular apresentados de acordo com as concentrações de cada extrato para os diferentes tempos observados.

Migração celular – <i>P</i>-valor			
	24h	48h	72h
SJ			
NG-97 [800 µM]	3,25x10 ⁻⁰⁶	3,86x10 ⁻⁰⁶	5,3x10 ⁻⁰⁸
U251 [1800 µM]	1,83x10 ⁻⁰⁶	0,002	1,95x10 ⁻⁰⁵
SJ-b			
NG-97 [600 µM]	7,52x10 ⁻⁰⁶	5,45x10 ⁻⁰⁷	1,07x10 ⁻⁰⁶
U251 [1800 µM]	0,012	0,015	5,15x10 ⁻⁰⁷

Os valores de significância foram obtidos através do Teste-T. Valor de $P < 0,05$ evidencia diferença estatística significativa

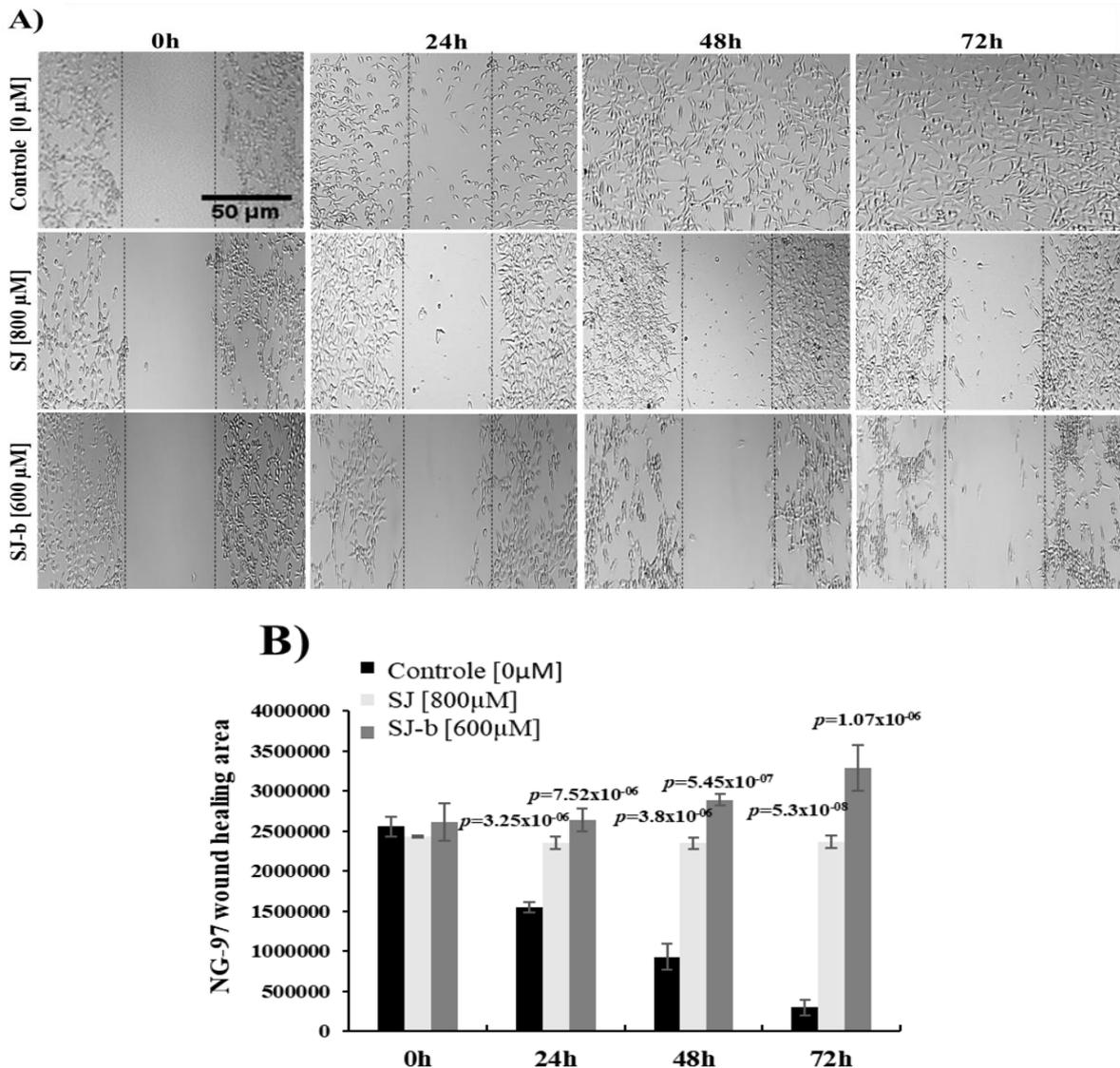


Figura 16: Avaliação da migração celular da linhagem NG-97 exposta ao extrato vegetal da *Sophora japonica* (SJ) e *Sophora japonica* biomodificada (SJ-b). **A)** NG-97 submetida a ranhura (entre linhas pontilhadas) e exposta ao extrato vegetal de SJ (800 μM) ou SJ-b (600 μM) nos tempos de 24, 48 e 72 horas. **B)** Gráfico evidenciando a inibição da migração celular a partir 24 horas após a exposição. A concentração de 0 μM indica células controles não expostas aos extratos e o valor da escala apresentada aplica-se para todas as fotos representativas da figura. Os valores de viabilidade estão apresentados com média ± desvio padrão para cada concentração avaliada e valores de significância foram obtidos através do Teste-T. Valor de $P < 0,05$ evidencia diferença estatística significativa.

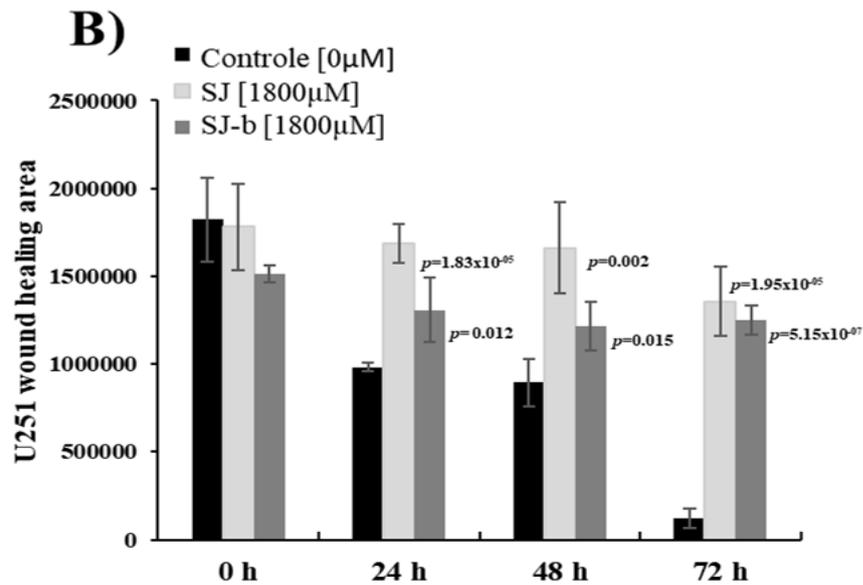
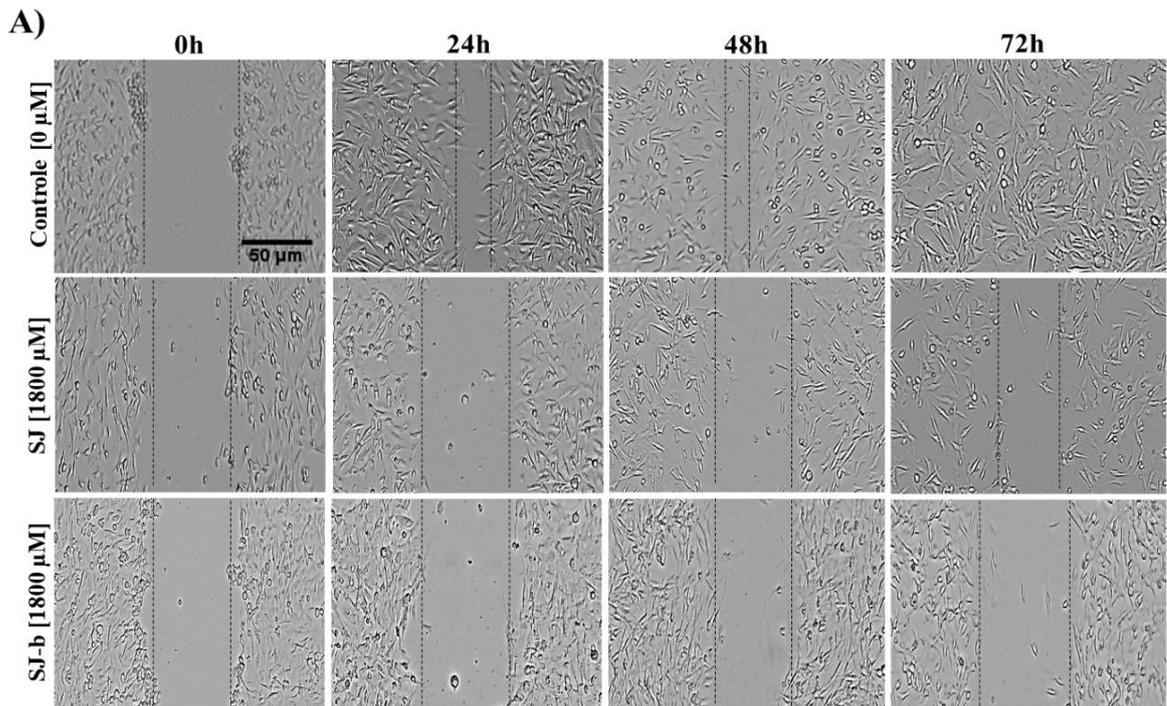


Figura 17: Avaliação da migração celular da linhagem U251 exposta ao extrato vegetal da *Sophora japonica* (SJ) e *Sophora japonica* biomodificada SJ-b. A) U251 submetida a ranhura (entre linhas pontilhadas) e exposta ao extrato vegetal de SJ (1800 μM) ou SJ-b (1800 μM) nos tempos de 24, 48 e 72 horas. B) Gráfico evidenciando a inibição da migração celular a partir 24 horas após a exposição. A concentração de 0 μM indica células controles não expostas aos extratos e o valor da escala apresentada aplica-se para todas as fotos representativas da figura. Os valores de viabilidade estão apresentados com média ± desvio padrão para cada concentração avaliada e os valores de significância foram obtidos através do Teste-T. Valor de $P < 0,05$ evidencia diferença estatística significativa.

Ainda, os extratos SJ e SJ-b atenuaram a migração celular através da modulação do nível de expressão relativa de *MMP-9*, especialmente o extrato SJ-b. Desta forma, a expressão de *MMP-9* foi menor nas linhagens NG-97 e U-251 expostas aos extratos SJ e SJ-b. Além disso, SJ e SJ-b foram capazes de inibir a expressão de *MMP-9* nas células expostas à TPA+SJ-b e TPA+SJ de forma significativa quando comparadas às células expostas apenas com TPA. Entretanto, não houve redução significativa da média de expressão relativa de *MMP-9* nas células expostas aos extratos em associação ao TPA comparado às células controles sem TPA. As expressões relativas do gene *MMP-9* para as linhagens estudadas e os valores de *P*-valor estão apresentados na Tabela 14. A Figura 18 indica a inibição da expressão relativa de *MMP-9* promovida pelos extratos nas linhagens NG-97 e U251.

Tabela 14 Expressão relativa do gene *MMP-9* com desvio padrão e valores de *P*-valor, para as linhagens NG-97 e U251 expostas ao extrato SJ, SJ-b, TPA+SJ ou TPA+SJ-b comparadas a células controles com e sem TPA.

<i>MMP-9</i>			
	Expressões relativas	Desvio Padrão (DP)	<i>P</i> -valor
NG-97			
Controle	1,02	0,23	Ref.
SJ	0,53	0,01	0,02
SJ-b	0,32	0,27	0,03
TPA	1,84	0,66	Ref.
TPA+SJ-b	0,60	0,32	0,04
TPA	0,57	0,05	0,02
Controle	1,02	0,23	Ref.
TPA+SJ-b	0,60	0,32	0,14
TPA+SJ	0,57	0,05	0,30
U251			
Controle	1,03	0,32	Ref.
SJ	0,36	0,04	0,02
SJ-b	0,80	0,04	0,3
TPA	4,50	0,57	Ref.
TPA+SJ-b	0,82	0,06	0,0003
TPA	1,42	0,28	0,001
Controle	1,03	0,32	Ref.
TPA+SJ-b	0,82	0,06	0,32
TPA+SJ	1,42	0,28	0,19

Ref.: Referência; SJ: *Sophora japonica*; SJ-b: *Sophora japonica* biomodificada; TPA: 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato. Os dados estão apresentados com média \pm desvio padrão e os valores de significância foram obtidos através do Teste-T. Valor de $P < 0,05$ evidencia diferença estatística significativa.

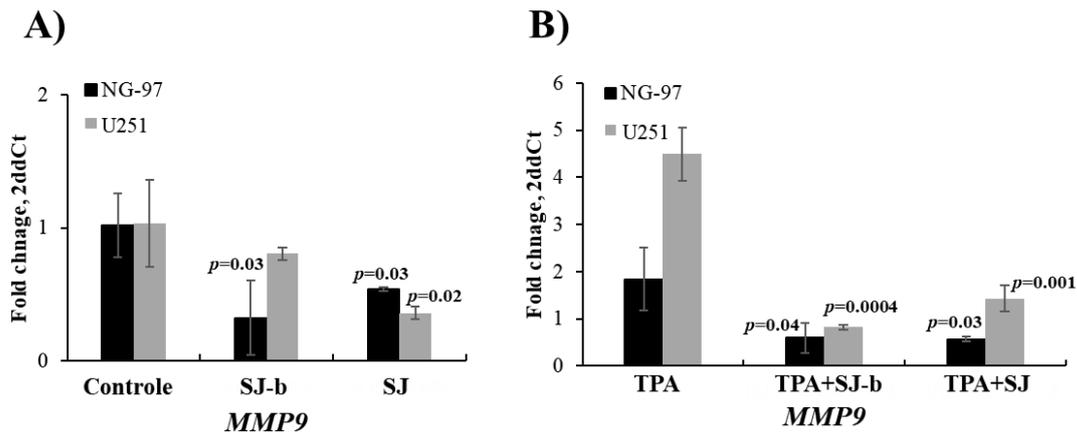


Figura 18 Avaliação da migração celular através da modulação do gene *MMP9* pelos extratos de *Sophora japonica* (SJ) e *Sophora japonica* biomodificada (SJ-b) nas linhagens NG-97 e U251. **A)** Redução no nível de expressão relativa de *MMP9*, principalmente na linhagem NG-97 em comparação com células controles não expostas aos extratos. **B)** Inibição significativa no nível de expressão relativa de *MMP9* nas linhagens NG-97 e U251 expostas à TPA plus SJ ou TPA plus SJ-b em comparação com células tratadas apenas com TPA. Os dados estão apresentados com média \pm desvio padrão e os valores de significância foram obtidos através do Teste-T. Valor de $P < 0,05$ evidencia diferença estatística significativa.

4.10.5. Avaliação da proliferação celular das linhagens de gliomas de alto grau expostas aos extratos vegetais de SJ e SJ-b

A ação antiproliferativa dos extratos vegetais de SJ e SJ-b foi avaliada pelo ensaio de proliferação celular por 5 dias com as linhagens NG-97 e U251. Desta forma, foi observado inibição da proliferação celular significativa nas células expostas ao extrato de SJ ou SJ-b. Além disso, o número de células coradas pelo corante azul de tripan foi maior nas células expostas aos extratos, comparado às células controles. Nas Figuras 19A, B, C e D é possível observar a curva indicativa da média de proliferação das células expostas aos extratos em comparação às células controles. Na Tabela 15 está apresentado os valores de significância para as diferentes concentrações dos extratos em diferentes tempos de exposição das células NG-97 e U251.

Tabela15 Diferenças significativas da proliferação celular das células expostas aos extratos comparadas às células controles.

Proliferação celular – P-valor					
SJ	24h	48h	72h	96h	120h
NG-97 [800 µM]	$4,00 \times 10^{-04}$	$2,40 \times 10^{-07}$	$1,16 \times 10^{-05}$	$4,11 \times 10^{-06}$	$5,65 \times 10^{-07}$
U251 [1800 µM]	$8,90 \times 10^{-06}$	$5,58 \times 10^{-11}$	$2,40 \times 10^{-11}$	$6,57 \times 10^{-17}$	$7,58 \times 10^{-16}$
SJ-b					
NG-97 [600 µM]	0,0063	$1,08 \times 10^{-05}$	$2,04 \times 10^{-06}$	$3,96 \times 10^{-07}$	$7,19 \times 10^{-09}$
U251 [1800 µM]	0,016	$2,64 \times 10^{-04}$	$1,02 \times 10^{-04}$	$8,95 \times 10^{-06}$	$1,93 \times 10^{-07}$

SJ: *Sophora japonica*; SJ-b: *Sophora japonica* biomodificada. Os valores de significância foram obtidos através do Teste-T. Valor de $P < 0,05$ evidencia diferença estatística significativa.

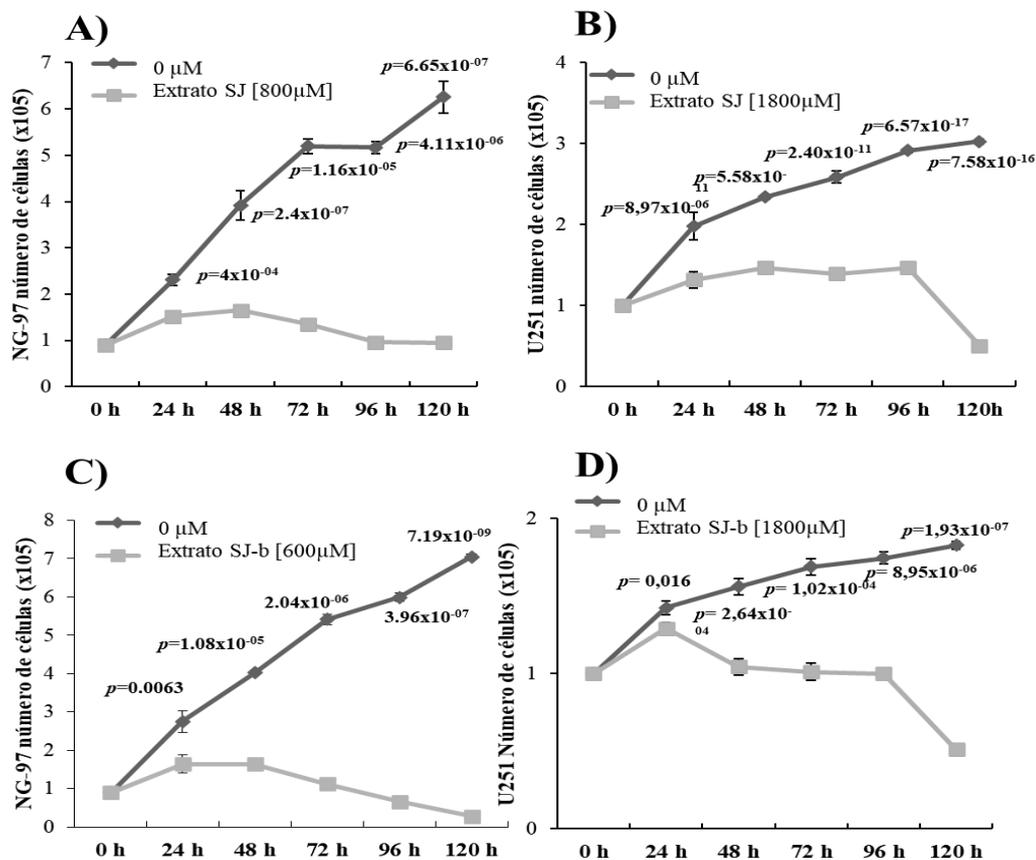


Figura 19 Inibição da proliferação celular pelos extratos vegetais de *Sophora japonica* (SJ) e *Sophora japonica* biomodificada (SJ-b) nas linhagens celulares NG-97 e U251. **A)** Inibição da proliferação celular nas células NG-97 expostas a 800 µM de extrato de SJ. **B)** Inibição da proliferação celular nas células U251 expostas a 1800 µM de extrato de SJ. **C)** Inibição da proliferação celular nas células NG-97 expostas a 600 µM de extrato de SJ-b. **D)** Inibição da proliferação celular nas células U251 expostas a 1800 µM de extrato de SJ-b. A concentração de 0 µM indicam as células controles não expostas aos extratos. Os dados estão apresentados com média \pm desvio padrão e os valores de significância foram obtidos através do Teste-T. Valor de $P < 0,05$ evidencia diferença estatística significativa.

Além disso, as análises por citometria de fluxo comprovaram que os extratos avaliados agiram no ciclo celular. O número de células marcadas pelo intercalante de DNA, iodeto de propídeo, na fase S e G2M foi significativamente maior nas células expostas aos extratos SJ ou SJ-b comparado às células controles não expostas aos extratos. Esse resultado pode ser melhor observado na linhagem U251 (Figura 20). Na Tabela 16 está descrito o percentual de células marcadas pelo iodeto de propídeo em cada fase do ciclo celular juntamente com os valores *P*-valor.

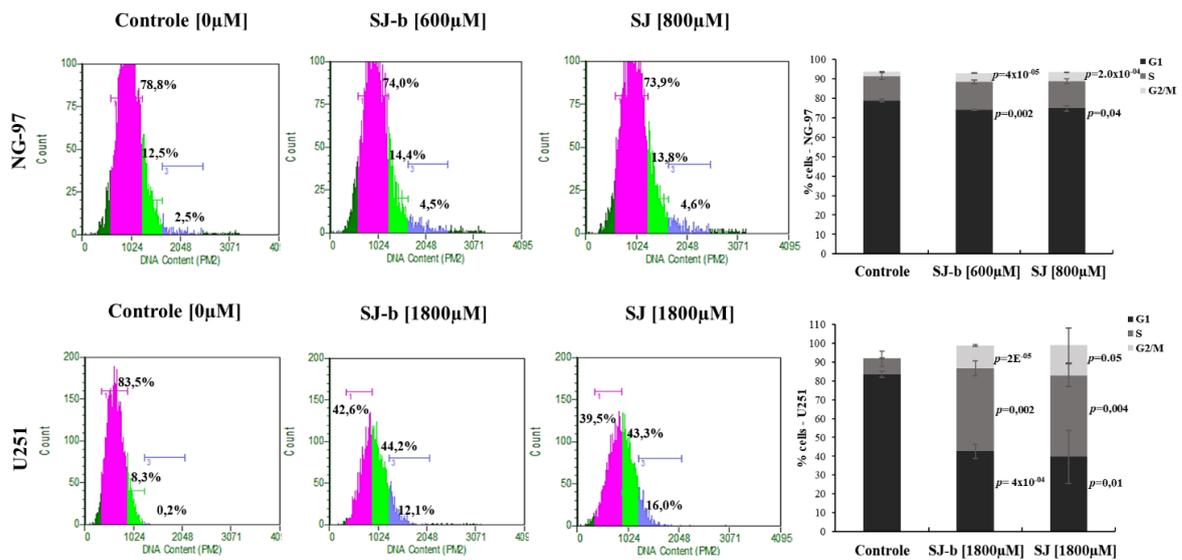


Figura 20 Parada do ciclo celular pelos extratos vegetais de *Sophora japonica* (SJ) e *Sophora japonica* biomodificada (SJ-b) nas linhagens celulares NG-97 e U251. O histograma superior é representativo de um ensaio demonstrando as porcentagens de cada fase do ciclo celular na linhagem celular de glioma grau III (NG-97) controle, expostas aos extratos de SJ-b ou à SJ [G1 (78,80%, 74,00% e 74,93%), S (12,5%, 14,37% e 13,83%) e G2/M (2,45%, 4,53% e 4,57%)], respectivamente. O histograma inferior é representativo de um ensaio demonstrando as porcentagens de cada fase do ciclo celular na linhagem celular de glioblastoma (U251) controle, expostas aos extratos de SJ-b ou à SJ [G1 (83,50%, 42,55% e 39,54%), S (8,30%, 44,20% e 43,30%) e G2/M (0,17%, 12,10% e 16,00%)], respectivamente. A concentração de 0 μM indica as células controles não expostas aos extratos. Os dados estão apresentados com média ± desvio padrão e os valores de significância foram obtidos através do Teste-T. Valor de $P < 0,05$ evidencia diferença estatística significativa.

Tabela 16 Percentual médio de células marcadas pelo intercalante de DNA iodeto de propídeo em cada fase do ciclo celular e os respectivos valores de significância (*P*-valor).

	Parada do ciclo celular			Valores de significância		
	Percentual			<i>P</i> -valor (G1)	<i>P</i> -valor (S)	<i>P</i> -valor G2/M
NG-97	G1	S	G2/M			
Controle	78,8%	12,5%	2,5%	Ref.	Ref.	Ref.
SJ [800 µM]	73,9%	13,8%	4,6%	0,02	0,04	2,0x10⁻⁴
SJ-b [600 µM]	4,6%	14,4%;	4,5%	0,02	0,002	4x10⁻⁵
U251						
Controle	83,5%;	8,3%;	0,2%	Ref.	Ref.	Ref.
SJ [1800 µM]	39,5%,	43,3%;	16,0%	0,01	0,004	0,05
SJ-b [1800 µM]	42,6%,	44,2%	12,1%	4x10⁻⁴	0,002	2x10⁻⁵

Ref.: células controles não expostas aos compostos utilizadas como referência para as análises estatísticas. Os valores de significância foram obtidos através do Teste-T. Valor de $P < 0,05$ evidencia diferença estatística significativa.

4.10.6. Avaliação do efeito pró-apoptótico do extrato vegetal de SJ e SJ-b nas linhagens de gliomas de alto grau

Foi observado que a célula U251 quando exposta ao extrato de SJ não apresentou um nível de fragmentação do DNA evidente em comparação com as células expostas ao extrato de SJ-b. Em contraste, SJ-b causou uma fragmentação do DNA perceptível nas células NG-97 (concentração de 600 µM) e U251 (Figuras 21A e 21B).

De fato, a análise do efeito apoptótico pelo ensaio de citometria de fluxo indicou que SJ e SJ-b induziram significativamente a externalização da proteína fosfatidilserina presente na membrana celular, facilitando o reconhecimento das células apoptóticas por macrófagos. As células expostas aos extratos apresentaram uma taxa de externalização da fosfatidilserina de [NG-97: SJ (39,16% vs. 8,26%; P -valor=0,05); SJ-b (28,56% vs. 8,26%; P -valor=0,03); [U251: SJ (18,50% vs. 4,90%; P -valor=0,05); SJ-b (10,96% vs. 4,90%; P -valor=0,006) em comparação com células controles não expostas aos extratos (Figura 22).

