



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

**ANÁLISE DO PERFIL DO NÚMERO DE CÓPIAS E TRANSCRIPTOMA DE PACIENTES COM
GLIOMAS E EM LINHAGENS DE GLIOBLASTOMAS TRATADAS COM PISOSTEROL**

WALLAX AUGUSTO SILVA FERREIRA

BELÉM, 2018

WALLAX AUGUSTO SILVA FERREIRA

**ANÁLISE DO PERFIL DO NÚMERO DE CÓPIAS E TRANSCRIPTOMA DE PACIENTES COM
GLIOMAS E EM LINHAGENS DE GLIOBLASTOMAS TRATADAS COM PISOSTEROL**

Defesa apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular da UFPA como requisito para obtenção do grau de Doutor em Neurociências e Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Edivaldo Herculano Corrêa de Oliveira.

BELÉM

Outubro – 2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- F383a Ferreira, Wallax Augusto Silva
ANÁLISE DO PERFIL DO NÚMERO DE CÓPIAS E TRANSCRIPTOMA DE PACIENTES COM
GLIOMAS E EM LINHAGENS DE GLIOBLASTOMAS TRATADAS COM PISOSTEROL / Wallax
Augusto Silva Ferreira. — 2018
302 f. : il. color
- Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia celular (PPGNBC),
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2018.
Orientação: Prof. Dr. Edivaldo Herculano Corrêa de Oliveira
1. Epigenética. 2. Gliomas. 3. Glioblastoma Multiforme. 4. Pisosterol. I. Oliveira, Edivaldo Herculano
Corrêa de, *orient.* II. Título

CDD 616.994

WALLAX AUGUSTO SILVA FERREIRA

**ANÁLISE DO PERFIL DO NÚMERO DE CÓPIAS E TRANSCRIPTOMA DE PACIENTES COM
GLIOMAS E EM LINHAGENS DE GLIOBLASTOMAS TRATADAS COM PISOSTEROL**

Defesa apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular da UFPA como requisito para obtenção do grau de Doutor em Neurociências e Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Edivaldo Herculano Corrêa de Oliveira.

Belém, Pará, 17 de outubro de 2018.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Edivaldo Herculano Corrêa de Oliveira.
(ICB – UFPA) (Orientador)

Prof. Dr. André Salim Khayat.
(ICB – UFPA)

Prof^a. Dra. Bárbara do Nascimento Borges.
(ICB – UFPA)

Prof^a. Dra. Priscilla Cristina Vieira.
(Hospital Ophir Loyola – HOL)

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”

Simone de Beauvoir

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Edivaldo Herculano Corrêa de Oliveira, que me apoiou de forma incondicional durante o desenvolvimento dessa tese. Você possibilitou uma oportunidade ímpar de crescimento e de enriquecer meus conhecimentos. Obrigado pela confiança, pelas discussões, pelo carinho, pelos ensinamentos durante todos esses anos e pela preciosa amizade que pude ganhar.

Aos meus amigos do Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética (SAMAM/IEC), que foi a minha segunda família durante todo o doutorado. Agradeço em especial a Carolina Koury pelo grande apoio nos experimentos de aCGH e a Michelle Mendonça por todo apoio logístico e técnico na cultura e armazenamento das células.

À Prof. Dr^a. Maria Lúcia Harada e à Prof. Dr^a. Bárbara do Nascimento Borges que me ensinaram muito durante boa parte de minha formação acadêmica. Muito obrigado por tudo!

Ao Prof. Dr. Rommel Rodríguez Burbano pela grande colaboração nos experimentos envolvendo o Pisosterol.

Ao meu amigo-irmão Francisco de Luna que nunca mediu esforços para me ajudar nos experimentos.

Ao cirurgião Reginaldo Brito e toda a sua equipe do Hospital Ophir Loyola pela ajuda nas coletas das biópsias dos pacientes.

Aos pacientes guerreiros e seus responsáveis, minha enorme gratidão por permitir tamanha invasão às suas vidas pela pesquisa e por me lembrar dos verdadeiros motivos para este trabalho ser desenvolvido.

À minha namorada, Késya Freitas, por todo amor, carinho e compreensão durante os momentos alegres e tristes dessa caminhada. Você não é só minha namorada, mas minha grande amiga, meu porto seguro. Te amo!

Agradeço à Deus pelo dom da vida e também por me dar pais maravilhosos que sempre apoiaram os meus sonhos. Agradeço em especial a minha mãe Ana Marta, sem a qual não teria conseguido chegar até aqui! Obrigado por me aturar, ouvir, compreender e direcionar, mesmo quando as palavras não eram suficientes para me confortar!

Aos membros da banca examinadora por terem aceitado participar da avaliação deste trabalho, contribuindo para sua melhoria.

À UFPA por ter sido minha casa durante esses 11 anos. Ao programa de pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular pelo acolhimento no doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado, e ao CNPq e FAPESPA pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT	11
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	12
LISTA DE TABELAS	15
LISTA DE ABREVIATURAS	17
1. Introdução	19
1.1. Câncer	19
1.2. Epidemiologia do Câncer	19
2. Tumores do Sistema Nervoso Central (SNC)	20
2.1. Fatores de riscos para os tumores do SNC	22
3. Gliomas	24
3.1. Classificação dos Gliomas	24
4. Genética molecular dos gliomas adultos	25
4.1. Gliomas difusos	27
4.1.1. Gliomas astrocíticos <i>IDH</i> mutantes	30
4.1.2. Oligodendrogliomas <i>IDH</i> mutantes	33
4.1.3. Glioblastomas (Grau IV da OMS)	36
4.1.4. Glioma difuso da linha média com mutação em H3-K27M (Grau IV da OMS) 40	
4.2. Gliomas oligoastrocíticos	41
4.2.1. Oligoastrocitoma anaplásico (NE)	42
5. Genética molecular dos gliomas pediátricos	43
5.1. Gliomas com crescimento circunscrito	43
5.1.1. Astrocitoma Pilocítico (AP) (Grau I da OMS)	43
5.1.2. Astrocitoma pilomixóide (Grau II da OMS)	44
5.1.3. Xantoastrocitoma pleomórfico (PXA) (Grau II da OMS)	45
5.1.4. Astrocitoma subependimário de células gigantes (SEGA) (Grau I da OMS) 46	
5.2. Gliomas difusos bem diferenciados	47
6. Genética molecular dos tumores ependimais	48
6.1. Subependimoma (Grau I da OMS)	48
6.2. Ependimoma mixopapilar (Grau I da OMS)	49
6.3. Ependimoma (Grau II da OMS)	50
6.4. Ependimoma anaplásico (Grau III da OMS)	50

7. Biomarcadores em gliomas.....	51
7.1. Biomarcadores moleculares que definem a entidade.....	51
7.2. Biomarcadores moleculares preditivos	51
7.3. Metilação da região promotora do gene <i>MGMT</i>	52
7.4. Codeleção 1p/19q.....	54
7.5. Biomarcadores preditivos emergentes	54
8. Epigenética.....	54
8.1. Metilação do DNA	56
9. Novas abordagens de diagnóstico molecular	59
10. Terapias atuais multimodais dos gliomas	60
11. Produtos naturais com potencial antineoplásico	62
12. Gênero <i>Pisolithus</i> e o Pisosterol.....	63
OBJETIVOS.....	68
13. Objetivo geral	69
14. Objetivos específicos.....	69
MATERIAL E MÉTODOS	71
RESULTADOS.....	80
CAPÍTULO 1.....	82
CAPÍTULO 2.....	100
CAPÍTULO 3.....	108
CAPÍTULO 4.....	155
CAPÍTULO 5.....	162
CAPÍTULO 6.....	173
DISCUSSÃO	186
CONCLUSÕES	198
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	199
ANEXOS	238
ANEXO A – Parecer Consubstanciado do CEP	239
APÊNDICES	242
APÊNDICE 1 – Lista de amostras de tecidos de pacientes diagnosticados com diferentes tumores gliais.....	243
APÊNDICE 2 – Variação do número de cópias (CNVs) da linhagem <i>AHOL</i>.....	244
APÊNDICE 3 – Vias gênicas influenciadas pelas amplificações ocorridas na linhagem <i>AHOL</i>.	246
APÊNDICE 4 – Análise de enriquecimento funcional do GO dos genes com a expressão aumentada da linhagem <i>AHOL1</i>. Foram considerados significantes, termos enriquecidos com p < 0.05	248

APÊNDICE 5 – Análise de enriquecimento funcional do GO dos genes com a expressão diminuída da linhagem <i>AHOL1</i> . Foram considerados significantes, termos enriquecidos com $p < 0.05$	258
APÊNDICE 6 – Análise de enriquecimento funcional do GO dos genes que sofreram ganhos nas linhagens de gliomas tratadas com pisosterol. Foram considerados significantes, termos enriquecidos com $p < 0.05$	284
APÊNDICE 7 – Análise de enriquecimento funcional do GO dos genes que sofreram perdas nas linhagens de gliomas tratadas com pisosterol. Foram considerados significantes, termos enriquecidos com $p < 0.05$	294
APÊNDICE 8 – Análise de enriquecimento funcional do GO dos genes <i>up-regulated</i> nas linhagens de gliomas tratadas com pisosterol. Foram considerados significantes, termos enriquecidos com $p < 0.05$	296
APÊNDICE 9 – Análise de enriquecimento funcional do GO dos genes <i>down-regulated</i> nas linhagens de gliomas tratadas com pisosterol. Foram considerados significantes, termos enriquecidos com $p < 0.05$	297

RESUMO

Os tumores do Sistema Nervoso Central (SNC) representam aproximadamente 2% de todos os tipos de cânceres. Embora a incidência dos tumores do SNC seja pequena, comparada às outras neoplasias, estes tumores estão entre as mais graves malignidades humanas, pois afetam o órgão responsável pela coordenação e integração de todas as atividades orgânicas. Os gliomas representam aproximadamente 80% de todos os tumores intracraniais, afetando tipicamente adultos, com uma incidência elevada entre 40 e 65 anos de idade. Apesar de numerosos fármacos contra os gliomas já terem sido desenvolvidos, os mesmos induzem reações adversas e os seus efeitos terapêuticos não são satisfatórios. O presente trabalho teve como objetivo avaliar e comparar o perfil de Variações no Número de Cópias (CNVs) e expressão gênica de pacientes diagnosticados com gliomas e em linhagens de glioblastomas (U87-MG, U343, AHOL1 e 1321N1) tratadas com pisosterol. Para os experimentos feitos com as linhagens tratadas com pisosterol, nós demonstramos que as mesmas foram altamente sensíveis ao tratamento do pisosterol. A droga reduziu o número de células vivas de forma dose-dependente. Além disso, demonstramos que após 48h de exposição ao pisosterol, todas as linhagens foram bloqueadas em G2/M. E por fim, demonstramos ainda que o pisosterol é capaz de modular a expressão de diversos genes da via *ATM/ATR*, além de promover a apoptose. Demonstramos em escala genômica que todas as linhagens tiveram mais genes que foram significativamente *down-regulated* do que *up-regulated* após o tratamento com pisosterol. Para os experimentos feitos com as biópsias de gliomas, demonstramos que de um painel de 26 genes, apenas 11 genes (*TNFRSF1A*, *SNAPC2*, *CASP8*, *IRAK3*, *GPX3*, *FZD9*, *TFAP2C*, *CDH1*, *RPRM*, *POU4F3* e *MGMT*) exibiram mudanças no padrão de metilação na região promotora em todos os graus analisados. Além disso, o padrão de metilação desses 11 genes tiveram correlações com algumas características clinicopatológicas, tais como idade, sexo e grau histológico. E por fim, fizemos uma caracterização molecular descrevendo as alterações genômicas dos gliomas originários de Belém-PA.

Palavras-chave: Epigenética, Gliomas, Glioblastoma Multiforme, Pisosterol, Metilação.

ABSTRACT

Central Nervous System Tumors (CNS) account for approximately 2% of all cancers. Although the incidence of CNS tumors is small, compared to other neoplasms, these tumors are among the most serious human malignancies because they affect the organ responsible for the coordination and integration of all organic activities. Gliomas represent approximately 80% of all intracranial tumors, typically affecting adults, with a high incidence between 40 and 65 years of age. Although numerous anti-glioma drugs have already been developed, they induce adverse reactions and their therapeutic effects are not satisfactory. The objective of this study was to evaluate and compare the profile of Copy Number Variation (CNV) and gene expression of patients diagnosed with gliomas and in glioblastomas cell lines (U87-MG, U343, AHOL1 and 1321N1) treated with pisosterol. For the experiments done with the cell lines treated with pisosterol, we demonstrated that they were highly sensitive to pisosterol treatment. This drug reduced the number of live cells in a dose-dependent manner. In addition, we demonstrated that after 48h of exposure to pisosterol, all cell lines were blocked in G2/M. Finally, we demonstrate that the pisosterol can modulate the expression of several genes of ATM/ATR pathway, promoting apoptosis. We demonstrated on genomic scale that all the cell lines had more genes that were significantly down-regulated than up-regulated after the treatment with pisosterol. For the experiments done with the gliomas biopsies, we demonstrated that only 11 genes (*TNFRSF1A*, *SNAPC2*, *CASP8*, *IRAK3*, *GPX3*, *FZD9*, *TFAP2C*, *CDH1*, *RPRM*, *POU4F3* and *MGMT*) exhibited changes in the pattern of methylation in all grades analyzed. In addition, the methylation pattern of these 11 genes had correlations with some clinicopathological characteristics, such as age, sex and histological grade. And finally, we made a molecular characterization describing the CNVs of the gliomas originating from Belém-PA.

Key words: Epigenetics, Gliomas, Glioblastoma Multiforme, Pisosterol, Methylation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Histologia dos tumores primários do SNC em crianças.
- Figura 2** – Histologia dos tumores primários do SNC em adultos.
- Figura 3** – Abordagem diagnóstica para a classificação histológica e molecular integrada dos gliomas difusos.
- Figura 4** – Astrocitoma difuso.
- Figura 5** – Astrocitoma Gemistocítico.
- Figura 6** – Astrocitoma anaplásico com vários graus de atipias nucleares.
- Figura 7** – Oligodendroglioma IDH mutante com a codeleção 1p/19q.
- Figura 8** – Oligodendroglioma anaplásico.
- Figura 9** – Glioblastoma *IDH* selvagem.
- Figura 10** – Subgrupos moleculares de glioblastoma, definidos por perfis genéticos e epigenéticos distintos.
- Figura 11** – Glioma difuso da linha média com mutação em H3-K27M.
- Figura 12** – Oligoastrocitoma.
- Figura 13** – Astrocitoma pilocítico.
- Figura 14** – Astrocitoma pilomixoide.
- Figura 15** – Características histológicas do xantoastrocitoma pleomórfico.
- Figura 16** – Astrocitoma subependimário de células gigantes.
- Figura 17** – Visão geral da estrutura cromossômica e modificações epigenéticas.
- Figura 18** – Principais vias de metilação do DNA.
- Figura 19** – *Pisolithus tinctorius*.
- Figura 20** – Estrutura molecular do pisosterol isolado do *Pisolithus tinctorius*.
- Figura 21** – Perfil dos CNVs de todos os cromossomos da linhagem *AHOL1*. Ganhos e perdas são mostrados em azul e vermelho, respectivamente.
- Figura 22** – *Heatmap* de todos os CNVs presentes em cada linhagem.
- Figura 23** – Alterações comuns dos transcriptomas das linhagens *AHOL1*, 1321N1, U343 e U87.
- Figura 24** – Perfil de CNVs diferenciais de todas as linhagens de gliomas tratadas com 0.5 µg/mL, 1.0 µg/mL e 1.8 µg/mL de pisosterol.
- Figura 25** – Perfil dos transcriptomas das linhagens *AHOL1*, 1321N1, U343 e U87 expostas a 0.5 µg/mL, 1.0 µg/mL e 1.8 µg/mL de pisosterol por 48h.

Figura 26 – Nível de metilação do DNA (%) da região promotora dos 11 genes em todas os graus de astrocitomas.

Figura 27 – Nível de metilação do DNA (%) da região promotora dos 11 genes em astrocitomas de grau I.

Figura 28 – Nível de metilação do DNA (%) da região promotora dos 11 genes em astrocitomas de grau II.

Figura 29 – Nível de metilação do DNA (%) da região promotora dos 11 genes em astrocitomas de grau III.

Figura 30 – Nível de metilação do DNA (%) da região promotora dos 11 genes em GBMs.

Figura 31 – Correlação entre o padrão de metilação da região promotora dos genes *CASP8* (A), *FZD9* (B), *MGMT* (C), *CDH1* (D), *GPX3* (E), *POU4F3* e *RPRM* (G) com a idade de todos os pacientes diagnosticados com astrocitomas.

Figura 32 – Correlação entre o padrão de metilação da região promotora dos genes *CASP8* (A), *IRAK3* (B), *POU4F3* (C), *RPRM* (D), *MGMT* (E), *GPX3* (F), *CDH1* (G) e *FZD9* (H) com o sexo de todos os pacientes com astrocitomas.

Figura 33 – Correlação entre o padrão de metilação da região promotora dos genes *POU4F3* (A), *TFAP2C* (B), *RPRM* (C), *GPX3* (D), *CDH1* (E), *IRAK3* (F), *SNAPC2* (G), *MGMT* (H), *TNFRSF1A* (I), *FZD9* (J) e *CASP8* (K) com os graus (I, II, III e IV) dos astrocitomas.

Figura 34 – Ideograma dos ganhos e perdas frequentes dos tumores oligodendrogliais e astrocíticos difusos.

Figura 35 – Principais categorias da Ontologia Gênica (GO) de processos biológicos dos genes que sofreram ganhos nos tumores oligodendrogliais e astrocíticos difusos.

Figura 36 – Principais categorias da Ontologia Gênica (GO) de funções moleculares dos genes que sofreram ganhos nos tumores oligodendrogliais e astrocíticos difusos.

Figura 37 – Principais categorias do *Disease Ontology* dos genes que sofreram ganhos nos tumores oligodendrogliais e astrocíticos difusos.

Figura 38 – Principais categorias da Ontologia Gênica (GO) de processos biológicos dos genes que sofreram perdas nos tumores oligodendrogliais e astrocíticos difusos.

Figura 39 – Principais categorias da Ontologia Gênica (GO) de funções moleculares dos genes que sofreram perdas nos tumores oligodendrogliais e astrocíticos difusos.

Figura 40 – Principais vias gênicas alteradas em consequência das perdas genômicas nos tumores oligodendrogliais e astrocíticos difusos.

Figura 41 – Ideograma dos ganhos e perdas frequentes dos tumores oligodendrogliais e astrocíticos difusos de grau II.

Figura 42 – Ideograma dos ganhos e perdas frequentes dos tumores oligodendrogliais e astrocíticos difusos de grau III.

Figura 43 – Ideograma dos ganhos e perdas frequentes dos tumores oligodendrogliais e astrocíticos difusos de grau IV.

Figura 44 – Ideograma do ganho em 7q do grupo dos outros tumores astrocíticos.

Figura 45 – Principais categorias de doenças do *Disease Ontology* relacionadas com o ganho do 7q do grupo dos outros tumores astrocíticos.

Figura 46 – Ideograma dos ganhos e perdas frequentes dos tumores ependemais. Azul: ganho.

Figura 47 – Principais categorias da Ontologia Gênica (GO) dos processos biológicos relacionados com os ganhos dos tumores ependimais.

Figura 48 – Principais categorias dos processos biológicos do GO relacionados com as perdas dos tumores ependimais.

Figura 49 – Principais categorias das funções moleculares do GO relacionados com as perdas dos tumores ependimais.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Síndromes genéticas associadas à tumores cerebrais.

Tabela 2 – Alterações genéticas, epigenéticas e cromossômicas comuns associadas às principais classes dos gliomas.

Tabela 3 – Classificação dos gliomas da OMS de 2016.

Tabela 4 – Biomarcadores moleculares preditivos relevantes para gliomas.

Tabela 5 – Iniciadores utilizados no presente estudo, com suas respectivas sequências, temperaturas de anelamento e referências.

Tabela 6 – Genes alvo e *housekeeping* usados na presente tese.

Tabela 7 – Genes alvos de drogas do DGIdb da linhagem AHOL. Cada gene foi apresentado mostrando sua localização cromossômica, citobanda, tamanho (kb), tipo de alteração encontrada na linhagem (Ganho ou deleção), drogas e o tipo de interação de cada droga.

Tabela 8 – Os 10 principais GDEs na linhagem AHOL1 (Fold-Change ≥ 2).

Tabela 9 – As 8 principais categorias da Ontologia Gênica (GO) dos GDEs da linhagem AHOL1 (Fold-Change ≥ 2).

Tabela 10 – Análise das vias dos GDEs os na linhagem AHOL1 (Fold-Change ≥ 2).

Tabela 11 – Vias significativas da correlação do transcriptoma com os CNVs na linhagem AHOL1 (Fold-Change ≥ 2).

Tabela 12 – Os termos mais enriquecidos da Ontologia Gênica (GO) dos CNVs das linhagens de gliomas tratadas com pisosterol.

Tabela 13 – Vias significativas comuns a todos os tratamentos com pisosterol (0.5 µg/mL; 1.0 µg/mL e 1.8 µg/mL) das linhagens de gliomas.

Tabela 14 – Termos enriquecidos da Ontologia Gênica (GO) dos genes *up-regulated* e *down-regulated* das linhagens de gliomas tratadas com pisosterol. Foram considerados significantes, termos enriquecidos com $p < 0.05$.

Tabela 15 – Principais vias significativas comuns a todos os tratamentos com pisosterol (0.5 µg/mL; 1.0 µg/mL e 1.8 µg/mL) das linhagens de gliomas.

Tabela 16 – Associações dos níveis de metilação avaliados por combinações pareadas em astrocitomas de grau I.

Tabela 17 – Associações dos níveis de metilação avaliados por combinações pareadas em astrocitomas de grau II.

Tabela 18 – Associações dos níveis de metilação avaliados por combinações pareadas em astrocitomas de grau III.