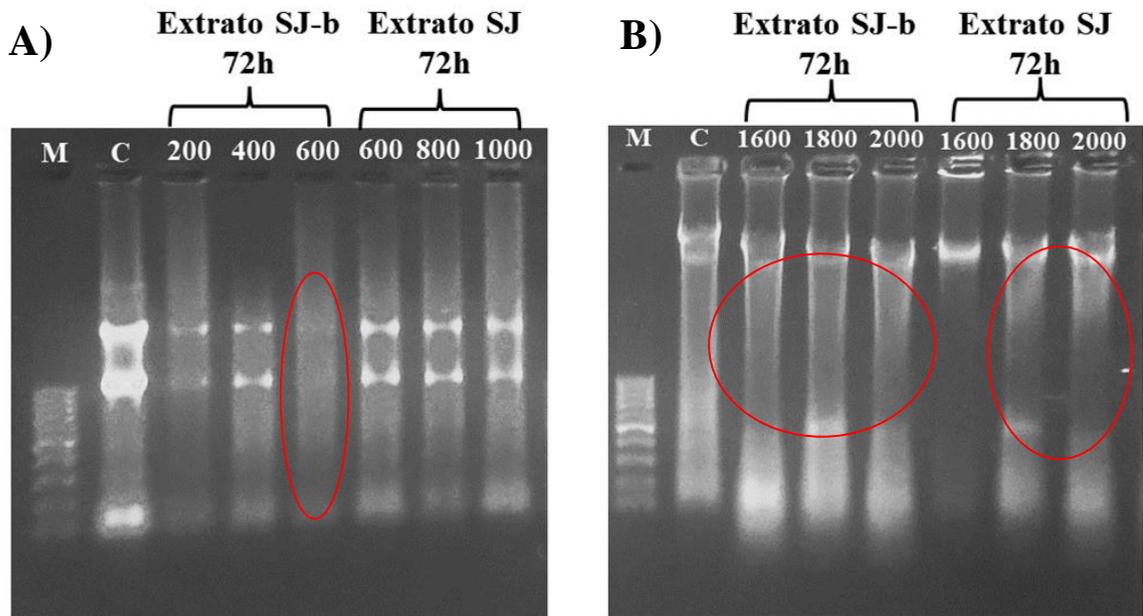


Figura 21: Fragmentação do DNA promovida pelos extratos vegetais de *Sophora japonica* antes e depois da biomodificação (SJ-b) nas linhagens celulares NG-97 e U251 pela eletroforese em gel de agarose. A) A linhagem NG-97 apresentou fragmentação do DNA nas células expostas à concentração de 600 μM de extrato de SJ-b (círculo vermelho) quando comparado às células expostas ao extrato de SJ em concentrações maiores. B) Células U251 expostas ao extrato de SJ-b ou SJ nas concentrações de 1600, 1800 e 2000 μM por 72 horas. É possível observar que o extrato de SJ-b promoveu uma maior fragmentação do DNA (círculo vermelho) em comparação com o extrato de SJ. Letra (M): marcador molecular de 1000 pares de base (pb), letra (C) DNA obtido de células controles não expostas a nenhum dos extratos.

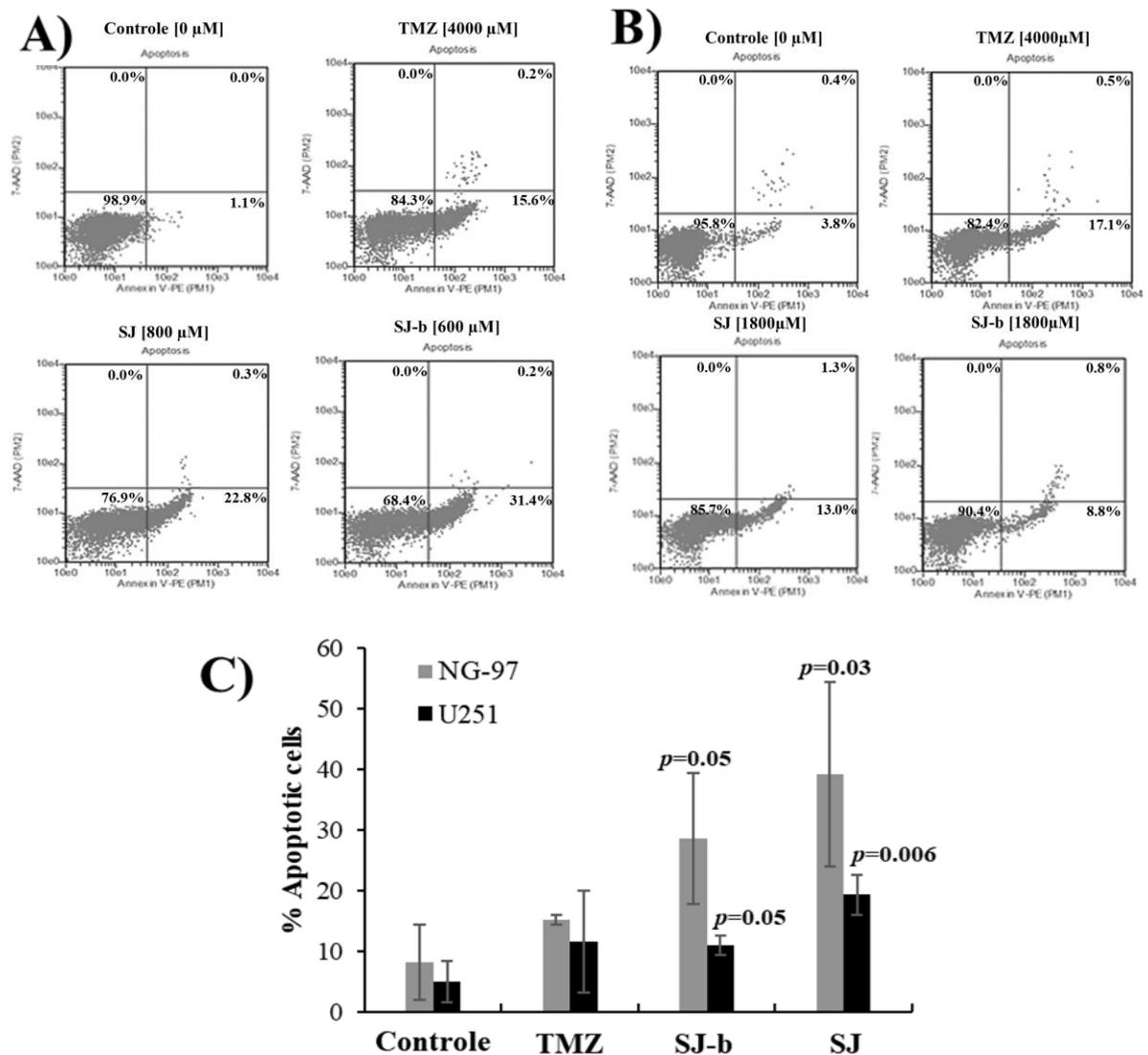


Figura 22: Extratos de *Sophora japonica* (SJ) e SJ após a reação de bioconversão (SJ-b) apresentam efeito pró-apoptótico em linhagens celulares NG-97 e U251. A) Resultados representativos demonstrando as porcentagens de células NG-97 positivamente coradas com Anexina V-PE/7-AAD, após tratamentos com TMZ (controle positivo) [4000 μM], SJ [800 μM] ou SJ-b [600 μM], após 72 h. B) Resultados representativos demonstrando as porcentagens de células U251 positivamente coradas com Anexina V-PE/7-AAD, após tratamentos com TMZ (controle positivo) [4000 μM], SJ [1800 μM] ou SJ-b [1800 μM], após 72 h. C) Gráfico demonstrando a média e desvio padrão dos ensaios em triplicata das porcentagens de células positivamente coradas com Anexina V-PE/7-AAD e indicativo de células apoptóticas, após exposição com os extratos SJ-b ou SJ. A concentração de 0 μM indicam as células controles não expostas aos extratos. Os dados estão apresentados com média ± desvio padrão e os valores de significância foram obtidos através do Teste-T. Valor de $P < 0,05$ evidencia diferença estatística significativa.

4.10.7. Avaliação da capacidade de inibição de CTS promovida pelos extratos vegetais de SJ e SJ-b

Foi investigado a capacidade dos extratos vegetais de SJ e SJ-b na inibição de formação de neuroesferas ou formação de CTS de gliomas, as quais podem sofrer auto-renovação, invasão e resistência a tratamentos, reiniciando o tumor, após remoção cirúrgica. Assim, observou-se que o extrato de SJ promoveu uma redução na formação de neuroesferas em relação às células não expostas [NG-97: 800 μ M; 48h (P -valor= $6,42 \times 10^{-07}$), 72 h (P -valor= $1,77 \times 10^{-07}$)] e [U251: 1800 μ M; 24 h (P -valor= $4,65 \times 10^{-05}$), 48 h (P -valor= $7,32 \times 10^{-07}$), 72 h (P -valor= $2,71 \times 10^{-08}$)]. Entretanto, o extrato de SJ-b promoveu uma redução na formação de neuroesferas iniciando-se após 24 h de exposição em ambas as linhagens celulares avaliadas [NG-97: 600 μ M; 24 h (P -valor=0,008), 48 h (P -valor= $9,11 \times 10^{-07}$), 72 h (P -valor= $7,00 \times 10^{-07}$)] e [U251: 1800 μ M; 24 h (P -valor= $1,24 \times 10^{-05}$), 48 h (P -valor= $3,41 \times 10^{-08}$), 72 h (P -valor= $1,84 \times 10^{-08}$)] (Figuras 23 e 24).

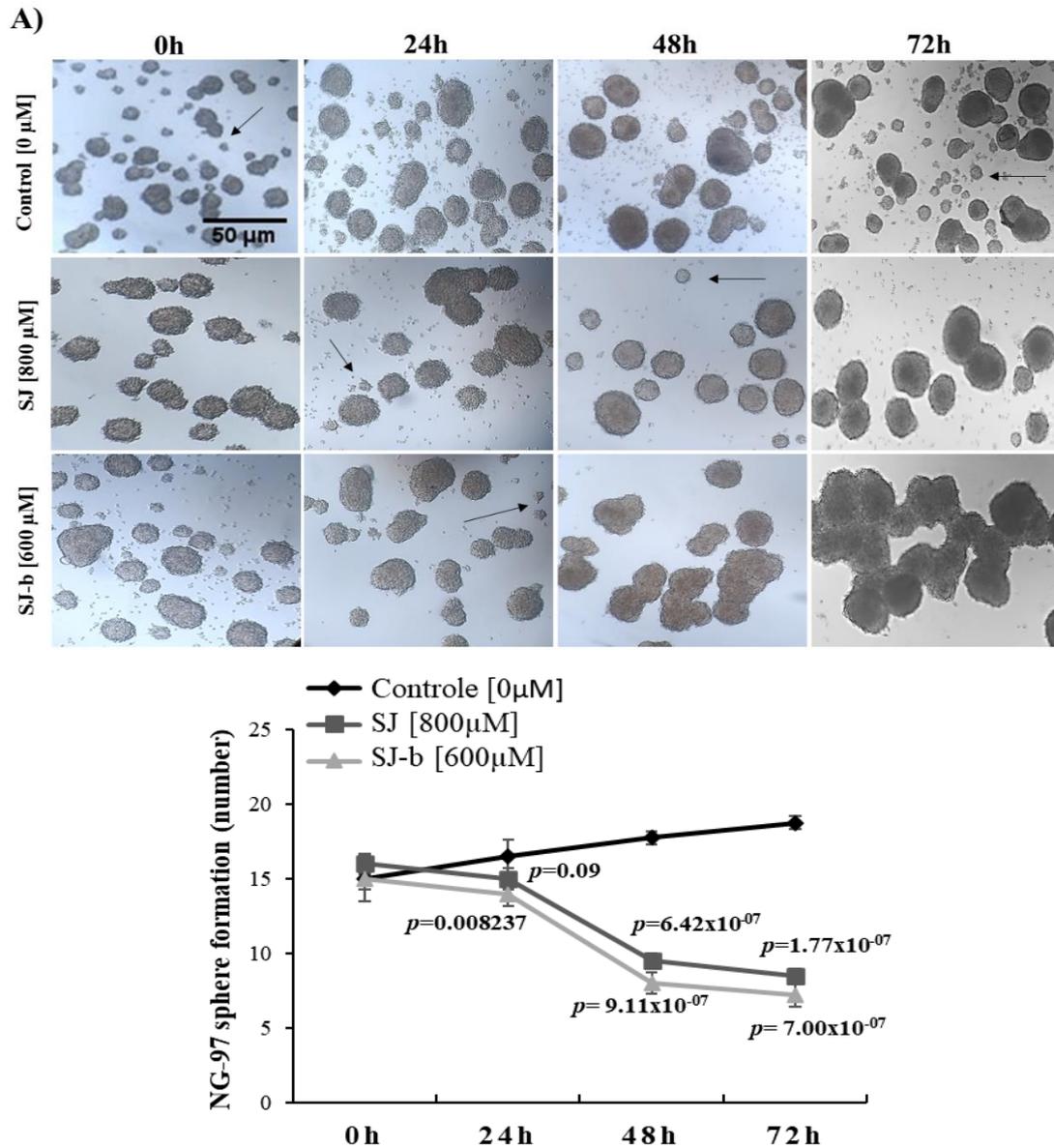


Figura 23: Inibição na formação de neuroesferas pelos extratos vegetais de *Sophora japonica* (SJ) e *Sophora japonica* biomodificada (SJ-b) na linhagem celular de glioma grau III. As células NG-97 foram estimuladas para formar células-tronco semelhantes de glioma e após, foram expostas ao extrato de SJ ou SJ-b. Foi possível observar uma inibição na capacidade de formação de neuroesferas após 24 horas de exposição. Células não expostas aos compostos foram usadas como controles. A concentração de 0 μM indica as células controles não expostas aos extratos. A escala apresentada na figura controle aplica-se para todas as fotos representativas na figura. As setas indicam a formação de novas neuroesferas. Os dados estão apresentados com média ± desvio padrão e os valores de significância foram obtidos através do Teste-T. Valor de $P < 0,05$ evidencia diferença estatística significativa.

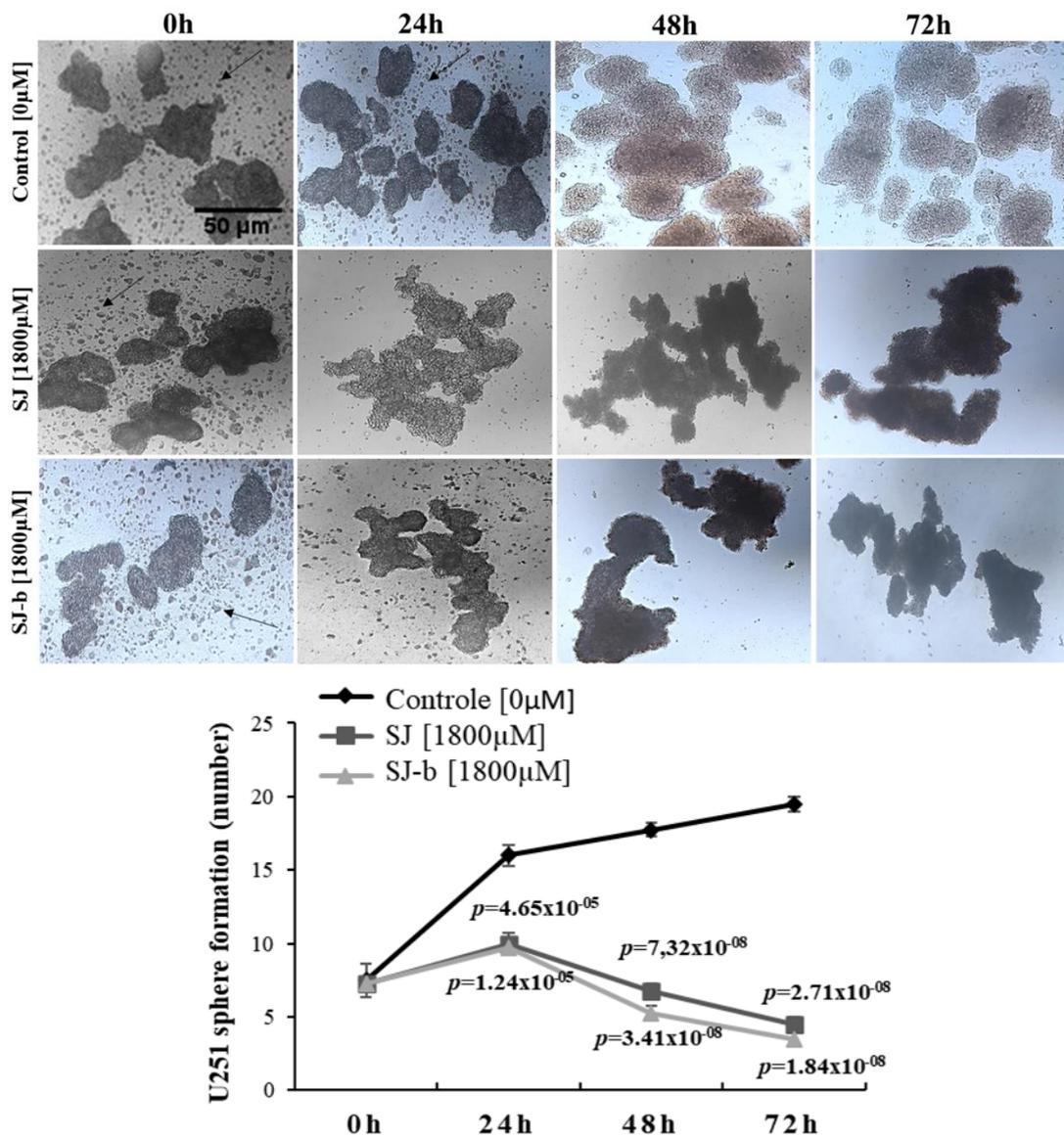


Figura 24: Inibição na formação de neuroesferas pelos extratos vegetais de *Sophora japonica* (SJ) e *Sophora japonica* biomodificada (SJ-b) na linhagem celular de glioblastoma. As células U251 foram estimuladas para formar células-tronco semelhantes de glioma e, em seguida, expostas aos extratos de SJ ou SJ-b. Foi possível observar uma inibição acentuada na capacidade de formação de neuroesferas após 48 horas de exposição. Células não expostas aos compostos foram usadas como controles. A concentração de 0 µM indica as células controles não expostas aos extratos. A escala apresentada na figura controle aplica-se para todas as fotos representativas na figura. As setas indicam a formação de novas neuroesferas. Os dados estão apresentados com média ± desvio padrão e os valores de significância foram obtidos através do Teste-T. Valor de $P < 0,05$ evidencia diferença estatística significativa.

4.10.8. Ação inibitório dos extratos vegetais de SJ e SJ-b em genes envolvidos com a via de sinalização NF-kB

A expressão relativa dos genes *TRAF6*, *IRAK2*, *TNF α* e *IL-1 β* após exposição das células NG-97 e U251 ao extrato de SJ ou SJ-b em comparação às células controles foi avaliada por PCR quantitativo (Tabela 17).

As células NG-97 e U251 apresentaram as expressões inibidas dos genes *TRAF6* (0,86 vs. 1,02 *P*-valor=0,45; 0,32 vs. 1,02, *P*-valor=0,03;) e *IRAK2* (0,33 vs. 1,28, *P*-valor=0,21; 0,12 vs. 1,28 *P*-valor=0,43), pertencentes a via NF-kB, após tratamentos com os extratos de SJ e SJ-b, respectivamente (Figura 25A e B).

Foi também observado que a NG-97 apresentou expressões reduzidas dos genes *TNF α* (0,43 vs. 1,00, *P*-valor=0,006; 0,32 vs. 1,00, *P*-valor=0,005) e *IL-1 β* (0,77 vs. 1,01, *P*-valor=0,005; 0,32 vs. 1,01, *P*-valor=0,20), estimuladores da via NF-kB, após exposição aos extratos de SJ ou SJ-b, respectivamente. Da mesma forma, foram observadas expressões reduzidas dos genes *TNF α* (0,37 vs. 1,00, *P*-valor= 0,04; 0,65 vs. 1,00 *P*-valor=0,0006) e *IL-1 β* (0,66 vs. 1,09, *P*-valor=0,04; 0,82 vs. 1,09 *P*-valor=0,28) na linhagem U251, após SJ ou SJ-b, respectivamente (Figura 25 C e D).

Tabela 17. Expressão gênica dos genes *TRAF6*, *IRAK2*, *TNF α* e *IL-1 β* nas linhagens NG-97 e U251

NG-97			
	Expressões relativas	Desvio Padrão (DP)	P-valor
<i>TRAF6</i>			
Controle	1,02	0,28	Ref.
SJ	0,86	0,12	0,45
SJ-b	0,32	0,12	0,03
<i>IRAK2</i>			
Controle	1,28	0,43	Ref.
SJ	0,33	0,12	0,21
SJ-b	0,12	0,03	0,43
<i>TNFα</i>			
Controle	1,00	0,15	Ref.
SJ	0,43	0,10	0,006
SJ-b	0,32	0,16	0,005
<i>IL-1β</i>			
Controle	1,01	0,17	Ref.
SJ	0,77	0,22	0,005
SJ-b	0,40	0,09	0,20
U251			
<i>TRAF6</i>			
Controle	1,07	0,50	Ref.
SJ	0,25	0,14	0,05
SJ-b	0,30	0,17	0,14
<i>IRAK2</i>			
Controle	2,95	0,70	Ref.
SJ	0,66	0,13	0,43
SJ-b	0,80	0,25	0,57
<i>TNFα</i>			
Controle	1,00	0,10	Ref.
SJ	0,37	0,18	0,04
SJ-b	0,65	0,05	0,0006
<i>IL-1β</i>			
Controle	1,09	0,10	Ref.
SJ	0,66	0,18	0,49
SJ-b	0,82	0,05	0,28

Ref.: células controles não expostas aos compostos utilizadas como referência para as análises estatísticas. SJ: *Sophora japonica*; SJ-b: *Sophora japonica* biomodificada. Os dados estão apresentados com média \pm desvio padrão e os valores de significância foram obtidos através do Teste-T. Valor de $P < 0,05$ evidencia diferença estatística significativa.

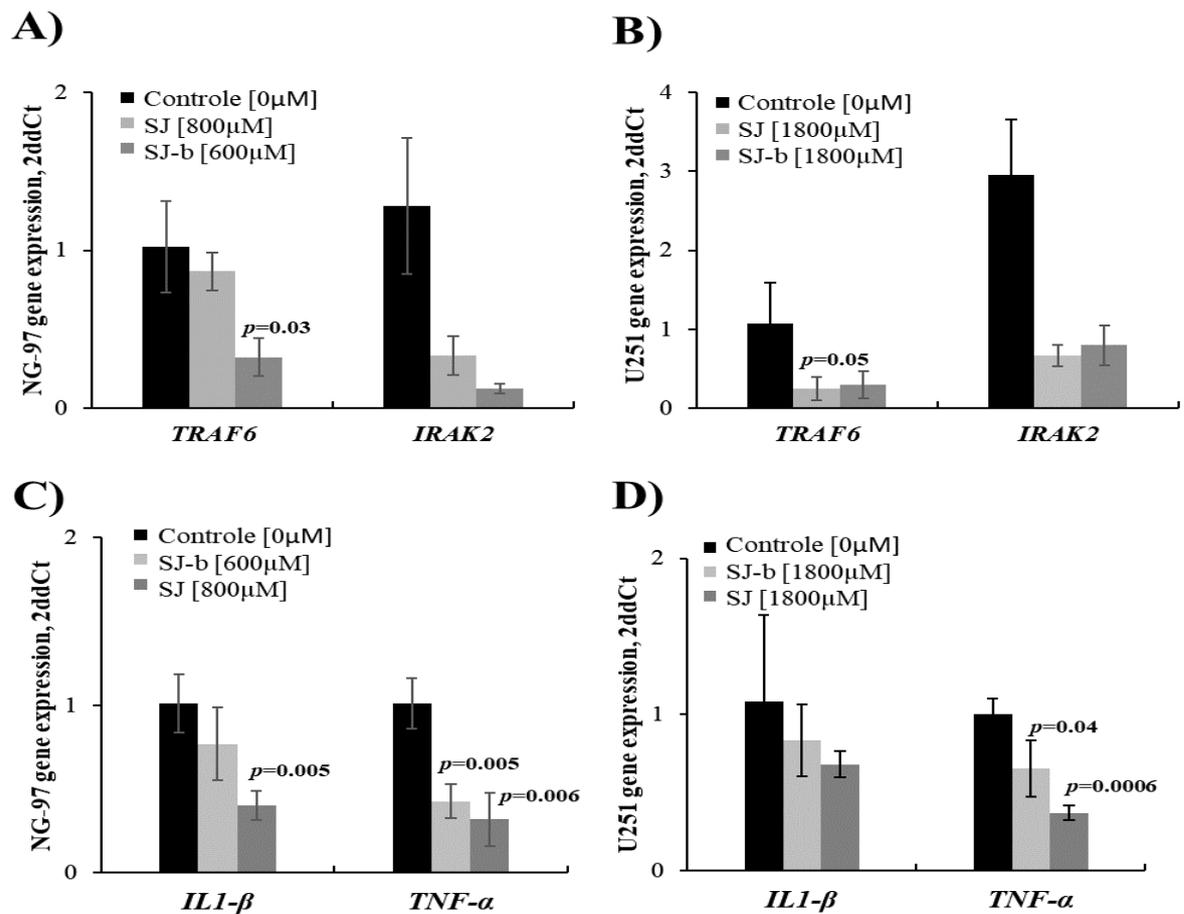


Figura 25. Efeito inibitório dos extratos vegetais de *Sophora japonica* (SJ) e *Sophora japonica* biomodificado (SJ-b) da via NF-κB. **A)** Células NG-97 expostas ao extrato de SJ ou SJ-b apresentaram inibição da expressão relativa dos genes *TRAF6* e *IRAK2*, pertencente à via NF-κB. **B)** Células U251 expostas ao extrato de SJ ou SJ-b apresentaram inibição da expressão relativa dos genes *TRAF6* e *IRAK2*. **C)** Células NG-97 tratadas com o extrato de SJ ou SJ-b demonstraram redução na expressão relativa dos genes *IL-1β* e *TNFα*, ativadores da via NF-κB **D)** Células U251 expostas ao extrato de SJ ou SJ-b demonstraram redução na expressão relativa dos genes *IL-1β* e *TNFα*. As barras em cor preta indicam as células controles não expostas aos extratos. Os dados estão apresentados com média ± desvio padrão e os valores de significância foram obtidos através do Teste-T. Valor de P<0,05 evidencia diferença estatística significativa.

4.10.9. Ação inibitório dos extratos vegetais de SJ e SJ-b na via de sinalização NF-KB

Para comprovar a ação inibitória na via NF-kB pelos extratos avaliados, foi realizado o ensaio da luciferase utilizando a linhagem NG-97. As células foram transfectadas com o plasmídeo NF-kB-luciferase reporter e expostas aos extratos de SJ e SJ-b. Foi observado redução significativa na atividade promotora de NF-kB pelos extratos de SJ (P -valor=0,03) ou SJ-b (P -valor=0,02) em comparação com células transfectadas com o plasmídeo NF-kB-luciferase e não tratadas com os extratos (Figura 26). Como esperado as células transfectadas e tratadas com LPS apresentaram aumento da atividade promotora de NF-kB (controle positivo do ensaio). (Figura 26). Os resultados demonstraram que ambos os extratos inibiram a atividade transcricional de NF-kB na linhagem NG-97.

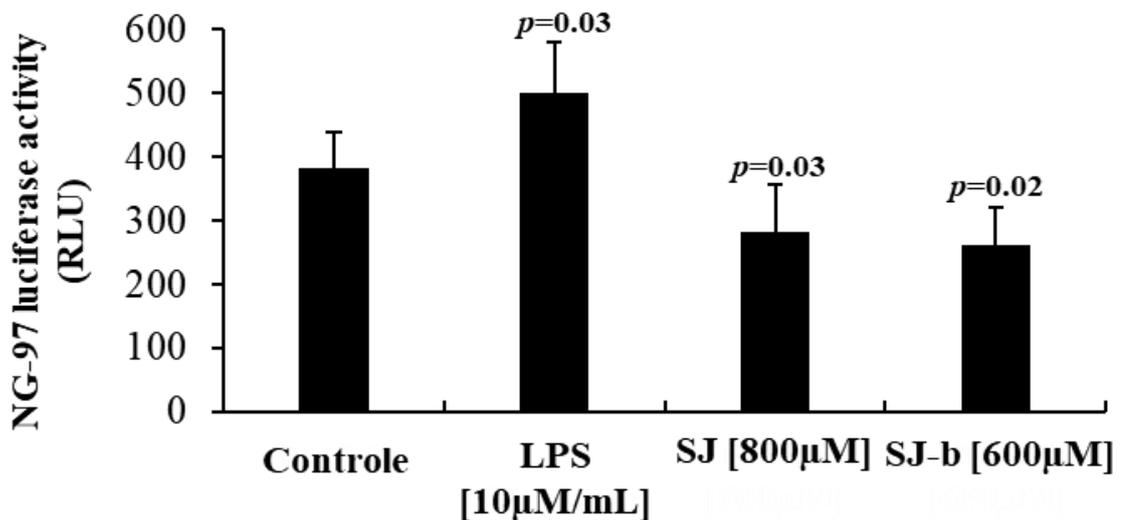


Figura 26 Efeito inibitório do extrato vegetal de *Sophora japonica* (SJ) e *Sophora japonica* biomodificado (SJ-b) na via NF-kB. O vetor NF-kB luciferase reporter foi transfectado transientemente nas células NG-97 e posteriormente, as células foram expostas a 10µg/mL de Lipopolissacarídeo (LPS), 800 µM de extrato de SJ ou 600 µM de extrato de SJ-b. Foi observado redução significativa da atividade promotora de NF-kB nas células expostas a ambos os extratos em comparação com células transfectadas e não expostas aos extratos (controle). Em contraste, as células expostas a LPS apresentaram aumento significativo da atividade de NF-kb, conforme esperado, indicando que o ensaio pode ser considerado confiável. Os dados estão apresentados com média \pm desvio padrão e os valores de significância foram obtidos através do Teste-T. Valor de $P < 0,05$ evidencia diferença estatística significativa.

5. DISCUSSÃO

O GBM é o tumor cerebral maligno mais frequente em adultos acima dos 50 anos, representando cerca de 48% dos casos (PHILIPS, 2018; SANTOS, 2021). Seu tratamento é complexo e inicialmente consiste em ressecção cirúrgica seguida de RT associado a TMZ (STUP et al 2005). Entretanto, os pacientes com resposta positiva à terapia preconizada, possuem baixa sobrevida após o diagnóstico (PHILIPS, 2018; SANTOS, 2021). No Brasil, os dados de incidência e taxa de mortalidade não são consolidados e os poucos estudos epidemiológicos em GBM no Brasil apresentaram dados regionais e com tamanho amostral limitado (MIRANDA-FILHO et al., 2017; MARQUES et al., 2022).

A idade média ao diagnóstico dos pacientes inseridos no presente estudo foi de 56 anos, de acordo com estudos brasileiro e asiático anteriores (MIRANDA-FILHO et al., 2017; CHAN et al., 2017; MARQUES et al., 2022). Entretanto, estudos Americano e Europeu apontaram idade média ao diagnóstico de aproximadamente 62 anos (THAKKAR et al 2014; BRODBELT et al., 2015 GRAMATZKI et al 2016). Brodbelt e colaboradores (2015) sugeriram que as disparidades entre a idade média ao diagnóstico para o GBM entre diferentes populações, podem ser explicadas devido às diferenças socioeconômicas, influenciando as expectativas de vida.

No presente estudo o GBM foi sutilmente mais frequente em pacientes do sexo masculino (54% dos casos) e majoritariamente mais frequente em pacientes declarados de cor da pele branca (92% dos casos). Estes dados estão em conformidade com o que é observado na população Americana e Brasileira (ELLOR; PAGANO-YOUNG; AVGEROPOULOS, 2014; OSTROM et al., 2018; MIRANDA-FILHO et al., 2017; MARQUES et al., 2022).

A localização do tumor e o subtipo molecular do GBM podem estar diretamente relacionados. Steed e colaboradores (2016) observaram que tumores do subtipo proneural/neural acometem com maior frequência os lobos frontal e temporal e comumente são mais densos quando localizados no lobo temporal esquerdo. Em contraste, os subtipos moleculares clássico e mesenquimal estão distribuídos de forma mais difusa pelo cérebro e dificilmente se sobrepõem em mais de um lobo. No presente estudo, cerca de 26% dos casos de GBM se encontravam ocupando dois ou mais lobos (multilobar), sugerindo que uma parcela importante dos casos de GBM podem ser do subtipo proneural/neural.

Ainda, considerando apenas os tumores ocupando apenas um lobo cerebral, a localização mais frequente foi no lobo frontal, cerca de 26% dos casos, seguido por aproximadamente 22%

no lobo temporal, 18% lobo parietal e 3% no lobo occipital. Estes achados estão de acordo com estudos desenvolvidos em populações Americana, Inglesa, Dinamarquesa, Indiana e Brasileira (BRODBELT et al., 2015; MIRANDA-FILHO et al., 2016; GHOSH et al., 2017; PHILIPS et al., 2018; BOHN et al., 2018; HANSEN et al 2018; TIAN et al.,2018; SHIEH et al., 2020).

A escala KPS é utilizada clinicamente para indicar o nível de inaptidão ou deficiência funcional do paciente ao diagnóstico. Quanto menor a classificação do paciente na escala, pior é o seu prognóstico (CHAMBLESS et al., 2015). Pacientes com um valor inferior a 70% na escala KPS, sempre que possível, não são submetidos à cirurgia para remoção do tumor, uma vez que, as chances de sobrevida destes são menores em comparação com pacientes com um $KPS \geq 70\%$ (CHAMBLESS et al., 2015). Em nosso estudo, mais de 78% dos pacientes apresentavam um $KPS \geq 70\%$, indicando condições adequadas para a cirurgia.

A maioria dos pacientes (82%) inseridos no presente estudo foram submetidos ao tratamento preconizado de acordo com o protocolo Stupp (2005). Além disso, alguns pacientes não apresentaram condições clínicas adequadas para receber o tratamento pós-cirúrgico preconizado. Desta forma, dentre os pacientes que não receberam o tratamento preconizado, cerca de 10% receberam como tratamento apenas o quimioterápico TMZ e aproximadamente 8% receberam como tratamento a RT.

Conforme o exposto, nosso grupo de estudo se apresentou de acordo com dados da literatura mundial.

As CTS são capazes de permanecerem no local da lesão tumoral mesmo após ressecção do tumor e posterior realização do tratamento preconizado, sendo capazes de infiltrar o parênquima cerebral normal subjacente e levar a recidiva da doença (LI et al., 2021). Em média 70% dos pacientes com uma sobrevida igual ou maior a 12 meses apresentam recidiva da doença neste intervalo de tempo (STUPP et al., 2015 KAZMI et al 2019). Em nosso estudo, 27% dos pacientes apresentaram recidiva da doença no intervalo de 12 meses e 92% evoluíram para óbito em um tempo médio de aproximadamente 8 meses.

Um dos objetivos do presente estudo foi identificar possíveis genótipos de risco para o GBM em um estudo caso-controle de duas SNVs localizadas na região 3'UTR de genes-alvo de miRs. Tais SNVs foram descritas como possivelmente envolvidas com a doença em um estudo anterior (SANTOS, 2019) por meio da genotipagem em larga escala com microarranjos de DNA. As amostras controles e pacientes com GBM apresentaram-se em desequilíbrio de HW para a SNV 76276169; entretanto, não foi identificado o genótipo variante nas amostras

avaliadas. Desta forma, as amostras de pacientes foram comparadas com amostras do banco com acesso público ABraOM, o qual avaliou mais de 1000 indivíduos saudáveis para as SNVs propostas. Entretanto, para a SNV 76276169 os resultados observados foram contrastantes com aqueles utilizando nossa população controle. A diferença nos resultados pode ser explicada primeiramente devido a população Brasileira ser o resultado de uma grande mistura de diferentes etnias, principalmente de índios, portugueses, africanos, árabes, italianos, espanhóis, alemães e japoneses (GIOLO et al., 2012). Além disso, as análises do tamanho amostral indicaram que o número ideal de pacientes para a identificação de todos os diferentes genótipos para a referida SNV seria cerca de 140 pacientes; entretanto, GBM é uma doença rara, com prevalência aproximada de 5/100.000 indivíduos (PHILIPS, 2018), e apenas 100 pacientes foram inseridos no nosso estudo. Ainda, outra razão para os resultados diferentes, foi a idade média dos nossos pacientes com GBM, a qual foi de aproximadamente 56 anos; a idade média dos nossos controles foi de cerca de 40 anos. Os indivíduos saudáveis do ABraOM apresentaram idade média de quase 72 anos. Apesar das limitações das nossas amostras caso-controle, as análises com ABraOM nos indicaram que o genótipo variante (CC) para a SNV rs76276169 foi identificada apenas em 1/1.171 indivíduo, sendo que em nosso grupo controle, não identificamos esse genótipo.

Desta forma, considerando nossos controles, o presente estudo identificou o genótipo selvagem (TT) e o alelo (T) da SNV rs76276169 como riscos para o GBM. Em nosso conhecimento, não há estudos caso-controles realizados com a SNV rs76276169 no GBM ou outras patologias. A SNV rs76276169 está localizada na 3'UTR do gene *PARG*, região de ligação do miR-491-3p (*seed sequence*). O gene *PARG* é responsável por modular diversos mecanismos celulares como modificação de histonas, diferenciação e morte celular e principalmente reparo a danos no DNA (AUBIN et al., 1982; SLADE et al., 2020; NICOLAI et al., 2021; LI et al., 2022). Especificamente, na via de reparo a erros no DNA, a proteína Parg contribuiu para que o processo de reparo ocorra nas células de forma adequada (SLADE et al., 2020). No GBM, a atividade da proteína Parg foi associada em estudos anteriores à pior resposta ao tratamento com TMZ (TENTORI et al., 2005; GOGOLA et al., 2018; LI et al., 2022), uma vez que, esta proteína age induzindo reparo a danos no DNA. Um dos principais esforços é o desenvolvimento de inibidores efetivos de *PARG*, que possam contribuir para uma melhor resposta dos pacientes ao quimioterápico TMZ (LI et al., 2022). Em estudo anterior do nosso grupo de pesquisa, a expressão do gene *PARG* foi avaliado nos diferentes genótipos da SNV rs76276169 e de forma interessante *PARG* apresentou-se superexpresso em pacientes

portadores do genótipo (TT) (SANTOS, 2019), indicando um pior prognóstico. Ainda, as análises preditivas indicaram que os alelos T e C da SNV rs76276169 não apresentam diferenças significativas na energia de ligação à miR-491-3, indicando que a expressão aumentada do gene *PARG* nos pacientes portadores do genótipo TT não foi influenciada pela ligação a este miR; entretanto, um número maior de pacientes precisa ser avaliado para uma melhor caracterização do papel dessa SNV no GBM.

Considerando os controles do banco ABraOM, não houve diferença de frequências dos genótipos para a SNV rs76276169 no grupo de pacientes.

O presente estudo também identificou o genótipo selvagem (GG) da SNV rs2229714 como fator de suscetibilidade ao GBM, considerando nosso grupo controle. Os pacientes portadores do genótipo (GG) apresentaram risco três vezes maior para o GBM em comparação com aqueles portadores dos genótipos heterozigoto (GA) ou variante (AA). Em concordância com nossos resultados, um estudo anterior verificou que o genótipo selvagem (GG) da SNV rs2229714 apresentou risco três vezes maior para o câncer de mama (SHAREEFI et al., 2020). O gene *RSK1* é responsável por regular vários mecanismos celulares como a sobrevivência celular, a progressão do ciclo celular, a proliferação e migração celulares e apoptose pela modulação de diversas vias de sinalização. Houles e Roux (2018) demonstraram que a proteína Rsk1 é responsável por fosforilar diversos substratos responsáveis pela interação entre as vias Mapk/Creb, Ras/Erk, mTORC1 e NF-kB, envolvidas na iniciação e progressão do GBM (BRENNAN et al., 2013; SOK et al., 2020). Watanabe e colaboradores (2019) observaram que *RSK1* modula por *feedback* negativo a via Mek/Erk quando ativada pela proteína Flt3-ItD, mantendo assim, a via continuamente ativa. Além disso, Rsk1 ativa (fosforilada na posição 359Thr/363Ser) foi identificada em pacientes com GBM do subtipo mesenquimal e sua atividade foi observada aumentada em gliomas de alto grau, sugerindo que o nível de expressão de *RSK1* aumenta de acordo com o grau do glioma, além de contribuir para a progressão da doença (BRENNAN et al., 2013; SOK et al., 2020; HAJJ et al., 2020).

A SNV rs2229714 está localizada na 3'UTR do gene *RSK1*, região de ligação do miR-663-b (*seed sequence*). Análises preditivas indicaram que o alelo G para a SNV rs2229714 apresenta uma maior afinidade à miR-663-b, indicando possivelmente expressão diminuída do gene *RSK1*. Assim, possivelmente, em pacientes com GBM portadores do genótipo GG, a expressão relativa de *RSK1* apresenta-se diminuída, mas estudos futuros deverão ser realizados para comprovar a análise de predição.

Ghanbari e colaboradores (2015) em uma análise global, avaliou 11.067 SNVs localizadas em miRs e em sítios de ligação de miRs em cardiopatias. Dentre as SNVs identificadas, a SNV rs2229714 foi associada a risco e apontada como sendo modulada por diferentes miRs a depender da presença do alelo (G) ou (A). A análise global deste estudo aponta que *RSK1* é modulado pelos miRNA-663-b, miRNA-1538 e miRNA-4745-3p na presença do alelo (G) e pelos miRNA-3140 e miRNA-6735-3p na presença do alelo (A). Estes resultados sugerem que a troca de bases G>A nesta SNV pode permitir que miRs que antes não modulavam *RSK1*, passem a modular este gene, e dessa forma a ação de *RSK1* estaria mais limitada em pacientes portadores dos genótipos (GA) ou (AA), justificando assim a proteção contra o GBM observada em nosso estudo principalmente para o genótipo (GA), e a associação do genótipo selvagem (GG) ao risco para o GBM. Desta maneira, a expressão de *RSK1* em indivíduos portadores dos diferentes genótipos da SNV rs2229714 deve ser avaliada em estudos futuros, para melhor compreensão da referida SNV no prognóstico de pacientes com GBM.

Considerando os controles do banco ABraOM, o genótipo (GG) para a SNV rs2229714 manteve-se associado ao risco para a doença em comparação com os genótipos combinados (GA+AA); entretanto, o alelo A passou a ser relacionado com o risco para o GBM. Resultados contrastantes podem ser atribuídos a mistura de etnias da população Brasileira e média das idades dos pacientes, e grupos controles inseridos no estudo.

A expressão relativa do gene *PARG* nos pacientes com GBM, foi significativamente maior nos pacientes portadores do genótipo heterozigoto (TC) comparados aos pacientes portadores do genótipo selvagem (TT) para SNV rs76276169, confirmando maior suscetibilidade ao GBM em pacientes portadores do genótipo TT, uma vez que, o gene *PARG* está envolvido no reparo de erros no DNA e na estabilidade do genoma (HARRISION et al., 2020). Ainda, estudos apontaram que todas as isoformas de *PARG* são essenciais no processo de reparo a danos no DNA (SLADE et al., 2020; NICOLAI et al., 2021; LI et al., 2022).

Ainda, a expressão relativa de *RSK1* para os pacientes com GBM portadores do genótipo recessivo (AA) foi significativamente menor comparado aos pacientes portadores do genótipo selvagem (GG) ou heterozigoto (GA) para SNV rs2229714, sugerindo que o risco aumentado para a doença em pacientes portadores do genótipo selvagem (GG) pode ser explicado pela ativação de *RSK1*, uma vez que, este gene está envolvido na ativação das vias oncogênicas MAPK, ERK, CREB e NF-kB contribuindo assim para o surgimento e progressão do GBM (KHEIRALLAH et al., 2013; GHODA et al 1997; BOHUSLV et al., 2004; XU et al., 2006).

Além disso, o alelo (A) foi observado como fator de proteção para doença, indicando inibição das vias citadas acima nos pacientes portadores deste alelo.

Opções terapêuticas eficazes que possam contribuir no tratamento e melhoria do prognóstico dos pacientes com GBM tem sido estudada, e os compostos naturais têm sido alvo de grande parte dos estudos (CHUNG et al., 2014; BONAFÉ, 2022). Os compostos presentes no extrato de SJ-b foram identificados por UPLC-QTOF-MSE, que é um QTOF com técnica hifenizada de espectrometria de massas de alta resolução que permite a separação cromatográfica de diferentes classes de compostos melhorando a sensibilidade na detecção de metabólitos. O modo MSE, por sua vez, integra MS completo com dados de fragmentação MS/MS para todos os íons precursores simultaneamente. Essa plataforma de aquisição de alto rendimento permite a anotação automática de compostos de diversos metabólitos secundários (ZHAO et al., 2014). Os principais compostos identificados nos extratos foram flavonas, tetraglicosídeos, isoflavonas, glicosídeos triterpênicos, ácido clorogênico e catequinas, de acordo com estudos anteriores (HE et al., 2016; KUMAR et al., 2016). A análise comparativa entre flavonoides presentes no extrato de SJ foi realizada em duas condições, (1) utilizando o extrato bruto de SJ e (2) utilizando o extrato de SJ após processo de hidrólise de porções de açúcares com a enzima hesperidina (SJ-b). Os resultados obtidos demonstraram que o extrato de SJ é rico em KPF aglicona e seus análogos glicosilados como o KPF-3-O-ramnosídeo, KPF-3-O-glicosídeo-3"-ramnosídeo e KPF-3-galactosídeo-6"-rhamnosídeo-3"-rhamnosídeo. Entretanto, o extrato de SJ-b apresentou maior concentração de KPF aglicona, correspondendo a 43% do peso seco do extrato SJ-b. No presente estudo, a atividade da hesperidina utilizada na hidrólise do substrato de *Sophora japonica* levou ao aumento de alguns compostos ativos, em particular KPF aglicona e KPF-O-glicosídeo.

Estudos demonstraram que o extrato bruto de SJ e seus compostos apresentam importantes propriedades farmacológicas, como atividade antiviral e antibacteriana, efeitos cardiovasculares, ação antiinflamatória e antioxidante, efeitos antiosteoporóticos, hemostáticos e antiateroscleróticos e ação antitumoral ativos (LIN et al., 2011; YU et al., 2012; CHAN e HSIEH et al., 2010; CHUNG et al., 2014). Em nosso melhor conhecimento não há estudos que avaliaram e compararam a ação dos extratos de SJ antes e após biomodificação em linhagens celulares de gliomas de alto grau.

Zhang e colaboradores (2008) demonstraram que o KPF se apresentou significativamente menos citotóxico em células normais do ducto pancreático humano em comparação ao

quimioterápico 5-Fluorouracil. Em nosso estudo, a linhagem não tumoral de fibroblasto dérmico humano (HDFa) foi utilizada para avaliar o nível de citotoxicidade dos extratos de SJ e SJ-b. Foi observado viabilidade celular em todos os tempos e concentrações avaliadas, se mantiveram acima dos 50% de forma semelhante ao observado na literatura.

A viabilidade celular para as linhagens de gliomas de alto grau, NG-97 e U251, após exposição aos extratos apresentou efeito citotóxico significativo de forma tempo e dose dependente. Ainda a citotoxicidade ao TMZ observada nas células avaliadas foi semelhante a outras células de glioma (U87-MG, U251, T98G) (SMALLEY; CHALMERS; MORLEY, 2014; PAZHOUHI et al 2018; KOBYLINSKA et al 2021). Entretanto, NG-97 apresentou maior sensibilidade ao TMZ que U251, conhecidamente resistente (SI et al., 2021; KOBYLINSKA et al 2021). De forma interessante, as células NG-97 e U251 expostas concomitantemente ao TMZ e os extratos de SJ ou SJ-b apresentaram efeito citotóxico significativamente maior, indicando efeito sinérgico. Esses resultados podem ser devido a maior quantidade de KPF aglicona no extrato de SJ-b.

Shafek e colaboradores (2012) relataram que o potencial de eliminação de radicais livres pelas moléculas glicosiladas KPF 3-O-glicosídeos (KPF 3-O- β - d -glucopiranosil (1 \rightarrow 2) β - d -xilopiranosídeo e KPF 3-O- α - l arabinopiranosil (1 \rightarrow 2) β - d -galactopiranosídeo) de *Solenostemma argel* foi mais fraco do que o de KPF aglicona. Xião (2017) revisou a influência da glicosilação de flavonóides em seus benefícios biológicos e os diferentes comportamentos farmacocinéticos entre as agliconas de flavonóides e seus glicosídeos; o autor observou que o KPF aglicona demonstrou maior potencial antioxidante do que seus derivados glicosilados. O mesmo estudo também apontou que a absorção e a bioatividade associadas a diferentes variações da molécula de flavonóides têm sido questionada e a bioatividade dos flavonóides glicosilados *in vitro* pode diferir daquela observada *in vivo*. Desta forma, no presente estudo pode-se inferir que o extrato SJ-b é superior ao extrato SJ devido a sua maior concentração de KPF aglicona e KPF O-glicosídeo simples.

Foi observado alterações morfológicas sugestivas de apoptose nas concentrações inferiores ao IC50 estabelecido para cada linhagem estudada. Resultados semelhantes também foram observados em estudos anteriores com KPF (SHRESTHA et al., 2021; WU et al., 2021). O ensaio de fragmentação do DNA demonstrou que células expostas ao extrato SJ-b por 72 h apresentaram nível mais evidente de fragmentação que células expostas ao extrato de SJ. Um estudo anterior relatou que o KPF foi capaz de induzir apoptose em linhagens celulares de câncer de pulmão humano e osteossarcoma (NGUYEN et al., 2003; HUANG et al., 2010). Um

estudo demonstrou que os níveis de proteína de Bcl-xL diminuíram em células de câncer de ovário, enquanto as proteínas p53, Bad e Bax foram reguladas positivamente após exposição com KPF. Os níveis de caspase3/7 também foram induzidos de maneira dependente da concentração do KPF (LUO et al., 2011).

O ensaio de citometria de fluxo indicou que ambos os extratos induziram significativamente a externalização de fosfatidilserina facilitando a fagocitação por macrófagos de células apoptóticas. Entretanto, não houve ligação significativa do composto químico fluorescente 7AAD a molécula de DNA, indicando que a apoptose observada não resultou em necrose. O efeito pró-apoptótico pelos compostos foi mais evidente em células NG-97. Além disso, os extratos avaliados apresentaram também efeito antiproliferativo significativo nas células NG-97 e U251, iniciando-se após 24h de exposição. Luo e colaboradores (2011) demonstraram também que a KPF inibiu a proliferação de linhagens celulares de câncer de ovário. Sharma e colaboradores (2007) demonstraram em linhagens celulares de GBM (U87MG, T98G e LN229) que o KPF aumentou o acúmulo intracelular de doxorrubicina, reduzindo o efluxo da droga e resultando na exacerbação do dano induzido pela doxorrubicina por meio da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), o que potencializou o efeito tóxico da doxorrubicina. Outro estudo investigou os efeitos de vários flavonóides polihidroxilados como rutina, quercetina, apigenina, crisina, kaempferol e 3',4'-diidroxiflavona, em células de GBM (GL-15) e semelhante ao nosso estudo, os autores observaram que os flavonoides estudados diminuíram o número de células viáveis e induziram a apoptose (SANTOS et al., 2015).

Além disso, em estudos prévios, o KPF causou parada do ciclo celular na fase G2/M, impedindo a migração em células de gliomas humanos por níveis aumentados de IL-6, IL-8, quimiocinas, proteína quimioatraente de monócitos-1, Bcl-2, caspase-3 clivada, proteínas antiapoptóticas survivina e XIAP, expressão de poli(ADP-ribose) polimerase clivada, despolarização do potencial de membrana mitocondrial e rápida redução na fosforilação de ERK e AKT (SHARMA et al., 2007; JEONG et al., 2009; COLOMBO et al., 2018). Em nosso estudo, também observamos a parada do ciclo nas fases S e G2/M nas linhagens NG-97 e U251 resistente a TMZ exposta aos extratos. De fato, os resultados observados podem ser explicados por um efeito sinérgico de KPF e seus derivados com outros flavonóides naturais presentes no extrato de *Sophora japonica* em menor quantidade, como a quercetina, rutina também descrita por promover parada do ciclo celular em G2/M (FORMICA e REGELSON 1995).

Ainda, foi observado significativa redução na migração celular, nas células expostas aos extratos avaliados, de acordo com um estudos prévios, o qual demonstrou que flavonóides são capazes de reduzir a expressão e atividade das metaloproteinases *MMP-2*, *MMP-3* e *MMP-9* (LIN et al., 2010; SANTOS et al., 2015; LI et al., 2019). Observamos resultados semelhantes após exposição das células aos extratos SJ ou SJ-b nas células de gliomas, ao observarmos uma redução significativa do nível de expressão de *MMP9*, mesmo quando as células foram estimuladas com TPA, um composto conhecido como ativador da migração celular.

Uma característica marcante do GBM é sua subpopulação de CTS responsáveis por promoverem a auto renovação das células tumorais e capacidade de recidiva após a remoção cirúrgica (SINGH et al., 2004; BAO et al., 2006; CALABRESE et al., 2007; CHEN et al., 2012; LATHIA et al., 2015; PRAGER et al., 2020). Em nosso estudo, os extratos de SJ e SJ-b inibiram de forma significativa a formação de neuroesferas, sugerindo que ambos os compostos possuem a capacidade de inibir a subpopulação de CTS. Em nosso conhecimento, este estudo é o primeiro a relatar a referida capacidade do extrato enriquecido com KPF.