Tabela 19 – Associações dos níveis de metilação avaliados por combinações pareadas em GBMs.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACVR1 - Receptor 1 da Activina

AP - Astrocitoma Pilocítico

Array-CGH (ou a-CGH) - *Array-comparative genomic hybridization* (Hibridização genômica comparativa por array)

BSP - *Bisulfite Sequencing PCR*

CBTRUS - Registro Central de Tumores Cerebrais dos Estados Unidos (*Central Brain Tumor Registry of the United States*)

CCNU - Lomustina

CET - Complexo Esclerose Tuberosa

CNV - *Copy number variation* (Variação no número de cópias)

d-2-HG - d-2-hidroxigutarato

DGIdb - Banco de Dados de Interação Droga-Gene (*The Drug Gene Interaction Database*)

DNMTs - DNA Metiltransferases

DNMT1 - *DNA methyltransferase 1* (DNA metiltransferase 1)

DNMT3a - *DNA methyltransferase 3a* (DNA metiltransferase 3a)

DNMT3b - *DNA methyltransferase 3b* (DNA metiltransferase 3b)

EGFRvIII - Variante III de EGFR

FISH - Hibridização Fluorescente *In Situ*

GBM – Glioblastomas

G-CIMP – Glioma com Fenótipo Metilador de Ilhas CpG

GDE – Gene Diferencialmente Expresso

GO – Ontologia gênica (*Gene Ontology*)

GPID - Gliomas Pontino Intrínseco Difuso

Gy - Gray

H3K27me3 - Trimetilação da lisina 27 da histona H3

HDAC - Histona Deacetilase

HDMs - Histonas Desmetilases

HOL - Hospital Ophir Loyola

HSRs - *Homogeneously staining regions* (regiões de coloração homogênea)

IARC - Agência Internacional de Pesquisa em Câncer

IDH1 - Isocitrato desidrogenase 1

IDH2 - Isocitrato desidrogenase 2

INCA - Instituto Nacional de Câncer

JHDMs - Domínio JmjC

LGG - Glioma de Baixo Grau

lincRNA - *Long intergenic non-coding RNA* (RNA Intergênico Longo Não Codificante)

lncRNA - *Long non-coding RNA* (RNA Longo Não Codificante)

LOH - Perda de Heterozigosidade

MGMT - O(6)-Metilguanina-DNA Metiltransferase

MMR - *Mismatch repair* (Reparo de bases mal pareadas)

mSv – Milisieverts

NF1 – Neurofibromatose Tipo 1

NGS - *Next Generation Sequencing* (Sequenciamento de Nova Geração)

NMSC - Câncer de Pele Não Melanoma

OMS - Organização Mundial da Saúde

PCV - Vincristina

Pisosterol - 3 β ,22,23-triidroxi-22-acetoxi-24-metil-lanosta-8,24(28)-dieno

PPM1D - Proteína Fosfatase Dependente de Magnésio 1D

PRC2 - Complexo Repressivo *Polycomb* 2

PXA - Xantastrocitoma Pleomórfico

RTK I - Receptor Tirosina Quinase I

RTK II - Receptor Tirosina Quinase II

SAM - S-adenosilmetionina

SEGA - Astrocitoma Subependimário de Células Gigantes

SLP - Sobrevida Livre de Progressão

SNC - Sistema Nervoso Central

SNPs - Polimorfismos De Nucleotídeo Único

snRNA - Pequeno RNA Nuclear (*Small Nuclear RNA*)

TBL - Traqueia, brônquios e pulmão

TET - *Ten-Eleven-Translocation*

TMZ - Temozolomida

TSC - Esclerose Tuberosa

TTF - *Tumour Treating Fields* (campos de tratamento de tumores)

α -KG - α -cetoglutarato

5mC - 5-metilcitosina

1. Introdução

1.1. Câncer

O câncer é uma doença multifatorial e heterogênea resultante do acúmulo randômico de alterações genéticas (de origem somática ou germinativa) e epigenéticas as quais interagem com vários fatores (Gatenby e Brown, 2017).

Embora o câncer tenha sido estudado como uma doença clonal por muitas décadas (Nowell, 1976), recentes estudos propõem que subpopulações celulares de diferentes seções do mesmo tumor podem variar na taxa de crescimento, imunogenicidade, resposta a drogas e capacidade de metastizar (Tabassum e Polyak, 2015).

Não há dúvida de que a maioria dos cânceres possui uma considerável heterogeneidade fenotípica intratumoral a qual pode ser hereditária ou não, decorrente da variabilidade genética e não-genética intratumoral (Marusyk *et al.*, 2012; Gerlinger *et al.*, 2014; Tabassum e Polyak, 2015). Muitas vezes, variações na disponibilidade de recursos, como o acesso diferenciado a nutrientes e/ou oxigênio em consequência da arquitetura tumoral, podem ser uma força motriz para gerar a heterogeneidade intratumoral (Gillies *et al.*, 2012; Tabassum e Polyak, 2015).

Assim, o câncer é atualmente visto e analisado como um ecossistema em evolução (Gatenby *et al.*, 2014; Gatenby e Brown, 2017). Espera-se que, assim como em qualquer ecossistema ou no contexto de órgãos, as células cancerosas se envolvam em interações heterotípicas com células em seu microambiente e usem os recursos disponíveis para proliferar e sobreviver (Egeblad *et al.*, 2010; Tabassum e Polyak, 2015). Além disso, recentes evidências reforçam a ideia de que subpopulações individuais de células cancerígenas também se comportam mais como sociedades e interagem substancialmente umas com as outras (Heppner, 1989; Tabassum e Polyak, 2015).

1.2. Epidemiologia do Câncer

O câncer é uma das principais causas de morte em países mais e menos desenvolvidos economicamente. Espera-se que a quantidade aumente mundialmente devido ao crescimento e envelhecimento populacional, particularmente nos países menos desenvolvidos, nos quais cerca de 82% da população mundial reside (Torre *et al.*, 2016).

Em 2016, havia 17,2 milhões de casos incidentes de câncer no mundo e 8,9 milhões de mortes por câncer. Globalmente, as probabilidades de desenvolver câncer

durante um período de vida (idade 0-79 anos) diferem entre os sexos: 1 em 3 para homens e 1 em 5 para mulheres. Em 2016, os cânceres de próstata, TBL (traqueia, brônquios e pulmão) e colorretal foram os mais comuns em homens, representando 40% de todos os casos. Para as mulheres, em 2016, os cânceres mais incidentes foram os de mama, colorretal e NMSC, correspondendo a 40% de todos os casos incidentes (Global Burden of Disease Cancer *et al.*, 2018).

Para as neoplasias infantis (idade de 0 a 19 anos), os cânceres e causas mais comuns de mortes por câncer foram as neoplasias cerebrais e do sistema nervoso e leucemia linfóide aguda. Para adolescentes e adultos jovens (20-39 anos de idade), os cânceres mais comuns em todo o mundo foram câncer de mama e câncer cervical. As principais causas de mortes por câncer nessa faixa etária foram cânceres cerebrais e do sistema nervoso e linfoma não-Hodgkin. Para a população com mais de 39 anos, as neoplasias que mais contribuíram para os casos incidentes foram TBL, câncer de mama, próstata e colorretal, enquanto os principais contribuintes para as mortes por câncer foram TBL, colorretal e câncer de estômago (Global Burden of Disease Cancer *et al.*, 2018).

2. Tumores do Sistema Nervoso Central (SNC)

Os tumores do SNC representam um grupo de tumores raros e bastante heterogêneos os quais afetam o cérebro, nervos craniais, meninges, crânio, glândula pituitária e glândula pineal. Embora sejam raros, esses tumores representam uma causa significativa de morbidade e mortalidade por câncer, especialmente em crianças e em adultos jovens, onde são responsáveis, respectivamente, por aproximadamente 30% e 20% das mortes (McNeill, 2016). Os tumores mais comuns em crianças são o astrocitoma pilocítico, tumores embrionários e gliomas malignos (Figura 1), enquanto os meningiomas, tumores hipofisários e gliomas malignos são os tipos mais comuns em adultos (Figura 2).

Para o Brasil, estimam-se 5.810 casos novos de câncer do SNC em homens e 5.510 em mulheres para cada ano do biênio 2018-2019. Esses valores correspondem a um risco estimado de 5,62 casos novos a cada 100 mil homens e 5,17 para cada 100 mil mulheres, correspondendo à décima e à nona posições, respectivamente (INCA, 2018).

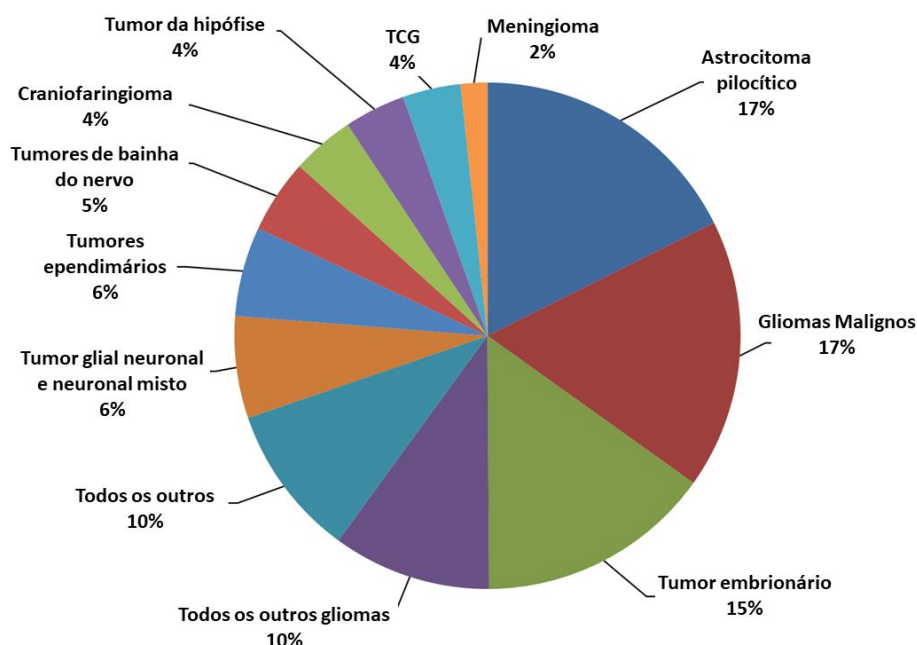


Figura 1 | Histologia dos tumores primários do SNC em crianças (Adaptado de McNeil *et al.*, 2016).

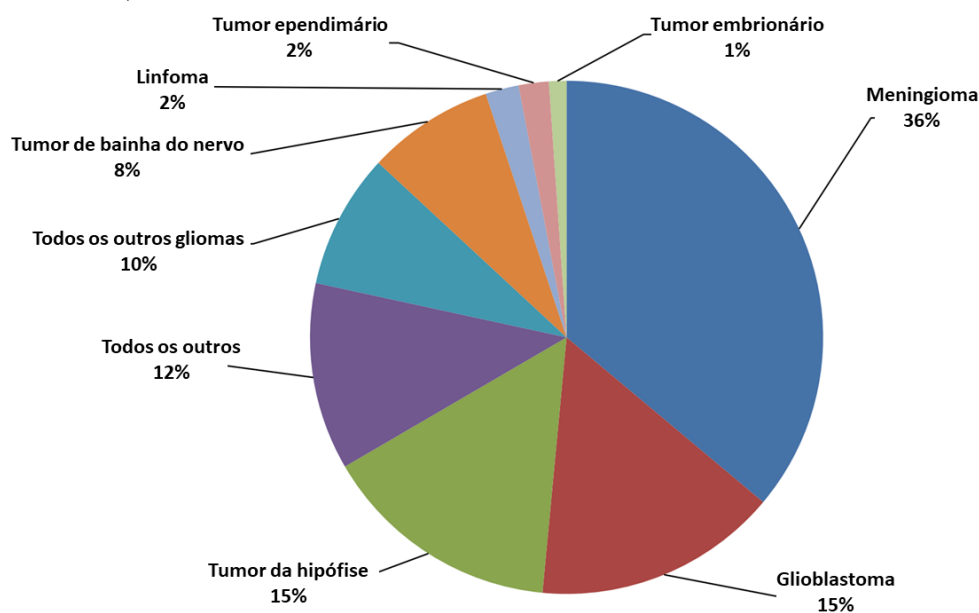


Figura 2 | Histologia dos tumores primários do SNC em adultos (Adaptado de McNeil *et al.*, 2016)

A designação histológica de cada tumor é fundamentada nas origens (locais de origem dos tumores) e nas semelhanças entre as células que constituem o tumor e as células normais do cérebro. Basicamente, os tumores cerebrais podem ser divididos em duas categorias principais: tumores primários e secundários. Os tumores primários originam-se do tecido cerebral, podem ser benignos ou malignos, e são classificados pelo

tecido o qual eles iniciam. Já os tumores secundários (ou metastáticos) se desenvolvem em alguma outra parte do corpo com metástase ao cérebro (Mcneill, 2016).

2.1. Fatores de riscos para os tumores do SNC

A identificação dos fatores de risco que contribuem para o desenvolvimento dos tumores do SNC não são bem estabelecidos. Os principais fatores que têm sido descritos terem uma associação com o desenvolvimento dos tumores de SNC são: radiação ionizante, a dieta, traumas na cabeça, consumo alcoólico materno, cigarro, exposição a agentes químicos, infecção por vírus, uso de drogas e outros medicamentos. Altas doses de radiação ionizante e síndromes genéticas raras são os únicos fatores de risco mais bem definidos e aceitos, entretanto, eles explicam apenas uma pequena porcentagem dos casos de gliomas (Mcneill, 2016).

Um estudo recente com 680.000 pessoas expostas a exames de tomografia computadorizada na infância e adolescência mostrou que existe duas vezes mais risco de desenvolverem tumores cerebrais, com uma relação dose-resposta e maior risco após a exposição em idades mais jovens. A dose média efetiva de radiação por varredura foi de 4,5 mSv (Mathews *et al.*, 2013).

Vários estudos ocupacionais mostraram um alto risco no desenvolvimento de astrocitomas em pessoas empregadas na área de elétricos-eletrônicos, ou trabalhadores expostos a produtos químicos orgânicos na refinação de petróleo e fabricação de produtos químicos (Thomas *et al.*, 1987). O risco foi maior para engenheiros, professores, técnicos, reparadores e montadores. O risco aumentou dez vezes entre os empregados por 20 ou mais anos.

A associação entre uso do telefone celular e desenvolvimento de tumores cerebrais permanece controversa. Vários estudos sugerem que a exposição a longo prazo (> 10 anos) e o uso intenso (> 897 h cumulativas) aumentam o risco de desenvolvimento de gliomas e tumores temporais (Baan *et al.*, 2011; Coureau *et al.*, 2014). Em 2011, a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) classificou os campos eletromagnéticos de radiofrequência de telefones celulares e de outros dispositivos que emitem campos eletromagnéticos não ionizantes semelhantes pertencentes ao grupo 2B, ou seja, um possível carcinógeno humano (Humans, 2013).

A radiação ionizante terapêutica é um fator de risco relevante e bem estabelecido para o desenvolvimento de tumores do SNC (Wrench *et al.*, 2002). As exposições

incluem radiação para o tratamento de micose do couro cabeludo (causadas por *Tinea capitis*) (Shore *et al.*, 2003; Sadetzki *et al.*, 2005), hemangiomas cutâneos (Karlsson *et al.*, 1997), hipertrofia das adenoides (Yeh *et al.*, 2001), bem como irradiação craniana profilática para o tratamento de leucemia infantil e linfoma (Little *et al.*, 1998; Neglia *et al.*, 2006; Taylor *et al.*, 2010). Casos de tumores cerebrais foram relatados entre os sobreviventes da bomba atômica (Thompson *et al.*, 1994; Preston *et al.*, 2007), trabalhadores de limpeza de Chernobyl (Rahu *et al.*, 2006; Rahu *et al.*, 2013) e entre os trabalhadores nucleares norte-americanos (Alexander e Dimarco, 2001). Os tumores mais comuns induzidos por radiação são os meningiomas, gliomas e schwannomas, e os menos frequentes são os hemangioblastomas, linfomas e tumores embrionários (Mcneill, 2016).

Embora existam várias síndromes genéticas associadas a um risco aumentado no desenvolvimento de tumores do SNC, a maioria dos tumores cerebrais é esporádica (Tabela 1). Em um estudo com 500 pacientes diagnosticados com glioma, por exemplo, menos de 1% tinham uma síndrome hereditária conhecida (Wrensch *et al.*, 1997).

Tabela 1 | Síndromes genéticas associadas à tumores cerebrais (Adaptada de Mcneill, 2016).

Síndrome Genética	Tumores do SNC	Cromossomo	Gene	Tumores associados
Neurofibromatose tipo 1	Glioma da via óptica	17q11.2	<i>NF1</i>	Feocromocitoma, tumores estromais gastrointestinais, rabdomiossarcoma, Leucemia mielóide crônica juvenil
	Gliomas			
Neurofibromatose tipo 2	Schwannoma vestibular	22q12	<i>NF2</i>	Nenhum
	Ependimoma			
	Meningioma			
Esclerose Tuberosa	Astrocitoma	9q34	<i>TSC1</i>	Rabdomioma cardíaco,
	subependimário de células gigantes	16p13.3	<i>TSC2</i>	angiomiolipoma renal
Síndrome de Li-Fraumeni	Gliomas	17p13.1	<i>TP53</i>	Carcinoma da mama, sarcomas, leucemia, carcinoma adrenocortical
	Meduloblastoma/PNET			
	Carcinoma do plexo coróide			
Doença de Cowden	Gangliocitoma displásico do cerebello	10q23	<i>PTEN</i>	Pólipos de cólon, carcinoma da mama e da tireoide
Síndrome de Turcot Tipo 1	Meduloblastoma	5q21	<i>APC</i>	Carcinoma do cólon
Síndrome de Turcot Tipo 2	Glioblastoma	3p21	<i>MLH1</i>	Carcinoma do cólon
		7p22	<i>PMS2</i>	

Síndrome de von Hippel-Lindau	Hemangioblastoma	3p25	<i>VHL</i>	Carcinomas de células renais, feocromocitomas, tumores do saco endolinfático
Síndrome do carcinoma basocelular Nevóide (síndrome de Gorlin)	Meduloblastoma Meningioma	9q31	<i>PTCH</i>	Carcinoma basocelular

3. Gliomas

Os gliomas são os tumores primários mais frequentes do SNC e formam um grupo heterogêneo de neoplasias com vários tipos histológicos e graus de malignidade (Little *et al.*, 1998; Ostrom *et al.*, 2015; Perry e Wesseling, 2016), sendo considerados originários de células gliais (progenitoras) ou de células tronco que desenvolvem características gliais após a transformação neoplásica (Taylor *et al.*, 2010).

A maioria dos gliomas ocorre nos lóbulos frontal, temporal, parietal e occipital (Ostrom *et al.*, 2015). Eles afetam tipicamente adultos, com uma incidência elevada entre os 40 e 65 anos de idade. Apenas 1% a 5% dos gliomas podem ser classificados como hereditários, pois a maioria é esporádica de causas desconhecidas (Louis *et al.*, 2007; Louis, Perry, *et al.*, 2016). Em sua maioria, os gliomas mostram-se resistentes a vários tratamentos tradicionais tais como quimioterapia, radioterapia, indução de apoptose e cirurgia. Embora o tratamento possa prolongar a vida do paciente, a maioria dos gliomas não possui cura (Lazarczyk *et al.*, 2007).

3.1. Classificação dos Gliomas

Antes da publicação da classificação revisada da Organização Mundial da Saúde (OMS) dos tumores do SNC feita por Louis *et al.* (2016), os gliomas eram exclusivamente classificados seguindo a examinação dos espécimes tumorais usando a microscopia de luz, de acordo com os critérios histológicos definidos na classificação da OMS de 2007 (Louis *et al.*, 2007).

Além da classificação histológica, atribui-se a cada tumor um grau histológico baseado no grau de anaplasia (Graus I, II, III e IV). Esse sistema de classificação da OMS reflete o grau de malignidade tumoral e o curso natural presumido da neoplasia, com grau I indicando uma lesão de crescimento lento geralmente associada a um prognóstico favorável, enquanto que o grau IV é atribuído a tumores altamente malignos (Reifenberger *et al.*, 2016).

A classificação histológica vem sendo, durante muitas décadas, o "padrão-ouro" para o diagnóstico dos gliomas; todavia, está associada a uma considerável variabilidade interobservador, particularmente no contexto dos gliomas difusamente infiltrantes (Van Den Bent, 2010). Dados de vários estudos revelaram que a classificação molecular dos gliomas correlaciona-se melhor com o desfecho clínico do que com a classificação histológica (Wiestler *et al.*, 2014; Cancer Genome Atlas Research *et al.*, 2015; Suzuki *et al.*, 2015; Weller, Weber, *et al.*, 2015). Além disso, certas entidades histológicas, como os glioblastomas (GBMs), abrangem um espectro de grupos tumorais biologicamente distintos associados com diferenças na idade de início, localização tumoral e prognóstico (Sturm *et al.*, 2012; Brennan *et al.*, 2013; Korshunov *et al.*, 2015; Ceccarelli *et al.*, 2016).

Na revisão da classificação da OMS dos tumores do SNC em 2016 (Louis *et al.*, 2016), os avanços na compreensão molecular dos gliomas foram impulsionados por uma nova abordagem de categorização tumoral que incorporou informações histológicas e moleculares em um diagnóstico integrado (Hainfellner *et al.*, 2014; Louis *et al.*, 2016).

4. Genética molecular dos gliomas adultos

Um dos principais avanços na classificação da OMS de 2016 (Louis, Perry, *et al.*, 2016) comparado com a de 2007 (Louis *et al.*, 2007), foi a separação das diferentes entidades dos gliomas de acordo com o estado mutacional dos genes Isocitrato Desidrogenase 1 (*IDH1*) ou Isocitrato Desidrogenase 2 (*IDH2*) (Tabela 2). A descoberta de mutações em *IDH* na maioria dos gliomas de grau II e III constituiu um avanço fundamental na compreensão desta doença (Balss *et al.*, 2008; Parsons *et al.*, 2008; Yan *et al.*, 2009).

Tabela 2 | Alterações genéticas, epigenéticas e cromossômicas comuns associadas às principais classes dos gliomas (Adaptado de Reifenberger *et al.*, 2016 e Masui *et al.*, 2016).