A ativação da via NF- κ B é crítica para o processo de inflamação, proliferação e carcinogênese, evidenciando a importância da identificação de compostos com potencial inibitório desta via. Flavonoides como quercetina, genisteína, apigenina, epigallocatequina 3-galato e KPF modulam a expressão e ativação das citocinas IL-1 β , fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), IL-6 e IL-8; regula a expressão gênica de muitas moléculas pró-inflamatórias, como NF- κ B, proteína ativadora-1 (AP-1), molécula de adesão intercelular-1 (ICAM) e molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM) (Al-Khayri et al., 2022). Ghoda e colaboradores (1997) verificaram que KPF demonstrou um efeito quimioprotetor ao inibir os genes *RSK2* e *MSK1*, ambos envolvidos na progressão tumoral e ativação da via NF- κ B, após exposição à luz ultravioleta na pele de camundongos com melanoma. Em nosso estudo, os genes participantes da via NF- κ B (*TRAF6* e *IRAK2*) e genes envolvidos na ativação de NF- κ B (*IL-1 β* e *TNF- α*) apresentaram expressão inibida após exposição aos extratos de SJ e SJ-b nas células NG-97 e U251. O ensaio da luciferase utilizando a linhagem NG-97 também comprovou que ambos os extratos foram capazes de modular a atividade promotora de NF- κ B, de acordo com estudos anteriores (LIN et al., 2010; YU et al., 2013; WANG et al., 2016).

No presente estudo foram avaliados a influência das SNVs rs76276169 T>C em *PARG* e rs2229714 G>A em *RSK1* no risco para o GBM. Ainda, a ação antitumoral dos extratos de SJ e SJ-b evidenciado pelo efeito citotóxico, apoptótico, antiproliferativo, anti-migratório e inibitório de CTS e da via NF- κ B. Assim, os extratos de SJ e SJ-b podem ser considerados

potenciais composto terapêutico para gliomas de alto grau. Futuros estudos *in vivo* poderão comprovar os resultados do presente estudo.

6. CONCLUSÕES

- ✓ Foram identificados os diferentes genótipos das SNVs rs76276169 T>C e rs2229714 G>A na região 3'UTR dos genes *PARG* e *RSK1*, respectivamente. O genótipo homocigoto selvagem das SNVs avaliadas foi significativamente associado à suscetibilidade ao GBM na comparação com o grupo controle do estudo.
- ✓ Os genótipos selvagens das SNVs foram associados à proteção da doença na comparação entre grupo de pacientes com GBM e grupo controle ABraOM, diferente do observado na comparação com o grupo controle do estudo. Essa divergência aponta para a limitação do nosso tamanho amostral.
- ✓ Os genótipos selvagens de risco das SNVs rs76276169 e rs2229714 não influenciaram os aspectos clínicos (idade, sexo, cor da pele e Karnofsky) e do tumor (localização primária).
- ✓ Os diferentes genótipos das SNVs rs76276169 e rs2229714 não influenciaram a sobrevida global dos pacientes com GBM e não foram um fator associado à recorrência da doença nesses pacientes.
- ✓ A média da expressão relativa de *PARG* foi significativamente maior nos pacientes portadores do genótipo heterocigoto (TC) para a SNV rs76276169. Além disso, a expressão relativa de *RSK1* foi significativamente diminuída nos pacientes portadores do genótipo variante (AA) para SNV rs2229714.
- ✓ Foram identificados o KPF aglicona e seus análogos glicosilados, Kaempferol-3-O-ramnosídeo, com uma porção glicosil, KPF-3-O-glicosídeo-3"-ramnosídeo e KPF-3-galactosídeo-6"-rhamnosídeo-3"-rhamnosídeo no extrato vegetal de SJ. Além disso, o uso da enzima hesperidina elevou os níveis de KPF aglicona em 40% no extrato de SJ-b.
- ✓ Os extratos de SJ e SJ-b apresentaram reduzido efeito citotóxico na linhagem celular não-tumoral de fibroblastos dérmicos (HDFa), com viabilidade celular ou IC50 inferior a 50% pelo ensaio MTT.
- ✓ O extrato de SJ apresentou efeito citotóxico nas linhagens de gliomas de alto grau, NG-97 e U251, com IC50 de 600 e 800 µM após 72 h de exposição, respectivamente. O

extrato de SJ-b apresentou efeito citotóxico nas células NG-97 e U251, com IC50 de 600 e 1800 μM após 72 h, respectivamente.

- ✓ A exposição das células NG-97 e U251 aos extratos de SJ ou SJ-b induziu a apoptose avaliada pelo ensaio de fragmentação do DNA; reduziu a proliferação celular a partir de 24 h de exposição pelo ensaio de exclusão celular com azul de Tripán.
- ✓ O ensaio de citometria de fluxo para ciclo celular evidenciou que ambos os extratos promoveram parada do ciclo celular nas fases S e G2/M nas linhagens celulares de gliomas, mas não resultaram em necrose. Entretanto, apoptose foi significativamente mais evidente nas células NG-97.
- ✓ O ensaio de migração celular evidenciou efeito anti-migratório significativo após exposição das células NG-97 e U251 aos extratos de SJ ou SJ-b, mesmo após estímulo com TPA, observado pela redução significativa do nível de expressão relativa de *MMP9*.
- ✓ Foi observado que os extratos SJ e SJ-b inibiram a formação de neuroesferas das células NG-97 e U251, indicando inibição das CTSs de gliomas.
- ✓ Nas células NG-97 a expressão relativa de *TRAF6* e *TNF α* foi significativamente reduzida após exposição ao extrato de SJ-b e a expressão de *IL1 β* foi significativamente reduzida após tratamento com extrato de SJ. Nas células U251 a expressão relativa de *TRAF6* e *TNF α* foi significativamente reduzida após exposição a ambos os compostos e a expressão de *IRAK2* foi reduzida após tratamento com SJ e SJ-b.
- ✓ Foi observado redução significativa da atividade promotora de NF-kB nas células expostas aos extratos de SJ ou SJ-b pelo ensaio da luciferase após transfecção transiente com o vetor NF-kB-luciferase repórter, confirmando a modulação da via pelos extratos estudados.

7. HIGHLIGHTS

O estudo apresentou resultados inéditos, dos quais os genótipos ancestrais das SNVs rs76276169-TT e rs2229714-GG, foram associados à suscetibilidade para o GBM; embora estudos com um tamanho amostral maior e em diferentes populações serão necessários. Além disso, os resultados evidenciaram que os extratos de SJ e SJ-b diminuíram a proliferação e induziram a apoptose nas células de gliomas de alto grau, devido a inibição da via NF-kB. O extrato de SJ-b demonstrou um efeito inibitório mais evidente em todos os ensaios realizados,

principalmente quanto ao potencial de invasão e migração celular, indicando ser este um candidato antineoplásico superior. Além disso, ambos os extratos inibiram a formação de neuroesferas (CTS), com melhor eficiência no extrato de SJ-b. Os resultados indicaram que a síntese do extrato de SJ enriquecido com KPF (SJ-b) pelo método de hidrólise enzimática parece ser uma alternativa viável. Além disso, é importante considerar um possível efeito sinérgico antitumoral do KPF com outros flavonoides presentes, mas em menor quantidade, no extrato de SJ-b.

8. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

- O tamanho amostral ideal estimado pelo cálculo de Bieguelman não foi atingido para este estudo, uma vez que o GBM é um tumor raro.
- A idade média dos pacientes com GBM e do grupo controle do estudo foi significativamente diferente.
- Resultados divergentes foram observados em relação ao risco para o GBM associado às SNVs rs76276169 e rs2229714, quando avaliados em comparação às amostras controle do estudo e amostras controle do banco de dados ABraOM, apontando uma limitação do nosso grupo controle.
- As amostras de DNA utilizadas para a avaliação da fragmentação do DNA pelo método de eletroforese, não foram submetidas a tratamento com RNase, indicando possível contaminação por RNA.
- O cálculo das concentrações utilizadas no estudo para os extratos SJ e SJ-b, foi realizado considerando apenas o peso molar do KPF, desconsiderando a presença de seus derivados e outros flavonóides, presentes em menor quantidade.
- Não foram realizadas análises estatísticas comparativas entre os extratos SJ e SJ-b para a validação do efeito superior de SJ-b em comparação ao extrato SJ. Essa conclusão foi apenas visual.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALARCON, C.R.; LEE, H.; GOODARZI, H.; HALBERG, N.; TAVAZOIE, S.F. N6-methyladenosine marks primary microRNAs for processing. **Nature**, v.519, p.482–5, 2015.
- ALIFIERIS, C., TRAFALIS, D.T. Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. **Pharmacol Ther.**, v.152, p. 63-82, 2015.
- American Association of Neuroscience Nurses (AANN) **Care of the adult patient with a brain tumor**. 2014 Disponível em: <<http://www.abta.org/resources/health-care-provider/final-adult-clinical-practice.pdf>> acesso em: 26/09/2022.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer Facts & Figures 2021**. Atlanta, GA: **American Cancer Society**. Disponíveis : <<https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2021.html>> Acesso em: 10 de agosto de 2021.
- ANJUM, R., BLENIS, J. The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signalling. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v.9, n.10, p.747-58, 2008.
- AUBIN, R.J.; DAM, V.T.; MICLETTE, J.; BROUSSEAU, Y.; HULETSKY, A.; POIRIER, G.G. Hyper (ADP-ribosyl) ation of histone H1. **Can J Biochem.**, v.60, n.12, p.1085-94, 1982.
- BAKER, S.D; WIRTH, M: STATEKEVICH, P; REIDEBERG, P; ALTON, K; SARTORIUS, S.E; DUGAN, M; CUTLER, D; BATRA, V; GROCHOW, L.B DONEHOWER, R.C; ROWINSKY, E.K Absorption, metabolism, and excretion of 14C-temozolomide following oral administration to patients with advanced cancer. **Clin Cancer Res**, v.5, p.309-317, 1999.
- BAO, S.; WU, Q.; MCLENDON, R. E.; HAO, Y.; SHI, Q.; HJELMELAND, A. B.; DEWHIRST, M. W.; BIGNER, D. D.; RICH, J. N. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. **Nature.**, v. 444, n. 7120, p. 756–760, 2006. doi: 10.1038/nature05236.
- BARNETT, R.; LARSON, G. A phenol-chloroform protocol for extracting DNA from ancient samples. **Methods Mol Biol.**, v. 840, p. 13-19, 2012.
- BAZZONI, R.; BENTIVEGNA, A. Role of Notch Signaling Pathway in Glioblastoma Pathogenesis. **Cancers Basel.**, v. 11, n. 3, p. 292, 2019.
- BEIGUELMAN, B. Curso Prático de Bioestatística, 5ª Ed. Ribeirão Preto: **FUNPEC**, p. 274, 2002.
- BEIGUELMAN, B. Dinâmica dos genes nas famílias e nas populações, 2ª Ed. **Sociedade Brasileira de Genética.**, 1995
- BOHN, A.; BRALEY, A.; DE LA VEGA, P.R.; CARLOS ZEVALLOS, J.; BARENGO, N.C. The association between race and survival in glioblastoma patients in the US: A retrospective cohort study. **PLoS ONE.**, v.13, p.e0198581, 2018.
- BOHUSLAV, J., CHEN, L.F., KWON, H., MU, Y., GREENE, W.C. p53 induces NF-kappaB activation by an IkappaB kinase-independent mechanism involving phosphorylation of p65 by ribosomal S6 kinase 1. **J Biol Chem.**, v. 279, n. 25, p. 26115-25, 2004
- BONAFÉ, G.A.; BOSCHIERO, M.N.; SODRÉ, A.R.; ZIEGLER, J.V.; ROCHA, T.; ORTEGA, M.M. Natural Plant Compounds: Does Caffeine, Dipotassium Glycyrrhizinate, Curcumin, and Euphol Play Roles as Antitumoral Compounds in Glioblastoma Cell Lines?. **Front Neurol.**, v, 12, p. 784330, 2022.
- BRASSESCO MS, ROBERTO GM, MORALES AG, OLIVEIRA JC, DELSIN LEA,

PEZUK JA, VALERA ET, CARLOTTI CG, REGO EM, DE OLIVEIRA HF, SCRIDELI CA, UMEZAWA K, TONE LG. Inhibition of NF- κ B by dehydroxymethylepoxyquinomicin suppresses invasion and synergistically potentiates temozolomide and γ -radiation cytotoxicity in glioblastoma cells. **Chemoter Res Pract.**, 2013: 1-16, 2013.

BRENNAN, C. W.; VERHAAK, R.G.; MCKENNA, A.; CAMPOS, B.; NOUSHMEHR, H.; SALAMA, S. R.; ZHENG, S.; CHAKRAVARTY, D.; SANBORN, J. Z.; BERMAN, S. H.; BEROUKHIM, R.; BERNARD, B.; WU, C. J.; GENOVESE, G.; SHMULEVICH, I.; BARNHOLTZ-SLOAN, J.; ZOU, L.; VEGESNA, R.; SHUKLA, S. A.; CIRIELLO, G.; YUNG, W. K.; ZHANG, W.; SOUGNEZ, C.; MIKKELSEN, T.; ALDAPE, K.; BIGNER, D. D.; VAN MEIR, E. G, PRADOS, M.; SLOAN, A.; BLACK, K. L.; ESCHBACHER, J.; FINOCCHIARO, G.; FRIEDMAN, W.; ANDREWS, D. W.; GUHA, A.; IACOCCA, M.; O'NEILL, B. P.; FOLTZ, G.; MYERS, J.; WEISENBERGER, D. J.; PENNY, R.; KUCHERLAPATI, R.; PEROU, C. M.; HAYES, D. N.; GIBBS, R.; MARRA, M.; MILLS, G. B.; LANDER, E.; SPELLMAN, P.; WILSON, R.; SANDER, C.; WEINSTEIN, J.; MEYERSON, M.; GABRIEL, S.; LAIRD, P.W.; HAUSSLER, D.; GETZ, G.; CHIN, L.; TCGA Research Network. The somatic genomic landscape of glioblastoma. **Cell**. V. 155, n. 2, p. 462-77, 2013.

BRODBELT, A.; GREENBERG, D.; WINTERS, T.; WILLIAMS, M.; VERNON, S.; COLLINS, V.P. Glioblastoma in England: 2007–2011. **Eur. J. Cancer.**, v.51, p.533–542, 2015.

BROOKES, A. J. The essence of SNPs. **Gene.**, v. 234, n. 2, p. 177-86, 1999.

CALABRESE, C.; POPPLETON, H.; KOCAK, M.; HOGG, T. L.; FULLER, C.; HAMNER, B.; OH, E. Y.; GABER, M. W.; FINKLESTEIN, D.; ALLEN, M.; FRANK, A.; BAYAZITOV, I. T.; ZAKHARENKO, S. S.; GAJJAR, A.; DAVIDOFF, A.; GILBERTSON, R. J. A perivascular niche for brain tumor stem cells. **Cancer Cell.**, v. 11, n. 1, p. 69-82, 2007.

CALDERÓN-MONTAÑO, J.M., BURGOS-MORÓN, E., PÉREZ-GUERRERO, C., LÓPEZ-LÁZARO, M. A review on the dietary flavonoid kaempferol. **Mini Rev Med Chem.**, v. 11, n. 4, p. 298-344, 2011.

CALIN, G.A.; DUMITRU, C.D.; SHIMIZU, M.; BICHI, R.; ZUPO, S.; NOCH, E.; ALDLER, H.; RATTAN, S.; KEATING, M.; RAI, K.; RASSENTI, L.; KIPPS, T.; NEGRINI, M.; BULLRICH, F.; CROCE, C.M. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v.99, n.24, p.15524-9, 2002.

CHAMBLESS, L.B.; KISTKA, H.M.; PARKER, S.L.; HASSAM-MALANI, L.; MCGIRT, M.J.; THOMPSON, R.C. The relative value of postoperative versus preoperative Karnofsky Performance Scale scores as a predictor of survival after surgical resection of glioblastoma multiforme. **J Neurooncol.**, v.121, n.2, p.359-64, 2015.

CHAN, D.T.; HSIEH, S.Y.; LAU, C.K.; KAM, M.K.; LOONG, H.H, TSANG, W.K, POON, D.M.; POON, W.S. Ten-year review of survival and management of malignant glioma in Hong Kong. **Hong Kong Med J.**, v.23, n.2, p.134-9, 2017.

CHEKALINA, N., BURMAK, Y., PETROV, Y., BORISOVA, Z., MANUSHA, Y., KAZAKOV, Y., KAIDASHEV, I. Quercetin reduces the transcriptional activity of NF- κ B in stable coronary artery disease. **Indian Heart J.**, v. 70, n. 5, p. 593-597, 2018.

CHEN, J.; LI, Y.; YU, T. S.; MCKAY, R. M.; BURNS, D. K.; KERNIE, S. G.; PARADA, L. F. A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. **Nature.**

v. 488, n. 7412, p. 522–526, 2012.

CHEN, T., ZHANG, X., ZHU, G., LIU, H., CHEN, J., WANG, Y., HE, X. Quercetin inhibits TNF- α induced HUVECs apoptosis and inflammation via downregulating NF- κ B and AP-1 signaling pathway in vitro. **Medicine (Baltimore)**, 2020 v. 99, n. 38, p.e22241.

CHEN, Y.; HU, F.; ZHOU, Y.; CHEN, W.; SHAO, H.; ZHANG, Y. MGMT promoter methylation and glioblastoma prognosis: a systematic review and meta-analysis. **Arch Med Res.**, v. 44, n. 4, p. 281-90, 2013.

CHONG, J., WISHART, D.S., AND XIA J. Using MetaboAnalyst 4.0 for comprehensive and integrative metabolomics data analysis. **Curr Protoc Bioinformatics.**, v.68, p.e86, 2019.

D'ALESSANDRO, G.; GRIMALDI, A.; CHECE, G.; PORZIA, A.; ESPOSITO, V.; SANTORO, A.; SALVATI, M.; MAINIERO, F.; RAGOZZINO, D.; DI ANGELANTONIO, S.; WULFF, H.; CATALANO, M.; LIMATOLA, C. KCa3.1 channel inhibition sensitizes malignant gliomas to temozolomide treatment. **Oncotarget.**, v.7, n.21, p.30781-96, 2016.

DENLI, A.M.; TOPS, B.B.; PLASTERK, R.H.; KETTING, R.F.; HANNON, G.J. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. **Nature.**, v.432, p.231–5, 2004.

DI MUZIO, B.; GAILLARD, F. **Glioblastoma de células gigantes**. Disponível em: <www.radiopaedia.org>. Acesso: em 20 de setembro de 2022

DU, Y., JIA, C., LIU, Y., LI, Y., WANG, J., SUN, K. Isorhamnetin Enhances the Radiosensitivity of A549 Cells Through Interleukin-13 and the NF- κ B Signaling Pathway. **Front Pharmacol.**, v. 11, n. 610772, 2021.

ELLOR, S. V.; PAGANO-YOUNG, T. A.; AVGEROPOULOS, N. G. Glioblastoma: Background, standard treatment paradigms, and supportive care considerations. **J Law Med Ethics.**, v. 42, n. 2, p. 171–182, 2014.

FARZANEH, F.; ZALIN, R.; BRILL, D.; SHALL, S. DNA strand breaks and ADP-ribosyl transferase activation during cell differentiation. **Nature.**, v.300, n.5890, p.362-6, 1982.

FERLAY, J.; COLOMBET, M.; SOERJOMATARAM, I.; MATHERS, C.; PARKIN, D. M.; PIÑEROS, M.; ZNAOR, A.; BRAY, F. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. **Int J Cancer.**, v.144, n. 8, p. 1941-1953, 2019.

FOGH, B.S.; MULTHAUPT, H.A.B. & COUCHMAN, J.R. Protein kinase C, focal adhesions and the regulation of cell migration. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 62, p. 172–184, 2014.

FORMICA, J.V., REGELSON, W. Review of the Biology of Quercetin and Related Bioflavonoids, **Fd Chem. Toxic.**, v. 33, n. 12, p. 1061-1080, 1995

FRÖDIN, M., GAMMELTOFT, S. Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction. **Mol Cell Endocrinol.**, v. 151, p. 65-77, 1999.

GAILLARD, F. WHO classification of CNS tumors. <www.radiopaedia.org>. Acesso: em 19 de setembro de 2022

GHODA L., LIN X., GREENE W.C. The 90-kDa ribosomal S6 kinase (pp90rsk) phosphorylates the N-terminal regulatory domain of I- κ B alpha and stimulates its degradation in vitro. **J. Biol. Biochem.**, v.272, p.2121–21288, 1997.

GHOSH, M.; SHUBHAM, S.; MANDAL, K.; TRIVEDI, V.; CHAUHAN, R.; NASEERA, S. Survival and prognostic factors for glioblastoma multiforme: Retrospective single-institutional study. **Indian J. Cancer.**, v.54, p.362–367, 2017.

GILAM, A.; CONDE, J.; WEISSGLAS-VOLKOV, D.; OLIVA, N.; FRIEDMAN, E.;

ARTZI, N.; SHOMRON, N. Local microRNA delivery targets Palladin and prevents metastatic breast cancer. **Nat Commun.**, v.7, p.12868, 2016.

GIOLO, S.R.; SOLER, J.M.; GREENWAY, S.C.; ALMEIDA, M.A.; DE ANDRADE, M.; SEIDMAN, J.G.; SEIDMAN, C.E.; KRIEGER, J.E.; PEREIRA, A.C. Brazilian urban population genetic structure reveals a high degree of admixture. **Eur J Hum Genet.**, v. 20, n. 1, p. 111-6, 2012.

GLOBOCAN. **Cancer tomorrow**. Disponível em: < <http://gco.iarc.fr/tomorrow/home>>. Acesso em: 10 de outubro de 2020.

GOGOLA, E.; DUARTE, A.A.; DE RUITER, J.R.; WIEGANT, W.W.; SCHMID, J.A.; DE BRUIJN, R.; JAMES, D.I.; GUERRERO LLOBET, S.; VIS, D.J.; ANNUNZIATO, S.; VAN DEN BROEK, B.; BARAZAS, M.; KERSBERGEN, A.; VAN DE VEM, M.; TARSOUNAS, M.; OGILVIE, D.J.; VAN VUGT, M.; WESSELS, L.F.A.; BARTKOVA, J.; GROMOVA, I.; ANDÚJAR-SÁNCHEZ, M.; BARTEK, J.; LOPES, M.; VAN ATTIKUM, H.; BORST, P.; JONKERS, J.; ROTTENBERG, S. Selective Loss of *PARG* Restores PARylation and Counteracts PARP Inhibitor-Mediated Synthetic Lethality. **Cancer Cell.**, v. 33, n. 6, p. 1078-1093, 2018

GOUSIAS, K.; MARKOU, M.; VOULGARIS, S.; GOUSSIA, A.; VOULGARI, P.; BAI, M.; POLYZOIDIS, K.; KYRITSIS, A.; ALAMANOS, Y. Descriptive epidemiology of cerebral gliomas in northwest Greece and study of potential predisposing factors, 2005-2007. **Neuroepidemiology.**, v. 33, n. 2, p. 89-95, 2009.

GRAMATZKI, D.; DEHLER, S.; RUSHING, E.J.; ZAUGG, K.; HOFER, S.; YONEKAWA, Y.; BERTALANFFY, H.; VALAVANIS, A.; KOROL, D.; ROHRMANN, S.; PLESS, M.; OBERLE, J.; ROTH, P.; OHGAKI, H.; WELLER, M. Glioblastoma in the Canton of Zurich, Switzerland revisited: 2005 to 2009. **Cancer.**, v.122, n.14, p.2206-15, 2016.

GUO, S.; WANG, Y.; LI, Y.; LI, Y.; FENG, C.; LI, Z. Daidzein-rich isoflavones aglycone inhibits lung cancer growth through inhibition of NF- κ B signaling pathway. **Immunol Lett.**, v. 222, p. 67-72, 2020.

GUPTA, S.C.; SUNDARAM, C.; REUTER, S.; AGGARWAL, B.B. Inhibiting NF- κ B activation by small molecules as a therapeutic strategy. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1799, n. 10-12, p.775-87, 2010.

HA M.; KIM, V.N. Regulation of microRNA biogenesis. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v.15, p.509–24, 2014.

HAN, J.; LEE, Y.; YEOM, K.H.; KIM, Y.K.; JIN, H.; KIM, V.N. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. **Genes Dev.**, v.18, n.24, p.3016-27, 2004.

HANSEN, S.; RASMUSSEN, B.K.; LAURSEN, R.J.; KOSTELJANETZ, M.; SCHULTZ, H.; NØRGÅRD, B.M.; GULDBERG, R.; GRADEL, K.O. Treatment and survival of glioblastoma patients in Denmark: The Danish Neuro-Oncology Registry 2009–2014. **J. Neurooncol.**, v.139, p.479–489, 2018

HARRISION, D.; GRAVELLS, P.; THOMPSON, R.; BRYANT, H.E. Poly (ADP-Ribose) Glycohydrolase (*PARG*) vs. Poly (ADP-Ribose) Polymerase (*PARP*) - Function in Genome Maintenance and Relevance of Inhibitors for Anti-cancer Therapy. **Front Mol Biosci.**, v. 7, n. 191, 2020.

HE, X.; BAI, Y.; ZHAO, Z.; WANG, X.; FANG, J.; HUANG, L.; ZENG, M.; ZHANG, Q.; ZHANG, Y.; ZHENG, X. Local and traditional uses, phytochemistry, and pharmacology of *Sophora japonica* L.: a review. **J Ethnopharmacol.**, v. 187, p. 160-182, 2016

- HILL, M.; TRAN, N. miRNA interplay: mechanisms and consequences in cancer. **Dis Model Mech.**, v.14 n.4 p.dmm 047662, 2021.
- HUANG, W.W.; CHIU, Y.J.; FAN, M.J.; LU, H.F.; YEH, H.F.; LI, K.H.; CHEN, P.Y.; CHUNG, J.G.; YANG, J.S. Kaempferol induced apoptosis via endoplasmic reticulum stress and mitochondria-dependent pathway in human osteosarcoma U-2 OS cells. **Mol Nutr Food Res.**, v. 54, p.1-11, 2010.
- HUNTER, J.E.; WILLMORE, E.; IRVING, J.A.; HOSTOMSKY, Z.; VEUGER, S.J., DURKACZ, B.W. NF- κ B mediates radio-sensitization by the PARP-1 inhibitor, AG-014699. **Oncogene.**, v.31, n.2, p.251-264, 2012.
- INSTITUTO NACIONAL DE CANCER (INCA) Estimativa 2020-2022: incidencia de cancer no Brasil / Instituto Nacional de Cancer Jose Alencar Gomes da Silva. Coordenacao de Prevencao e Vigilancia. – Rio de Janeiro: INCA, 2020
- JOHNSON, D. R.; FOGH, S. E.; GIANNINI, C.; KAUFMANN, T. J.; RAGHUNATHAN, A.; THEODOPOULOS, P. V.; CLARKE, J. L.; Case-based review: Newly diagnosed glioblastoma. **Neurooncol Pract.**, v. 2, n. 3, p. 106–121, 2015.
- JOST, P.J.; RULAND, J. Aberrant NF- κ B signaling in lymphoma: mechanisms, consequences, and therapeutic implications. **Blood.**, v. 109, n. 7, p. 2700-2707, 2007
- KAINA, B.; CHRISTMANN, M.; NAUMANN, S.; ROOS, W. P. MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. **DNA Repair (Amst).**, v. 6, n. 8, p. 1079-99, 2007.
- KARPOVA, Y.; JOHNSON, S.J.; BORDET, G.; GUO, D.; GHATAK, A.; MARKOV, D.A.; TULIN, A.V. Upregulation of PARG in prostate cancer cells suppresses their malignant behavior and downregulates tumor-promoting genes. **Biomed Pharmacother.**, v.153, p.113504, 2022.
- KAZMI, F.; SOON, Y.Y.; LEONG, Y.H.; KOH, W.Y.; VELLAYAPPAN, B. Re-irradiation for recurrent glioblastoma (GBM): a systematic review and meta-analysis. **J Neurooncol.**, v.142, n.1, p.79-90, 2019.
- KERNOHAN JW, SAYRE GP *Tumors of the Central Nervous System*. Armed Forces Institute of Pathology: Washington, DC, 1952.
- KLEIHUES, P.; BURGER, P. C.; SCHEITHAUER, B. W. The new WHO classification of brain tumours. **Brain Pathol.**, v. 3, n 3, p. 255-68, 1993.
- KLEIHUES, P.; LOUIS, D. N.; SCHEITHAUER, B. W.; RORKE, L. B.; REIFENBERGER, G.; BURGER, P. C.; CAVENEE, W. K. The WHO classification of tumors of the nervous system. **J Neuropathol Exp Neurol.**, v. 61, n. 3, p. 215-25, 2002.
- KRASNAPOLSKI, M. A.; TODARO, L. B.; DE KIER JOFFÉ, E. B. Is the epithelial-to-mesenchymal transition clinically relevant for the cancer patient? **Curr Pharm Biotechnol.**, v. 12, n. 11, p. 1891-9, 2011.
- KOBYLINSKA, L.I.; KLYUCHIVSKA, O.Y.; GRYTSYNA, I.I.; FINIUK, N.; PANCHUK, R.R.; STARYKOVYCH, M.O.; LEHKA, L.; LESYK, R.B.; ZIMENKOVSKY, B.S.; STOIKA, R.S. Differential pro-apoptotic effects of synthetic 4-thiazolidinone derivative Les-3288, doxorubicin and temozolomide in human glioma U251 cells. **Croat Med J.**, v.58, n.2, p.150-159, 2017.
- KUMAR, S.; ASHRAF, M.U.; KUMAR, A.; BAE Y.S. Therapeutic Potential of microRNA Against Th2-associated Immune Disorders. **Curr Top Med Chem.**, v.21, n.8, p.753-766,

2021.

KUMAR, H.; SAVALIYA, M.; BISWAS, S.; NAYAK, P.G.; MALIYAKKAL, N.; MANJUNATH SETTY, M.; GOURISHETTI, K.; PAI, K.S. Assessment of the in vitro cytotoxicity and in vivo anti-tumor activity of the alcoholic stem bark extract/fractions of *Mimusops elengi* Linn. **Cytotechnology.**, v.68, p.861-877, 2016.

LAN, L.; NAKAJIMA, S.; OOHATA, Y., TAKAO, M., OKANO, S., MASUTANI, M., WILSON, S.H., AND YASUI, A.. In situ analysis of repair processes for oxidative DNA damage in mammalian cells. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.101, p. 13738–13743, 2004.

LAN, L.; NAKAJIMA, S.; OOHATA, Y.; TAKAO, M.; OKANO, S.; MASUTANI, M.; WILSON, S.H.; YASUI, A. Análise in situ de processos de reparo de danos oxidativos ao DNA em células de mamíferos **Proc Natl Acad Sci.**, v.101, n.38, p.13738-43, 2004.

LARJAVAARA, S.; MÄNTYLÄ, R.; SALMINEN, T.; HAAPASALO, H.; RAITANEN, J.; JÄÄSKELÄINEN, J.; AUVINEN, A. Incidence of gliomas by anatomic location. **Neuro Oncol.**, v. 9, n. 3, p. 319-25, 2007.

LATHIA, J. D.; MACK, S. C.; MULKEARNS-HUBERT, E. E.; VALENTIM, C. L.; RICH, J. N. Cancer stem cells in glioblastoma. **Genes Dev.**, v. 29, n. 12, p. 1203-17, 2015.

Li Y, Ma Y, Wu Z, Xie R, Zeng F, Cai H, Lui S, Song B, Chen L, Wu M. Advanced Imaging Techniques for Differentiating Pseudoprogression and Tumor Recurrence After Immunotherapy for Glioblastoma. **Front Immunol.**, v. 12, p. 790674, 2021.

LI, J.; KOCZOR, C.A.; SAVILLE, K.M.; HAYAT, F.; BEISER, A.; MCCLELLAN, S.; MIGAUD, M.E.; SOBOL, R.W. Overcoming Temozolomide Resistance in Glioblastoma via Enhanced NAD⁺ Bioavailability and Inhibition of Poly-ADP-Ribose Glycohydrolase. **Cancers.**, v.14, n.15, p.3572, 2022.

LI, X.; LIU, Y.; GRANBERG, K.J.; WANG, Q.; MOORE, L.M.; JI, P.; GUMIN, J.; SULMAN, E.P.; CALIN, G.A.; HAAPASALO, H.; NYKTER, M.; SHMULEVICH, I.; FULLER, G.N.; LANG, F.F.; ZHANG, W. Two mature products of MIR-491 coordinate to suppress key cancer hallmarks in glioblastoma. **Oncogene.**, v. 34, n. 13, p. 1619-1628, 2015

LIN, C.W.; SHEN, S.C.; CHIEN, C.C.; YANG, L.Y.; SHIA, L.T.; CHEN, Y.C. 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced invasion/migration of glioblastoma cells through activating PKC α /ERK/NF- κ B-dependent MMP-9 expression. **J. Cell. Physiol.**, v.225 n.2, p.472–481, 2010.

LIU, J. Control of protein synthesis and mRNA degradation by microRNAs. **Curr Opin Cell Biol.**, v.20, n.2, p.214-2, 2008.

LIU, Y.F.; BAI, Y.Q.; QI, M. Daidzein attenuates abdominal aortic aneurysm through NF- κ B, p38MAPK and TGF- β 1 pathways. **Mol Med Rep.**, v. 14,n. 1, p. 955-62, 2016.

LOUIS D.N.; PERRY, A.; REIFENBERGER, G.; DEIMLING, A.V.; BRANGER, D.F.; CAVENEE, W.K.; OHGAKI, H.; WIESTLER, O.D.; KLEIHUES, P.; ELLISON, D.W. The 2016 World Health Organization of Tumors of the central nervous system: a summary. **Acta Neuropathol.**, v.131, n.6, p. 803 – 820, 2016.

LOUIS, D. N.; OHGAKI, H.; WIESTLER, O. D.; CAVENEE, W. K.; BURGER, P. C.; JOUVET, A.; SCHEITHAUER, B. W.; KLEIHUES, P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta Neuropathol.**, v. 114 n. 2 p. 97-109, 2007.

LOUIS, D. N.; PERRY, A.; WESSELING, P.; BRAT, D. J.; CREE, I. A.; FIGARELLA-BRANGER, D.; HAWKINS, C.; NG, H. K.; PFISTER, S. M.; REIFENBERGER, G.;

- SOFFIETTI, R.; VON DEIMLING, A.; ELLISON, D.W. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Neuro Oncol.**, v. 23, n. 8, p. 1231-1251, 2021.
- LU, J.; GETZ, G.; MISKA, E.A.; ALVAREZ-SAAVEDRA, E.; LAMB, J.; PECK, D.; SWEET-CORDERO, A.; EBERT, B.L.; MAK, R.H.; FERRANDO, A.A.; DOWNING, J.R.; JACKS, T.; HORVITZ, H.R.; GOLUB, T.R. MicroRNA expression profiles classify human cancers. **Nature.**, v. 435 n.7043, p.834-8, 2005.
- LUO, H.; JIANG, B.H.; KING, S.M.; CHEN, Y.C. Inhibition of cell growth and VEGF expression in ovarian cancer cells by flavonoids. **Nutr Cancer.**, v. 60, n. 6, p.800–9, 2008.
- MAHASE, S.; RATTENNI, R.N.; WESSELING, P.; LEENDERS, W.; BALDOTTO, C.; JAIN, R.; ZAGZAG, D. Hypoxia-Mediated Mechanisms Associated with Antiangiogenic Treatment Resistance in Glioblastomas. **Am J Pathol.**, v. 187, n. 5, p. 940-953, 2017.
- MARQUES, L. B.; COLOMBO, R.; VILLALOBOS, A.C.; WAGNER, A.L.; LANG, M.R.; STECLAN, C.A. (). Incidência de gliomas do sistema nervoso central e sua correlação com a ocupação profissional na região do Planalto Norte Catarinense. **Saúde Rev. Inter.**, 11(ed.esp.anais), p.19–25, 2022.
- MassBank of North America (MoNA). <<https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/>> Acesso: em 01 de novembro de 2020.
- MINNITI, G.; LOMBARDI, G.; PAOLINI, S. Glioblastoma em Pacientes Idosos: Gestão Atual e Perspectivas Futuras. **Câncer Basileia.**, v. 11, n. 3, p. 336, 2019.
- MIRANDA-FILHO, A.; PIÑEROS, M.; SOERJOMATARAM, I.; DELTOUR, I.; BRAY, F. Cancers of the brain and CNS: global patterns and trends in incidence. **Neuro Oncol.**, v. 19 n. 2 p. 270-280, 2017.
- MOCHLY-ROSEN, D.; DAS, K. & GRIMES, K.V. Protein kinase C, an elusive therapeutic target? **Nat. Rev. Drug Discov.**, v.11, p. 937–957, 2012.
- MORTUSEWICZ, O.; FOUQUEREL, E.; AMÉ, J.C.; LEONHARDT, H.; SCHREIBER, V. *PARG* is recruited to DNA damage sites through poly(ADP-ribose)- and PCNA-dependent mechanisms. **Nucleic Acids Res.**, v.39, n.12, p. 5045-56, 2011.
- NASLAVSKY, MS.; YAMAMOTO, G.L.; DE ALMEIDA, T.F.; EZQUINA, S.A.M.; SUNAGA, D.Y.; PHO, N.; BOZOKLIAN, D.; SANDBERG, T.O.M.; BRITO, L.A.; LAZAR, M.; BERNARDO, D.V.; AMARO, E.J.R.; DUARTE, Y.A.O.; LEBRÃO, M.L, PASSOS-BUENO, M.R.; ZATZ, M. Exomic variants of an elderly cohort of Brazilians in the ABraOM database. **Hum Mutat.**, v. 38, n. 7, p. 751-763, 2017.
- NGUYEN, T.T.T.; TRAN, E.; ONG, C.K.; LEE, S.K.; DO, P.T, HUYNH, T.T.; NGUYEN, T.H.; LEE, J.J.; TAN, Y.; ONG, C.S, HUYNH, H. kaempferol-induced growth inhibition and apoptosis in A549 lung cancer cells is mediated by activation of mek-mapk. **J Cell Physiol.**, v.197, p. 110-121, 2003.
- NICOLAI, M.M.; WEISHAUPT, A.K.; BAESLER, J.; BRINKMANN, V.; WELLENBERG, A.; WINKELBEINER, N.; GREMME, A.; ASCHNER, M.; FRITZ, G.; SCHWERDTLE, T.; BORNHORST, J. Effects of Manganese on Genomic Integrity in the Multicellular Model Organism *Caenorhabditis elegans*. **Int J Mol Sci.**, v.22, n.20, p.10905, 2021.
- NORTHCOTT, P. A.; NAKAHARA, Y.; WU, X.; FEUK, L.; ELLISON, D. W.; CROUL, S.; MACK, S.; KONGKHAM, P. N.; PEACOCK, J.; DUBUC, A.; RA, Y. S.; ZILBERBERG, K.; MCLEOD, J.; SCHERER, S.W.; SUNIL RAO, J.; EBERHART, C. G.; GRAJKOWSKA,

- W.; GILLESPIE, Y.; LACH, B.; GRUNDY, R.; POLLACK, I. F.; HAMILTON, R. L.; VAN METER, T.; CARLOTTI, C. G.; BOOP, F.; BIGNER, D.; GILBERTSON, R. J.; RUTKA, J. T.; TAYLOR, M. D. Multiple recurrent genetic events converge on control of histone lysine methylation in medulloblastoma. **Nat Genet.**, v. 41, n. 4, p. 465-72, 2009.
- O'BRIEN, J.; HAYDER, H.; ZAYED, Y.; PENG, C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. **Front Endocrinol.**, v.9, n.402, 2018.
- OKADA, C.; YAMASHITA, E.; LEE, S.J.; SHIBATA, S.; KATAHIRA, J.; NAKAGAWA, A.; YONEDA, Y.; TSUKIHARA, T. A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery. **Science.**, v.326, n.5957, p.1275-9, 2009.
- OSTROM, Q. T.; BAUCHET, L.; DAVIS, F. G.; DELTOUR, I.; FISHER, J. L.; LANGER, C. E.; PEKMEZCI, M.; SCHWARTZBAUM, J. A.; TURNER, M. C.; WALSH, K. M.; WRENSCH, M. R.; BARNHOLTZ-SLOAN, J. S. The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review. **Neuro Oncol.**, v. 16, n. 7, p. 896-913, 2014.
- OSTROM, Q. T.; COTE, D. J.; ASCHA, M.; KRUCHKO, C.; BARNHOLTZ-SLOAN, J. S. Adult Glioma Incidence and Survival by Race or Ethnicity in the United States From 2000 to 2014. **JAMA Oncol.**, v. 4, n. 9, p. 1254–1262, 2018.
- OSTROM, Q. T.; GITTLEMAN, H.; FARAH, P.; ONDRACEK, A.; CHEN, Y.; WOLINSKY, Y.; STROUP, N. E.; KRUCHKO, C.; BARNHOLTZ-SLOAN, J. S. CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. **Neuro Oncol.**, 2013 v. 16, n. 5, p. 760, 2013.
- PAUWELS, E. K.; BOURGUIGNON, M. H. Radiation dose features and solid cancer induction in pediatric computed tomography. **Med Princ Pract.**, v. 21, n. 6, p. 508-15, 2012.
- PAZHOUHI, M.; SARIRI, R.; KHAZAEI, M.R.; MORADI, M.T, KHAZAEI, M. Synergistic effect of temozolomide and thymoquinone on human glioblastoma multiforme cell line (U87MG). **J Cancer Res Ther.**, v.14, n.5, p.1023-1028, 2018.
- PEARCE, M. S.; SALOTTI, J. A.; LITTLE, M. P.; MCHUGH, K.; LEE, C.; KIM, K. P.; HOWE, N. L.; RONCKERS, C. M.; RAJARAMAN, P.; SIR CRAFT, A. W.; PARKER, L.; BERRINGTON DE GONZÁLEZ, A. Radiation exposure from CT scans in childhood and subsequent risk of leukaemia and brain tumours: a retrospective cohort study. **Lancet.**, v. 380, n. 9840, p. 499-505, 2012.
- PEKALA, P.H.; AND MOSS, J. 3T3-L1 preadipocyte differentiation and poly(ADP-ribose) synthetase. **Mol. Cell. Biochem.**, v.53, n.54, p.221–232, 1983.
- PERRY, J.; ZINMAN, L.; CHAMBERS, A.; SPITHOFF, K.; LLOYD, N.; LAPERRIERE, N. The use of prophylactic anticonvulsants in patients with brain tumours - A systematic review. **Curr. Oncol.**, v. 13, n. 6, p. 222–229, 2006.
- PHILIPS, A.; HENSHAW, D.L.; LAMBURN, G.; O'CARROLL, M.J. Brain tumours: Rise in glioblastoma multiforme incidence in England 1995–2015 suggests an adverse environmental or lifestyle factor. **Int. J. Environ. Res. Public Health.**, v. 2018, p.7910754, 2018.
- PLOTKIN, L.I.; WALLACE, J.M. MicroRNAs and osteocytes. **Bone.**, v.150: n.115994, 2021.
- PLUMB, R.S.; JOHNSON, K.; RAINVILLE, P.; SMITH, B.W.; WILSON, I.D.; CASTRO-PEREZ, J.M.; NICHOLSON, J.K. UPLC/MS(E); a new approach for generating molecular fragment information for biomarker structure elucidation. **Rapid Commun Mass Spectrom.**

v. 20, n.13, p. 1989-94, 2006.

PRAGER, B. C.; BHARGAVA, S.; MAHADEV, V.; HUBERT, C. G.; RICH, J. N. Glioblastoma Stem Cells: Driving Resilience through Chaos. **Trends Cancer.**, v. 6, n. 3, p. 223-235, 2020.

RAMOS, S. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. **J Nutr Biochem.**, v. 18, n.7, p. 427-42, 2007.

RAMZAN, F.; VICKERS, M.H.; MITHEN, R.F. Epigenetics, microRNA and Metabolic Syndrome: A Comprehensive Review. **Int. J. Mol. Sci.**, v.22, p.5047, 2021.

RICCI-VITIANI, L.; PALLINI, R.; BIFFONI, M.; TODARO, M.; INVERNICI, G.; CENCI, T.; MAIRA, G.; PARATI, E. A.; STASSI, G.; LAROCCA, L. M.; DE MARIA, R. Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. **Nature.**, v. 468, n. 7325, p. 824-8, 2010.

ROSIŃSKA, S.; GAVARD, J. Tumor Vessels Fuel the Fire in Glioblastoma. **Int J Mol Sci.** v. 22, n. 12, p. 6514, 2021.

ROSSO, L.; BROCK, C.S.; GALLO, J.M.; SALEEM A.; PRICE P.M. TURKHEIMER, F.E.; ABOAGYE, E.O. A new model for prediction of drug distribution in tumor and normal tissues: pharmacokinetics of temozolomide in glioma patients. **Cancer Res.**, v.69, n.1, p.120-7, 2009.

SALIMINEJAD, K.; KHORRAM KHORSHID, H.R.; SOLEYMANI FARD, S.; GHAFFARI, S.H. An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. **J Cell Physiol.**, v.234 n.5, p.5451-5465, 2019.

SANTOS JS. **Identificação de variantes genicas de base única em microRNAs envolvidos com a suscetibilidade em pacientes com glioblastoma.** 2019. 117 f. (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade São Francisco Bragança Paulista, 2019

SANTOS, JS.; GONÇALVES CIRINO, J.P.; DE OLIVEIRA CARVALHO, P.; ORTEGA, M.M. The Pharmacological Action of Kaempferol in Central Nervous System Diseases: A Review. **Front Pharmacol.**, v.11 p.565700, 2021.

SCHEITHAUER, B. W. Development of the WHO classification of tumors of the central nervous system: a historical perspective. **Brain Pathol.**, v. 19, n. 4, p. 551-564, 2009.

SCHIFF, D.; LEE, E. Q.; NAYAK, L.; NORDEN, A. D.; REARDON, D. A.; WEN, P. Medical management of brain tumors and the sequelae of treatment. **Neuro-Oncology.**, v. 17, n. 4, p. 488-504, 2015.

SCHMITTGEN, T.D. Regulation of microRNA processing in development, differentiation and cancer. **J Cell Mol Med.**, v.12, n.5B, p.1811-9, 2008.

SCHRIMPE-RUTLEDGE, A.C.; CODREANU, S.G.; SHERROD, S.D.; MCLEAN, J.A. Untargeted Metabolomics Strategies - Challenges and Emerging Directions. **J Am Soc Mass Spectrom.**, v. 27, p. 1897-1905, 2016.

SEIDEL, S.; GARVALOV, B. K.; WIRTA, V.; VON STECHOW, L.; SCHÄNZER, A.; MELETIS, K.; WOLTER, M.; SOMMERLAD, D.; HENZE, A.T.; NISTÉR, M.; REIFENBERGER, G.; LUNDEBERG, J.; FRISÉN, J.; ACKER, T. A hypoxic niche regulates glioblastoma stem cells through hypoxia inducible factor 2 alpha. **Brain.**, v. 133, n. Pt 4, p. 983-95, 2010.

SHAREEFI, G.; TURKISTANI, A.N.; ALSAYYAH, A.; KUSSAIBI, H.; ABDEL HADI,

- M.; ALKHARSAH, K.R. Pathway-Affecting Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in RPS6KA1 and MBIP Genes are Associated with Breast Cancer Risk. **Asian Pac J Cancer Prev.**, v.21, n.7, p.2163-2168, 2020.
- SHARMA, V.; JOSEPH, C.; GHOSH, S.; AGARWAL, A.; MISHRA, M.K.; SEM, E. Kaempferol induces apoptosis in glioblastoma cells through oxidative stress. **Molecular Cancer Therapy.**, v. 6, p. 2544–2553, 2007.
- SHAFEK, R.E.; SHAFIK, N.H.; MICHAEL, H.N. Antibacterial and antioxidant activities of two new kaempferol glycosides isolated from *Solenostemma argel* stem extract. **Asian J. Plant Sci.**, v. 11, p. 143–147, 2012.
- SHI, Y.; CHEN, X.; XI, B.; YU, X.; OUYANG, J.; HAN, C.; QIN, Y.; WU, D.; SHEN, H. SNP rs3202538 in 3'UTR region of ErbB3 regulated by miR-204 and miR-211 promote gastric cancer development in Chinese population. **Cancer Cell Int.**, v.17, n.81, 2017.
- SHIEH, L.T.; GUO, H.R.; CHANG, Y.K.; LU, N.M.; HO, S.Y. Clinical implications of multiple glioblastomas: An analysis of prognostic factors and survival to distinguish from their single counterparts. **J Formos Med Assoc.**, v.119, n.3, p.728-734, 2020.
- SHRESTHA, R.; MOHANKUMAR, K.; MARTIN, G.; HAILEMARIAM, A.; LEE, S.O.; JIN, U.H.; BURGHARDT, R.; SAFE, S. Flavonoids kaempferol and quercetin are nuclear receptor 4A1 (NR4A1, Nur77) ligands and inhibit rhabdomyosarcoma cell and tumor growth. **J Exp Clin Cancer Res.**, v.40, n.1, p.392, 2021.
- CHUNG, M.H.; KIM, D.H.; NA, H.K.; KIM, J.H.; KIM, H.N.; HAEGEMAN, G.; SURH, Y.J. Genistein inhibits phorbol ester-induced NF-kappaB transcriptional activity and COX-2 expression by blocking the phosphorylation of p65/RelA in human mammary epithelial cells. **Mutat. Res.**, v. 768, p.74–83, 2014.
- SI, J.; LI, W.; LI, X.; CAO, L.; CHEN, Z.; JIANG, Z. Heparanase confers temozolomide resistance by regulation of exosome secretion and circular RNA composition in glioma. **Cancer Sci.**, v.112, n.9, p.3491-3506, 2021.
- SIMS, J.L.; BERGER, S.J.; BERGER, N.A. Poly (ADP-ribose) Polymerase inhibitors preserve nicotinamide adenine dinucleotide and adenosine 5'-triphosphate pools in DNA-damaged cells: mechanism of stimulation of unscheduled DNA synthesis. **Biochemistry.**, v.22, n.22, p.5188-94, 1983.
- SINGH, S. K.; HAWKINS, C.; CLARKE, I. D.; SQUIRE, J. A.; BAYANI, J.; HIDE, T.; HENKELMAN, R. M.; CUSIMANO, M. D.; DIRKS, P. B. Identification of human brain tumour initiating cells. **Nature.**, v. 432, n. 7015, p. 396–401, 2004.
- SLADE, D. PARP and PARG inhibitors in cancer treatment. **Genes Dev.**, v.34, n.5-6, p.360-394, 2020.
- SLATTERY, E.; DIGNAM, J.D.; MATSUI, T.; ROEDER, R.G. Purification and analysis of a factor which suppresses nick-induced transcription by RNA polymerase II and its identity with poly(ADP-ribose) polymerase. **J Biol Chem.**, v.258, n.9, p.5955-9, 1983.
- SMALLEY, S.; CHALMERS, A.J.; MORLEY, S.J. mTOR inhibition and levels of the DNA repair protein MGMT in T98G glioblastoma cells. **Mol Cancer.**, v.13, p144, 2014.
- SMITH, D.; SHIMAMURA, T.; BARBERA, S.; BEJCEK, B.E. NF-kappaB controls growth of glioblastomas/astrocytomas. **Mol Cell Biochem.**, v. 307, n. 2, p. 141-147, 2008.