TIPO DE GLIOMA	ALTERAÇÃO GENÉTICA	ALTERAÇÃO EPIGENÉTICA	ALTERAÇÃO CROMOSSÔMICA
TUMORES ASTROCÍTICOS DIFUSOS E OLIGODENDROGLIAIS			
Astrocitoma difuso, IDH mutante	Mutação do <i>IDH1</i> ou <i>IDH2</i> , <i>TP53</i> e <i>ATRX</i>	G-CIMP	Trissomia do 7 ou ganho do 7q; LOH do 17p
Astrocitoma anaplásico, IDH mutante	Mutação do <i>IDH1</i> ou <i>IDH2</i> , <i>TP53</i> e <i>ATRX</i>	G-CIMP	Trissomia do 7 ou ganho do 7q; LOH do 17p

Oligodendroglioma, IDH mutante e 1p/19q-codeletado	Mutação do <i>IDH1</i> ou <i>IDH2</i> , <i>TERT</i> , <i>CIC</i> e <i>FUBP1</i> .	G-CIMP	Codeleção de 1p/19q
Oligodendroglioma Anaplásico, IDH mutante e 1p/19q-codeletado	Mutação do <i>IDH1</i> ou <i>IDH2</i> , <i>TERT</i> , <i>CIC</i> , <i>FUBP1</i> , <i>TCF12</i> ; Deleção do <i>CDKN2A</i>	G-CIMP	Codeleção de 1p/19q
Glioblastoma, IDH mutante	Mutação do <i>IDH1</i> ou <i>IDH2</i> , <i>TP53</i> e <i>ATRX</i> ; Deleção homozigota do <i>CDKN2A</i>	G-CIMP	Trissomia do 7 ou ganho do 7q; LOH do 17p; Deleção do 10q
Glioblastoma, IDH selvagem	Mutação do <i>TERT</i> , <i>PTEN</i> , <i>TP53</i> , <i>PIK3CA</i> , <i>PIK3R1</i> , <i>NF1</i> , <i>H3F3A-G34</i> ; Deleção homozigota do <i>CDKN2A</i> e <i>PTEN</i> ; Amplificação do <i>EGFR</i> , <i>PDGFRA</i> , <i>MET</i> , <i>CDK4</i> , <i>CDK6</i> , <i>MDM2</i> e <i>MDM4</i> ; Rearranjo do <i>EGFRvIII</i>	Metilação da região promotora do <i>MGMT</i>	Trissomia do 7 ou ganho de 7q; Monossomia do 10; Cromossomos <i>double-minute</i>
Glioma difuso da linha média, H3-K27M-mutante [‡]	Mutação do <i>H3F3A-K27M</i> ou <i>HIST1H3B/C-K27M</i> , <i>TP53</i> , <i>PPMD1</i> , <i>ACVR1</i> e <i>FGFR1</i> ; Amplificação do <i>PDGFRA</i> , <i>MYC</i> , <i>MYCN</i> , <i>CDK4</i> , <i>CDK6</i> , <i>CCND1-3</i> , <i>ID2</i> e <i>MET</i> .	Perda da trimetilação na lisina da histona-H3	
Glioma difuso pediátrico bem diferenciado [§]	Rearranjo do <i>MYB</i> ou <i>MYBL</i> ; Duplicação do <i>FGFR1</i>		
OUTROS GLIOMAS (ASTROCÍTICOS)			
Astrocitoma Pilocítico	Fusões gênicas em <i>BRAF</i> , <i>RAF1</i> e <i>NTRK2</i> ; Mutações em <i>BRAF-V600E</i> , <i>NF1</i> , <i>KRAS</i> , <i>FGFR1</i> e <i>PTPN11</i> .		
Xantoastrocitoma Pleomórfico	Mutação V600E do gene <i>BRAF</i> . Deleção do <i>CDKN2A/p14^{ARF}</i> .		
Astrocitoma subependimário de células gigantes	Mutação do <i>TSC1</i> ou <i>TSC2</i> ;		
Glioma angiocêntrico	Fusões/rearranjos genéticos <i>MYB-QKI</i>		
TUMORES EPENDIMAIS SUPRATENTORIAIS			
Ependimoma, fusão RELA- positiva ^{II}	Fusão <i>C11orf95-RELA</i>		Aberrações do 11q
Ependimoma ^{II}	Fusões gênicas em <i>YAP1</i>		Aberrações do 11q
TUMORES EPENDIMAIS DA FOSSA POSTERIOR (FP)			
Ependimoma FP-A ^{II}		Hipermetilação Global	Genótipo estável
Ependimoma FP-B ^{II}		Hipermetilação Global	Múltiplos desequilíbrios de no número de cópias
TUMORES EPENDIMAIS INTRAMEDULARES			
Ependimoma	Mutação do <i>NF2</i>		Deleção do 22q

[‡] Inclui os Gliomas Pontino Intrínseco Difuso (GPID); [§] Grupo de gliomas IDH do tipo selvagem em crianças que não foram reconhecidos como uma entidade distinta pela OMS; ^{II} Inclui os tumores de graus II e III da OMS.

Dados de numerosos estudos evidenciaram que a presença de mutações no gene *IDH* é capaz de distinguir gliomas com biologia e comportamentos clínicos distintos (Weller, Wick, *et al.*, 2015).

As proteínas IDH mutantes adquirem uma atividade enzimática neomórfica que resulta na conversão de α -cetoglutarato (α -KG) em d-2-hidroxicetoglutarato (d-2-HG), que por sua vez inibe as dioxigenases α -KG-dependentes, tais como a família de hidroxilases TET (*Ten-Eleven-Translocation*) e as Histonas Demetilases (HDMs) contendo o domínio JmjC (JHDMs) (Xu *et al.*, 2011). Como consequência, as mutações em *IDH* alteram o padrão de metilação do DNA e das histonas, eventualmente levando à hipermetilação de ilhas CpGs, originando os gliomas com fenótipo metilador de ilhas CpG (G-CIMP) (Noussmehr *et al.*, 2010).

Os testes diagnósticos para mutações em *IDH* geralmente envolvem a marcação imuno-histoquímica com um anticorpo contra a proteína IDH1-R132H (Capper *et al.*, 2009), o qual permite a detecção da mutação *missense* mais comum em gliomas (presente em aproximadamente 90% dos tumores *IDH* mutados), provando ser confiável em diferentes laboratórios (Van Den Bent, Hartmann, *et al.*, 2013).

Os tumores imunonegativos, no entanto, requerem testes moleculares adicionais - por exemplo, sequenciamento do DNA - para demonstrar a presença de outras mutações em *IDH1* ou em *IDH2* (Louis, Perry, *et al.*, 2016).

4.1. Gliomas difusos

Este grupo de neoplasias inclui gliomas astrocíticos *IDH* mutantes (Graus II-IV da OMS), tumores oligodendrogliais *IDH* mutantes com a codeleção 1p/19q (Graus II-III da OMS), glioblastoma *IDH* selvagem (Grau IV da OMS), e uma nova classe recentemente introduzida, o glioma difuso da linha média com mutação em H3-K27M (Louis, Perry, *et al.*, 2016) (Tabela 3). Os astrocitomas difusos e anaplásicos *IDH* selvagens (Grau II e III da OMS, respectivamente) são considerados categorias provisórias na classificação da OMS de 2016 (Louis, Perry, *et al.*, 2016) (Figura 3; Tabela 3).

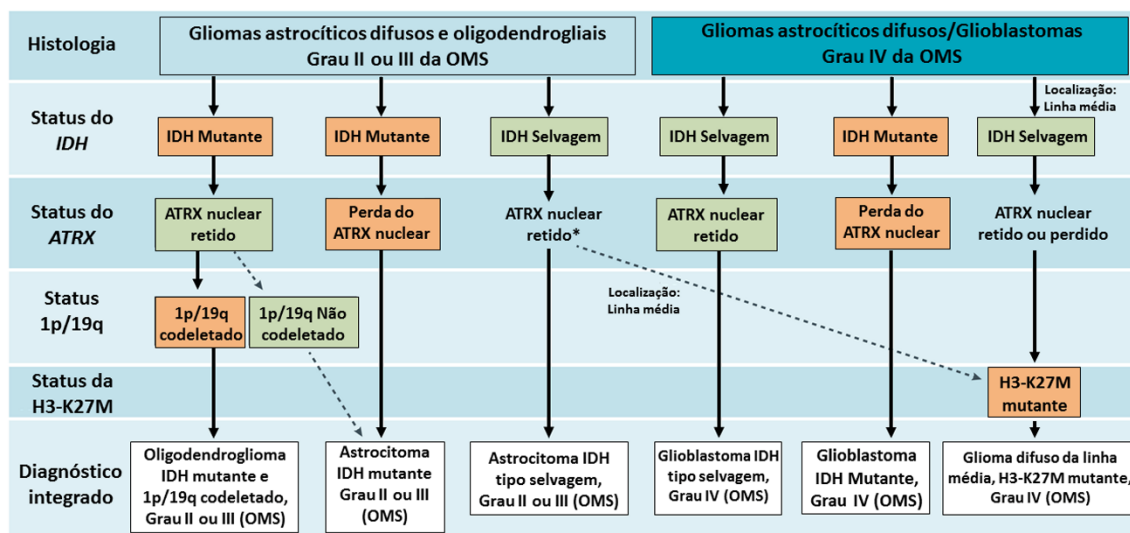


Figura 3 | Abordagem diagnóstica para a classificação histológica e molecular integrada dos gliomas difusos (Louis *et al.*, 2016) (Adaptado de Reifenberger *et al.*, 2016). Além do tipo histológico e dos graus, os gliomas difusos são classificados quanto ao estado mutacional dos genes Isocitrato desidrogenase 1 (*IDH1*) e Isocitrato desidrogenase 2 (*IDH2*). A expressão do regulador transcricional nuclear *ATRX* é determinada por imuno-histoquímica. O teste para a codeleção de 1p/19q é realizado em pacientes com tumores *IDH* mutantes com expressão de *ATRX* no núcleo, a fim de refinar ainda mais a classificação desses tumores. Os gliomas *IDH* tipo selvagem localizados em estruturas da linha média (tálamo, tronco encefálico ou medula espinal) devem ser testados para mutações na histona-H3-K27M. As linhas tracejadas indicam subgrupos menores de tumores com os respectivos diagnósticos. * A expressão de *ATRX* nuclear é retida na maioria dos tumores astrocíticos *IDH* tipo selvagem de graus II ou III.

Tabela 3 | Classificação dos gliomas da OMS de 2016 (Adaptado de Louis *et al.*, 2016 e Reifenberger *et al.*, 2016).

CLASSIFICAÇÃO TUMORAL	GRAU OMS
TUMORES ASTROCÍTICOS DIFUSOS E OLIGODENDROGLIAIS	
Astrocitoma difuso, IDH mutante	II
▪ Astrocitoma Gemistocítico, IDH mutante	
Astrocitoma difuso, IDH tipo selvagem*	II
Astrocitoma difuso (NE)	II
Astrocitoma anaplásico, IDH mutante	III
Astrocitoma anaplásico, IDH tipo selvagem*	III
Astrocitoma anaplásico (NE)	III
Glioblastoma, IDH tipo selvagem	IV
▪ Glioblastoma de células gigantes	IV
▪ Gliosarcoma	IV
▪ Glioblastoma Epitelióide*	
Glioblastoma, IDH mutante	IV

Glioblastoma (NE)	IV
Glioma difuso da linha média, H3-K27M mutante	IV
Oligodendroglioma, IDH mutante e 1p/19q codeletado	II
Oligodendroglioma (NE)	II
Oligodendroglioma anaplásico, IDH mutante e 1p/19q codeletado	III
Oligodendroglioma anaplásico (NE)	III
Oligoastrocitoma (NE) [‡]	II
Oligoastrocitoma anaplásico (NE) [‡]	III
OUTROS TUMORES ASTROCÍTICOS	
Astrocitoma pilocítico	I
▪ Astrocitoma pilomixóide [§]	
Astrocitoma subependimário de células gigantes	I
Xantoastrocitoma pleomórfico	II
Xantoastrocitoma pleomórfico anaplásico	III
TUMORES EPENDIMAIS	
Subependimoma	I
Ependimoma mixopapilar	I
Ependimoma	II
▪ Ependimoma de células claras	
▪ Ependimoma papilar	
▪ Ependimoma tanicítico	
Ependimoma, fusão RELN- positiva	II ou III
Ependimoma anaplásico	III
OUTROS GLIOMAS	
Glioma cordóide do terceiro ventrículo	II
Glioma angiocêntrico	I
Astroblastoma	-

NE (Não especificada): categoria reservada para tumores os quais não foram molecularmente testados ou que os resultados dos testes permanecem inconclusivos; **H3-K27M:** Histona H3 mutada em K27M; * Entidades tumorais provisórias ou variantes; [§] O astrocitoma pilomixóide não possui uma classificação definitiva da OMS. [‡] O diagnóstico de “oligoastrocitoma (NE)” ou “oligoastrocitoma anaplásico (NE)” não é incentivado na classificação dos gliomas da OMS de 2016. Os gliomas oligoastrocíticos (mistos) devem ser atribuídos a uma entidade tumoral astrocítica ou oligodendroglioma por meio de testes moleculares apropriados para mutações em *IDH1/2* e codeleção 1p/19q.

Em adultos, a maioria dos gliomas difusos está associada a um mau prognóstico e muitas vezes possuem alterações genéticas que são detectadas em pacientes com GBM *IDH*-selvagem, indicando que esses casos podem refletir uma subestimação do grau de malignidade baseado na histologia (Wiestler *et al.*, 2014; Reuss *et al.*, 2015). Contudo, é

importante salientar que um subconjunto de astrocitomas difusos *IDH* selvagem partilham semelhanças moleculares com o astrocitoma pilocítico (Grau I da OMS) e/ou outros gliomas pediátricos de baixo grau, e estes estão associados com resultados de sobrevivência favoráveis (Ceccarelli *et al.*, 2016).

Assim, em pacientes com a neoplasia inicialmente classificada como astrocitoma difuso *IDH*-selvagem ou anaplásico, testes moleculares adicionais para alterações genéticas associadas tanto com GBM *IDH*-selvagem (por exemplo, mutações na região promotora de *TERT*, amplificação de *EGFR*, perda do cromossomo 10 e ganho do cromossomo 7), ou com astrocitoma pilocítico (fusão *KIAA11549-BRAF*), podem fornecer informações úteis para o diagnóstico (Masui *et al.*, 2016) (Tabela 2).

4.1.1. Gliomas astrocíticos *IDH* mutantes

Astrocitoma difuso *IDH* Mutante (Grau II da OMS)

São astrocitomas difusamente infiltrantes com mutações nos genes *IDH1* e/ou *IDH2*. Esses tumores apresentam células moderadamente pleomórficas e são caracterizados por um alto grau de diferenciação celular e crescimento lento (Figura 4). O diagnóstico é respaldado pela presença de mutações em *ATRX* e *TP53* (Louis, Perry, *et al.*, 2016).

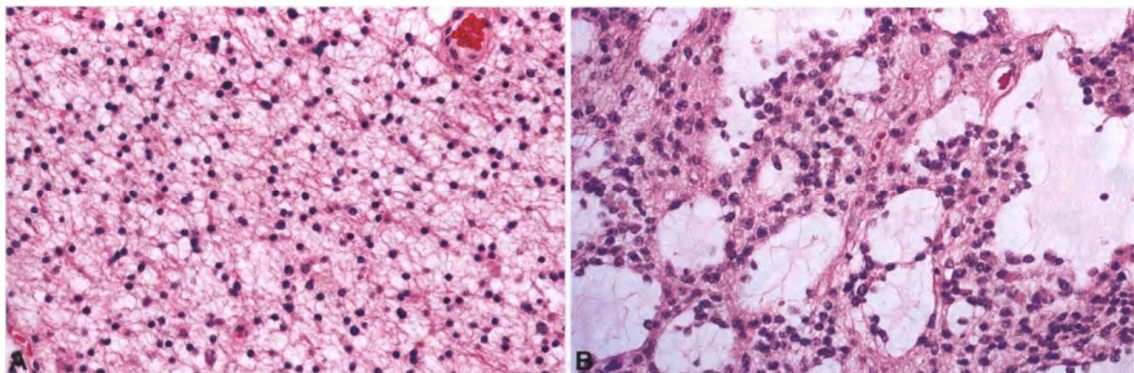


Figura 4 | Astrocitoma difuso. **A:** Células astrocíticas fibrilares neoplásicas uniformes. **B:** Formação de microcistos de forma extensiva (Adaptada de Louis *et al.*, 2016).

Os astrocitoma difusos *IDH* mutantes afetam mais comumente adultos (média de 30 anos) e ocorre em todo o SNC, sendo preferencialmente localizado nos lobos frontais. Além disso, esses tumores têm a capacidade intrínseca de progredirem para o astrocitoma anaplásico *IDH* mutante (OMS grau III) e eventualmente para glioblastoma *IDH* mutante (OMS grau IV) (Louis, Perry, *et al.*, 2016).

Astrocitoma gemistocítico *IDH* mutante (Grau II da OMS)

O astrocitoma gemistocítico *IDH* mutante é uma variante do astrocitoma difuso *IDH* mutante, caracterizado pela presença de astrócitos neoplásicos gemistocíticos (gemistócitos) (Figura 5). Apesar desses tumores surgirem em qualquer local do SNC, eles desenvolvem-se mais comumente nos lobos frontal e temporal (Louis *et al.*, 2016).

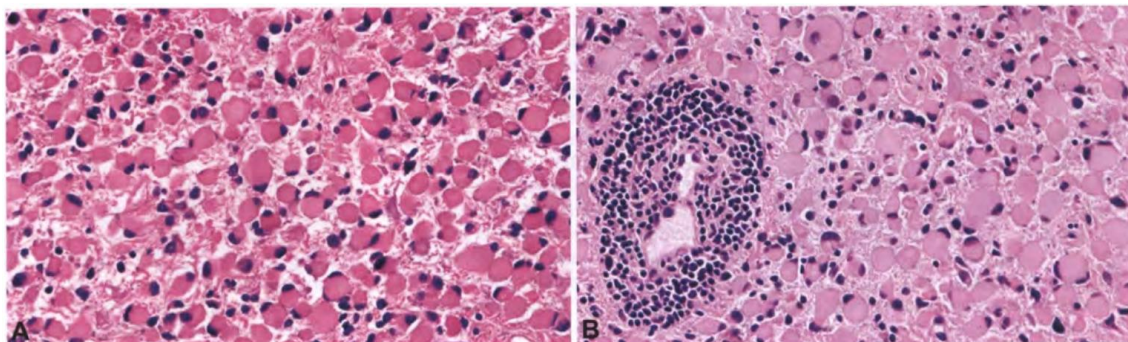


Figura 5 | A: Astrocitoma Gemistocítico. As células tumorais apresentam citoplasma eosinofílico, com núcleos deslocados para a periferia. **B:** Infiltrado linfocitário perivascular (Adaptada de Louis *et al.*, 2016).

Os astrocitomas gemistocíticos representam aproximadamente 10% de todos os astrocitomas difusos de grau II da OMS. A idade média de pacientes diagnosticados com esses tumores é de 40 anos, afetando mais homens do que mulheres (razão de 2:1). Geneticamente, esses tumores possuem uma alta frequência de mutações no gene *TP53* (presentes em mais de 80% dos casos) (Louis *et al.*, 2016).

Astrocitoma anaplásico *IDH* mutante (Grau III da OMS)

São astrocitomas de infiltração difusa com anaplasia focal ou dispersa, apresentando uma atividade proliferativa significativa e mutações nos genes *IDH1* ou *IDH2* (Louis *et al.*, 2016). Os astrocitomas anaplásicos surgem em qualquer região do SNC, mas ocorrem com frequência no lobo frontal cerebral (Louis *et al.*, 2016) (Figura 6).

Embora o astrocitoma anaplásico *IDH* mutante seja classificado pela OMS como grau III baseado nas características histológicas, ainda são necessários mais estudos para a distinção precisa entre o astrocitoma difuso *IDH* mutante (Grau II da OMS) e o astrocitoma anaplásico *IDH* mutante (Figura 6) (Louis *et al.*, 2016).

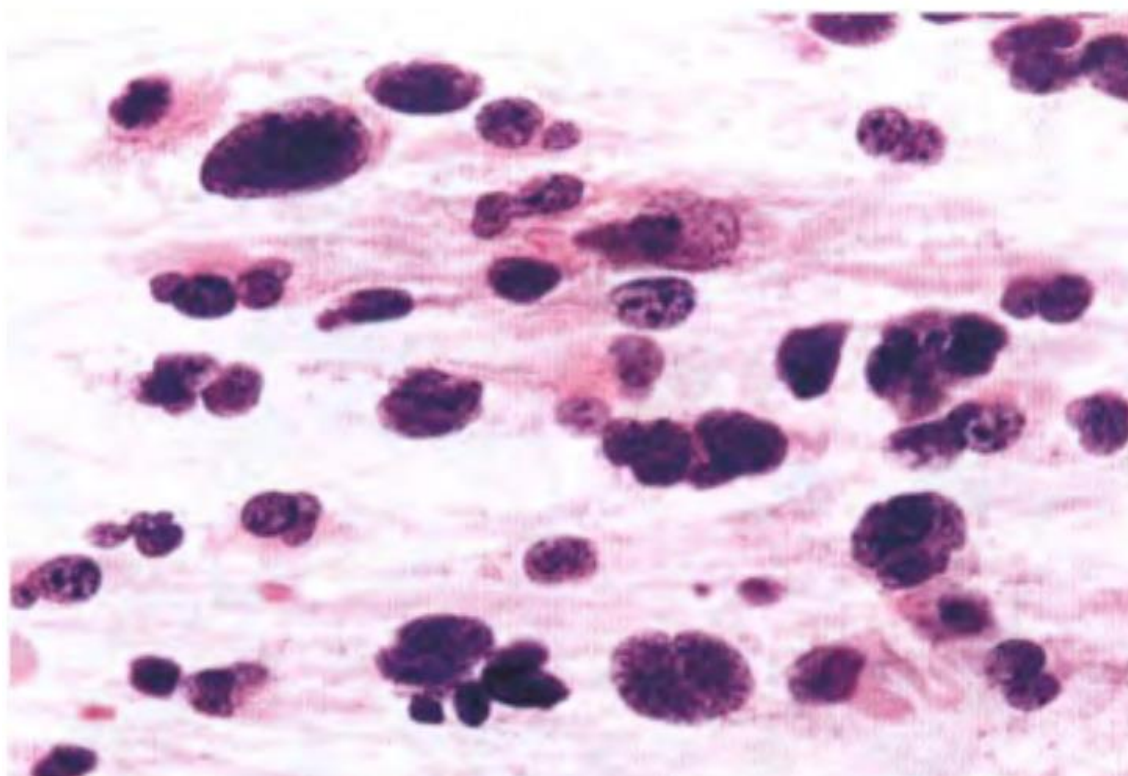


Figura 6 | Astrocitoma anaplásico com vários graus de atipias nucleares (Adaptada de Louis *et al.*, 2016).

Os astrocitomas anaplásicos *IDH* mutantes surgem a partir de astrocitomas difusos de baixo grau, além de possuírem uma tendência intrínseca à progressão maligna para o glioblastoma *IDH* mutante (Grau IV da OMS) (Louis *et al.*, 2016).

O pico de incidência do astrocitoma anaplásico *IDH* mutante ocorre em média aos 38 anos de idade. No entanto, até a descoberta da mutação no *IDH* como marcador molecular, o diagnóstico do astrocitoma anaplásico baseava-se apenas em evidências histológicas. Dados do hospital da Universidade de Zurique, na era pré-*IDH*, mostraram que a média de diagnóstico era de aproximadamente 45 anos, com uma relação homem-mulher de 1,6: 1 (Louis *et al.*, 2016).

As características moleculares do astrocitoma anaplásico assemelham-se em grande parte as do astrocitoma difuso do *IDH* mutante (Grau II da OMS). Mutações em *IDH1* ou *IDH2* estão presentes em todos os tumores, e alterações em *TP53* e *ATRX* são encontradas na maioria dos tumores (Balss *et al.*, 2008). Além disso, o astrocitoma anaplásico possui uma alta frequência de perdas 9p e 19q (Killela *et al.*, 2014; Cancer Genome Atlas Research *et al.*, 2015).

4.1.2. Oligodendrogliomas *IDH* mutantes

Oligodendroglioma *IDH* mutante com a codeleção 1p/19q (Grau II da OMS)

Os oligodendrogliomas são gliomas com crescimento lento e infiltração difusa, apresentando mutações em *IDH1* ou *IDH2* e a codeleção dos braços cromossômicos 1p e 19q (Louis, Perry, *et al.*, 2016).

Histologicamente, esses tumores são compostos por células que morfologicamente assemelham-se a oligodendrócitos, com núcleos arredondados isomórficos. Além disso, é comum haver microcalcificações e uma rede de capilares ramificados (Louis, Perry, *et al.*, 2016) (Figura 7).

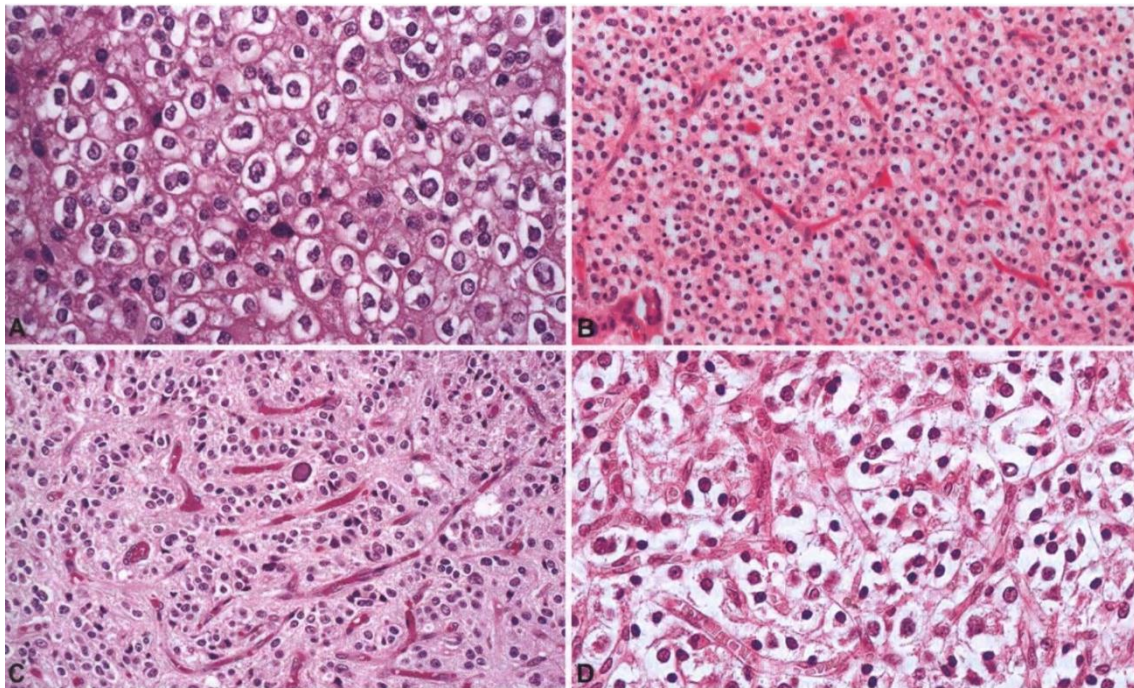


Figura 7 | Oligodendroglioma *IDH* mutante com a codeleção 1p/19q. **A:** Padrão típico de “favo de mel” ou “ovo frito” dos oligodendrogliomas: as células tumorais apresentam um claro halo perinuclear e uma membrana plasmática nitidamente delineada. **B:** Clareamento perinuclear. **C:** Rede de capilares ramificados. É possível observar a atipia nuclear moderada e a microcalcificação ocasional. **D:** Rede visível de capilares ramificados (Adaptada de Louis *et al.*, 2016).

A grande maioria dos oligodendrogliomas *IDH1/2* mutantes com a codeleção 1p/19q surgem adultos, com um pico de incidência entre 35-44 anos, localizando-se preferencialmente nos hemisférios cerebrais (mais frequentemente no lobo frontal). Os oligodendrogliomas são raros em crianças, representando apenas 0,8% em pacientes com

idades menores que 15 anos e 1,8% em pacientes com 15-19 anos. No geral, os homens são mais afetados do que as mulheres, em uma proporção 1,3: 1. Nos EUA, o oligodendroglioma é mais comum em brancos do que em negros, com uma taxa de incidência de 2,5: 1 (Louis *et al.*, 2016).

Citogeneticamente, os oligodendrogliomas possuem uma translocação não balanceada entre os cromossomos 1 e 19, a qual resulta na perda do cromossomo der (1;19) (p10; q10), causando deleções do braço inteiro de 1p e 19q, e a retenção do cromossomo del [t({1;19)(q10;p10)] (Griffin *et al.*, 2006; Jenkins *et al.*, 2006).

A grande maioria das mutações (> 90%) que afetam o gene *IDH1* nos oligodendrogliomas (Grau II) é a R132H, a qual é detectável por imuno-histoquímica (Capper *et al.*, 2009). Em <10% dos casos, podem ocorrer mutações no códon 132 do gene *IDH1* ou mutações no códon 172 do gene *IDH2*, com a proporção de mutações em *IDH2* sendo maior em gliomas oligodendrogliais do que em gliomas astrocíticos (Hartmann *et al.*, 2009) (Tabela 2).

Ao contrário dos astrocitomas difusos *IDH* mutantes (Grau II), os oligodendrogliomas *IDH* mutantes com a codeleção 1p/19q não possuem mutações no *ATRX*. Entretanto, em 95% dos casos, os oligodendrogliomas possuem mutações ativadoras na região promotora do gene *TERT*, que consequentemente aumentam a expressão gênica. De fato, a mutação da região promotora no *TERT* está fortemente associada à codeleção 1p/19q em gliomas *IDH* mutantes e é um evento precoce no desenvolvimento dos oligodendrogliomas (Louis, Perry, *et al.*, 2016; Reifenberger *et al.*, 2016) (Tabela 2).

Mais de dois terços dos tumores oligodendrogliais possuem mutações no gene *CIC* e um número muito pequeno podem possuir mutações no gene *FUBP1*, *NOTCH1*, *SETD2* e *PIK3CA* (Tabela 2) (Reifenberger *et al.*, 2016).

Outros genes presentes em 1p (*CAMTA1*, *CHD5*, *CITED4*, *DFFB*, *DIRAS3*, *PRDX1*, *ATRX*, *AJAP1* e *TP73*) e em 19q (*EMP3*, *ARHGAP35*, *PEG3* e *ZNF296*) possuem um padrão anormal de metilação e/ou uma expressão reduzida em oligodendrogliomas *IDH* mutantes com a codeleção 1p/19q (Riemenschneider e Reifenberger, 2009; Reifenberger *et al.*, 2016).

Oligodendroglioma anaplásico *IDH* mutante com a codeleção 1p/19q (Grau III da OMS)

Os oligodendrogliomas anaplásicos *IDH* mutantes com a codeleção 1p/19q possuem características histológicas focais ou difusas de anaplasia, além da proliferação microvascular patológica e/ou alta atividade mitótica (Figura 8) (Louis, Perry, *et al.*, 2016).

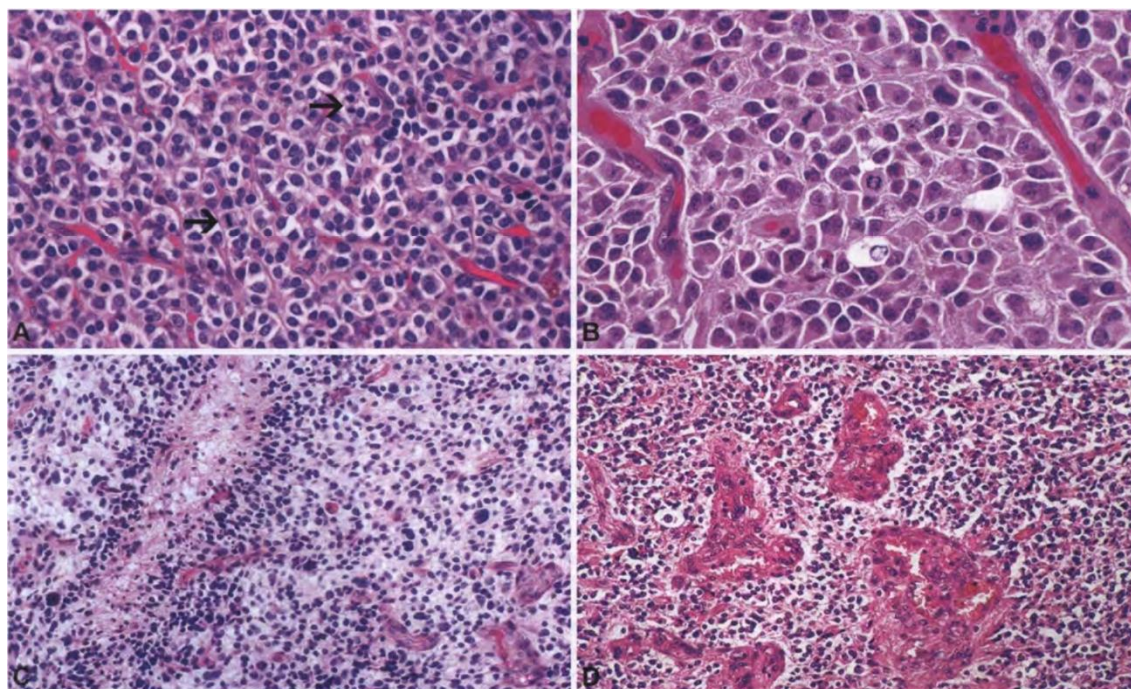


Figura 8 | Oligodendroglioma anaplásico. **A:** Aglomerados celulares em "favo-de-mel" com atividade mitótica (setas). **B:** Atipia nuclear marcada e alta atividade mitótica. **C:** Necrose focal com células tumorais em paliçada. **D:** Proliferação microvascular (Adaptada de Louis *et al.*, 2016).

De acordo com a CBTRUS, o oligodendroglioma anaplásico (definido apenas pela histologia) tem uma taxa de incidência anual estimada de 0,11 casos a cada 100.000 habitantes, representando 0,5% de todos os tumores cerebrais primários. Aproximadamente um terço de todos os tumores oligodendrogliais são oligodendrogliomas anaplásicos (Ostrom *et al.*, 2014; Ostrom *et al.*, 2015; Louis, Perry, *et al.*, 2016).

A maioria dos oligodendrogliomas anaplásicos *IDH* mutantes com a codeleção 1p/19q manifestam-se preferencialmente em pacientes adultos, com uma média de idade de 49 anos. Além disso, esses tumores são predominantes em homens, com uma proporção de 1,2:1. Nos EUA, os oligodendrogliomas anaplásicos são mais comuns em

brancos do que em negros, com uma razão de incidência de 2,4: 1 (Ostrom *et al.*, 2014; Ostrom *et al.*, 2015; Louis, Ohgaki, *et al.*, 2016; Louis, Perry, *et al.*, 2016).

As alterações citogenéticas característica desses tumores são as deleções dos braços inteiros de 1p e 19q que consequentemente resulta em um prognóstico menos favorável. Entretanto, é possível encontrar outras alterações menos frequentes, tais como ganhos do 7, 8q, 11q, 15q e 20 assim como perdas dos cromossomos 4q, 6, 9p, 10q, 11, 13q, 18 e 22q (Koschny *et al.*, 2006; Trost *et al.*, 2007; Idbaih *et al.*, 2012).

É também comum encontrar mutações nos genes *TERT*, *CIC*, *FUBP1*, *NOTCH1*, *SETD2*, *PIK3CA* e *TCF12*. Os loci *CDKN2A* e *CDKN2B* em 9p21 estão alterados em um subconjunto de oligodendrogliomas anaplásicos devido a deleção homozigótica, mutação ou metilação anormal da região promotora (Wolter *et al.*, 2001; Fallon *et al.*, 2004; Idbaih *et al.*, 2012). Em casos isolados, a deleção homozigótica ou mutação do gene *CDKN2C* em 1p32 foi observada em tumores sem deleções no gene *CDKN2A* (Pohl *et al.*, 1999). Perdas do 10q, mutações no *PTEN* e amplificações de proto-oncogenes não são frequentes nesses tumores (Sasaki *et al.*, 2001; Fallon *et al.*, 2004; Idbaih *et al.*, 2008).

Epigeneticamente, esses tumores são caracterizados por serem G-CIMP tipo A (Suzuki *et al.*, 2015) e frequentemente demonstram um perfil de expressão semelhante ao glioblastoma próneural. Além disso, a região promotora do *MGMT* é normalmente hipermetilada (Mollemann *et al.*, 2005).

4.1.3. Glioblastomas (Grau IV da OMS)

Glioblastoma *IDH* selvagem

São gliomas de alto grau com diferenciação astrocitária, apresentando atipias nucleares, pleomorfismo celular (na maioria casos), alta atividade mitótica e um padrão de crescimento tipicamente difuso, além da proliferação microvascular e/ou necrose (Figura 9).

Esses tumores podem surgir em indivíduos de qualquer idade, mas ocorrem predominantemente em pacientes com idade maior que 50 anos. Esses tumores manifestam-se tipicamente como GBM primários, que são GBMs que apresentam uma história clínica curta geralmente menor que 3 meses antes do diagnóstico e sem a detecção de um glioma pré-existente de grau inferior (Louis, Perry, *et al.*, 2016; Reifenberger *et al.*, 2016).

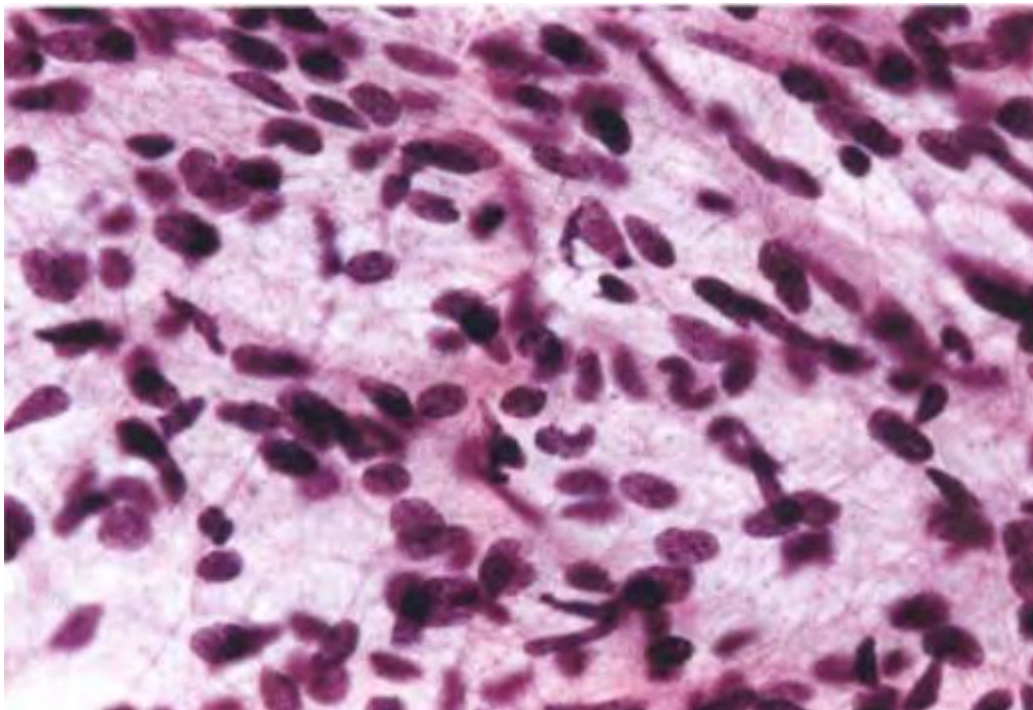


Figura 9 | Glioblastoma *IDH* selvagem. Presença de pequenas células bipolares alongadas (Adaptada de Louis *et al.*, 2016).

Os GBMs que se desenvolvem *de novo* em localizações não-linfóides em pacientes com 55 anos ou mais, podem ser diagnosticados como GBM *IDH* selvagem quando *IDH1*-R132H não é detectado por imuno-histoquímica. Em pacientes com idades menores que 55 anos e pacientes com evidências clínicas de um glioma pré-existente de baixo grau, é necessário realizar o sequenciamento do DNA para saber se existem mutações em *IDH*, para que o diagnóstico não seja erroneamente aplicado como GBM *IDH* mutante (Louis, Perry, *et al.*, 2016; Reifenberger *et al.*, 2016).

Os GBMs *IDH* selvagem em adultos são caracterizados por ganho frequente do cromossomo 7 e perda dos cromossomos 9, 10 e 13. O ganho do cromossomo 7p em combinação com a perda de 10q é a alteração genética mais frequente nesses tumores. A mutação ou deleção homozigótica de *PTEN*, deleção homozigótica de *CDKN2A* e *CDKN2B* e mutações na região promotora do *TERT* são bastante comuns (Aldape *et al.*, 2015) (Tabela 2). Outras alterações menos comuns incluem mutações em *TP53*, *PIK3CA*, *PIK3R1* e *NF1* (Brennan *et al.*, 2013).

As amplificações gênicas também são comumente detectadas em GBMs *IDH* tipo selvagem e envolvem os genes *EGFR*, *PDGFRA*, *MET*, *CDK4* e *CDK6*, os quais medeiam a transição de G1 para fase S do ciclo celular, e *MDM2* e *MDM4*, que codificam proteínas que inibem a atividade de P53 (Aldape *et al.*, 2015) (Tabela 2). A amplificação

de *EGFR* é detectável em cerca de 40% dos GBMs *IDH* tipo selvagem, e metade desses tumores, também possuem um rearranjo genético que resulta na deleção dos éxons 2 e 7 de *EGFR* (Aldape *et al.*, 2015; Weller, Wick, *et al.*, 2015), e esta aberração, leva a expressão da variante III de (EGFRvIII) (Aldape *et al.*, 2015).

A mutação *V600E* no gene *BRAF* codifica uma proteína mutante alvo de muitas drogas, e é detectável em aproximadamente 50% dos GBMs epitelióides (Kleinschmidt-Demasters *et al.*, 2013), uma variante provisória recentemente descrita de GBM *IDH* tipo selvagem. O GBM de células gigantes e o gliossarcoma são outras variantes histológicas do GBM *IDH* tipo selvagem (Louis, Perry, *et al.*, 2016; Reifenberger *et al.*, 2016) (Tabela 3).

Glioblastoma *IDH* mutante

São gliomas de alto grau com diferenciação predominantemente astrocitária, apresentando atipia nuclear, pleomorfismo celular (na maioria dos casos), alta atividade mitótica e um padrão de crescimento difuso, bem como proliferação microvascular e/ou necrose e mutação no gene *IDH1* ou no gene *IDH2* (Louis, Perry, *et al.*, 2016).

Os GBMs *IDH* mutantes representam menos que 10% de todos os GBMs, afetando principalmente adultos (média de 45 anos) (Louis, Perry, *et al.*, 2016; Reifenberger *et al.*, 2016). Estes tumores incluem quase todos os GBMs secundários que se desenvolvem através da progressão de gliomas pré-existentes de graus inferiores. Consequentemente, o perfil molecular desta classe de gliomas é semelhante ao dos astrocitomas *IDH* mutantes, incluindo mutações frequentes em *TP53* e *ATRX*, e são G-CIMP positivos (Aldape *et al.*, 2015) (Tabela 2).

O prognóstico dos pacientes com GBM *IDH* mutante é, no entanto, melhor, com uma maior probabilidade de sobrevida do que os pacientes com GBM *IDH* tipo selvagem, devido a maior frequência de metilação da região promotora do *MGMT* e o diagnóstico ocorrer em pacientes mais jovens. Contudo, outros fatores ainda não foram identificados (Aldape *et al.*, 2015; Weller, Wick, *et al.*, 2015; Reifenberger *et al.*, 2016)

Todas as mutações do gene *IDH1* nesses tumores estão localizadas na primeira ou segunda base do códon 132. A mutação mais frequente é R132H (CGT→CAT), encontrada em 83-91% dos gliomas astrocíticos e oligodendrogliais. Entretanto, é possível encontrar outras mutações raras, como a R132C (CGT→TGT), encontrada em 3,6-4,6% dos casos), R132G (em 0,6-3,8%), R132S (em 0,8-2,5%) e R132L (em 0,5-

4,4%). Mutações no gene *IDH2* são raras em GBMs *IDH* mutantes, e quando ocorrem, afetam o códon 172, sendo a mutação R172K a mais frequente (Tabela 2) (Louis, Perry, *et al.*, 2016). Epigeneticamente, esses tumores possuem vários *locis* com as ilhas CpGs metiladas (Noushmehr *et al.*, 2010).

Subgrupos moleculares de glioblastomas adultos

Dados recentes de transcriptoma evidenciaram quatro subtipos distintos de GBM: proneural, neural, clássico e mesenquimal (Verhaak *et al.*, 2010). A utilidade clínica da estratificação dos pacientes de acordo com estas assinaturas de expressão gênica ainda é limitada, uma vez que podem ser heterogêneas dentro de um dado tumor e podem mudar em resposta a estímulos externos, incluindo a terapia (Bhat *et al.*, 2013; Patel *et al.*, 2014). No entanto, a assinatura de expressão do tipo mesenquimal tem sido associada à radioresistência e a uma sobrevivência desfavorável (Bhat *et al.*, 2013), enquanto a assinatura do tipo proneural tem sido associada como benéfica no tratamento antiangiogênico em pacientes com GBM *IDH* selvagem (Sandmann *et al.*, 2015).

Os perfis de metilação do DNA podem ser usados para distinguir robustamente subgrupos de GBMs associados com padrões epigenéticos específicos e perfis de expressão gênica (Sturm *et al.*, 2012; Brennan *et al.*, 2013). Quatro subgrupos principais de GBMs adultos foram identificados, incluindo *IDH* mutante, G-CIMP-positivo, promotor metilado do *MGMT* com perfil de expressão gênica do subtipo proneural, e três subgrupos de GBM com *IDH* tipo selvagem (Figura 4). Entre os subgrupos de GBM *IDH* tipo selvagem, os GBMs RTK I (receptor tirosina cinase I) ocorrem predominantemente em adolescentes e adultos jovens e são caracterizados pela amplificação de *PDGFRA* e um perfil de expressão gênica proneural. Os subtipos de GBM RTK II (receptor tirosina quinase II) e *IDH* tipo selvagem mesenquimal predominam em pacientes com mais de 50 anos de idade, e são distinguidos pelos perfis de metilação do DNA, assim como pelas poucas alterações no número de cópias (Sturm *et al.*, 2012; Reifenberger *et al.*, 2016) (Figura 10).

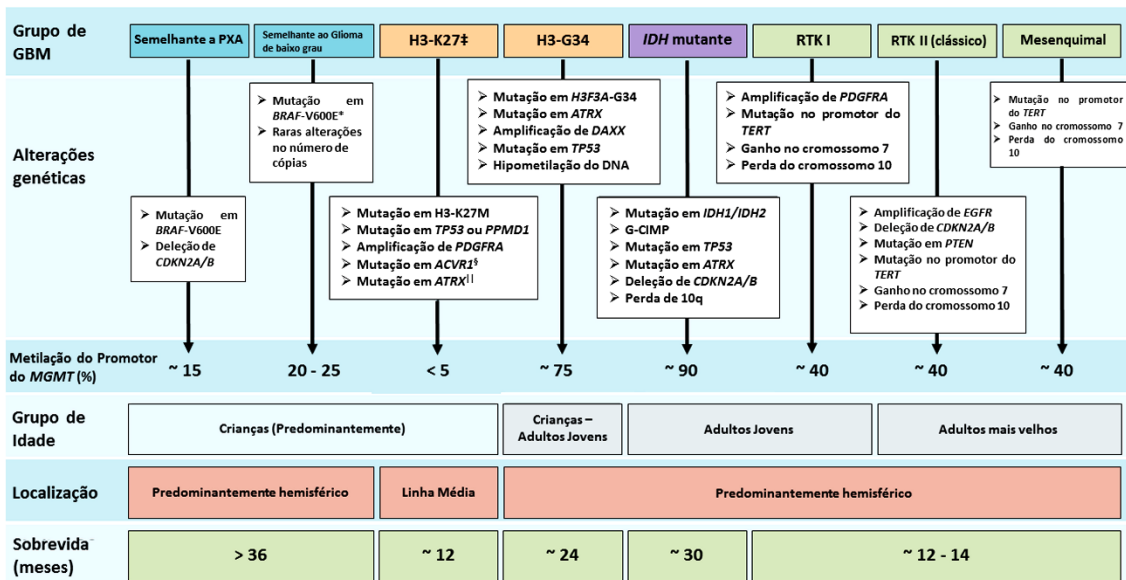


Figura 10 | Subgrupos moleculares de glioblastoma, definidos por perfis genéticos e epigenéticos distintos (Hanahan e Weinberg, 2011; Sturm *et al.*, 2012; Korshunov *et al.*, 2015) (Adaptado de Reifenberger *et al.* 2016). **Crianças:** <18 anos; **Adultos jovens:** 20-50 anos; **Adultos mais velhos:** > 50 anos.