- SOK, P.; GÓGL, G.; KUMAR, G.S.; ALEXA, A.; SINGH, N.; KIRSCH, K.; SEBŐ, A.; DRAHOS, L.; GÁSPÁRI, Z.; PETI, W.; REMÉNYI, A. MAP Kinase-Mediated Activation of RSK1 and MK2 Substrate Kinases. **Structure.**, v.28, n.10, p.1101-1113.e5, 2020.
- SOOMRO, S. H.; TING, L. R.; QING, Y. Y.; REN, M. Molecular biology of glioblastoma: Classification and mutational locations. **J Pak Med Assoc.**, v. 67, n. 9, p. 1410-1414, 2017.
- SOTTORIVA, A.; SPITERI, I.; PICCIRILLO, S. G.; TOULOUKIS, A.; COLLINS, V. P.; MARIONI, J. C.; CURTIS, C.; WATTS, C.; TAVARÉ, S. Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 110, n. 10, p. 4009-14, 2013.
- STARK, K.; ESSLINGER, U.B.; REINHARD, W.; PETROV, G.; WINKLER, T.; KOMAJDA, M.; ISNARD, R.; CHARRON, P.; VILLARD, E.; CAMBIEN, F.; TIRET, L.; AUMONT, M.C.; DUBOURG, O.; TROCHU, J.N.; FAUCHIER, L.; DEGROOTE, P.; RICHTER, A.; MAISCH, B.; WICHTER, T.; ZOLLBRECHT, C.; GRASSL, M.; SCHUNKERT, H.; LINSEL-NITSCHKE, P.; ERDMANN, J.; BAUMERT, J.; ILLIG, T.; KLOPP, N.; WICHMANN, H.E.; MEISINGER, C.; KOENIG, W.; LICHTNER, P.; MEITINGER, T.; SCHILLERT, A.; KÖNIG, I.R.; HETZER, R.; HEID, I.M.; REGITZ-ZAGROSEK, V.; HENGSTENBERG, C. Genetic association study identifies HSPB7 as a risk gene for idiopathic dilated cardiomyopathy. **PLoS Genet.**, v.6, n.10, p.e1001167, 2010. doi: 10.1371/journal.pgen.1001167. PMID: 20975947; PMCID: PMC2958814.
- STEED, T.C.; TREIBER, J.M.; PATEL, K.; RAMAKRISHNAN, V.; MERK, A.; SMITH, A.R.; CARTER, B.S.; DALE, A.M.; CHOW, L.M.; CHEN, C.C. Differential localization of glioblastoma subtype: implications on glioblastoma pathogenesis. **Oncotarget.**, v.7, n.18, p.24899-907, 2016.
- STEUER, A.E.; BROCKBALS, L.; KRAEMER, T. Metabolomic Strategies in Biomarker Research—New Approach for Indirect Identification of Drug Consumption and Sample Manipulation in Clinical and Forensic Toxicology? **Front Chem**, v. 7, p. 319, 2019.
- STUPP, R.; MASON, W.P.; VAN DEN BENT, M.J.; WELLER, M.; FISHER, B.; TAPHOORN, M.J.; BELANGER, K.; BRANDES, A.A.; MAROSI, C.; BOGDAHN, U.; CURSCHMANN, J.; JANZER, R.C.; LUDWIN, S.K.; GORLIA, T.; ALLGEIER, A.; LACOMBE, D.; CAIRNCROSS, J.G.; EISENHAEUER, E.; MIRIMANOFF, R.O. European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. **N Engl J Med.**, v. 352, n. 10, p. 987-96, 2005.
- STUPP, R.; TAILLIBERT, S.; KANNER, A. A.; KESARI, S.; STEINBERG, D. M.; TOMS, S. A.; TAYLOR, L. P.; LIEBERMAN, F.; SILVANI, A.; FINK, K. L.; BARNETT, G. H.; ZHU, J. J.; HENSON, J. W.; ENGELHARD, H. H.; CHEN, T. C.; TRAN, D. D.; SROUBEK, J.; TRAN, N. D.; HOTTINGER, A. F.; LANDOLFI, J.; DESAI, R.; CAROLI, M.; KEW, Y.; HONNORAT, J.; IDBAIH, A.; KIRSON, E. D.; WEINBERG, U.; PALTI, Y.; HEGI, M. E.; RAM, Z. Maintenance Therapy With Tumor-Treating Fields Plus Temozolomide vs Temozolomide Alone for Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. **JAMA**, v. 314, n. 23, p. 2535-43, 2015.
- SUN, B.K.; TSAO, H. Small RNAs in development and disease. **J Am Acad Dermatol.**, v.59, n.5, p.725-37; quiz 738-40, 2008.
- TANG, J.B.; SVILAR, D.; TRIVEDI, R.N.; WANG, X.H.; GOELLNER, E.M.; MOORE, B.; HAMILTON, R.L.; BANZE, L.A.; BROWN, A.R.; SOBOL, R.W. N-methylpurine DNA glycosylase and DNA polymerase beta modulate BER inhibitor potentiation of glioma cells to

- temozolomide. **Neuro Oncol.**, v.13, n.5, p.471-86, 2011.
- TEJERO, R.; HUANG, Y.; KATSYV, I.; KLUGE, M.; LIN, J. Y.; TOME-GARCIA, J.; DAVIAUD, N.; WANG, Y.; ZHANG, B.; TSANKOVA, N. M.; FRIEDEL, C. C.; ZOU, H.; FRIEDEL, R. H. Gene signatures of quiescent glioblastoma cells reveal mesenchymal shift and interactions with niche microenvironment. **EBioMedicine.**, v. 42, p. 252-269, 2019.
- TENTORI, L.; LEONETTI, C.; SCARSELLA, M.; MUZI, A.; VERGATI, M.; FORINI, O.; LACAL, P.M.; RUFFINI, F.; GOLD, B.; LI, W.; ZHANG, J.; GRAZIANI, G. Poly (ADP-ribose) glycohydrolase inhibitor as chemosensitiser of malignant melanoma for temozolomide. *Eur J Cancer.* v. 41, n. 18 p. 2948-2957, 2005.
- TEO, W. Y.; SEKAR, K.; SESHACHALAM, P.; SHEN, J.; CHOW, W. Y.; LAU, C. C.; YANG, H.; PARK, J.; KANG, S. G.; LI, X.; NAM, D. H.; HUI, K. M. Relevance of a TCGA-derived Glioblastoma Subtype Gene-Classifer among Patient Populations. **Sci Rep.**, v. 9, n. 1, p. 7442, 2019.
- THAKKAR, J.P.; DOLECEK, T.A.; HORBINSKI, C., OSTROM, Q.T.; LIGHTNER, D.D.; BARNHOLTZ-SLOAN, J.S.; VILLANO, J.L. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**, v.23, n.10, p.1985-96, 2014.
- THE CANCER GENOME ATLAS (TCGA). Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. **Nature.**, v.455, p.1061–1068, 2008.
- TIAN, M.; MA, W.; CHEN, Y.; YU, Y.; ZHU, D.; SHI, J.; ZHANG, Y. Impact of gender on the survival of patients with glioblastoma. **Biosci Rep.**, v.38, n.6, p.BSR20180752, 2018.
- UNION FOR INTERNATIONAL CANCER CONTROL (UICC). Committee on Tumor Nomenclature. *Illustrated Tumor Nomenclature*, **Springer.**, p.229. 1965.
- VELÁSQUEZ, C.; MANSOURI, S.; GUTIÉRREZ, O.; MAMATJAN, Y.; MOLLINEDO, P.; KARIMI, S.; SINGH, O.; TERÁN, N.; MARTINO, J.; ZADEH, G.; FERNÁNDEZ-LUNA, J. L. Hypoxia Can Induce Migration of Glioblastoma Cells Through a Methylation-Dependent Control of ODZ1 Gene Expression. **Front Oncol.**, v. 9, n. 1036, 2019.
- VERHAAK, R. G.; HOADLEY, K. A.; PURDOM, E.; WANG, V.; QI, Y.; WILKERSON, M. D.; MILLER, C. R.; DING, L.; GOLUB, T.; MESIROV, J. P.; ALEXE, G.; LAWRENCE, M.; O'KELLY, M.; TAMAYO, P.; WEIR, B. A.; GABRIEL, S.; WINCKLER, W.; GUPTA, S.; JAKKULA, L.; FEILER, H. S.; HODGSON, J. G.; JAMES, C. D.; SARKARIA, J. N.; BRENNAN, C.; KAHN, A.; SPELLMAN, P. T.; WILSON, R. K.; SPEED, T. P.; GRAY, J. W.; MEYERSON, M.; GETZ, G.; PEROU, C. M.; HAYES, D. N. Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in *PDGFRA*, *IDH1*, *EGFR*, and *NF1*. **Cancer Cell.** v. 17, n. 1, p. 98-110, 2010.
- VIHINEN, M.; Muddled genetic terms miss and mess the message. **Cell Press.**, v. 31, n. 8, p. 423-425, 2015.
- WANG, J.; FANG, X.; GE, L.; CAO, F.; ZHAO, L.; WANG, Z.; XIAO, W. Antitumor, antioxidant and anti-inflammatory activities of kaempferol and its corresponding glycosides and the enzymatic preparation of kaempferol. **PLoS One.**, v.13, n.5, p.e0197563, 2018.
- WANG, J.; WANG, M.L.; WANG, C.H.; SUN, S.Y.; ZHANG, H.B.; JIANG, Y.Y.; XU, Q.W.; WANG, Y.; GU, S.X. A novel functional polymorphism of *GFAP* decrease glioblastoma susceptibility through inhibiting the binding of miR-139. **Aging.**, v.10, n.5, p.988-999, 2018.

- WANG, Q.; HU B, HU X, KIM H, SQUATRITO M, SCARPACE L, DECARVALHO AC, LYU S, LI P, LI Y, BARTHEL F, CHO HJ, LIN YH, SATANI N, MARTINEZ-LEDESMA E, ZHENG S, CHANG E, SAUVÉ CG, OLAR A, LAN ZD, FINOCCHIARO G, PHILLIPS JJ, BERGER MS, GABRUSIEWICZ KR, WANG G, ESKILSSON E, HU J, MIKKELSEN T, DEPINHO RA, MULLER F, HEIMBERGER AB, SULMAN EP, NAM DH, VERHAAK RGW. Tumor Evolution of Glioma-Intrinsic Gene Expression Subtypes Associates with Immunological Changes in the Microenvironment. **Cancer Cell**. v. 32, n. 1, p. 42-56.e6, 2017.
- WANG, S.; XU, H.; XIN, Y.; LI, M.; FU, W.; WANG, Y.; LU, Z.; YU, X.; SUI, D. Neuroprotective effects of Kaempferide-7-O-(4"-O-acetylramnosyl)-3-O-rutinoside on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. **Eur J Pharmacol.**, v.788, p.335-342, 2016.
- WATANABE, D.; NOGAMI, A.; OKADA, K.; AKIYAMA, H.; UMEZAWA, Y.; MIURA, O. FLT3-ITD Activates RSK1 to Enhance Proliferation and Survival of AML Cells by Activating mTORC1 and eIF4B Cooperatively with PIM or PI3K and by Inhibiting Bad and BIM. **Cancers.**, v.11, n.12, p.1827, 2019.
- WHATCOTT, C.J.; MEYER-FICCA, M.L, MEYER, R.G, JACOBSON, M.K. A specific isoform of poly(ADP-ribose) glycohydrolase is targeted to the mitochondrial matrix by a N-terminal mitochondrial targeting sequence. **Exp Cell Res.**, v. 315, n. 20, p.3477-85, 2009.
- WORLD CANCER REPORT. World Health Organization. [S.l.]: Cap.5, p.16, 2014.
- WU, P.; MENG, X.; ZHENG, H.; ZENG, Q.; CHEN, T.; WANG, W.; ZHANG, X.; SU, J. Kaempferol Attenuates ROS-Induced Hemolysis and the Molecular Mechanism of Its Induction of Apoptosis on Bladder Cancer. **Molecules.**, v.23, n.10, p.2592, 2018.
- XIAO, J. Dietary flavonoid aglycones and their glycosides: which show better biological significance? **Food Sci. Nutr.**, v.57, n.9, p.1874–1905, 2017.
- YANG, J.H.; KIM, S.C.; SHIN, B.Y.; JIN, S.H.; JO, M.J.; JEGAL, K.H.; KIM, Y.W.; LEE, J.R.; KU, S.K.; CHO, I.J.; KI, S.H. O-Methylated flavonol isorhamnetin prevents acute inflammation through blocking of NF- κ B activation. **Food Chem Toxicol.**, v. 59, p. 362-72, 2013.
- YOUNG, R. M.; JAMSHIDI, A.; DAVIS, G.; SHERMAN, J. H. Current trends in the surgical management and treatment of adult glioblastoma. **Ann Transl Med.**, v. 3, n. 15, p. 121, 2015.
- YU L., CHEN C., WANG LF, KUANG X., LIU K., ZHANG H.). Neuroprotective effect of kaempferol glycosides against brain injury and neuroinflammation by inhibiting NF- κ B and STAT3 activation in transient focal stroke. **PloS One.**, v.8, n.2, p.e55839, 2013.
- ZHANG, J.; STEVENS, M. F. G.; BRADSHAW, T. D. Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. **Curr. Mol. Pharmacol.**, v. 5, p. 102–114, 2012.
- ZHANG, Y.; CHEN, A.Y.; LI, M.; CHEN, C.; YAO, Q. Ginkgo biloba extract kaempferol inhibits cell proliferation and induces apoptosis in pancreatic cancer cells. **J Surg Res.**, v.148, n.1, p.17-23, 2008.
- ZHAO, Y.Y.; LIN, R.C. UPLC-MS(E) application in disease biomarker discovery: The discoveries in proteomics to metabolomics. **Chem Interactions** v. 215, p. 7-16, 2014.
- ZHENG, C.; YIN, Q.; WU, H. Structural studies of NF- κ B signaling. **Cell Res.** v.21 n.1, p.183-95, 2011
- ZHOU, J.; DING, D.; WANG, M.; CONG, Y. Telomerase reverse transcriptase in the

regulation of gene Expression. **BMB Rep.**, v. 47, n. 1 p. 8-14, 2014.

ZULCH, K. J. **Atlas of Gross Neurosurgical Pathology**. 1° ed. Springer: Berlin, 1975.

ZULCH, K. J. **Atlas of the Histology of Brain Tumors** 1° ed. Springer: Berlin, 1971.

ZULCH, K. J. **Histological Typing of Tumours of the Central Nervous System**. 11° ed. World Health Organization: Geneva, 1979.

ANEXO I

Quadro 1. Estrutura de relatório em camadas de acordo com as recomendações da 5ª edição da OMS.

Relatório em camadas		
Estrutura do relatório	Exemplos	
	Caso 1	Caso 2
Diagnóstico integrado	Ependimoma supratentorial, NOS ⁽¹⁾	Glioma difuso de baixo grau, via MAPK alterada <i>Subtipo: glioma difuso de baixo grau, FGFR1 TKD-duplicado</i> ⁽⁴⁾
Classificação histopatológica	Ependimoma ⁽²⁾	Oligodendroglioma ⁽²⁾
Classificação SNC OMS	3 ⁽³⁾	Não atribuído ⁽⁵⁾
Informações moleculares	Os derivados extraídos do tecido incluído em parafina eram de qualidade insuficiente para sequenciamento e restou tecido insuficiente para análise por FISH	Duplicação do domínio de tirosina quinase <i>FGFR1</i> (sequenciamento de próxima geração)

Abreviações: SNC – sistema nervoso central; OMS – organização mundial da saúde; NOS – sem outras especificações, FISH – hibridização *in situ* por fluorescência.

- ⁽¹⁾ Uso do sítio no diagnóstico, e uso da designação NOS neste caso porque não pôde ser trabalhado adequadamente em nível molecular.
- ⁽²⁾ Diagnóstico histológico
- ⁽³⁾ Grau atribuído ao tumor
- ⁽⁴⁾ Designação de um tipo de tumor com um subtipo
- ⁽⁵⁾ Grau do tumor indefinido

Louis, D.N.; Perry, A.; Wesseling, P.; Brat, D.J.; Cree, I.A.; Figarella-Branger, D.; Hawkins, C.; Ng, H.K.; Pfister, S.M.; Reifenberger, G.; Soffiatti, R.; von Deimling, A.; Ellison, D.W. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Neuro Oncol.**, v. 23, n. 8, p. 1231-1251, 2021

ANEXO II

Classificação dos tumores do Sistema nervoso central segundo a Organização Mundial da Saúde publicada em 2021, 5º edição.

Continua

Gliomas difusos do tipo adulto

Astrocitoma, mutante *IDH*
 Oligodendroglioma, *IDH*-mutante e 1p/19q-codeleted
 Glioblastoma, *IDH*-tipo selvagem

Gliomas difusos de baixo grau do tipo pediátrico

Astrocitoma difuso, alterado por *MYB* ou *MYBL1*
 Glioma angiocêntrico
 Tumor neuroepitelial polimorfo de baixo grau do jovem
 Glioma difuso de baixo grau, via MAPK alterada

Gliomas de alto grau difusos do tipo pediátrico

Glioma difuso de linha média, H3 K27 alterado
 Glioma hemisférico difuso, mutante H3 G34
 Glioma de alto grau do tipo pediátrico difuso, tipo selvagem H3 e tipo selvagem *IDH*
 Glioma hemisférico do tipo infantil

Gliomas astrocíticos circunscritos

Astrocitoma pilocítico
 Astrocitoma de alto grau com características pilóides
 Xantoastrocitoma pleomórfico
 Astrocitoma subependimário de células gigantes
 Glioma cordoide
 Astroblastoma, *MNI*-alterado

Tumores Glioneurais e Neurais

Ganglioglioma
 Ganglioglioma infantil desmoplásico (DIG)/astrocitoma infantil desmoplásico
 Tumor neuroepitelial desembrioplástico
 Tumor glioneuronal difuso com características semelhantes a oligodendroglioma e

Aglomerados nucleares (inclusão provisória)

Tumor glioneuronal papilar
 Tumor glioneuronal formador de roseta
 Tumor glioneuronal mixóide
 Tumor glioneuronal leptomeníngeo difuso
 Gangliocitoma
 Tumor neuronal multinodular e vacuolizante
 Gangliocitoma cerebelar displásico (doença de Lhermitte-Duclos)
 Neurocitoma central
 Neurocitoma extraventricular
 Liponeurocitoma cerebelar

Classificação dos tumores do Sistema nervoso central segundo a Organização Mundial da Saúde publicada em 2021, 5ª edição.

Continuação

Tumores ependimários

Ependimoma supratentorial

Ependimoma supratentorial, ZFTA positivo para fusão

Ependimoma supratentorial, positivo para fusão YAP1

Ependimoma da fossa posterior

Ependimoma da fossa posterior, grupo PFA

Ependimoma da fossa posterior, grupo PFB

Ependimoma espinhal

Ependimoma espinhal, amplificado por *MYCN*

Ependimoma mixopapilar

Subependimoma

Tumores do plexo coróide

Papiloma do plexo coróide

Papiloma atípico do plexo coróide

Carcinoma do plexo coróide

Tumores embrionários

Meduloblastoma

Meduloblastomas, molecularmente definidos

Meduloblastoma, ativado por WNT

Meduloblastoma, ativado por SHH e tipo selvagem TP53

Meduloblastoma, ativado por SHH e mutante TP53

Meduloblastoma, não-WNT/não-SHH

Meduloblastomas, definidos histologicamente

Outros tumores embrionários do SNC

Tumor teratóide/rabdóide atípico

Tumor neuroepitelial cribriforme (inclusão provisória)

Tumor embrionário com rosetas multicamadas (ETMR)

Neuroblastoma do SNC, ativado por FOXR2

Tumor do SNC com duplicação em tandem interna BCOR

Tumor embrionário do SNC

Tumores da pineal

Pineocitoma

Tumor do parênquima pineal de diferenciação intermediária

Pineoblastoma

Tumor papilar da região pineal

Tumor mixóide desmoplásico da região pineal, mutante SMARCB1

Classificação dos tumores do Sistema nervoso central segundo a Organização Mundial da Saúde publicada em 2021, 5º edição.

Continuação

Tumores dos nervos cranianos e paraespinais

Schwannoma e Schwannoma (intracraniano)
 Neurofibroma
 Perineurioma
 Tumor da bainha do nervo híbrido
 Tumor maligno da bainha do nervo melanótico
 Tumor maligno da bainha do nervo periférico
Paraganglioma

Meningiomas

Meningioma

Tumores mesenquimais não meningoteliais

Tumores de tecidos moles

Tumores fibroblásticos e miofibroblásticos

Tumor fibroso solitário

Tumores vasculares

Hemangiomas e malformações vasculares

Hemangioblastoma

Tumores do músculo esquelético

Rabdomiossarcoma

diferenciação incerta

Tumor mesenquimal intracraniano, FET-CREB positivo para fusão (inclusão provisória)

Sarcoma rearranjado por CIC

Sarcoma intracraniano primário, mutante DICER1

Sarcoma de Ewing

Tumores condro-ósseos

Tumores condrogênicos

Condrossarcoma mesenquimal

Condrossarcoma

Tumores notocordais

Cordoma (incluindo cordoma pouco diferenciado)

Tumores melanocíticos

Neoplasias melanocíticas meníngeas difusas

Melanocitose meníngea

Melanomatose meníngea

Neoplasias melanocíticas meníngeas circunscritas

Melanocitoma meníngeo

Melanoma meníngeo

Classificação dos tumores do Sistema nervoso central segundo a Organização Mundial da Saúde publicada em 2021, 5º edição.

Conclusão

Tumores hematolinfóides

Linfomas

Linfomas do SNC

Linfoma difuso primário de grandes células B do SNC

Linfoma do SNC associado à imunodeficiência

Granulomatose linfomatoide

Linfoma intravascular de grandes células B

Linfomas raros diversos no SNC

Linfoma MALT da dura-máter

Outros linfomas de células B de baixo grau do SNC

Linfoma anaplásico de grandes células (ALK+/ALK-)

Linfomas de células T e células NK/T

Tumores histiocíticos

Doença de Erdheim-Chester

Doença de Rosai-Dorfman

Xantogranuloma juvenil

Histiocitose de células de Langerhans

Sarcoma histiocítico

Tumores de células germinativas

Teratoma maduro

Teratoma imaturo

Teratoma com malignidade do tipo somático

Germinoma

Carcinoma embrionário

Tumor do saco vitelino

Coriocarcinoma

Tumor misto de células germinativas

Tumores da região selar

craniofaringioma adamantinomatoso

craniofaringioma papilar

pituitoma, tumor de células granulares da região selar e oncocitoma de células

fusiformes

adenoma hipofisário (pitNET)

blastoma pituitário

Metástases para o SNC

metástases para o cérebro e parênquima da medula espinhal

metástases para as meninges

Louis, D.N.; Perry, A.; Wesseling, P.; Brat, D.J.; Cree, I.A.; Figarella-Branger, D.; Hawkins, C.; Ng, H.K.; Pfister, S.M.; Reifenberger, G.; Soffietti, R.; von Deimling, A.; Ellison, D.W. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Neuro Oncol.**, v. 23, n. 8, p. 1231-1251, 2021.

ANEXO III



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização de novas variantes gênicas de base única em genes alvo de microRNAs envolvidos com a suscetibilidade em pacientes com glioblastoma

Pesquisador: Manoela Marques Ortega

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 1

CAAE: 29122720.7.0000.5514

Instituição Proponente: Universidade São Francisco-SP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.888.928

Apresentação do Projeto:

Caracterização de novas variantes gênicas (SNVs) envolvidos com a suscetibilidade em pacientes com glioblastoma

Objetivo da Pesquisa:

Validar as SNVs g.51026856T>C (rs76276169) e g.26900708 G>A (rs2229714) localizadas na 3'UTR dos genes PARG e RPS6KA1, alvos de miR491-3p e miR-663b, respectivamente, como possíveis marcadores moleculares para o GBM.

Avaliar o efeito antitumoral dos compostos Kaempferol e Kaempferol 7-O Glucoside em linhagens celulares de GBM e em cultura primária de pacientes com GBM ao diagnóstico

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos.

Benefícios: identificar novas variantes possivelmente responsáveis pelo fenótipo agressivo do GBM.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto de pesquisa para obtenção de Doutorado em Ciências da Saúde

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Endereço: Av. São Francisco de Assis, 218, sala 35, prédio central
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 12.916-900
UF: SP **Município:** BRAGANCA PAULISTA
Telefone: (11)2454-8302 **E-mail:** comiteetica@usf.edu.br



Continuação do Parecer: 3.888.928

Termos adequados

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:

APÓS DISCUSSÃO EM REUNIÃO DO DIA 27/02/2020, O COLEGIADO DELIBEROU PELA APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISAS. APÓS A CONCLUSÃO DO PROJETO É OBRIGATÓRIO O ENVIO DO RELATÓRIO FINAL PARA ENCERRAMENTO DO PROJETO.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1455314.pdf	16/02/2020 17:51:03		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_sangue.docx	16/02/2020 17:49:45	Manoela Marques Ortega	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_TT.docx	16/02/2020 17:48:39	Manoela Marques Ortega	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_TCN.docx	16/02/2020 17:48:30	Manoela Marques Ortega	Aceito
Cronograma	Cronograma_CEP_14_02_2020.docx	16/02/2020 17:42:18	Manoela Marques Ortega	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Documento_auto_Dr_Pedro_Izzo.pdf	16/02/2020 17:41:45	Manoela Marques Ortega	Aceito
Folha de Rosto	Folha_rosto.pdf	16/02/2020 17:41:33	Manoela Marques Ortega	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_CEP_Jessica_Santos_22_01_2019_final.pdf	16/02/2020 17:38:34	Manoela Marques Ortega	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_Confidenc_07_11_19.pdf	07/11/2019 13:43:09	Manoela Marques Ortega	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta_Autor_Dr_Benites.pdf	31/10/2019 14:56:26	Manoela Marques Ortega	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta_Autor_Tadeu_Assin.pdf	29/10/2019 13:36:09	Manoela Marques Ortega	Aceito

Endereço: Av. São Francisco de Assis, 218, sala 35, prédio central
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 12.916-900
UF: SP **Município:** BRAGANCA PAULISTA
Telefone: (11)2454-8302 **E-mail:** comiteetica@usf.edu.br



Continuação do Parecer: 3.888.928

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BRAGANCA PAULISTA, 28 de Fevereiro de 2020

Assinado por:
CARLOS EDUARDO PULZ ARAUJO
(Coordenador(a))

Endereço: Av. São Francisco de Assis, 218, sala 35, prédio central
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 12.916-900
UF: SP **Município:** BRAGANCA PAULISTA
Telefone: (11)2454-8302 **E-mail:** comiteetica@usf.edu.br

ANEXO IV



UNIVERSIDADE SÃO
FRANCISCO-SP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: IDENTIFICAÇÃO DE POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO EM MICRORNAS ENVOLVIDOS COM A SUSCETIBILIDADE AO GLIOBLASTOMA

Pesquisador: Manoela Marques Ortega

Área Temática: Genética Humana;
(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 2

CAAE: 49150015.7.0000.5514

Instituição Proponente: Universidade São Francisco-SP

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO
Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.324.812

Apresentação do Projeto:

IDENTIFICAÇÃO DE POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO EM MICRORNAS ENVOLVIDOS COM A SUSCETIBILIDADE AO GLIOBLASTOMA MULTIFORME

Objetivo da Pesquisa:

Os mesmos da versão anterior

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os mesmos da versão anterior

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Na versão atual do projeto o TCLE está mais claro. O CEP também está ciente do desligamento de dois profissionais.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

De acordo

Recomendações:

Aprovação

Endereço: SÃO FRANCISCO DE ASSIS 218

Bairro: JARDIM SÃO JOSE

CEP: 12.916-900

UF: SP

Município: BRAGANÇA PAULISTA

Telefone: (11)2454-8981

Fax: (11)4034-1825

E-mail: comite.etica@saofrancisco.edu.br



UNIVERSIDADE SÃO
FRANCISCO-SP



Continuação do Parecer: 1.324.812

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:

APÓS DISCUSSÃO EM REUNIÃO DO DIA 12/11/2015, O COLEGIADO DELIBEROU PELA APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISAS.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_580819.pdf	28/10/2015 18:20:40		Aceito
Declaração de Pesquisadores	Notific.docx	28/10/2015 18:20:09	Manoela Marques Ortega	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Glio_mod_NOVO.docx	28/10/2015 18:18:21	Manoela Marques Ortega	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DR_Luciano_Declar.pdf	11/09/2015 16:30:24	Manoela Marques Ortega	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DR_Tadeu_declar.pdf	11/09/2015 16:28:57	Manoela Marques Ortega	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Autorizacao_HMSJ.pdf	11/09/2015 14:51:13	Manoela Marques Ortega	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	MicroRNA_Glioblastoma_CEP.docx	11/09/2015 14:42:32	Manoela Marques Ortega	Aceito
Folha de Rosto	Glio_CEP_FROSTO.pdf	11/09/2015 14:40:55	Manoela Marques Ortega	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

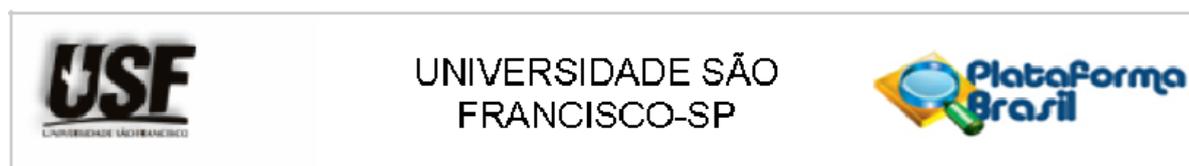
Não

BRAGANCA PAULISTA, 16 de Novembro de 2015

Assinado por:
Alessandra Gambero
(Coordenado r)

Endereço: SAO FRANCISCO DE ASSIS 218
Bairro: JARDIM SAO JOSE **CEP:** 12.916-900
UF: SP **Município:** BRAGANCA PAULISTA
Telefone: (11)2454-8981 **Fax:** (11)4034-1825 **E-mail:** comite.etica@saofrancisco.edu.br

ANEXO V



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: IDENTIFICAÇÃO DE POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO (SNPs) EM GENES ENVOLVIDOS COM O REPARO DE ERROS DO DNA POR RECOMBINAÇÃO HOMOLÓGA E SUSCETIBILIDADE AO CÂNCER COLORRETAL

Pesquisador: Manoela Marques Ortega

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 1

CAAE: 45723615.0.0000.5514

Instituição Proponente: Universidade São Francisco-SP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.108.563

Data da Relatoria: 11/06/2015

Apresentação do Projeto:

Sim

Objetivo da Pesquisa:

- Verificar se os SNPs nos genes analisados, separadamente e em conjunto, podem influenciar o risco de ocorrência da doença por aspectos clínicos (idade, sexo, e cor da pele) e características tumorais (grau de diferenciação e estágio clínico).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo o responsável:

Riscos: Não se aplica.