4.1.4. Glioma difuso da linha média com mutação em H3-K27M (Grau IV da OMS)

São gliomas de alto grau infiltrativo que surgem na linha média do SNC, com diferenciação astrocítica, apresentando a mutação K27M em H3F3A ou HIST1H3B/C. Esses gliomas afetam predominantemente crianças (média de 5-11 anos), mas também pode acometer indivíduos adultos. Eles surgem comumente no tronco cerebral, tálamo e medula espinhal (Louis, Perry, *et al.*, 2016).

A alta atividade mitótica está presente na maioria dos casos, mas não é necessária para o diagnóstico. Além disso, a proliferação microvascular e a necrose podem ser observadas. As células tumorais infiltram-se difusamente em estruturas cerebrais adjacentes e distais (Figura 11). O prognóstico é ruim, apesar das terapias atuais, com uma taxa de sobrevida em 2 anos <10% (Louis, Perry, *et al.*, 2016).

Geneticamente, esses tumores possuem mutações heterozigóticas recorrentes na posição K27 nos genes codificadores de histonas *H3F3A*, *HIST1H3B* e *HIST1H3C* em tumores que surgem na ponte (em menos de 80% dos casos), tálamo (em menos de 50%) e medula espinhal (em menos de 60%). As mutações de K27M que afetam a histona H3.3

(codificadas por *H3F3A*) são cerca de três vezes mais prevalentes que a mesma mutação na variante da histona H3.1 (ocorrendo em *HIST1H3B* ou *HIST1H3C*).

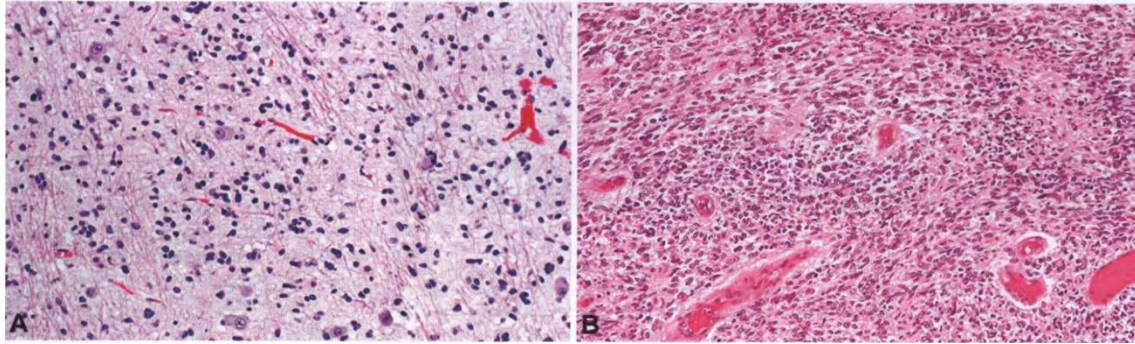


Figura 11 | Glioma difuso da linha média com mutação em H3-K27M. **A:** As células tumorais se infiltram e capturam elementos cerebrais normais. **B:** Necrose focal (Adaptada de Louis *et al.*, 2016).

Outras mutações em vias canônicas estão presentes nesses tumores, tais como as que afetam os genes *PDGFRA*, *PIK3CA*, *PIK3R1* ou *PTEN* (ocorrem em menos de 50% dos casos), *TP53*, *PPM1D*, *CHEK2* ou *ATM* (ocorrendo em menos de 70% dos casos), e raramente nos genes *RB1* e *ACVR1* (Louis, Perry, *et al.*, 2016).

4.2. Gliomas oligoastrocíticos

São gliomas com crescimento lento e infiltração difusa compostos de uma mistura conspícua de dois tipos de células neoplásicas distintas que se assemelham morfológicamente a células tumorais com características oligodendrogliais ou astrocíticas (Figura 12).

Além disso, os oligoastrocitomas não possuem um perfil genético único que permita classificá-los como uma entidade, mas sim, possuem tanto genótipos de astrocitomas quanto de oligodendrogliomas (Figura 3; Tabela 3) (Cavenee *et al.*, 2016; Louis, Ohgaki, *et al.*, 2016; Louis, Perry, *et al.*, 2016). Consequentemente, a OMS 2016 desincentiva o diagnóstico de tumores como oligoastrocitomas ou glioma misto. Ao invés disso, os gliomas oligoastrocíticos (mistos) devem ser atribuídos a uma entidade tumoral astrocítica ou oligodendrogliar por meio de testes moleculares apropriados para mutações em *IDH1/2* e codeleção 1p/19q (Figura 3; Tabela 3) (Louis, Ohgaki, *et al.*, 2016).

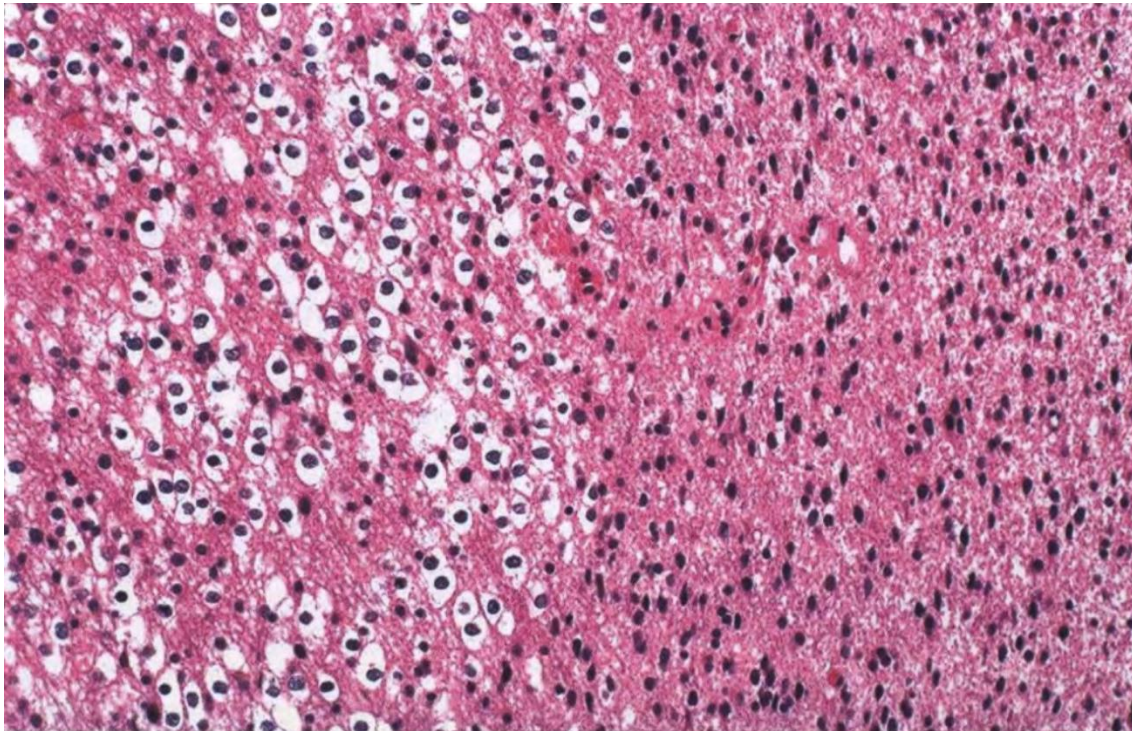


Figura 12 | Oligoastrocitoma. Áreas tumorais claramente separadas exibindo diferenciação oligodendroglial (esquerda) e astrocítica (direita) (Adaptada de Louis *et al.*, 2016).

Análises genéticas moleculares mostraram claramente que a grande maioria dos tumores previamente classificados como oligoastrocitomas tem um perfil genético típico de astrocitoma difuso (isto é, mutação no gene *IDH* combinada com mutação no gene *TP53* e mutação/perda da expressão de *ATRX* nuclear) ou de oligodendroglioma (mutação no gene *IDH* combinada com codeleção 1p/19q e mutação da região promotora de *TERT*) (Cavenee *et al.*, 2016; Louis, Ohgaki, *et al.*, 2016).

4.2.1. Oligoastrocitoma anaplásico (NE)

Os oligoastrocitomas anaplásicos (NE) possuem características histológicas focais ou difusas de anaplasia, incluindo celularidade aumentada, atipia nuclear, pleomorfismo e alta atividade mitótica (Louis *et al.*, 2016).

Análises moleculares demonstram que os oligoastrocitomas anaplásicos não possuem perfis genéticos ou epigenéticos únicos e específicos. Ao invés disso, a grande maioria possui alterações genéticas e perfis de metilação típicas de astrocitomas anaplásicos *IDH* mutantes ou de oligodendrogliomas anaplásicos *IDH* mutantes com a codeleção 1p/19q.

5. Genética molecular dos gliomas pediátricos

Os gliomas pediátricos compreendem em três grupos principais: gliomas de baixo grau, sendo constituído por tumores com padrão de crescimento circunscrito e que frequentemente possuem alterações no gene *BRAF*; tumores com padrões de crescimento difuso, os quais possuem alterações frequentes no gene *FGFR1*, ou rearranjo do *MYB*, ou dos genes *MYBL*; Gliomas de alto grau, que incluem os astrocitomas anaplásicos, glioma pontino intrínseco difuso, GBM e glioma difuso da linha média com mutação em H3-K27M (Reifenberger *et al.*, 2016).

5.1. Gliomas com crescimento circunscrito

5.1.1. Astrocitoma Pilocítico (AP) (Grau I da OMS)

São astrocitomas caracterizados por um padrão bifásico com proporções variáveis de células bipolares compactadas com fibras de Rosenthal e células multipolares de textura frouxa, com microcistos e ocasionalmente corpos granulares (Figura 13).

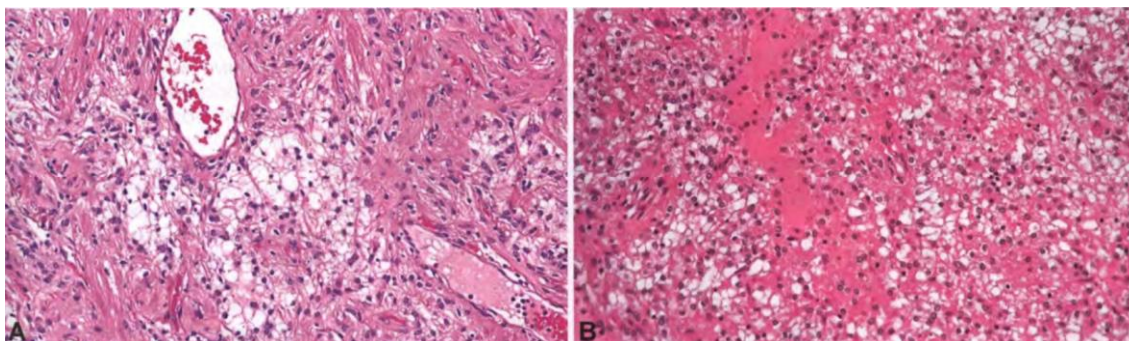


Figura 13 | Astrocitoma pilocítico. **A:** Padrão bifásico típico. **B:** Padrão pseudo-oligodendroglial. Células com núcleos arredondados e alterações microcísticas ocasionais (Adaptada de Louis *et al.*, 2016).

Esses tumores representam aproximadamente 5,1% de todos os gliomas (Karlsson *et al.*, 1997; Shore *et al.*, 2003), acometendo com maior frequência crianças e adolescentes do sexo masculino entre os 0 – 19 anos (Karlsson *et al.*, 1997; Sadetzki *et al.*, 2005). É, dentre os astrocitomas, o único considerado benigno, pois geralmente não são agressivos e mantém seu status de grau I por décadas, em contraste com os tumores astrocíticos difusos (graus II, III e IV). Raramente, alguns casos podem progredir para um grau de maior malignidade (Lindberg *et al.*, 1995; Yeh *et al.*, 2001).

O AP pode surgir em qualquer lugar do SNC, sendo mais frequentemente o cerebelo (42 %), compartimento supratentorial (36%), via ótica e hipotálamo (9 %), tronco cerebral (9 %) e medula espinhal (2 %) (Lindberg *et al.*, 1995; Karlsson *et al.*,

1997). Em crianças, a principal área cerebral afetada é o cerebelo (67% dos casos) e raramente há o desenvolvimento desse tumor no compartimento supratentorial. Já em adultos, não há uma diferença significativa de ocorrência entre o cerebelo e o compartimento supratentorial (33% cada) (Lindberg *et al.*, 1995; Karlsson *et al.*, 1997).

Geneticamente, o AP é caracterizado por alterações que resultam na ativação da sinalização MAPK (Jones *et al.*, 2013) e na fusão dos genes *BRAF* e *KIAA1549* no cromossomo 7q, particularmente nos tumores cerebelares (Hawkins *et al.*, 2011).

Os subgrupos dos APs possuem fusões envolvendo diferentes genes da via MAPK, como *RAF1*, *PTPN11* ou *NTRK2*, ou mutações em *BRAF*, *KRAS*, *FGFR1* ou *NF1* (Jones *et al.*, 2013). As mutações nos genes que não estão envolvidos com a via MAPK são geralmente ausentes, tornando o AP uma "doença de via única" (Jones *et al.*, 2013).

5.1.2. Astrocitoma pilomixóide (Grau II da OMS)

O astrocitoma pilomixóide é uma variante histológica rara do astrocitoma pilocítico, o qual é caracterizado por um arranjo angiocêntrico de células tumorais monomórficas bipolares em um fundo mixoide proeminente (Figura 14).

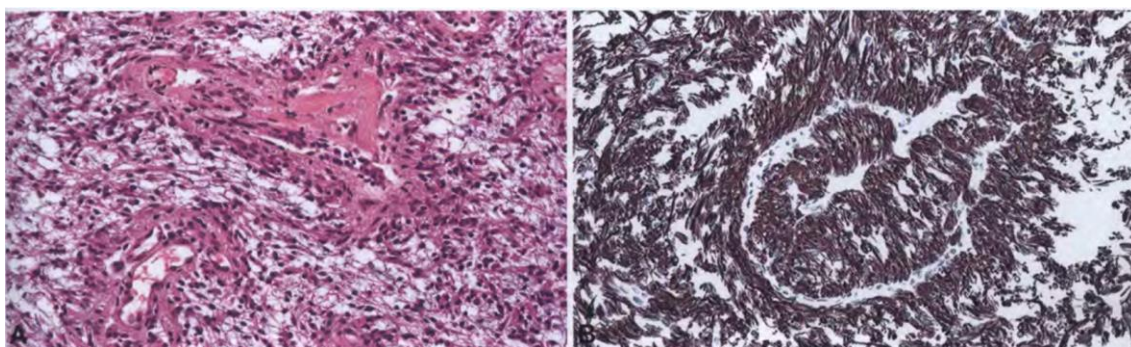


Figura 14 | Astrocitoma pilomixóide. **A:** População monomórfica de células pequenas, muitas vezes bipolares, com um fundo mixoide. **B:** Padrão de imunorreatividade difuso e forte para GFAP. (Adaptada de Louis *et al.*, 2016).

Esses tumores ocorrem comumente na região hipotalâmica-quiasmática, embora possam ocorrer no tálamo, cerebelo, tronco cerebral, lobo temporal e medula espinhal. O astrocitoma pilomixóide afeta predominantemente bebês e crianças pequenas (com uma idade média de 10 meses) (Louis, Perry, *et al.*, 2016).

A coloração imuno-histoquímica demonstra reatividade forte e difusa para GFAP, proteína S100 e vimentina. Alguns casos são positivos para sinaptofisina, mas a coloração para NFP ou cromogranina-A é negativa. A expressão de CD34 foi relatada em alguns casos na região hipotalâmica/quiasmática. A coloração é negativa para a mutação V600E do gene *BRAF* (Louis, Perry, *et al.*, 2016).

5.1.3. Xantoastrocitoma pleomórfico (PXA) (Grau II da OMS)

O PXA é um tumor raro que compreende aproximadamente 1% de todos tumores astrocíticos do SNC. Eles são comumente diagnosticados em crianças (<18 anos) e em adultos jovens (20-50 anos) e podem ocorrer ocasionalmente em pacientes portadores da neurofibromatose tipo 1 (NF1). Esses tumores são superficiais e ocorrem com maior frequência no lobo temporal, podendo apresentar cistos leptomeníngeos (Abid *et al.*, 2018).

Histologicamente, os PXAs são caracterizados por apresentar células tumorais astrocíticas grandes, pleomórficas e parcialmente multinucleadas, com citoplasma lipidizado (“xantomatoso”). PXAs expressam GFAP, o qual corrobora sua natureza astrocítica, além de expressar marcadores neuronais (sinaptofisina, neurofilamento, β -tubulina classe III, MAP2), bem como CD34 (Figura 15) (Abid *et al.*, 2018).

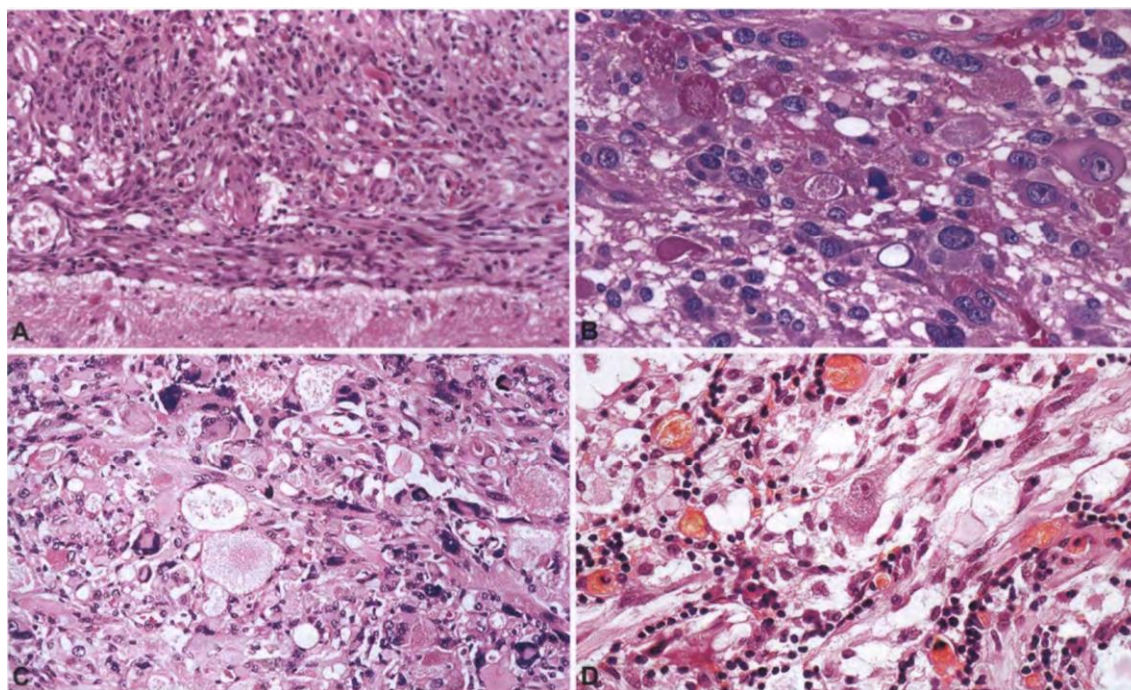


Figura 15 | Características histológicas do xantoastrocitoma pleomórfico. **A:** Xantoastrocitoma pleomórfico leptomeníngeo, delineado nitidamente a partir do córtex cerebral. **B:** Corpos granulosos, intensamente eosinofílicos ou pálidos. **C:** Células

tumorais mostrando o pleomorfismo nuclear e citoplasmático e alteração xantomatosa. **D: Células ganglionares maduras** (Adaptada de Louis *et al.*, 2016).

O comportamento biológico do PXA geralmente é benigno, com uma taxa de sobrevivência de 10 anos de 70% e um lapso sem recidiva de 61%. No entanto, PXA grau II pode torna-se maligno em até 15-20% dos casos (Abid *et al.*, 2018).

A perda no cromossomo 9 é a alteração genômica mais comum dos PXAs grau II, sendo detectável por CGH em 50% dos casos. Outras perdas afetam os cromossomos 17 (10%), 8, 18 e 22 (4% cada). Ganhos cromossômicos podem ser identificados nos cromossomos X (16%), 7, 9q, 20 (8% cada), 4, 5 e 19 (4% cada) (Weber, R. *et al.*, 2007; Riemenschneider e Reifenberger, 2009).

A OMS reconheceu em 2016 o PXA anaplásico (Grau III da OMS) como uma entidade distinta, definida pela presença de ≥ 5 mitoses por 10 campos de alta potência e/ou a presença de necrose. A taxa de recorrência desses tumores é muito maior e a sobrevida menor, quando comparado com os graus I e II (Abid *et al.*, 2018).

O PXA (incluindo todos os graus) possui uma alta taxa de mutação *V600E* no gene *BRAF*, a qual geralmente ocorre junto com a deleção homozigótica de *CDKN2A/B* (Weber, R. G. *et al.*, 2007; Schindler *et al.*, 2011; Koelsche *et al.*, 2014) (Tabela 2). As alterações genéticas presentes no PXA negativo para a mutação *V600E* no gene *BRAF* não estão bem caracterizadas (Vaubel *et al.*, 2018).

Outro fato a ser destacado é que as alterações genéticas que proporcionam a progressão do PXA (Grau II da OMS) para o PXA anaplásico (Grau III da OMS) são mal definidas, assim como a relação entre o PXA anaplásico e os GBMs epitelióides, os quais também possuem a mutação *V600E* no gene *BRAF* (Alexandrescu *et al.*, 2016).

5.1.4. Astrocitoma subependimário de células gigantes (SEGA) (Grau I da OMS)

São tumores benignos, de crescimento lento, composto de astrócitos ganglionares grandes, geralmente surgindo na parede dos ventrículos laterais (Louis *et al.*, 2016).

O SEGA é a neoplasia mais comum do SNC em pacientes com esclerose tuberosa (TSC). Contudo, é incerto se o mesmo possa afetar pacientes sem a TSC. A taxa de incidência de SEGA nos pacientes com TSC é de 5-15%. O SEGA manifesta-se

durante as duas primeiras décadas de vida e raramente surge de novo após os 20-25 anos (Louis, Perry, *et al.*, 2016).

Histologicamente, os SEGAs são circunscritos e muitas vezes calcificados. Eles são compostos principalmente de grandes células que se assemelham a astrócitos gemistocíticos e são organizadas em fascículos, folhas e ninhos (Figura 16) (Louis, Perry, *et al.*, 2016).

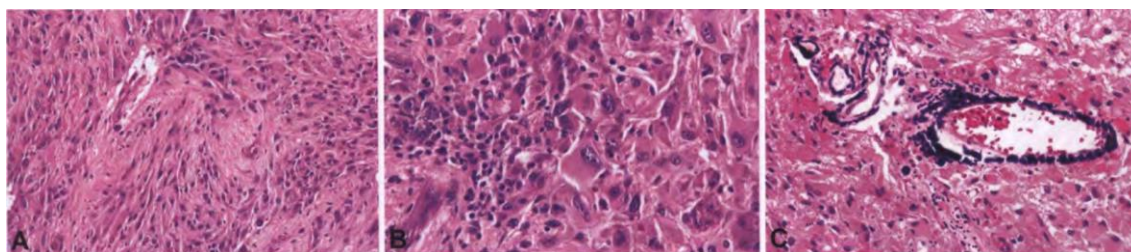


Figura 16 | Astrocitoma subependimário de células gigantes. **A:** Células alongadas dispostas dentro de fascículos extensos, misturadas com células grandes. **B:** Infiltração de células inflamatórias, incluindo linfócitos maduros e mastócitos. **C:** Calcificação multifocal dentro do tumor e/ou dos vasos sanguíneos (Adaptada de Louis *et al.*, 2016).

Geneticamente, os SEGAs apresentam mutações e perdas alélicas que conduzem à perda da expressão de *TSC1* ou *TSC2*, resultando na ativação da via mTOR (Tabela 2) (Alexandrescu *et al.*, 2016).

5.2. Gliomas difusos bem diferenciados

Ao contrário dos gliomas difusos em adultos, os gliomas difusos pediátricos geralmente não possuem mutações em *IDH* e alterações em 1p/19q (Zhang, J. *et al.*, 2013; Nauen *et al.*, 2016). Alguns subgrupos de gliomas difusos pediátricos possuem alterações no *FGFR1*, rearranjos dos genes *MYB* ou do *MYBL*, ou alterações no *BRAF* (Zhang, J. *et al.*, 2013; Qaddoumi *et al.*, 2016) (Tabela 2), mas não são considerados como entidades ou variantes distintas na classificação da OMS de 2016 (Louis, Perry, *et al.*, 2016; Reifenberger *et al.*, 2016). Estes tumores apresentam tipicamente um prognóstico favorável e a progressão maligna é incomum.

O glioma angiocêntrico, um glioma (Grau I da OMS) raro com crescimento infiltrativo em adultos jovens e crianças, é caracterizado por rearranjos de fusão *MYB-QKI*, que podem favorecer a tumorigênese por meio de três mecanismos diferentes: a ativação do *MYB* como resultado do truncamento, a translocação do *enhancer* levando a

uma expressão aberrante de *MYB-QKI* e a perda hemizigota do gene supressor tumoral *QKI* (Bandopadhyay, Ramkissoon, *et al.*, 2016).

6. Genética molecular dos tumores endodimais

Os endodimomas são tumores neuroepiteliais que podem surgir em qualquer compartimento do SNC. Histologicamente, a OMS classifica os endodimomas em grau I, II e III (Louis, Perry, *et al.*, 2016; Leeper *et al.*, 2017) (Tabela 3). O grau I inclui os subendodimomas e os endodimomas mixopapilares, ambos de crescimento lento e considerados como neoplasias benignas. Os tumores de grau II são designados como endodimoma, enquanto os tumores grau III são chamados endodimomas anaplásicos. Embora os tumores endodimais sejam capazes de se desenvolver em todas as faixas etárias, existem dois picos principais, em torno de 0-4 e 55-59 anos de idade (Wu *et al.*, 2016; Hubner *et al.*, 2018).

Existem diferenças claras quanto à localização predominante, opções de tratamento e desfechos clínicos entre os tumores que afetam pacientes adultos e pediátricos (Hubner *et al.*, 2018). Em adultos, a maioria das neoplasias endodimárias é diagnosticada na coluna vertebral (46%), enquanto a fossa posterior (35%) e supratentorial (19%) são menos frequentemente afetadas (Vera-Bolanos *et al.*, 2015).

Em geral, os endodimomas intracranianos são responsáveis por apenas 4% de todos os tumores cerebrais em adultos, resultando em uma taxa de incidência ajustada de 0,3/100.000 nos EUA (Hubner *et al.*, 2018). Em contraste, os endodimomas pediátricos são quase exclusivamente localizados intracranianamente (90%), com dois terços desses tumores ocorrendo na fossa posterior (Kilday *et al.*, 2009). Poucas síndromes de câncer familiar foram associadas com endodimoma. É sabido que a neurofibromatose tipo 2 (NF2) é responsável por um aumento na incidência de endodimomas na coluna vertebral (Kilday *et al.*, 2009).

6.1. Subendodimoma (Grau I da OMS)

Os subendodimomas são tumores raros, benignos e não invasivos, de origem endodimária, preferencialmente localizados no quarto ventrículo (aproximadamente 56-60% dos casos) ou nos ventrículos laterais (30-40% dos casos) (Ernestus e Schroder, 1993) e raramente podem ser diagnosticados na coluna vertebral (Hernandez-Duran *et al.*, 2014; Kammerer *et al.*, 2018). A incidência desses tumores é mais comum em homens

de meia idade e idosos (Hubner *et al.*, 2018; Kammerer *et al.*, 2018). O tratamento pode incluir observação, ressecção e raramente, radio ou quimioterapia (Fischer *et al.*, 2017).

As alterações genéticas dos subependimomas são amplamente desconhecidas e escassos. Uma recente análise do número de cópias somáticas de subependimomas localizados no quarto ventrículo de gêmeas monozigóticas mostrou ganho do cromossomo 9q e duplicações em vários loci (Noell *et al.*, 2014). Outras alterações número de cópias somáticas em subependimomas esporádicos foram descritas para os cromossomos 7, 8 e 14 (Mariano *et al.*, 2016). Até o momento, a única condição hereditária relacionada ao subependimoma tem sido associada a mutações no gene *PAX6* no cromossomo 11p13 (Osumi, 2001) e mutações no gene *TRPS1* associadas a síndrome tricorninofalangiana tipo 1 (STRF-1) (Fischer *et al.*, 2017).

Recentemente, Pajtler e Witt *et al.* (2015) identificaram 3 subtipos moleculares de subependimomas baseado no perfil de metilação. Cada subtipo ocupava um dos três compartimentos do SNC: supratentorial, fossa posterior e espinhal (Pajtler *et al.*, 2015). Esses subgrupos moleculares de subependimomas são predominantes em adultos e estão associados a um bom prognóstico. Os subgrupos que afetam os compartimentos supratentorial e a fossa posterior possuem genomas balanceados enquanto que os subependimomas que afetam a medula espinhal são caracterizados por possuírem a deleção 6q. Raros casos de subependimomas da fossa posterior também podem apresentar essa deleção (Leeper *et al.*, 2017).

6.2. Ependimoma mixopapilar (Grau I da OMS)

Os ependimomas mixopapilares são tumores que surgem a partir de células ependimárias da medula espinhal, especialmente da região do cone medular e cauda equina, representando de 10-20% de todos os tumores que afetam a coluna vertebral. Eles ocorrem mais comumente em adultos e a incidência anual é de 0,08 em homens e 0,05 em mulheres a cada 100.000 (Bandopadhyay, Silvera, *et al.*, 2016; Perry e Wesseling, 2016; Wu *et al.*, 2016; Leeper *et al.*, 2017).

Apesar de seu comportamento clínico benigno, os ependimomas mixopapilares são frequentemente aneuplóides ou tetraplóides e apresentam inúmeros desequilíbrios cromossômicos. Os desequilíbrios mais comuns são ganhos concomitantes dos cromossomos 9 e 18. Outras alterações recorrentes incluem ganhos dos cromossomos 3, 4, 5, 7, 8, 9, 11, 13, 16, 17q, 18, 20 e X, bem como perdas dos cromossomos 10 e 22 (Riemenschneider e Reifenberger, 2009; Rousseau *et al.*, 2010).

6.3. Ependimoma (Grau II da OMS)

Os ependimomas de grau II podem originar-se no compartimento supratentorial e na fossa posterior, bem como na medula espinhal ou adjacente à mesma. Os ependimomas da fossa posterior são mais frequentes em crianças, enquanto a maioria dos ependimomas medulares ocorre em adultos (Perry e Wesseling, 2016).

Segundo a nova classificação proposta pela OMS de 2016, os ependimomas de grau II são subdivididos em: Ependimoma de células claras, Ependimoma papilar e Ependimoma tanicítico (Louis, Perry, *et al.*, 2016) (Tabela 3).

As alterações citogenéticas mais comuns nos ependimomas de grau II são as perdas dos cromossomos 6q, 10, 13, 14 e 22q, bem como ganhos dos cromossomos 1q, 7, 9, 12q, 15q e 18 (Riemenschneider e Reifenberger, 2009). Estudos recentes usando CGH relataram padrões distintos de aberrações cromossômicas ligadas a certas características clínicas e patológicas, como a idade do paciente, localização tumoral e o subtipo histológico ou grau da OMS (Carter, M *et al.*, 2002; Dyer, Sara *et al.*, 2002; Jeuken *et al.*, 2002; Mendrzyk, Frank *et al.*, 2006). As perdas no 22q e ganhos do cromossomo 4 são mais comuns em tumores em adultos. Os ganhos no 1q correlaciona-se com a presença de alterações cromossômicas estruturais, idade pediátrica, histologia de alto grau e comportamento clínico agressivo (Carter, M *et al.*, 2002; Dyer, Sara *et al.*, 2002; Mendrzyk, Frank *et al.*, 2006).

6.4. Ependimoma anaplásico (Grau III da OMS)

Atualmente, o ependimoma anaplásico é caracterizado por possuir um aumento de celularidade, alta atividade mitótica, clara diferenciação ependimal com pseudorrosetas perivasculares, atipia celular, proliferação endotelial com atipia microvascular, além de necrose em pseudopaliçadas (Hubner *et al.*, 2018). Os ependimomas anaplásicos podem surgir em qualquer parte do SNC em qualquer idade (Leeper *et al.*, 2017).

As alterações moleculares observadas nos ependimomas anaplásicos são bastante semelhantes as observadas nos ependimomas de baixo grau (Graus I e II da OMS). Frequentemente esses tumores apresentam ganhos em 1p e perdas dos cromossomos 9, 13 e 10q (Hubner *et al.*, 2018).

7. Biomarcadores em gliomas

7.1. Biomarcadores moleculares que definem a entidade

A classificação da OMS de 2016 dos gliomas incorporou a mutação *IDH1/2*, a codeleção de 1p/19q, a mutação H3-K27M e a fusão *C11orf95-RELA* como biomarcadores para diagnóstico que definem entidades distintas de gliomas (Louis, Perry, *et al.*, 2016) (Tabela 2). Outros biomarcadores podem fornecer informações diagnósticas adicionais, incluindo a perda da expressão nuclear de ATRX, mutação na região promotora do *TERT*, mutação ou fusão do *BRAF* e a mutação H3-G34 (Louis, Perry, *et al.*, 2016; Masui *et al.*, 2016). Se os testes moleculares não puderem ser realizados ou se os resultados não forem conclusivos, o termo "NE" (não especificado) foi introduzido para indicar que o diagnóstico é baseado apenas na histologia, ou seja, a informação sobre o(s) biomarcador(es) relevante(s) não estava disponível para um diagnóstico integrado (Louis, Perry, *et al.*, 2016).

7.2. Biomarcadores moleculares preditivos

O número de biomarcadores de significância preditiva para orientar o tratamento pós-cirúrgico dos pacientes com gliomas está aumentando (Wick *et al.*, 2012). Entre estes, a presença da metilação da região promotora do *MGMT* é preditiva de benefício da quimioterapia com agentes alquilantes em pacientes com glioma *IDH* selvagem, particularmente em idosos (≥ 70 anos) (Malmstrom *et al.*, 2012; Wick *et al.*, 2012).

Dois ensaios clínicos de fase III de longo prazo em pacientes com glioma anaplásico mostraram que a codeleção 1p/19q é um marcador preditivo do benefício da radioterapia e quimioterapia inicial combinadas com procarbazina, lomustina (CCNU) e vincristina (PCV) (Cairncross *et al.*, 2013; Van Den Bent, Brandes, *et al.*, 2013). Outras alterações genéticas estão emergindo como potenciais biomarcadores preditivos de resposta à terapia dos gliomas (Masui *et al.*, 2016) (Tabela 4).

Tabela 4 | Biomarcadores moleculares preditivos relevantes para gliomas (Adaptado de Reifenger *et al.*, 2016).

Biomarcador	Aplicação	Referências
Biomarcadores preditivos de uso clínico		
Metilação do promotor de <i>MGMT</i>	Predição do benefício da quimioterapia com agentes alquilantes em pacientes com gliomas <i>IDH</i> tipo selvagem, em particular em pacientes idosos (≥ 70 anos) com GBM.	(Malmstrom <i>et al.</i> , 2012; Wick <i>et al.</i> , 2012)
Codeleção 1p/19q	Previsão do benefício da radioterapia inicial combinada com a PCV em oposição à radioterapia isolada em pacientes com glioma anaplásico.	(Cairncross <i>et al.</i> , 2013; Van Den Bent, Brandes, <i>et al.</i> , 2013)
Exemplos de biomarcadores preditivos emergentes		
Mutação do <i>BRAF</i>	Identificação de pacientes com gliomas <i>BRAF</i> -V600 mutantes elegíveis para a terapia com inibidor de <i>BRAF</i> .	(Chamberlain, 2013; Robinson <i>et al.</i> , 2014; Lee <i>et al.</i> , 2016; Preusser <i>et al.</i> , 2016)
Mutação do <i>IDH1/IDH2</i>	Identificação de pacientes com gliomas difusos <i>IDH</i> mutantes elegíveis para vacinação baseada em peptídeos ou inibidores de <i>IDH</i> mutantes.	(Rohle <i>et al.</i> , 2013; Schumacher <i>et al.</i> , 2014)
Expressão de EGFRvIII	Identificação de pacientes com glioblastomas EGFRvIII positivos elegíveis para a vacinação baseada em peptídeos de EGFRvIII.	(Sampson <i>et al.</i> , 2010; Schuster <i>et al.</i> , 2015)
Amplificação de <i>EGFR</i>	Identificação de pacientes com glioblastomas com <i>EGFR</i> amplificados elegíveis para tratamento com anticorpos anti- <i>EGFR</i> .	(Zahonero <i>et al.</i> , 2015; Phillips <i>et al.</i> , 2016)
Fusão <i>FGFR-TACC</i>	Identificação de pacientes com GBM <i>FGFR-TACC</i> positivos elegíveis para a terapia com inibidores de <i>FGFR</i> .	(Singh <i>et al.</i> , 2012; Di Stefano <i>et al.</i> , 2015)

EGFRvIII, variante III de EGFR; procarbazona, lomustina (CCNU) e vincristina (PCV)

7.3. Metilação da região promotora do gene *MGMT*

A temozolomida (TMZ) é um agente alquilante do DNA o qual é usado concomitante na radioquimioterapia e quimioterapia de manutenção do GBM (Stupp *et al.*, 2005). Um aduto de DNA induzido pela temozolomida, 6-O-metilguanina, é efetivamente reparado pela O(6)-Metilguanina-DNA Metiltransferase (*MGMT*), através da alquilação do próprio *MGMT*, seguida pela ubiquitinação e subsequente degradação proteossomal desta enzima (Wick *et al.*, 2014). Deste modo, os níveis de expressão de

MGMT correspondem à capacidade de reparo de 6-O-metilguanina celular e as células tumorais com expressão de *MGMT* baixa ou ausente, tornam-se mais sensíveis à temozolomida (Wick *et al.*, 2014).

Aproximadamente 40% dos GBMs *IDH* tipo selvagem têm hipermetilação de uma ilha CpG 5' associada a *MGMT*, o que resulta na repressão transcricional e na redução na expressão do gene (Wick *et al.*, 2014). Essa mudança epigenética é conhecida como metilação da região promotora do *MGMT*, a qual tem sido estreitamente ligada ao benefício na terapia com temozolomida e prolonga a sobrevida dos pacientes com GBM (Hegi *et al.*, 2005; Gilbert *et al.*, 2013). Além disso, os ensaios clínicos de fase III em pacientes com idade > 65 anos com GBM evidenciaram que a metilação da região promotora do *MGMT* é um biomarcador altamente relevante para orientar as decisões de tratamento entre o uso de radioterapia ou a quimioterapia com TMZ (Malmstrom *et al.*, 2012; Wick *et al.*, 2012). No entanto, o papel preditivo da metilação da região promotora do *MGMT* para uma resposta à TMZ pode ser restringido àqueles com gliomas *IDH* tipo selvagem. A metilação da região promotora do *MGMT* está presente na maioria dos gliomas *IDH* mutantes e G-CIMP positivos, e prediz um prognóstico favorável nestes tumores, mas não está associada a um benefício diferencial em resposta à TMZ ou radioterapia (Wick *et al.*, 2013).

A hipermetilação da região promotora do *MGMT* geralmente possui uma homogeneidade intratumoral nos gliomas (Grasbon-Frodl *et al.*, 2007), e permanece estável durante o curso do desenvolvimento tumoral. Contudo, os tumores com uma hipermetilação em *MGMT* podem adquirir uma resistência secundária à TMZ em consequência das mutações que impulsionam à evolução clonal e à recorrência tumoral. Por exemplo, as mutações nos genes de reparo de incompatibilidade do DNA (MMR, do inglês, *mismatch repair*) podem causar um genótipo hipermutador (Cancer Genome Atlas Research, 2008).

Apesar do significado clínico da metilação do promotor de *MGMT*, o teste para o diagnóstico permanece desafiador, devido à metilação heterogênea dos sítios CpGs associados a *MGMT* entre diferentes tumores, limiares pouco claros para definir "positividade" e o uso de diversos métodos (testes) ainda não normalizados (Wick *et al.*, 2014; Masui *et al.*, 2016). Assim, a adequação dos protocolos de teste e o estabelecimento de avaliações de qualidade internas e externas são importantes para assegurar a robustez dos resultados dos diagnósticos.

7.4. Codeleção 1p/19q

A codeleção 1p/19q tem sido considerada como um biomarcador preditivo do benefício da adição de vincristina (PCV) combinado ao tratamento inicial com irradiação em pacientes com glioma anaplásico (Cairncross *et al.*, 2013; Van Den Bent, Brandes, *et al.*, 2013).

Os mecanismos subjacentes às respostas favoráveis ao tratamento e à alta sobrevivência a longo prazo dos pacientes com gliomas *IDH* mutante e 1p/19q codeletados (sobrevivida global mediana > 10 anos) ainda são mal compreendidos. Apenas a codeleção 1p/19q de todo o braço combinada com mutação em *IDH* é prognosticamente favorável. As deleções parciais em qualquer dos braços cromossômicos, as quais podem ocorrer em pacientes com GBM *IDH* tipo selvagem, estão associadas a um prognóstico ruim (Vogazianou *et al.*, 2010).

7.5. Biomarcadores preditivos emergentes

A mutação V600E no gene *BRAF* emergiu como um biomarcador preditivo promissor de resposta a inibidores de BRAF em pacientes com glioma (Preusser *et al.*, 2016). Similarmente, a detecção de mutações em *IDH* é importante para identificar pacientes aptos para tratamentos com inibidores de *IDH* mutante (Rohle *et al.*, 2013) ou com vacinas de peptídeos sintéticos direcionados à *IDH1*-R132H (Schumacher *et al.*, 2014) em ensaios clínicos. Da mesma maneira, os tratamentos direcionados para EGFR ou EGFRvIII necessitaria de testes preditivos para amplificações de *EGFR* ou positividade de EGFRvIII (Sampson *et al.*, 2010; Schuster *et al.*, 2015; Phillips *et al.*, 2016). Outro biomarcador preditivo é a presença de fusões *FGFR-TACC*, as quais podem permitir a identificação de pacientes com GBM que são potencialmente elegíveis para a terapia com inibidor de FGFR (Singh *et al.*, 2012; Di Stefano *et al.*, 2015).

8. Epigenética

Quando Conrad Waddington cunhou o termo "epigenética" (Waddington, 1942), o mesmo foi utilizado para explicar por que as variações genéticas, por vezes, não levam à variações fenotípicas e como os genes podem interagir com o ambiente para produzir um determinado fenótipo. Entretanto, o termo tem sido extensivamente revisado e

discutido (Haig, 2004; Deichmann, 2016), visto que não se assemelha com o conceito original proposto por Conrad Waddington (Greally, 2018).

O conceito adotado em minha tese será o descrito por (Chen *et al.*, 2017), o qual afirma que a epigenética consiste em mecanismos pelos quais a cromatina é alterada quimicamente (através de modificações nas histonas e no DNA) ou estruturalmente (remodelação da cromatina e interações inter/intracromossômicas DNA-DNA).

No genoma humano, o DNA é altamente compactado e organizado em cromossomos tridimensionais (3D). Ele é enrolado em torno das histonas para formar os nucleossomos, os quais são as unidades estruturais básicas dos cromossomos. As histonas são carregadas positivamente nas caudas N-terminais, com abundantes resíduos de lisina e arginina e, portanto, ligam-se firmemente ao DNA para restringir sua acessibilidade. Aproximadamente 80% do DNA genômico é empacotado em nucleossomos, e os 20% restantes estão contidos em regiões que conectam os nucleossomos vizinhos (Figura 17) (Chen *et al.*, 2017).