Benefícios: Não se aplica.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Amostras: 350 indivíduos com CCR, ao diagnóstico e livre de tratamento, foram selecionados para esse estudo. Os pacientes foram atendidos e submetidos à cirurgia para a ressecção do tumor pelo Prof. Dr. Carlos AR Martinez no Hospital da

Endereço: SAO FRANCISCO DE ASSIS 218

Bairro: JARDIM SAO JOSE

CEP: 12.916-900

UF: SP

Município: BRAGANCA PAULISTA

Telefone: (11)2454-8981

Fax: (11)4034-1825

E-mail: comite.etica@saofrancisco.edu.br



UNIVERSIDADE SÃO
FRANCISCO-SP



Continuação do Parecer: 1.106.583

Universidade São Francisco e Gastrocentro da Universidade de Campinas. Aproximadamente 350 amostras de sangue periférico de doadores de sangue saudáveis do Hemonúcleo Regional de Bragança Paulista, SP serão incluídos no estudo, após carta consentimento livre e esclarecidos assinados. Extração de DNA: fragmentos do tecido neoplásico foram conservados e congelados em RNAlater a 80°C. As amostras de DNA serão extraídas seguindo protocolo previamente estabelecido. DNA genômico será obtido das amostras de leucócitos do sangue periférico de indivíduos controles saudáveis por meio da técnica de extração de DNA com cloreto de lítio e proteinase K. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) para os SNPs dos genes DOT1L e XRCC3: Os genótipos serão obtidos por meio da RT-PCR usando TaqMan® SNP Genotyping Assays, com as referências (gene: número do rs do SNP e número do ensaio): (DOT1L: rs740404, C__2581200_1_; rs960492, C__9611288_10; rs12982744, C__2580893_10); (XRCC3: rs2295152, C__2983903_1_; rs861530, C__8901544_10; rs1799794, C__2983904_10; rs1799796, C__2983922_20). As RT-PCR serão realizadas em aparelho 7500 real-time PCR system, de acordo com o método recomendado pelo fabricante. Análise da expressão dos genes DOT1L e XRCC3: para verificar a influência dos SNPs selecionados para o estudo na expressão dos genes DOT1L e XRCC3, iniciadores para os genes DOT1L e XRCC3 serão utilizados para a amplificação por meio da PCR quantitativa em tempo real (qPCR) com o corante SYBRGreen, de amostras de RNA extraídas de pacientes com CCR que apresentarem cada um dos distintos genótipos (homozigoto selvagem, heterozigoto e homozigoto variante), totalizando 30 amostras. O detalhamento da metodologia encontra-se no projeto.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequado

Recomendações:

Recomendo acrescentar em Riscos/Benefícios: que poderá haver desconforto na coleta da amostra de sangue.

Endereço: SAO FRANCISCO DE ASSIS 218
Bairro: JARDIM SAO JOSE **CEP:** 12.916-900
UF: SP **Município:** BRAGANCA PAULISTA
Telefone: (11)2454-8981 **Fax:** (11)4034-1825 **E-mail:** comite.etica@saofrancisco.edu.br



UNIVERSIDADE SÃO
FRANCISCO-SP



Continuação do Parecer: 1.106.583

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

APÓS DISCUSSÃO EM REUNIÃO DO DIA 11/06/2015, O COLEGIADO DELIBEROU PELA APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISAS.

BRAGANCA PAULISTA, 15 de Junho de 2015

Assinado por:
MARCELO LIMA RIBEIRO
(Coordenador)

Endereço: SAO FRANCISCO DE ASSIS 218

Bairro: JARDIM SAO JOSE

CEP: 12.916-900

UF: SP

Município: BRAGANCA PAULISTA

Telefone: (11)2454-8981

Fax: (11)4034-1825

E-mail: comite.etica@saofrancisco.edu.br



ANEXO VI

Termo de Consentimento Livre Esclarecido a ser obtido dos indivíduos para participação do estudo intitulado “Caracterização de Novas Variantes Gênicas de Base Única em Genes Alvo de MicroRNAs Envolvidas com a Suscetibilidade em Pacientes com Glioblastoma”

Nome: _____

Idade: _____ Sexo: _____ Raça: _____

Endereço residencial: _____

Endereço comercial: _____

Aceito participar do estudo proposto, no qual uma pequena parte do tecido tumoral após cirurgia será doado. Estou ciente que este material será utilizado para a avaliação de uma predisposição pessoal para o desenvolvimento de glioblastoma por meio das análises de polimorfismos em microRNAs que são pequenas moléculas conhecidas como reguladoras de genes e podem estar envolvidas no aumento do risco para o desenvolvimento de glioblastoma.

Estou ciente de que não terei prejuízos com a realização deste exame. Sei que terei direito de saber o resultado do meu exame, caso esteja interessado. Neste caso, poderei marcar uma consulta no Hospital da Universidade São Francisco, na Avenida São Francisco de Assis, 260, Jd. São José, no telefone (11) Bragança Paulista - SP, com o Prof. Dr. Carlos Parisi de Oliveira, CRM 20699/SP, que dará esclarecimentos necessários para o meu caso. Sei que posso sair do estudo a qualquer momento e que isto não vai prejudicar o meu atendimento no Hospital da Universidade São Francisco.

Entendo ainda que meus dados pessoais serão mantidos em sigilo pelo pesquisador. Sei que outros estudos de predisposição genética ao câncer só serão realizados com o meu tecido tumoral, ou produto deste, após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade São Francisco, Bragança Paulista-SP e caso eu concorde com o seu armazenamento.

Eu concordo com a coleta, o depósito e o armazenamento do meu tecido tumoral ou produto do mesmo em biorrepositório:

SIM ou NÃO

Eu concordo com a dispensa de novo termo de consentimento a cada pesquisa aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade São Francisco (USF) com a utilização do tecido tumoral ou produto do mesmo:

SIM ou NÃO

Se eu tiver qualquer dúvida sobre o estudo poderei procurar a Profa. Dra. Manoela Marques Ortega, pesquisadora responsável pelo projeto e Professor Auxiliar Doutor do Curso de Pós Graduação em Ciências da Saúde, na Universidade São Francisco, na Av. São Francisco de Assis, 218, Jardim São José, Bragança Paulista - SP, telefone (11) 2554-8741

Se tiver reclamações sobre qualquer procedimento do estudo, poderei procurar a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade São Francisco (USF) no telefone (11) 2454- 8981 ou email: comite.etica@saofrancisco.edu.br. Eu li/ouvi o conteúdo deste termo e recebi esclarecimentos sobre as minhas dúvidas oralmente.

.....
Assinatura do indivíduo

.....
Assinatura do responsável legal

.....
Assinatura do pesquisador responsável
(Profa. Dra. Manoela Marques
Ortega)

.....
Assinatura do Médico Neurocirurgião
(Prof. Dr. Carlos Tadeu Parisi de Oliveira, CRM 20699/SP)

Bragança Paulista, /..... /.....

ANEXO VII



Termo de Consentimento Livre Esclarecido a ser obtido dos indivíduos para participação do estudo intitulado “Caracterização de Novas Variantes Gênicas de Base Única em Genes Alvo de MicroRNAs Envolvidas com a Suscetibilidade em Pacientes com Glioblastoma”

Nome: _____

Idade: _____ Sexo: _____ Raça: _____

Endereço residencial: _____

Endereço comercial: _____

Aceito participar do estudo proposto, no qual fornecerei informações sobre a ocorrência de câncer em meus familiares e uma amostra de sangue a ser colhida em veia de um dos braços (volume: 10 ml). Estou ciente que este material será utilizado para a avaliação de uma predisposição pessoal para o desenvolvimento de glioblastoma. Estou ciente de que não terei prejuízos com a realização deste exame. Sei que posso sentir dor de pequena intensidade e curta duração no local de punção da veia. Sei que terei direito de saber o resultado do meu exame, caso esteja interessado. Neste caso, poderei procurar a Profa. Dra. Manoela Marques Ortega, pesquisadora responsável pelo projeto e Professora Auxiliar Doutor do Departamento de Pós Graduação em Ciências da Saúde, na Universidade São Francisco, na Av. São Francisco de Assis, 218, Jardim São José, Bragança Paulista - SP, telefone (11) 2554-8471, que dará esclarecimentos necessários para o meu caso. Sei que posso sair do estudo a qualquer momento e que isto não vai prejudicar o meu atendimento no Hospital da Universidade São Francisco. Sei ainda que meus dados pessoais serão mantidos em sigilo pelo pesquisador. Sei que outros estudos de predisposição genética ao câncer só serão realizados com o meu sangue, ou produto deste, após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade São Francisco, Bragança Paulista-SP e caso eu concorde com o seu armazenamento. Eu concordo com a coleta, o depósito e o armazenamento do meu sangue ou produto do mesmo em biorrepositório:

SIM ou NÃO

Eu concordo com a dispensa de novo termo de consentimento a cada pesquisa aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade São Francisco (USF) com a utilização do sangue ou produto do mesmo:

SIM ou NÃO

Se eu tiver qualquer dúvida sobre o estudo poderei procurar a Profa. Dra. Manoela Marques Ortega da Universidade São Francisco. Se tiver reclamações sobre qualquer procedimento do estudo, poderei procurar a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade São Francisco (USF) no telefone (11) 2454-8981 ou email: comite.etica@saofrancisco.edu.br. Eu li/ouvi o conteúdo deste termo e recebi esclarecimentos sobre as minhas dúvidas oralmente.

.....
Assinatura do indivíduo

.....
Assinatura do responsável legal

.....
Assinatura do Pesquisador Responsável

Profa. Dra. Manoela Marques Ortega

.....
Assinatura do Médico Hematologista

Dr. Bruno Deltreggia Benites, CRM 129482/SP

Bragança Paulista, /..... /.....

APÊNDICE I

Compostos constituintes das flores de *Sophora japonica*.

Continua

Compostos	Local	Referência
<i>Kaempferol</i>	A,B	Ho et al.(1982); Tulaganov and Gaibnazarava (2001); Tang et al.(2002a);Wangetal.(2008); Chen et al.(2010); Diao et al.(2011)Shi W et al. (2017)
<i>Kaempferol 3-O-β-D-glucopyranoside</i>	B,C	Tang et al.(2001a, 2008a); Ha et al.(2010)
<i>Kaempferol 3-O-α-rhamnopyranosyl(1-6)- β-glucopyranoside (Kaempferol 3-O-β-rutinoside)</i>	B	Tang et al.(2001a); Yang et al.(2015)
<i>Kaempferol 3-O-rutinoside</i>	B	Shi W et al.(2017)
<i>Quercetin</i>	A	Kimura and Yamada(1984); Ishida et al.(1987); Tulaganov and Gaibnazarava (2001); Tang et al.(2002b); Wang et al.(2008); Diao et al.(2011)
<i>3'-methylquercetin</i>	A,B	Lo et al.(2009)
<i>Tamarixetin (4'-O-methylquercetin)</i>	G,B	Chen et al.(2010); Mohamed et al.(2015)
<i>Isoquercitrin (Quercetin3-O-β- glucopyranoside)</i>	A,B,C	Li et al.(2010); Tang et al.(2001a, 2008a); Ha et al.(2010)
<i>Quercetin 5-O-β-D-glucopyranoside</i>	B,C	Ha et al.(2010)
<i>Rutin (Quercetin3-O-α-rhamnopyranosyl(1-6)-β-glucopyranoside)</i>	A	Ho et al.(1982); Kimura and Yamada (1984); Tulaganov and Gaibnazarava (2001); Tangetal.(2001a); Wang et al.(2001); Kim et al.(2004); Kim and Yun-Choi (2008); Tang et al.(2008a); Abdallah et al.(2014)
<i>Rutin-7-O-rhamnoside</i>	A,B	Kite et al.(2009)
<i>Camellianoside (Quercein3-O-β-D- xylopyranosyl-(1-3)-O-α-Lrhamnopyranosyl-(1-6)-O-β-D-glucopyranoside)</i>	B,C	Ha et al.(2010)
<i>Quercein3-O-β-D-glucopyranosyl-(1-3)- O-α-L-rhamnopyr-anosyl-(1-6)-O-β-D-glucopyranoside</i>	B	Ha et al.(2010)
<i>Quercetin 3-O-rutinoside</i>	B	Shi W et al., 2017
<i>Quercetina 3- ó -α- L -rhamnopyranosyl (1 → 6) -β- D -glucopyranoside-4'- O -β- D - glucopyranoside</i>	B	Shi W et al., 2017
<i>Quercetin 3-O-α-rhamnosyl(1'''→6'')-β-sophoroside-7-O-α-L-rhamnopyranoside</i>	B	Shi W et al., 2017

Compostos constituintes das flores de *Sophora japonica*.

Continuação

<i>Isorhamnetin</i>	A	Ishida et al.(1989); Tang et al.(2002b); Diao et al.(2011)
<i>Narcissin (Isorhamnetin-3-rutinoside)</i>	A	Kimura and Yamada (1984); Yang et al.(2015)
<i>Genistein</i>	A	Ho et al.(1982); Tulaganov and Gaibnazarava (2001); Wang et al.(2001, 2008); Tang et al.(2002b); Kim et al.(2004); Ma and Lou(2006); Kim and Yun-Choi (2008); Chen et al.(2010); Diao et al.(2011)
<i>Cajanin</i>	A	Chen et al.(2010)
<i>Pratensein</i>	A	Chen et al.(2010)
<i>Orobol</i>	A,B	Lo et al.(2009); Chen et al.(2010) Shi W et al. (2017)
<i>Betulin</i>	A	Xu (1957)
<i>Sophoradiol</i>	A	Kitagawa et al.(1988); Zhou et al.(2006)
<i>Kakkasaponin II</i>	A	Zhang et al.(2015)
<i>Kaikasaponin I</i>	A	Kitagawa et al.(1988); Zhang et al.(2015)
<i>Kaikasaponin III</i>	A	Kitagawa et al.(1988); Zhang et al.(2015)
<i>Soyasaponin I</i>	A	Kitagawa et al.(1988); Grishkovets and Gorbacheva (1995); Zhang et al. (2015)
<i>Dehydrosoyasaponin I</i>	A	Zhang et al.(2015)
<i>Phaseoside IV</i>	A	Zhang et al.(2015)
<i>Soyasaponin III</i>	A	Kitagawa et al.(1988); Grishkovets and Gorbacheva (1995)
<i>Azukisaponin I</i>	A	Kitagawa et al.(1988)
<i>Azukisaponin II</i>	A	Kitagawa et al.(1988); Grishkovets and Gorbacheva (1995)
<i>Azukisaponin V</i>	A	Kitagawa et al.(1988); Grishkovets and Gorbacheva (1995)
<i>Kaikasaponin II</i>	A	Kitagawa et al.(1988)
<i>Maltol 3-O-(β-D-apiofuranosyl-(1-2)-β-D- glucopyranosyl)</i>	A	Zhang et al.(2015)
<i>Maltol3-O-(4'-O-p-coumaroyl-6'-O-(3- hydroxy-3-methylglutar-oyl))-β- glucopyranoside</i>	B	Kite et al.(2007); Yang et al.(2015)
<i>Maltol-3-O-(4'-O-cis-p-coumaroyl-6'-O-(3-hydroxy-3-methylglu-taroyl))-β- glucopyranoside</i>	B	Yang et al.(2015)
<i>Maltol-3-O-(6'-O-4'-hydroxy-trans-cinnamoyl-β-glucopyranoside</i>	C	Li (2005)

Compostos constituintes das flores de *Sophora japonica*.

Conclusão

<i>Soyamalosides A</i>	A	Zhang et al.(2015)
<i>Soyamalosides B (Maltol 3-O-(3'-O-trans-p-coumaroyl-6'-O-(3-hydroxy-3-methylglutaroyl))-β-D-glucopyranoside)</i>	A	Zhang et al.(2015)
<i>Soyamalosides C</i>	A	Zhang et al.(2015)
<i>2-O-methyl-inositol</i>	C	Li et al.(2010)
<i>N, N'-diferuloyl-putrescine</i>	A,B	Lo et al.(2009)
<i>N,N'-dicoumaroyl-putrescine A</i>	A,B	Lo et al.(2009)
<i>N-p-coumaroyl-N'-feruloylputrescine</i>	A,B	Lo et al.(2009)
<i>N-(E)-feruloyl-N'-(Z)-feruloyl-putrescine</i>	A,B	Lo et al.(2009)
<i>N,N'-dicoumaroylputrescine</i>	A	Zhang et al.(2015)

Tabela adaptada de: HE, X.; BAI, Y.; ZHAO, Z.; WANG, X.; FANG, J.; HUANG, L.; ZENG, M.; ZHANG, Q.; ZHANG, Y.; ZHENG, X. Local and traditional uses, phytochemistry, and pharmacology of *Sophora japonica* L.: a review. **J Ethnopharmacol.**, v. 187, p. 160-182, 2016.

A: botões de flores; B: flores; C: flores carbonizadas; D: pericarpos; E: frutos; F: semente; G: folhas; H: casca do caule; I: caule; J: galhos; K: madeira; L: raiz

A: botões de flores; B: flores; C: flores carbonizadas.

APÊNDICE II

Frequências dos diferentes genótipos e alelos para a variante rs76276169 T>C em *PARG*.

Variantes	Populações	Amostra	Genótipos			Alelos		Tamanho amostras*
			TT (%)	TC (%)	CC (%)	T (%)	C (%)	
rs76276169T>C <i>PARG</i>	ABraOM	1.171	1.080 (92,23)	90 (76,86)	1 (0,9)	1.124 (96,1)	46,0 (3,9)	1.044
	Europeu	24.698	22.289,94 (90,3)	2.346,31 (9,5)	61,75 (0,3)	23.463,10 (95,0)	1.234,90 (0,05)	811
	Africano	3.168	2.566,08 (81,0)	2.566,08 (81,0)	570,24 (18,0)	2.851,20 (90,0)	316,80 (10,0)	385
	Asiático	128	115,52 (90,3)	12,16 (9,5)	0,32 (0,3)	121,60 (95,0)	6,40 (5,0)	811
	Latino americano ¹	168	161,35 (96,0)	6,58 (3,9)	0,07 (0,04)	164,64 (98,0)	3,36 (2,0)	2.092
	Latino americano ²	700	686,07 (98,0)	13,72 (2,0)	0,07 (0,0)	693,00 (99,0)	7,00 (1,0)	4.226
	Americano	694	666,52 (96,0)	27,20 (3,9)	0,28 (0,0)	680,12 (98,0)	13,88 (2,0)	2.092
	Japonês	28.258	27,138,98 (96,0)	1.107,71 (3,9)	11,31 (0,04)	27.692,84 (98,0)	565,16 (2,0)	2.092
	Judeu Ashkenazi	3.324	3.127,55 (94,1)	193,46 (5,8)	2,99 (0,1)	3.224,28 (97,0)	99,72 (3,0)	1.387
	Média							1.660

** Tamanho amostral calculado segundo os critérios de Beiguelman. BEIGUELMAN, B. Curso Prático de Bioestatística, 5ª Ed. Ribeirão Preto: FUNPEC, p. 274, 2002.

Latino americano¹: Indivíduos latino-americanos com ascendência afro-caribenha;

Latino americano²: Indivíduos latino-americanos com ascendência principalmente europeia e nativa americana

APÊNDICE III

Frequências dos diferentes genótipos e alelos para a variante rs2229714 G>A em *RSKI*.

Variantes	Populações	Amostra	Genótipos			Alelos		Tamanho amostras**
			TT (%)	TC (%)	CC (%)	T (%)	C (%)	
Rs2229714G>A PARG	ABraOM	1.171	931 (79,50)	228 (19,47)	12 (1,02)	1.045 (89,2)	126 (10,8)	354
	Europeu	232.620	172.045,75 (74,0)	56.014,90 (24,1)	4.559,35 (2,0)	200.053,2 (86,0)	32.566,8 (14,0)	262
	Africano	9.716	7.696,04 (79,2)	1.902,39 (19,6)	117,56 (1,2)	8.647,24 (89,0)	1.068,76 (11,0)	345
	Asiático	3.924	3.768,61 (96,0)	153,82 (3,9)	1,57 (0,04)	3.845,52 (98,0)	78,48 (2,0)	2.092
	Latino americano ¹	1.042	732,24 (70,6)	280,09 (26,9)	26,67 (2,6)	875,28 (84,0)	166,72 (16,0)	219
	Latino americano ²	6.646	5.872,40 (88,4)	749,67 (11,3)	23,93 (0,4)	6.247,24 (94,0)	398,76 (6,0)	669
	Americano	694	574,70 (82,8)	101,05 (14,6)	4,44 (0,6)	631,54 (91,0)	62,46 (9,0)	486
	Japônês	28.258	27.695,66 (98,0)	559,51 (2,0)	2,83 (0,0)	27.975,42 (99,0)	282,58 (0,01)	4.225
	Judeu Ashkenazi	3.324	2.632,94 (79,2)	650,84 (19,6)	4,44 (0,6)	631,54 (91,0)	62,46 (0,1)	383
	Média							1.004

** Tamanho amostral calculado segundo os critérios de Beiguelman. BEIGUELMAN, B. Curso Prático de Bioestatística, 5ª Ed. Ribeirão Preto: FUNPEC, p. 274, 2002.

Latino americano¹: Indivíduos latino-americanos com ascendência afro-caribenha;

Latino americano²: Indivíduos latino-americanos com ascendência principalmente européia e nativa americana

APÊNDICE IV

Dados clínicos de 65 pacientes com glioblastoma inseridos no estudo até o momento, considerando data da cirurgia, data do diagnóstico da doença, sexo, idade, cor da pele, localização do tumor, recidiva, realização de quimioterapia e radioterapia, sintomas (cefaleia, crise convulsiva, hemiparesia, paresia, perda do equilíbrio, perda da força motora, alteração do humor, confusão mental, mal-estar, enjoo, vomito e alteração visual), diagnóstico, data do óbito.

Continua

	<i>Genótipo rs76276169</i>	<i>Genótipo rs2229714</i>	<i>Cirurgia</i>	<i>Diagnóstico</i>	<i>Sexo</i>	<i>Idade</i>	<i>Cor da pele</i>	<i>Localização do tumor</i>	<i>Recidiva</i>	<i>QT e RT</i>	<i>KPS</i>	<i>Diagnóstico</i>	<i>Data Óbito</i>	<i>Última consulta</i>
TC5	TC	GG	27/07/2004	06/08/2004	M	37	B	Frontal D	Não	QT + RT	80%	GBM grau IV	16/11/2004	
TC6	TT	SA	24/10/2012	29/11/2012	F	47	B	Parietal E	Não	RT	100%	GBM grau IV	24/12/2013	
TC9	TT	SA	11/03/2010	29/03/2010	M	57	B	Fronto-parieto- temporal	Não	QT + RT	60%	Astro. Anap. III	17/08/2010	
TC10	TT	GA	12/05/2011	24/05/2011	F	65	B	Temporo-occipital D	Não	QT	100%	GBM grau IV	02/05/2012	
TC11	TT	GG	29/04/2011	09/05/2011	M	46	B	Parietal D	Não	QT + RT	80%	GBM grau IV	22/06/2012	
TC12	TT	SA		14/02/2014	F	24	B	Frontal D	Não	QT	90%	GBM grau IV		03/08/2018
TC13	TT	GG	04/07/2012	11/07/2012	M	41	B	Lobo frontal	Não	Não	30%	Astro. Anap. III	13/03/2015	
TC14	TT	SA	05/12/2012	12/12/2012	M	44	B	Parieto-occipital D	Não	QT + RT	100%	GBM grau IV	07/03/2013	
TC21	TT	GA	04/12/2013	11/12/2013	M	69	B	Parieto-occipital E	Não	Não	40%	Astro. Anap. III	18/02/2014	
TC22	TT	GG	06/08/2003	15/08/2003	F	61	B	Parietal D	Não	QT + RT	50%	GBM grau IV	06/02/2004	
TC24	TT	GA	08/05/2012	31/05/2012	F	67	B	Parietal D	Não	QT + RT	90%	GBM grau IV	29/10/2013	
TC25	TT	GG	07/01/2009	13/01/2009	F	67	B	Parietal D	Não	Não	50%	GBM grau IV	16/01/2009	
TC28	TC	GG	26/06/2012	10/07/2012	M	55	B	Parietal D	Não	QT	100%	GBM grau IV	26/09/2012	
TC29	TT	GG	09/01/2006	17/01/2006	M	49	B	Temporal E	Sim	QT + RT	90%	GBM grau IV	04/08/2008	

Dados clínicos de 65 pacientes com glioblastoma inseridos no estudo até o momento, considerando data da cirurgia, data do diagnóstico da doença, sexo, idade, cor da pele, localização do tumor, recidiva, realização de quimioterapia e radioterapia, sintomas (cefaleia, crise convulsiva, hemiparesia, paresia, perda do equilíbrio, perda da força motora, alteração do humor, confusão mental, mal-estar, enjoo, vômito e alteração visual), diagnóstico, data do óbito.