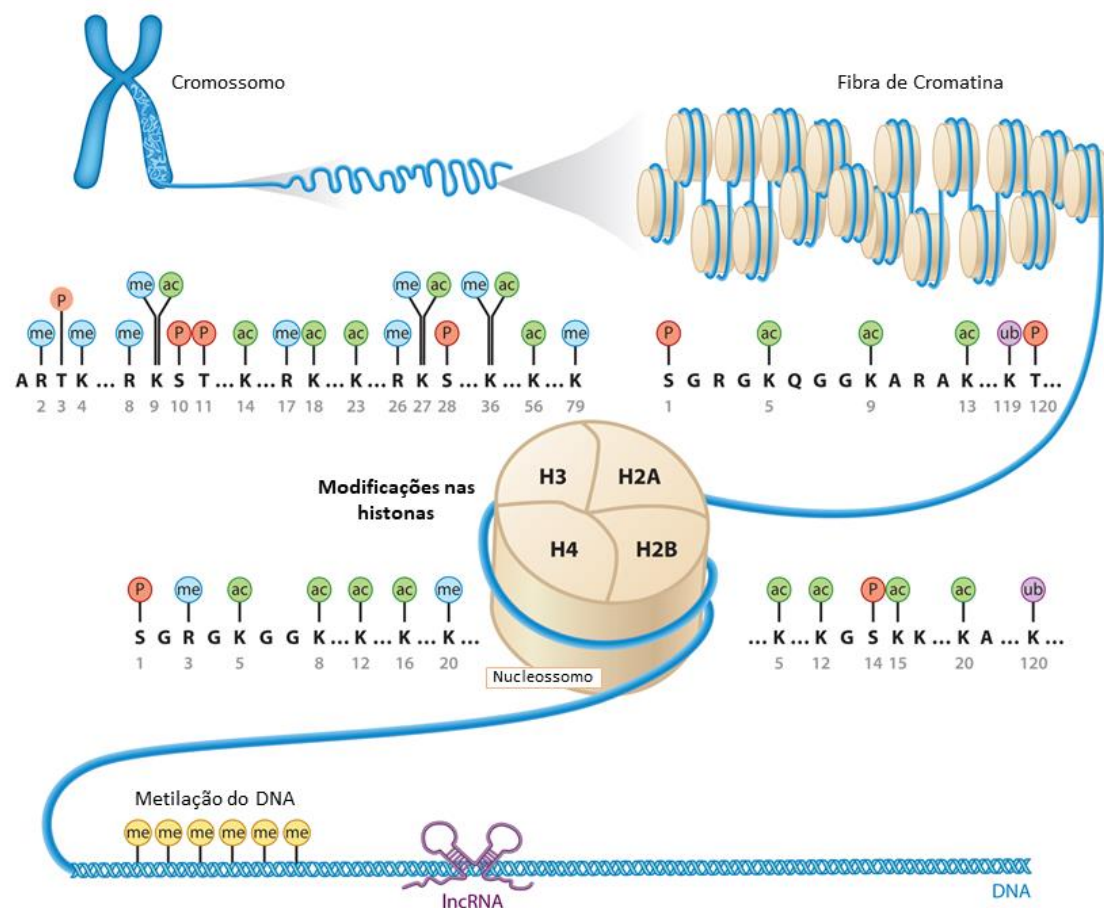


Figura 17 | Visão geral da estrutura cromossômica e modificações epigenéticas. A ligação do DNA aos octâmeros de histonas permite que o mesmo seja compactado em nucleossomos e subsequentemente em fibras e cromossomos. A cromatina está sujeita à

diversas regulações epigenéticas, incluindo a metilação do DNA e modificações pós-traducionais de histonas, incluindo acetilação (ac), metilação (me), fosforilação (P) e ubiquitinação (ub). Os RNAs longos não-codificantes (lncRNAs), através de sua interação com o DNA, são importantes modificadores epigenéticos que regulam a transcrição (Adaptado de Chen *et al.*, 2017).

As modificações epigenéticas podem ocorrer em vários locais do genoma humano. Nenhuma delas são capazes de alterar as sequências primárias do DNA, mas podem ter efeitos profundos na transcrição dos genes. Além disso, em resposta a estímulos (fatores ambientais e fenômenos tecido-específicos), os mecanismos epigenéticos trabalham juntos para regular o funcionamento correto do genoma (Chen *et al.*, 2017).

Em mamíferos, as modificações epigenéticas incluem a metilação (Morgan *et al.*, 2005; Raiber *et al.*, 2017), hidroximetilação (Munzel *et al.*, 2011; Ye e Li, 2014), modificações nas histonas (Jenuwein e Allis, 2001; Qi *et al.*, 2018) e mecanismos mediados por moléculas não-codificantes de RNA (Bernstein e Allis, 2005).

8.1. Metilação do DNA

A 5-metilcitosina (5mC) foi provavelmente a primeira variante de uma base nucleotídica canônica a ser descoberta. Foi descoberta em 1899 (Ruppel, 1899), e sua existência foi confirmada por Johnson e Coghill em 1925, que a identificaram como um produto da hidrólise do ácido tuberculínico (Johnson e Coghill, 1925). Desde a descoberta da 5mC, mais de 17 bases de DNA modificadas foram descobertas nos genomas de bactérias e eucariotos (Raiber *et al.*, 2017).

A metilação do DNA é catalisada por uma família de DNA metiltransferases (DNMTs) (Dnmt1, Dnmt3a, Dnmt3b, Dnmt3c e Dnmt3L) que transferem um grupo metil da S-adenosilmetionina (SAM) para o quinto carbono da citosina para formar a 5mC. As Dnmt3a e Dnmt3b são responsáveis por estabelecer um novo padrão de metilação para o DNA não modificado e são, portanto, conhecidas como DNMTs *de novo* (Figura 18a). Já a Dnmt1 atua durante a replicação do DNA, copiando o padrão de metilação do DNA parental na fita recém-sintetizada (Figura 18b) (Stummer *et al.*, 2006; Bettegowda *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015; Raiber *et al.*, 2017). Recentemente, uma nova DNMT (Dnmt3c) foi descoberta em genomas de roedores, cuja função relaciona-se com a metilação *de novo* das regiões promotoras de retrotransposons das células germinativas masculinas

(Drusco *et al.*, 2015). Por último, a Dnmt3L é expressa principalmente durante o desenvolvimento inicial e é restrita às células germinativas e ao timo de adultos. É sabido que a Dnmt3L não possui atividade catalítica, entretanto, ela pode associar-se as Dnmt3a e Dnmt3b, estimulando-as desempenharem sua atividade de metiltransferase (Vuorinen *et al.*, 2003).

Embora o cérebro possua o nível mais alto de metilação do DNA do que qualquer tecido do corpo, a 5mC representa apenas 1% do genoma humano. A metilação do DNA ocorre com maior frequência em citosinas que precedem um nucleotídeo de guanina (CG). Esses dinucleotídeos não estão uniformemente distribuídos pelo genoma, mas sim concentrados em pequenos trechos ricos em repetições CG, conhecidas como "Ilhas CpGs", e em sequências repetitivas (repetições centroméricas, retrotransposons, rDNA) (Raiber *et al.*, 2017).

A metilação do DNA é importante para o silenciamento dos elementos retrovirais, *imprinting* parental, regulação da expressão gênica tecido-específica, inativação do cromossomo X, desenvolvimento do sistema imune, reprogramação celular, comportamento e estabilidade genômica (Raiber *et al.*, 2017). É importante ressaltar que a metilação do DNA não atua isoladamente, mas sim em conjunto com as modificações das histonas dentro de contextos específicos da cromatina (Shi *et al.*, 2015).

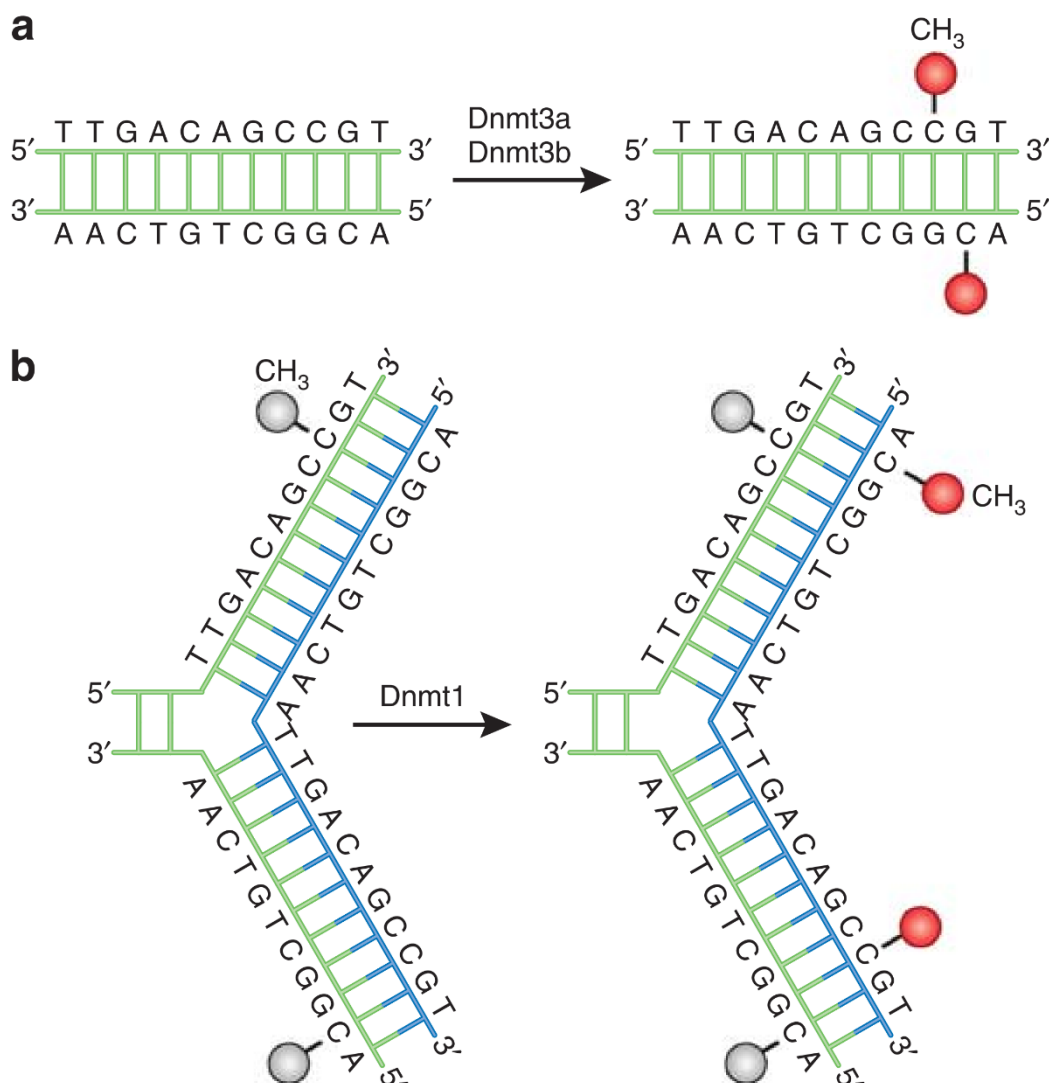


Figura 18 | Principais vias de metilação do DNA. (a) Dnmt3a e Dnmt3b são as DNMTs *de novo* e transferem os grupos metil (vermelho) para os sítios novos do DNA. (b) A Dnmt1 é a principal responsável pela manutenção do padrão de metilação durante a replicação do DNA. Quando o DNA é replicado, o DNA do parental retém o padrão original de metilação (cinza). A Dnmt1 associa-se às bolhas de replicação e replica com precisão o padrão original de metilação do DNA, adicionando grupos metil (vermelho) na fita filha recém-formada (azul) (Raiber *et al.*, 2017).

A metilação do DNA foi descrita pela primeira vez no câncer em 1983 por Feinberg & Vogelstein (Weller *et al.*, 2014), o qual demonstraram que certos loci gênicos possuíam menores níveis de metilação (ou seja, eram hipometilados) em células tumorais em comparação com as células normais. Em 1999, Toyota *et al.* (Van Den Bent *et al.*, 2005) descreveram pela primeira vez o fenótipo metilador de ilhas CpG (CIMP), caracterizado pela hipermetilação de ilhas CpGs em todo o genoma do câncer colorretal.

Atualmente, sabe-se que os CIMP_s ocorrem em vários tipos de cânceres, geralmente formando subtipos únicos. Em gliomas, as alterações no padrão de metilação do DNA mais bem caracterizadas são: a presença de gliomas com fenótipo metilador de ilhas CpG (G-CIMP) que está associado a mutações no *IDH* e melhor sobrevida global, sendo frequente em gliomas de baixo grau (Noushmehr *et al.*, 2010); e a metilação da região promotora do *MGMT* em um subconjunto de gliomas, que está associada à melhora na resposta à terapia com agentes alquilantes do DNA (Hegi *et al.*, 2005). Essas alterações globais e focais têm sido usadas para classificação clínica dos gliomas há vários anos. No entanto, elas tiveram pouco impacto na melhoria das decisões de tratamento (Daniels *et al.*, 2011; Wick *et al.*, 2014).

9. Novas abordagens de diagnóstico molecular

Cada um dos biomarcadores expostos e discutidos anteriormente podem ser avaliados utilizando testes baseados numa única proteína ou gene, envolvendo imuno-histoquímica, hibridização fluorescente *in situ* (FISH), sequenciamento do DNA e outros métodos (Masui *et al.*, 2016). Contudo, o advento de tecnologias de alto rendimento (*high-throughput*) para testes moleculares, incluindo o microarranjo (*Microarray*) e sequenciamento de nova geração (NGS - *Next Generation Sequencing*), possibilitam oportunidades promissoras para o desenvolvimento de novos diagnósticos.

Atualmente, a aplicabilidade do sequenciamento do exoma ou do genoma completo é restrita, na sua maioria, a projetos de pesquisa e ensaios clínicos selecionados (Reifenberger *et al.*, 2016). No entanto, painéis genéticos de NGS adaptados à tumores cerebrais, tipicamente cobrindo entre ~ 20 a ~ 150 genes que são conhecidos por estarem mutados em gliomas e/ou outros tipos de tumores cerebrais, já são realizados na prática clínica em alguns centros (Dubbink *et al.*, 2016; Nikiforova *et al.*, 2016; Sahm *et al.*, 2016; Zacher *et al.*, 2017). Esta técnica pode ser aplicada a amostras de tecidos rotineiramente processadas, permitindo o sequenciamento de genes diagnosticamente relevantes, bem como a identificação de mutações, com um elevado grau de sensibilidade e especificidade. Desta maneira, a análise paralela robusta e rápida de múltiplos marcadores pode ser alcançada a custos acessíveis.

Outra abordagem complementar envolve o perfil de metilação do DNA usando a tecnologia de microarranjo, o qual mostrou a existência de distintos subgrupos moleculares entre os gliomas anaplásico (Wiestler *et al.*, 2014), GBMs (Sturm *et al.*,

2012; Korshunov *et al.*, 2015) e os tumores ependimais (Pajtler *et al.*, 2015). O uso dessa abordagem também revelou que a gliomatose cerebral não é uma entidade distinta (Herrlinger *et al.*, 2016b; a). Além disso, alterações do número de cópias em todos os cromossomos e o estado de metilação da região promotora do *MGMT* podem ser avaliadas em paralelo com os perfis de metilação do DNA usando diferentes algoritmos de bioinformática para análise dos dados de microarranjo (Wiestler *et al.*, 2014; Bady *et al.*, 2016). O uso destes e de outros ensaios moleculares avançados em breve se tornará uma prática comum.

A classificação atual da OMS dos gliomas baseia-se exclusivamente em avaliações de tecidos tumorais. Entretanto, abordagens utilizando NGS em biópsias líquidas, como por exemplo o líquido cefalorraquidiano ou o plasma, são promissoras para abordagens menos invasivas para o diagnóstico e monitoramento de vários tipos de cânceres, incluindo os gliomas (Bettegowda *et al.*, 2014; De Mattos-Arruda *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015). Os micro-RNAs associados aos gliomas, como o miR-21, também podem ser detectados no fluido cefalorraquidiano e podem potencialmente servir como biomarcadores diagnósticos, prognósticos e/ou preditivos (Drusco *et al.*, 2015; Shi *et al.*, 2015).

10. Terapias atuais multimodais dos gliomas

Apesar dos formidáveis avanços na compreensão da genética dos gliomas, as terapias moleculares têm, até o momento, falhado nos ensaios clínicos de fase III em pacientes portadores destes tumores, e as modalidades clássicas de tratamento, tais como a cirurgia, radioterapia e/ou quimioterapia, continuam sendo a base terapêutica (Wick *et al.*, 2012; Weller, Wick, *et al.*, 2015). A cirurgia pode ser curativa em pacientes com gliomas circunscritos, tais como o astrocitoma pilocítico, PXA e astrocitoma subependimário de células gigantes (Reifenberger *et al.*, 2016).

A ressecção total também está associada à melhora da sobrevida dos pacientes com gliomas difusos, incluindo GBM (Stummer *et al.*, 2006; Senft *et al.*, 2011), e esta melhora na sobrevida também se aplica aos idosos (Vuorinen *et al.*, 2003; Wick *et al.*, 2012). No entanto, os gliomas difusos geralmente recidivam após a ressecção.

A melhor escolha e o tempo dos diversos tratamentos disponíveis dependem da idade do paciente, do estado do desempenho clínico, do tipo tumoral e dos biomarcadores moleculares. A radioterapia pós-cirúrgica fornece um melhor controle local dos gliomas

difusos de qualquer grau quando comparado com a cirurgia isolada. Além disso, a radioterapia aumenta a sobrevida dos pacientes com gliomas de grau III ou IV e é, portanto, o padrão de atendimento para esses pacientes (Weller *et al.*, 2014). O atraso no tratamento radioterápico até a recorrência, após a cirurgia, não compromete a sobrevida de pacientes com gliomas de grau II (Van Den Bent *et al.*, 2005), mas essas estratégias de "espera vigilante" só devem ser consideradas adequadas para pacientes com idade <40 anos, com características prognósticas favoráveis (Pignatti *et al.*, 2002; Daniels *et al.*, 2011).

Os resultados do ensaio RTOG 9802 demonstraram que os pacientes com gliomas difusos de grau II que tinham necessidade do tratamento além da cirurgia, tinham uma sobrevida prolongada quando a poliquimioterapia com vincristina (PCV) foi adicionada à radioterapia (Buckner *et al.*, 2016). Por outro lado, o ensaio EORTC 22033-26033 (Baumert *et al.*, 2016), no qual a eficácia da radioterapia isolada foi comparada com a quimioterapia isolada, não resultou na identificação de qualquer subgrupo de pacientes que obteve um maior benefício de qualquer tratamento em relação ao outro.

A codeleção 1p/19q é um biomarcador preditivo de benefício a longo prazo da poliquimioterapia com vincristina (PCV) administrada imediatamente antes ou depois da radioterapia em pacientes com glioma anaplásico (Cairncross *et al.*, 2013; Van Den Bent, Brandes, *et al.*, 2013). Contudo, se o tratamento com PCV poderá ser efetivamente substituído por TMZ, será explorado no novo estudo CODEL (Drappatz e Lieberman, 2018).

A quimioradioterapia pós-operatória, com 60 Gy (gray) em 30 frações concomitante com TMZ diário, seguida de seis ciclos de manutenção de TMZ, é o padrão de tratamento para pacientes com GBM (Stupp *et al.*, 2005; Weller *et al.*, 2014). Esta abordagem terapêutica foi estabelecida com base nos resultados de um ensaio que não incluiu pacientes com idade >70 anos (Stupp *et al.*, 2005), e as análises dos dados dos subgrupos sugeriram apenas benefícios limitados da adição de TMZ à radioterapia em pacientes com idade entre 65-70 anos (Sahebjam *et al.*, 2012; Laperriere *et al.*, 2013). Os ensaios em pacientes idosos (com idade $\geq$ 60-70 anos) com GBM, que têm um prognóstico particularmente ruim, demonstraram a eficácia de regimes de radioterapia mais curtos e hipofracionados nesta população (Roa *et al.*, 2004; Laperriere *et al.*, 2013), e um papel preditivo da metilação do promotor do *MGMT* para beneficiar o tratamento de primeira linha com TMZ isoladamente (Malmstrom *et al.*, 2012; Wick *et al.*, 2012). Recentes ensaios em pacientes idosos (com 65 anos de idade ou mais) com GBM, a adição

de TMZ à radioterapia de curta duração (40 Gy em 15 frações) resultou numa maior sobrevida do que a radioterapia de curta duração isoladamente (Perry *et al.*, 2017).

A definição dos padrões para o tratamento dos gliomas recidivos continua sendo um desafio. A ressecção total prolonga a sobrevida dos pacientes com GBM recorrente (Suchorska *et al.*, 2016), mas ainda não está claro a relevância da reoperação em pacientes com outros tipos de gliomas. A radioterapia em tumores recorrentes é uma opção para os pacientes que não receberam este tratamento como terapia de primeira linha, entretanto, é limitada pelos efeitos neurotóxicos causado pelo acúmulo das doses, as quais podem acarretar na radionecrose (Mayer e Sminia, 2008). Os tratamentos sistêmicos que podem ser utilizados em tumores recidivos incluem a quimioterapia com agentes alquilantes, principalmente com a lomustina (Wick *et al.*, 2010; Batchelor *et al.*, 2013), ou com o TMZ em pacientes com *MGMT* metilado (Perry *et al.*, 2010; Weller, Tabatabai, *et al.*, 2015), mas os efeitos na sobrevida são moderados. Nos EUA e outros países, a terapia antiangiogênica com bevacizumab foi aprovada para o tratamento de GBMs recorrentes, baseada nas taxas de resposta radiológica na faixa de 20-40% em dois ensaios não controlados (Friedman *et al.*, 2009; Kreisl *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2012).

A aplicação de "campos de tratamento de tumores" (*tumour treating fields - TTF*), isto é, campos elétricos alternados que são aplicados através de eletrodos que são colocados na pele do couro cabeludo raspado os quais interferem na divisão celular e na montagem das organelas, prolongou a sobrevida de pacientes com GBM recentemente diagnosticado em um estudo de fase III (Stupp *et al.*, 2015; Stupp *et al.*, 2017). Entretanto, o ceticismo ainda circunda essa abordagem, devido a problemas no *design* dos ensaios e na uniformidade dos resultados entre os subgrupos (Wick, 2016).

11. Produtos naturais com potencial antineoplásico

O câncer permanece como uma das maiores causas de morte no mundo. Vários tipos de quimioterapias falham devido às reações adversas, resistência aos fármacos e a especificidade de alvos de alguns tipos de fármacos. Existe um interesse emergente no desenvolvimento de fármacos que superem os problemas acima referidos, utilizando compostos naturais que possam atingir múltiplos alvos com efeitos secundários reduzidos, os quais são eficazes contra vários tipos de cânceres (Newman *et al.*, 2003; Aung *et al.*, 2017).

Compostos naturais de várias fontes, incluindo plantas, fungos, animais e microrganismos, oferecem uma grande oportunidade para a descoberta de novas drogas para o tratamento do câncer (Aung *et al.*, 2017). Ao longo dos últimos 30 anos, um grande número de medicamentos anticancerígenos e anti-infecciosos vieram de produtos naturais ou derivados de produtos naturais (Newman e Cragg, 2016).

Os fungos estão entre os mais diversos grupos encontrados na natureza, pois apresentam uma grande variedade de habitat, sendo encontrados em ambientes terrestres e aquáticos, e são funcionalmente considerados benéficos ou patológicos (Hawksworth, 1997). Nos últimos anos, o interesse pelo potencial farmacêutico dos fungos aumentou rapidamente. Numerosas moléculas sintetizadas por fungos são conhecidas por serem bioativas e consistem principalmente de polissacarídeos, proteínas, gorduras, minerais, glicosídeos, alcalóides, óleos voláteis, terpenóides, tocoferóis, fenólicos, flavonóides, carotenóides, folatos, lecitinas, enzimas, ácido ascórbico dentre outros (Valverde *et al.*, 2015).

12. Gênero *Pisolithus* e o Pisosterol

Pisolithus Alb. & Schwein. (Albertini e Schweinitz, 1805) é um gênero de fungos pertencente à família Sclerodermataceae (subordem Sclerodermatineae) (Binder e Hibbett, 2006). São fungos cosmopolitas, ocupando tanto regiões temperadas quanto tropicais e formam associações simbióticas ectomicorrízicas com uma ampla variedade de plantas lenhosas (Marx, 1977; Martin *et al.*, 2002; Rusevska *et al.*, 2015), incluindo membros das Pinaceae, Myrtaceae, Fagaceae, Mimosaceae, Dipterocarpaceae e Cistaceae (Martin *et al.*, 2002). Além disso, este gênero possui uma grande diversidade em sua ecologia, características morfológicas e moleculares, eficiência simbiótica, fisiologia e distribuição geográfica (Martin *et al.*, 2002). Estudos filogenéticos realizados na última década ressaltaram a presença de várias espécies dentro deste gênero, que por muito tempo foi considerado monotípico (Anderson *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 1998; Gomes *et al.*, 2000; Anderson *et al.*, 2001; Díez *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2002).