Continuação

TC31	TT	AA	24/06/2016	05/07/2016	M	31	B	Frontal D	Sim	QT + RT	100%	Astro. Anap. III		05/12/2017
TC33	TT	GG	15/12/2009	05/01/2010	F	67	B	Frontal D	Não	QT + RT	80%	GBM grau IV	17/08/2010	
TC34	TT	GG	23/03/2007	04/05/2007	M	73	B	Parietal D	Não	QT + RT	40%	GBM grau IV	21/07/2007	
TC36	TT	GG	28/06/2011	06/07/2011	F	57	B	Temporo-occipital E	Sim	Não	50%	GBM grau IV	30/12/2011	
TC37	TT	GG	17/08/2011	29/08/2011	M	71	B	Frontal E	Não	Não	100%	GBM grau IV	19/08/2011	
TC39	TT	GG	01/09/2009	03/11/2009	M	47	B	Temporal D	Sim	QT + RT	100%	GBM grau IV	23/10/2010	
TC40	TC	GG	10/08/2011	16/08/2011	F	76	B	Parietal D	Não	Não	80%	GBM grau IV	22/08/2011	
TC41	TT	GG	14/11/2012	28/11/2012	F	68	B	Frontal E	Não	QT + RT	50%	GBM grau IV	31/10/2014	
TC42	TT	GG	06/03/2009	25/03/2009	F	48	B	Temporo-parieto-occipital E	Sim	QT + RT	90%	GBM grau IV	27/09/2009	
TC43	TT	GG	15/12/2008	09/01/2009	F	57	B	Frontal E	Sim	QT + RT	90%	GBM grau IV	29/01/2010	
TC48	TT	GG	21/09/2012	28/09/2012	M	55	B	Frontal D	Sim	QT + RT	90%	GBM grau IV	12/05/2013	
TC49	TT	GG	19/05/2014	29/05/2014	F	75	B	Parietal D	Não	Não	80%	GBM grau IV	27/05/2014	
TC50	TC	GA	16/01/2014	22/01/2014	M	68	B	Temporal D	Não	Não	40%	GBM grau IV	07/03/2014	
TC54	TC	GG	13/01/2010	15/03/2010	M	77	PA	Frontal D	Não	QT + RT	100%	GBM grau IV	09/03/2012	
TC58	TT	GA	29/11/2012	10/12/2012	M	58	B	Fronto-parietal	Sim	QT + RT	90%	GBM grau IV	07/06/2013	
TC67	TT	GG	15/04/2014	29/04/2014	F	65	P	Temporal D	Não	QT + RT	50%	GBM grau IV	03/09/2014	
TC68	TC	GG	20/01/2006	31/01/2006	M	70	B	Parietal E	Não	Não	80%	GBM grau IV	04/11/2006	
TC70	TT	GA	27/11/2014	22/01/2015	M	67	B	Temporal D	Não	Não	80%	GBM grau IV	04/12/2014	

Dados clínicos de 65 pacientes com glioblastoma inseridos no estudo até o momento, considerando data da cirurgia, data do diagnóstico da doença, sexo, idade, cor da pele, localização do tumor, recidiva, realização de quimioterapia e radioterapia, sintomas (cefaleia, crise convulsiva, hemiparesia, paresia, perda do equilíbrio, perda da força motora, alteração do humor, confusão mental, mal-estar, enjoo, vômito e alteração visual), diagnóstico, data do óbito.

Continuação

TC72	TT	GG	29/10/2003	27/11/2003	F	51	B	Fronto-parietal E	Sim	QT + RT	90%	GBM grau IV	25/02/2005	
TC75	TT	GG	28/02/2011	03/03/2011	M	67	B	Parietal D	Não	Não	40%	GBM grau IV	17/05/2011	
TC80	TT	GA	06/11/2012	14/11/2012	M	62	B	Temporal D	Não	Não	80%	GBM grau IV	12/11/2012	
TC81	TT	GG	12/04/2011	20/04/2011	M	52	PA	Teporo-parietal D	Não	Não	50%	GBM grau IV	19/04/2011	
TC84	TC	GG	31/10/2013	08/11/2013	M	52	B	Parieto-occipital D	Não	Não	80%	GBM grau IV	18/12/2013	
TC86	TT	GA	12/09/2005	17/10/2005	M	53	B	Parietal D	Sim	QT + RT	80%	GBM grau IV	26/10/2006	
TC89	TT	GG	16/07/2013	19/07/2013	F	37	B	Frontal D	Não	QT + RT	100%	GBM grau IV	09/05/2014	
TC92	TC	GG	12/11/2012	03/12/2012	F	48	B	Temporal D	Sim	QT + RT	100%	Gliossarcoma	02/10/2013	
TC93	TC	AA	26/11/2013	04/12/2013	F	57	B	Temporal D	Não	QT + RT	60%	GBM IV	25/06/2014	
TC95	TT	GA	26/05/2003	10/06/2003	F	37	B	Fronto-parietal E	Não	QT + RT	80%	GBM grau IV	09/07/2004	
TC98	TC	GG	06/06/2011	14/06/2011	F	61	B	Parietal E	Não	QT + RT	60%	GBM grau IV	11/01/2012	
TC103	TC	GG	19/12/2012	07/01/2013	M	45	B	Fronto-parietal D	Não	QT + RT	90%	Oligoanaplásico III	25/03/2014	
TC105	TT	SA	30/11/2012	14/03/2013	F	53	B	Frontal D	Não	Não	100%	GBM grau IV	25/04/2013	
TC113	TT	GG	08/11/2013	18/11/2013	M	56	B	Parietal D	Sim	Não	80%	GBM grau IV	25/11/2013	
TC114	TC	GA	02/06/2014	06/06/2014	F	64	B	Temporal E	Sim	QT + RT	90%	GBM grau IV	26/09/2014	
TC115	TC	GG	24/03/2010	29/11/2010	M	54	B	Parietal D	Não	QT + RT	50%	Astro. Anap. III	15/04/2011	
TC120	TT	GA	13/01/2010	27/01/2010	M	48	B	Frontal D	Sim	QT + RT	60%	Astro. Anap. III	14/11/2010	
TC122	TT	GG	09/03/2016	17/03/2016	F	71	B	Temporo-parietal D	Sim	QT + RT	90%	GBM grau IV	01/07/2016	

Dados clínicos de 65 pacientes com glioblastoma inseridos no estudo até o momento, considerando data da cirurgia, data do diagnóstico da doença, sexo, idade, cor da pele, localização do tumor, recidiva, realização de quimioterapia e radioterapia, sintomas (cefaleia, crise convulsiva, hemiparesia, paresia, perda do equilíbrio, perda da força motora, alteração do humor, confusão mental, mal-estar, enjoo, vômito e alteração visual), diagnóstico, data do óbito.

Conclusão

TC124	TT	GG	17/03/2016	S/I	F	27	B	Frontal E	Não	QT	60%	GBM grau IV	28/09/2016	
TC125	TT	GA	25/04/2016	05/05/2016	F	63	B	Parieto-occipital E	Sim	QT +RT	100%	GBM grau IV		05/07/2017
TC126	TC	GG	24/04/2016	02/05/2016	F	66	B	Fronto-parietal E	Não	Não	90%	GBM grau IV	25/05/2016	
TC128	TT	GG	30/05/2016	09/06/2016	M	36	B	Temporal D	Não	QT + RT	100%	GBM grau IV	19/01/2017	
TC131	TC	GG	16/01/2017	18/01/2017	F	76	B	Occipital D	Não	Não	60%	GBM grau IV	16/04/2017	
TC133	TC	GG	17/04/2017	08/05/2017	M	50	B	Fronto-parietal D	Não	QT+RT	100%	GBM grau IV		26/07/2017
TC134	TT	GA	31/10/2016	10/11/2011	M	37	PA	Occipital E	Sim	RT	90%	GBM grau IV	21/08/2017	
TC135	TT	GA	22/05/2017	26/05/2017	M	68	B	Frontal D	Não	QT + RT	60%	GBM grau IV	11/10/2017	
TC137	TT	GA	02/06/2017	23/06/2017	M	67	B	Frontal D	Não	RT	70%	GBM grau IV	08/01/2018	
TC139	TT	SA	24/07/2017	10/12/2017	F	74	PA	Frontal E	Não	Não	90%	GBM grau IV		24/11/2017
TC140	TC	GA	27/07/2017	07/08/2017	F	40	B	Giro cíngulo D	Não	QT + RT	70%	GBM grau IV		18/04/2018
TC151	TT	GG	05/12/2017	15/12/2017	M	50	B	Temporal E	Não	QT + RT	90%	GBM grau IV		30/80/2018
TC152	TT	GG	20/08/2013	02/09/2013	M	S/I	B	N/A	Não	N/A	N/A	GBM grau IV		02/12/2014
TC153	TT	GG	02/06/2013	28/06/2013	M	S/I	B	N/A	Não	N/A	N/A	GBM grau IV		29/06/2013
TC154	SA	GG	28/11/2016	13/12/2016	M	61	B	N/A	Não	N/A	N/A	GBM grau IV		27/03/2018

TC: tecido tumoral; F: sexo feminino; M: sexo masculino; B: branco; PA: pardo; P: Preto; D: direito; E: esquerda; QT: quimioterapia; RT: radioterapia; GBM: Glioblastoma; KPS: Karnofsky; SA sem amplificação S/I: sem informação N/A: não analisado; Astro. Anap III.: Astrocitoma Anaplásico grau III

APÊNDICE V

Dados clínicos de 36 pacientes com glioblastoma inseridos no estudo até o momento, considerando data da cirurgia, data do diagnóstico da doença, sexo, idade, cor da pele, localização do tumor, recidiva, realização de quimioterapia e radioterapia, diagnóstico, data do óbito ou última consulta.

Continua

	Genótipo rs76276169	Genótipo rs2229714	Data cirurgia	Data resultado biópsia	Sexo	Idade diagnóstico	Cor pele	Localização	Recidiva	QT e RT	KPS	Diagnóstico	Data óbito	Última consulta
TCF1	TC	GA	17/06/2015	20/07/2015	M	60	B	Fronto-temporal D	Não	QT + RT	80%	GBM grau IV	16/10/2015	
TCF2	TC	GG	02/02/2016	29/02/2016	F	52	B	Parietal D	Não	Não	90%	GBM grau IV	01/04/2016	
TCF3	TC	GA	20/01/2016	16/02/2016	M	61	B	Fronto-temporo- parietal D	Não	Não	90%	GBM grau IV	02/02/2016	
TCF4	TC		31/07/2015	06/05/2016	M	58	B	Parietal D	Sim	QT + RT	90%	Ast. pilocítico	16/11/2016	
TCF5	TC	GA	22/08/2016	07/11/2016	F	44	B	Temporal D	Não	QT + RT	80%	GBM grau IV	07/11/2016	
TCF6	TC	GG	19/02/2016	16/12/2015	M	53	B	Parieto-occipital E	Sim	QT	90%	GBM grau IV	08/03/2017	
TCF7	TC	GG	31/01/2017	16/02/2017	M	76	B	Temporal E	Não	QT + RT	90%	Ast. Anap. Grau III	13/02/2017	
TCF8	TC	GG	01/07/2016	01/09/2016	F	53	B	Frontal E	Não	Não	80%	GBM grau IV	17/11/2016	
TCF9	TC	GA	27/05/2015	29/06/2016	M	67	B	Parietal D	Sim	QT + RT	90%	Gliossarcoma IV	03/06/2016	
TCF10	TC	GA	30/11/2016	14/12/2016	F	40	B	Frontal D	Sim	QT	90%	GBM grau IV		02/02/2018
TCF11	TC	GG	19/10/2016	11/11/2016	M	66	B	Frontal E	Não	Não	80%	GBM grau IV	09/06/2017	
TCF13	TC	GA	19/06/2017	26/06/2017	M	71	B	Frontal D	Não	Não	80%	GBM grau IV	25/06/2017	
TCF14	TC	GG	25/08/2017	31/08/2017	F	66	B	Parieto-temporal D	Não	Não	80%	GBM grau IV	16/09/2017	
TCF15	TC	GG	14/07/2017	21/07/2017	F	42	B	Temporal E	Não	QT + RT	80%	GBM grau IV	25/08/2017	
TCF16	TC	GA	20/09/2017	26/09/2017	F	62	B	Frontal	Não	QT	70%	GBM grau IV		02/03/2018
TCF17	TC	GA	24/10/2017	30/10/2017	M	56	B	Temporal E	Não	Não	90%	GBM grau IV	31/10/2017	
TCF18	TC	GA	14/11/2017	22/11/2017	M	59	B	Frontal D	Sim	Não	90%	GBM grau IV	27/12/2017	

Dados clínicos de 36 pacientes com glioblastoma inseridos no estudo até o momento, considerando data da cirurgia, data do diagnóstico da doença, sexo, idade, cor da pele, localização do tumor, recidiva, realização de quimioterapia e radioterapia, diagnóstico, data do óbito ou última consulta.

Conclusão

TCF19	TC	GG	10/03/2018	12/04/2018	M	61	B	Temporal E	Não	Não	80%	Ast. Anap. grau III		27/03/2018
TCF20	TC	SA	27/04/2018	03/05/2018	M	58	B	Temporal D	Não	QT + RT	90%	GBM grau IV		18/05/2018
TCF21	TT	GG	02/05/2018	07/05/2018	F	54	B	Frontoparietal D	Sim	QT+RT	80%	GBM grau IV	04/04/2019	
TCF22	TT	GG	09/01/2019	17/01/2019	M	55	A	Temporo D	Não	QT+RT	90%	GBM grau IV		08/11/2019
TCF23	TT	GG	27/07/2018	02/08/2018	M	56	B	frontal E	Não	S/I	80%	GBM grau IV		29/07/2018
TCF24	TT	GG	24/05/2019	30/05/2019	F	68	B	Temporal D	Não	Não	80%	GBM grau IV	20/09/2019	
TCF25	TT	GA	04/04/2018	09/04/2018	F	62	B	Frontotemporoparietal D	Sim	QT+RT	S/I	GBM grau IV	01/09/2018	
TCF26	TC	GA	13/02/2019	20/02/2019	F	57	B	Temporal D	Sim	QT	70%	GBM grau IV		04/09/2020
TCF27	TC	GA	07/11/2018	25/01/2019	M	51	S/I	Fronto parietal E	Não	Não	70%	GBM grau IV		21/08/2020
TCF28	TC	GG	20/03/2019	28/03/2019	M	41	B	Frontal E	Não	Não	70%	Gliossarcoma grau IV		11/09/2020
TCF30	TT	GG	06/02/2019	13/12/2019	M	67	PA	Temporal D	Não	Não	70%	Glioma de alto Grau	27/01/2020	
TCF31	TC	GA	04/12/2019	20/02/2019	F	27	B	Fronto-temporo-parietal D	Não	QT + RT	70%	GBM grau IV		31/08/2019
TCF32	TC	GA	18/02/2019	02/12/2019	M	62	B	Occipital	Não	QT	70%	GBM grau IV		22/11/2019
TCF33	TT	GA	19/11/2019	27/11/2019	M	30	S/I	Fronto-temporal E	Não	Não	70%	GBM grau IV	27/11/2019	
TCF34	SA	SA	27/03/2020	27/03/2020	M	29	PA	Temporal E	Não	Não	90%	GBM grau IV		18/03/2022
TCF36	TT	SA	10/08/2021	19/08/2021	M	60	B	Temporal D	Não	Não	70%	GBM grau IV	28/08/2021	
TCF37	TT	GG	08/08/2021	22/08/2021	M	64	B	Frontotemporoparietal E	Não	Não	90%	GBM grau IV		08/04/2022
TCF38	TT	SA	01/08/2021	11/08/2021	M	75	B	Frontal D	Não	Não	60%	GBM grau IV	25/08/2021	

TC: tecido tumoral; F: sexo feminino; M: sexo masculino; B: branco; PA: pardo; P: Preto; D: direito; E: esquerda; QT: quimioterapia; RT: radioterapia; GBM: Glioblastoma; KPS: Karnofsky; S/I: sem informação N/A: não analisado.

APÊNDICE VI

Dados clínicos de 254 controles inseridos no estudo, considerando idade, sexo, cor da pele.

Continua

<i>Identificação</i>	<i>Idade</i>	<i>Sexo</i>	<i>Cor</i>	<i>Genótipo rs76276169</i>	<i>Genótipo rs2229714</i>
SP016	42	M	B	TC	GA
SP017	53	M	B	TC	GG
SP018	52	M	P	TC	GA
SP019	34	F	B	TC	GG
SP020	35	F	B	TC	GG
SP021	26	F	B	TC	GG
SP027	24	F	B	TC	GA
SP029	43	F	B	TC	GG
SP031	30	F	P	TC	GG
SP032	45	F	B	TC	GA
SP033	39	M	B	TC	GA
SP035	18	M	P	TC	GA
SP037	42	M	B	TC	GG
SP039	37	M	B	TC	GG
SP040	23	F	B	TC	GG
SP041	27	F	B	TC	GG
SP042	40	F	B	TC	GG
SP043	45	F	B	TC	GG
SP044	24	M	B	TC	GG
SP045	31	M	B	TT	GG
SP046	20	M	B	TC	GA
SP047	24	F	B	TC	GA
SP048	21	F	B	TC	GA
SP049	32	M	B	TC	GA
SP050	56	M	B	TC	GA
SP052	23	F	B	TC	GA
SP054	33	M	B	TC	GA
SP055	18	F	B	TC	GA
SP056	32	F	N	TC	GA
SP058	20	F	B	TC	GG
SP059	27	M	B	TC	GG
SP060	56	F	B	TC	GA
SP061	31	M	B	TC	GA
SP062	32	M	B	TC	GA
SP063	24	M	B	TC	GG
SP064	49	M	B	TC	GA
SP065	26	F	B	TT	GG
SP066	47	M	B	TC	GG
SP068	21	M	P	TC	GA

Dados clínicos de 254 controles inseridos no estudo, considerando idade, sexo, cor da pele.

Continuação

SP069	26	M	B	TC	GA
SP073	47	M	B	TT	GA
SP074	39	M	B	TT	GG
SP075	28	F	B	TT	GG
SP076	24	M	P	TT	GG
SP077	24	M	P	TT	SA
SP078	26	F	B	TC	SA
SP079	40	M	B	TC	GA
SP080	32	M	PA	TT	GA
SP081	32	M	B	TC	GG
SP086	51	F	B	TC	GA
SP097	56	M	B	TC	GA
SP098	36	M	B	TC	GG
SP099	52	M	B	TC	GG
SP101	26	M	B	TC	GA
SP102	36	M	P	TC	GG
SP103	56	F	B	TC	GA
SP104	62	M	B	TC	GG
SP105	53	M	P	TC	GA
SP106	65	M	B	TC	GA
SP107	40	M	PA	TC	GA
SP108	56	F	B	TC	GA
SP109	57	M	B	TC	GA
SP110	37	F	B	TC	GA
SP111	40	M	B	TC	GA
SP112	32	M	B	TC	GG
SP113	49	M	B	TC	GA
SP114	53	M	B	TT	GG
SP115	39	M	P	TC	GG
SP116	24	M	B	TC	GG
SP117	42	M	B	TC	GA
SP118	40	M	B	TC	GA
SP119	46	M	B	TT	GG
SP121	44	F	B	TC	GA
SP122	20	F	B	TT	GG
SP124	34	M	B	TC	SA
SP126	21	M	B	TT	GG
SP127	38	M	B	TC	GG
SP128	45	F	B	TC	GG
SP130	33	F	B	TC	GG
SP131	18	F	B	TC	GG

Dados clínicos de 254 controles inseridos no estudo, considerando idade, sexo, cor da pele.

Continuação

SP132	41	M	PA	TC	GA
SP133	38	F	B	TC	GA
SP134	66	M	B	TC	GA
SP136	38	M	B	TC	SA
SP137	49	M	B	TC	GG
SP139	51	M	B	TC	GA
SP140	40	M	B	TC	SA
SP141	23	M	B	TC	GA
SP142	44	M	B	TC	SA
SP143	30	M	B	TC	GA
SP145	41	M	B	TT	GA
SP146	46	F	B	TT	GA
SP147	49	M	B	TC	GG
SP148	40	M	B	TC	GA
SP149	48	M	B	TT	GG
SP150	58	M	B	TC	GG
SP151	54	M	B	TT	GA
SP152	45	M	B	TC	GG
SP153	52	M	B	TC	GA
SP154	53	M	B	TC	GG
SP155	43	F	B	TC	GA
SP167	42	M	B	TC	GG
SP168	52	M	B	TC	SA
SP169	43	M	B	TC	GA
SP170	56	M	B	TC	GA
SP171	45	M	P	TC	GG
SP172	38	F	B	TC	GA
SP173	42	M	B	TC	SA
SP178	62	M	B	TC	GA
SP183	47	M	B	TC	SA
SP188	45	M	B	TC	GG
SP192	40	M	B	TC	GA
SP194	40	M	B	TC	GA
SP196	40	F	B	TT	GG
SP197	44	F	B	TT	GA
SP215	51	M	PA	TC	GA
SP216	24	M	B	TC	GG
SP217	42	M	B	TC	GA
SP218	39	M	B	TT	GA
SP231	30	F	PA	TC	GA
SP234	41	M	B	TT	GA

Dados clínicos de 254 controles inseridos no estudo, considerando idade, sexo, cor da pele.

Continuação

SP235	40	F	B	TC	GA
SP243	46	F	B	TC	GG
SP246	44	F	B	TC	AA
SP248	44	M	B	TC	GA
SP249	43	F	P	TT	GG
SP250	38	F	B	TC	GA
SP252	77	F	B	TT	GG
SP253	37	F	B	TT	GA
SP254	23	F	B	TC	SA
SP255	37	M	B	TC	SA
SP257	49	M	B	TT	SA
SP258	47	M	B	TC	SA
SP259	70	M	B	TT	GA
SP260	47	M	B	TT	GG
SP265	65	F	B	TT	GG
SP267	22	F	B	TC	SA
SP268	27	M	B	TT	GA
SP269	89	F	B	TT	GA
SP270	37	F	B	TC	GA
SP271	69	F	B	TT	GA
SP272	35	M	B	TC	SA
SP273	47	F	B	TC	GA
SP274	27	F	B	TT	GG
SP276	77	F	B	TC	GA
SP277	30	M	B	TT	GG
SP278	21	F	B	TC	GA
SP279	41	F	B	TT	GG
SP281	49	M	B	TC	GA
SP282	84	F	B	TT	GG
SP283	68	F	B	TC	GG
SP285	50	F	B	TT	GA
SP287	49	F	B	TC	GA
SP289	48	F	B	TC	GA
SP290	40	M	B	TC	GA
SP291	34	M	B	TC	GA
SP292	38	M	B	TC	GA
SP293	21	F	B	TC	GG
SP294	55	F	B	TC	GA
SP295	28	F	B	TC	GG
SP296	52	F	B	TC	GA
SP297	35	F	B	TC	GA

Dados clínicos de 254 controles inseridos no estudo, considerando idade, sexo, cor da pele.

Continuação

SP298	38	M	B	TT	GA
SP299	29	M	B	TT	GA
SP300	33	F	B	TT	GG
SP301	48	M	B	TT	GG
SP302	48	M	B	TC	GG
SP303	74	F	B	TC	GA
SP304	23	F	B	TC	GG
SP305	39	M	B	TC	SA
SP306	57	M	B	TT	GA
SP307	46	F	B	TC	AA
SP308	46	M	B	TC	GA
SP309	31	M	B	TT	GG
SP310	41	M	B	TT	SA
SP311	53	M	B	TC	GA
SP312	46	F	B	TC	GG
SP313	27	F	B	TC	GA
SP314	32	M	PA	TC	SA
SP315	32	F	B	TC	GA
SP316	35	F	B	TC	GA
SP317	23	F	B	TC	GA
SP318	29	M	B	TT	GA
SP319	32	M	B	TT	GG
SP320	47	M	B	TT	GG
SP321	46	M	B	TT	GA
SP322	28	M	B	TT	GA
SP323	38	F	B	TC	GA
SP324	42	M	B	TT	GA
SP325	52	M	B	TT	GA
SP326	38	M	B	TT	GA
SP327	21	F	B	TT	GA
SP328	43	F	B	TT	GG
SP329	31	M	B	TT	GA
SP330	56	F	B	TT	GA
SP331	20	F	B	TT	GA
SP332	32	M	B	TT	GA
SP333	32	M	B	TT	GA
SP334	75	M	B	TT	GA
SP335	32	F	B	TC	GA
SP338	25	M	B	TT	GG
SP339	51	M	B	TT	GA

Dados clínicos de 254 controles inseridos no estudo, considerando idade, sexo, cor da pele.

Continuação

SP340	40	F	B	TT	GA
SP341	54	F	B	TT	GA
SP345	71	M	B	TT	GA
SP346	74	F	B	TT	GA
SP347	80	M	B	TT	GA
SP351	38	M	B	TT	GA
SP352	66	F	B	TT	GA
SP353	50	M	B	TT	GA
SP354	57	F	B	TT	GA
SP356	65	F	B	TT	GA
SP358	43	F	B	TT	AA
SP359	29	F	B	TT	GA
SP362	41	F	B	TT	GA
SP363	34	F	B	TT	GA
SP364	38	F	B	TT	GA
SP365	89	F	B	TT	GA
SP366	36	F	B	TT	GA
SP367	27	F	B	TT	GA
SP369	34	F	B	TT	GA
SP370	37	M	B	TT	GA
SP371	81	F	B	TT	GA
SP372	54	F	B	TT	GA
SP373	30	F	B	TT	GA
SP374	51	M	B	TT	GA
SP376	57	F	B	TT	GG
SP377	56	F	B	TT	GA
SP378	53	F	B	TT	GA
SP379	48	F	B	TT	GA
SP380	55	F	B	TT	GA
SP381	21	F	B	TT	GA
SP382	87	M	B	TT	GA
SP383	32	M	PA	TC	SA
SP384	32	F	B	TC	SA
SP385	35	F	B	TT	GA
SP386	23	F	B	TC	GA
SP387	38	F	B	TC	GA
SP388	89	F	B	TC	GA
SP389	38	F	B	TC	GA
SP390	30	F	B	TC	GA
SP391	51	M	B	TC	GA

Dados clínicos de 254 controles inseridos no estudo, considerando idade, sexo, cor da pele.

Conclusão

SP392	57	F	B	TC	GG
SP393	43	F	B	TC	GA
SP394	29	F	B	TC	GA
SP395	41	F	B	TT	GA
SP396	38	M	B	TC	GA
SP397	32	F	B	TC	GA
SP398	25	M	B	TC	GA
SP399	51	M	B	TC	GA
SP400	32	M	B	TT	GG
SP401	46	M	B	TT	GA
SP402	51	M	B	TT	GG
SP403	50	M	B	TT	GA

SP: sangue periférico; AS: sem amplificação; M: masculino; F: feminino; B: branco; PA: pardo; P: Preto; A: amarelo.