O *Pisolithus tinctorius* (Classe dos Basidiomycetes) (Figura 19) é um fungo comumente encontrado no solo de ecossistemas florestais, capaz de estabelecer simbiose com uma vasta gama de plantas (Marx, 1977), e, por isso, é considerado um sistema modelo para as análises das interações simbióticas ectomicorrízicas (Martin *et al.*, 1999; Rusevska *et al.*, 2015). Além disso, este fungo é comercialmente importante, visto que o inoculo dos seus basidiósporos pode ser utilizado para facilitar a criação de florestas

artificiais (Marx *et al.*, 1982), além de produzir um gel de cor enegrecida que pode ser utilizado como corante natural de roupas (Mamede, 2012). De forma adicional, alguns relatos demonstram que *P.tinctorius* era utilizado como uma importante fonte de alimento por aborígenes australianos, além de possuírem propriedades homeostáticas que beneficiaram indígenas norte-americanos (Kalotas, 1996).



© Dianna Smith
Figura 19 | *Pisolithus tinctorius* (Adaptada de <http://www.fungikingdom.net/>)

O potencial farmacológico do *P.tinctorius* já foi relatado em vários estudos, destacando-se em particular sua atividade antifúngica (Tsantrizos *et al.*, 1991), atividade antibacteriana (Ameri *et al.*, 2011; Mamede, 2012), atividade imunossupressiva (Fujimoto *et al.*, 1994) e antiobesidade (Ahn *et al.*, 2007).

Diversos compostos já foram extraídos do *P.tinctorius*, sendo os triterpenos, os constituintes antiobesidade (Lobo *et al.*, 1983; Lobo *et al.*, 1985; Lobo *et al.*, 1988; Fujimoto *et al.*, 1994; Baumert *et al.*, 1997; Zamuner *et al.*, 2005; Costa-Lotufo *et al.*, 2010). Dentre os triterpenos com propriedades anticancerígenas produzidos por esse fungo, destaca-se o pisosterol (3 β ,22,23-triidroxi-22-acetoxi-24-metil-lanosta-8,24(28)-dieno), um triterpeno isolado e descrito pela primeira vez por Gill (Gill *et al.*, 1989) (Figura 20).

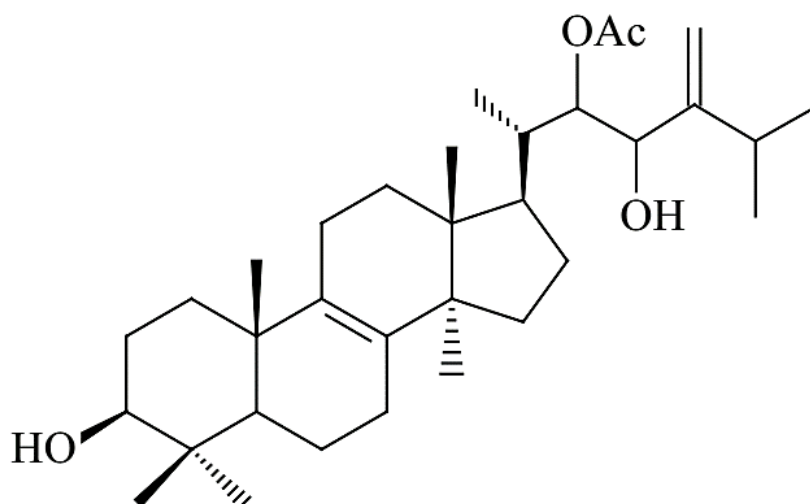


Figura 20 | Estrutura molecular do pisosterol isolado do *Pisolithus tinctorius* (Montenegro *et al.*, 2004).

O primeiro estudo *in vitro* realizado com o pisosterol isolado dos esporocarpos do *P. tinctorius*, demonstrou que esse triterpeno possui uma atividade citotóxica em várias células tumorais (especialmente em linhagens celulares de leucemia e melanoma), de forma dose-dependente, sem, no entanto, alterar o desenvolvimento embrionário do ouriço do mar ou causar lise dos eritrócitos de camundongos (Montenegro *et al.*, 2004).

Montenegro *et al.* (2008) demonstraram a atividade antitumoral do pisosterol *in vivo*, utilizando a linhagem celular sarcoma 180 em ratos, no qual a taxa de inibição do crescimento tumoral foi de 43%. No entanto, este estudo também demonstrou que o pisosterol apresentou uma hepatotoxicidade intrínseca, levando a degeneração hidrópica dos hepatócitos, seguido pela esteatose microvesicular em algumas áreas, além da vacuolização e degeneração hidrópica do epitélio tubular proximal e áreas de necrose nos rins. Entretanto, os autores consideraram que estes danos podem ser reversíveis (Montenegro *et al.*, 2008).

Além das atividades descritas acima, foi observado que o pisosterol é um potente indutor de diferenciação celular, levando as células leucêmicas HL-60 à diferenciação monocítica tempo e dose dependente (alcançando seu efeito máximo após 72h a 5 µg/mL), sendo este um dos seus prováveis mecanismos de ação. Ainda, os autores observaram a apoptose nas células tratadas com pisosterol de forma dose dependente, com um aumento significativo na dose mais elevada testada (5 µg/mL) (Montenegro *et al.*, 2007).

Burbano *et al.* (2009), também utilizando as células HL-60, demonstraram que o tratamento com 1.8 µg/mL de pisosterol é capaz de diminuir de 99% para 10% a amplificação gênica no cromossomo 8 (8q24) em regiões homogeneamente coradas ou HSRs (*homogeneously staining regions*), além de inibir a proliferação celular. Demonstraram também que após o tratamento de pulso com pisosterol a 1.8 µg/mL, o efeito da droga é temporário nas células HL60, uma vez que após lavagem e reincubação em meio de cultura sem pisosterol, as células com HSR retomaram o seu crescimento, provavelmente devido a droga inibir a via de indução da proliferação celular do proto-oncogene *C-MYC* ou de algum outro gene amplificado na região 8q24. Além disso, quando retomaram o seu crescimento, as células com HSRs não sofreram apoptose ou necrose significativa na presença de pisosterol a uma concentração de 1.8 µg/mL. Esses resultados levaram os autores a sugerir que o pisosterol não elimina definitivamente as células com HSRs em 8q24, mas sim, que a maioria delas (90%) foi bloqueada na interfase, retomando o crescimento na ausência de pisosterol, e parece provável que as células sem HSR (menos de 1%), antes do tratamento sejam capazes de suportar a citotoxicidade do pisosterol. As células sem um alto grau de amplificação genética (HSRs e *double-minute*) apresentam um comportamento menos agressivo e invasivo (Burbano *et al.*, 2006) e são alvos fáceis para a quimioterapia (Fegan *et al.*, 1995; Burbano *et al.*, 2009).

A fim de confirmar o efeito das concentrações do pisosterol na amplificação do proto-oncogene *C-MYC* em células HL60, Silva *et al.* (2010) conduziram um estudo utilizando FISH com uma sonda específica para o gene *C-MYC*. Eles observaram que antes do tratamento, 87,5% das células apresentavam HSRs. Após o tratamento, não foram identificados efeitos nas concentrações mais baixas de pisosterol (0,5 e 1,0 µg/mL). No entanto, com o tratamento de 1,8 µg/mL, apenas 15% das células apresentavam HSRs e 39,5% apresentavam poucos sinais fluorescentes (3 ou 4 alelos), sugerindo que o pisosterol provavelmente bloqueia as células com HSRs na interfase. Esses resultados demonstraram que o pisosterol bloqueia a proliferação da maioria das células com alta amplificação de *C-MYC* (Silva *et al.*, 2010).

Em um estudo posterior, Pereira *et al.* (2011) analisaram o perfil citogenético e morfológico de duas linhagens de GBM (U343 e AHOL1), antes e após o tratamento com diferentes concentrações de pisosterol (0.5, 1.0 e 1.8 µg/ml⁻¹). Apesar dos autores não relatarem nenhuma alteração significativa na morfologia celular e na frequência de anomalias cromossômicas (quebras, translocações e anomalias numéricas), foi

demonstrado que o tratamento com a droga bloqueou a divisão de células que apresentavam a amplificação do *C-MYC*, indicando, consequentemente, que essa droga não induz a diferenciação celular e não tem efeito clastogênico e/ou aneugênico em linhagens de GBM. Além disso, os autores observaram que houve uma diminuição significativa no índice mitótico apenas a $1.8 \mu\text{g/ml}^{-1}$ de pisosterol, resultados similares aos encontrados por Montenegro *et al.* (2004) em células leucêmicas HL-60 (Pereira *et al.*, 2011).

Recentemente, Alves *et al.* (2015) analisaram o potencial anticancerígeno dos extratos e frações brutas dos esporos de *P. tinctorius* em linhagens celulares de osteosarcoma humano MG63, carcinoma de mama humano T47D, adenocarcinoma de cólon humano RKO e nas células endoteliais normais hCMEC/D3. Os resultados mostraram uma redução aproximada de 95% na viabilidade das células tumorais sem uma redução significativa na viabilidade das células hCMEC/D3 em 4 de 11 frações (Alves *et al.*, 2015).

Estes estudos supracitados demonstraram que tanto os esporos quanto os esporocarpos de *P. tinctorius* são uma fonte proveitosa de compostos com potencial anticancerígeno e abrem caminho para descoberta de novas fontes fúngicas de compostos anticancerígenos.

OBJETIVOS

13. Objetivo geral

Avaliar e comparar o perfil de Variações no Número de Cópias (CNVs) e expressão gênica de pacientes diagnosticados com gliomas e em linhagens de glioblastomas (U87-MG, U343, AHOL1 e 1321N1) tratadas com pisosterol.

14. Objetivos específicos

Estudo com as linhagens de glioblastomas (U87-MG, U343, AHOL1 e 1321N1) tratadas com pisosterol.

- Caracterizar os CNVs e o transcriptoma da linhagem AHOL1;
- Avaliar como diferentes concentrações do pisosterol podem influenciar o ciclo celular de quatro linhagens de glioblastomas (U87-MG, U343, AHOL1 e 1321N1);
- Avaliar se diferentes concentrações do pisosterol influenciam o perfil de metilação das regiões promotoras de 13 genes envolvidos na via ATM/ATR (*ATM*, *CASP-3*, *CDK1*, *CDKN1A*, *CDKN2A*, *CDKN2B*, *CHK1*, *p14ARF*, *TP53*, *MYC*, *BCL2*, *BMI-1* e *MDM2*);
- Traçar o perfil de expressão dos 13 genes envolvidos na via ATM/ATR supracitados, correlacionando com os diferentes tratamentos do pisosterol;
- Verificar correlações entre a expressão de cada um desses genes com o perfil de metilação em todos os tratamentos com o pisosterol;
- Elucidar por qual mecanismo o pisosterol induz a apoptose;
- Identificar alterações no número de cópias nas linhagens tratadas com pisosterol utilizando aCGH (*Array-comparative genomic hybridization*);
- Identificar genes diferencialmente expressos (GDE) nas linhagens supracitadas tratadas com pisosterol, utilizando a plataforma aCGH;
- Identificar as principais alterações moleculares decorrentes do tratamento com pisosterol, a fim de identificar possíveis alvos terapêuticos em GBMs;
- Fazer uma análise integrada dos dados obtidos do número de cópias com os genes diferencialmente expressos, a fim de verificar quais são as vias gênicas as quais são influenciadas com o tratamento do pisosterol;

Estudo com amostras primárias de pacientes diagnosticados com diferentes tipos de gliomas

- Detectar CNVs em amostras de pacientes diagnosticados com gliomas utilizando aCGH (*Array-comparative genomic hybridization*);
- Associar as CNVs encontradas com os dados clinico-patológicos dos pacientes, a fim de identificar biomarcadores de valor prognóstico;
- Comparar os dados obtidos, a fim de identificar marcadores moleculares específicos para os tumores analisados que possam ser usados como biomarcadores para diagnóstico;
- Caracterizar e quantificar o perfil de metilação de 26 genes – *BIRC5* (*SURVIVIN*), *BMP4*, *CASP8*, *CDH1*, *PTGS2* (*COX2*), *FZD9*, *GATA6*, *GPX3*, *HIPK2*, *HOXA9*, *HOXA11*, *IRAK3*, *LDB3*, *MAGEA1*, *MGMT*, *MTSS1*, *CDKN1B* (*P27^{KIP1}*), *P73*, *PENK*, *POU4F3*, *RPRM*, *RRAD*, *SNAPC2*, *TFAP2C*, *TFF* e *TNFRS1A* – de tecidos de pacientes diagnosticados com astrocitomas e tecido cerebral normal;
- Correlacionar o perfil de metilação dos genes candidatos supracitados com as características clinico-patológicas dos pacientes.

MATERIAL E MÉTODOS

Aspectos Éticos

O presente trabalho faz parte de um projeto maior intitulado “**Análise de Alterações Gênicas e Cromossômicas em Tumores do Sistema Nervoso Humano**”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto Evandro Chagas (**Parecer nº: 593.717-0 Data da Relatoria: 05/07/2012**) (Anexo A). Os pacientes ou seus parentes mais próximos serão informados sobre o estudo realizado e, em caso de concordância em participar do mesmo, solicitar-se-á a assinatura de um termo de livre consentimento.

Isolamento e purificação do Pisosterol

O pisosterol utilizado no presente estudo é cortesia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, em parceria com o Laboratório de Citogenética Humana, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará. Este composto químico, isolado do fungo ectomicorrízico *P.tinctorius*, foi coletado de uma plantação de eucaliptos no Nordeste do Brasil. O material obtido de *P.tinctorius* foi pulverizado em ar seco (370 g), e extraído com acetona, resultando em 21 g de extrato, após evaporação do solvente sob reduzida pressão. O extrato de acetona (4 g) sofreu cromatografia em gel sílico, com um eluído de acetona/metanol em mistura binária (100:0-0:100), rendendo 120 g. A estrutura do pisosterol foi determinada por meios espectroscópicos.

Amostras de tecidos tumorais dos pacientes

Foram utilizadas 98 biópsias de pacientes diagnosticados com gliomas (56 mulheres e 52 homens) atendidos no Hospital Ophir Loyola (Belém, Pará, Brasil) durante o período de janeiro de 2006 a janeiro de 2018 (Apêndice 1). Além disso, amostras não neoplásicas foram obtidas de 10 biópsias de pacientes com traumatismo cranioencefálico no mesmo hospital. Todas as amostras foram armazenadas com DNA/RNA Shield™ (Zymo Research) no ultrafreezer vertical à -80°C no Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética - SAMAM/IEC.

Linhagens tumorais e o tratamento com pisosterol

Para análise da influência do pisosterol na variação do número de cópias, expressão e mecanismos de controle epigenético, foram utilizadas quatro linhagens de

glioblastomas: a **U-343MG** (Linhagem obtida de um glioblastoma primário, gentilmente cedida pelo Laboratório de Citogenética e Mutagênese, USP-Ribeirão Preto, SP), **AHOL1** (obtida a partir de um glioblastoma secundário e estabelecida no Laboratório de Citogenética Humana da UFPA), **U-87 MG** (Linhagem comercial de um glioblastoma obtida da *American Type Culture Collection*, ATCC-Manassas, VA, USA) e **1321N1** (Linhagem comercial de um astrocitoma humano obtida da Sigma-Aldrich, Catálogo 86030402). Todas as linhagens atualmente encontram-se criopreservadas em nitrogênio líquido no Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética - SAMAM/IEC, sendo que a criopreservação, descongelamento e manutenção das mesmas seguiram os protocolos descritos na literatura (Lima *et al.*, 2004).

Todas as linhagens foram cultivadas e submetidas ao tratamento com Pisosterol em três concentrações ($0.5 \mu\text{g/mL}^{-1}$, $1 \mu\text{g/mL}^{-1}$ e $1.8 \mu\text{g/mL}^{-1}$), seguida das análises de CNVs e expressão gênica.

Extração e quantificação do DNA e RNA dos tecidos tumorais e das linhagens de GBM

As extrações do DNA genômico foram feitas utilizando o kit *ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep System* (Promega®), seguindo as especificações do fabricante.

Para a obtenção do RNA total, foi utilizado o *SV Total RNA Isolation System* (Promega®), seguindo as especificações fornecidas pelo fabricante.

A concentração do DNA e RNA foram determinadas por análise fluorimétrica (Qubit 4 - *Thermo Fisher Scientific*). Para verificar a integridade do DNA genômico extraído, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1%, corados com *GelRed™* (UNISCIENCE). A integridade do RNA total foi avaliada em gel agarose 3% corado com *GelRed™* (UNISCIENCE) e no equipamento Agilent 2100 Bioanalyser, com o Pico LabChip Kit (Agilent Technologies, Palo Alto, CA), conforme instruções do fabricante. A qualidade foi expressa pelo número de integridade do RNA (NIR).

Tratamento do DNA genômico com o bissulfito de sódio

Nessa técnica, o tratamento com bissulfito de sódio converterá todas as citosinas não metiladas em uracilas e as citosinas metiladas permanecerão citosinas após o tratamento. Dessa forma, será possível identificar as regiões metiladas nas sequências desejadas.

A conversão com bissulfito de sódio do DNA genômico dos tecidos tumorais dos pacientes e das linhagens de GBM será feita utilizando o kit *EpiTect Bisulfite* (Qiagen) seguindo as instruções do fabricante. Após a conversão, o DNA modificado será armazenado a -20°C.

Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Cada reação de PCR foi realizada em um volume final de 25 µL contendo 2 µL de DNA tratado com bissulfito de sódio; 2,5 µL de solução tampão de reação 10X; 1 µL de MgCl₂ (1,5 mM); 0,5 µL de dNTPs (10 mM) (Invitrogen); 1µL de cada *primer* (10 mM), 0,3 µL de Taq DNA polimerase (Promega, Inc) e água ultrapura para completar um volume final de 25 µL.

Os produtos da amplificação da PCR foram analisados em gel de agarose 3% corado com *GelRed*TM (UNISCIENCE), e posteriormente purificados com o kit *EZ-10 Spin Column PCR Product Purification* (Bio Basic/Ludwig Biotec), seguindo as instruções do fabricante.

Os iniciadores que foram utilizados nas PCRs e no sequenciamento dos 26 genes candidatos (Tabela 5), foram desenhados com base nas sequências das regiões promotoras disponíveis nos bancos de dados *GenBank*, *Ensembl* e *UCSC Genome Browser*, utilizando o software *Methyl Primer Express*TM (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA).

Tabela 5 | Iniciadores utilizados no presente estudo, com suas respectivas sequências, temperaturas de anelamento e referências.

Gene	Sequência dos Iniciadores (5' – 3')	Temperatura de anelamento (°C)	Tamanho do Amplicon	Fonte
<i>BIRC5</i>	FO 5' TATTTGTAAAGTTTTTTGTTTG 3' FI 5' TTTTAGGATTTAAGTGATGTTTTTG 3' R 5' TTTTATATTTAAGAATTGGTTTTTT 3'	55	676 pb 430 pb	(Borges, 2010)
<i>BMP4</i>	F 5' TTGGTTTTTTTTTAGGGGTAT 3' R 5' TACTTCTCTACTTCTAAACCTCTCCT 3'	61,2	319 bp	Presente estudo
<i>CASP8</i>	F 5' TGTATTTTAGTATTTTGGGAGG 3' R 5' ATTTCRCTCTTATTACCCAA 3'	52,3	250 bp	Presente estudo
<i>CDH1</i>	F1 5' TTTTGATTTTAGGTTTTAGTGAGTTAT 3' R1 5' AATACCTACAACAACAACAACA 3' F2 5' TGTAGGTTTTATAATTTATTAGATTT 3' R2 5' ACTCCAAAAACCCATACTAAC 3'	53,2 55	455 pb 351 pb	(Borges <i>et al.</i> , 2010)
<i>CDKN1B</i> (<i>P27^{KIP1}</i>)	F 5' GTTTAATGGGAGTTTTAGTTGGAG 3' R 5' AATCAATCTTTAAATCCACCAAATAC 3'	56,7	392 bp	(Kawamata <i>et al.</i> , 2005)
<i>FZD9</i>	F 5' AGTTTGGTTAAAAATGGTGAAAT 3' R 5' ATTCTCTCCCTTCCCTTACTAC 3'	57,8	319 bp	Presente estudo
<i>GATA6</i>	F 5' TTGGAAGAGTAGTTGGAGGA 3' R 5' AATCTAAATCCTTCCCAACAAA 3'	57,8	397 bp	Presente estudo
<i>GPX3</i>	F 5' GTTTTAGGGAGTTATTAGTTTTT 3' Rext 5'GGAGAAAAAATTAGTTTT 3' RI 5' ATTTTGAGTGTGTTTTTATTT 3'	49,6	503 pb 366 pb	(Borges, 2010)
<i>HIPK2</i>	F 5' TTGTTTTTGGTTGGAAGTT 3' R 5' AAAAAATCCATATCAAAACCAA 3'	48,5	299 pb	Presente estudo
<i>HOXA11</i>	F 5' TTGAGGTGAGTTTTTTTTTTT 3' R 5' AACTAAACACATCCTCTCCTCT 3'	60,7	264 bp	Presente estudo

HOXA9	F 5' AGGGGGTTTTAGGAATATAAAA 3' R 5' ATATCACCCCAAAAAAATTTA 3'	54,2	412 bp	Presente estudo
IRAK3	F 5' TGGGTTGGATGTAGAGATTTT 3' R 5' AATTTTACAAAAACCAAAAAACATC 3'	55,4	199 bp	Presente estudo
LDB3	F 5' AAAGTTTTAGATGGAGTAGTGGG 3' R 5' CCCCTAAACAAAAATAAATTAA 3'	57,5	363 bp	Presente estudo
MAGEA1	F 5' GTTTATTTTATTTTATTTAGGTAGGATT 3' R 5' CTAATCACAAACCTCTAATTC 3'	55	350 pb	(Aparicio <i>et al.</i> , 2009)
MGMT	F 5' GTTTYGGATATGTTGGGATAG 3' R 5' CTAATCCAAAAACCCCAAC 3'	55,3	299 pb	Presente estudo
MTSS1	F 5' ATGATGGTTTGGGAAGAGGTT 3' R 5' TAACCTAATTATCAATCTTCTCCC 3'	55	338 bp	Presente estudo
PENK	F 5' AATGTTTTTTTTTGGGGTTT 3' R 5' CCCTTCACATTTTACATACATAA 3'	51,4	289 pb	Presente estudo
POU4F3	F 5' GGAGGAAGAGTGGGTTAAGTTAT 3' R 5' CAAACTACCCATTTCCAAAAC 3'	60,4	284 bp	Presente estudo
PTGS2 (COX-2)	F 5' TAGTTTTATAAAAAGGAAGGTTTTT 3' R 5' ATATCATCTATCCCTATTTAAAAAA 3'	55	338 bp	(Borges, 2010)
RPRM	F 5' GCTTTAGAAGAGCCTAGCTGCT 3' R 5' CTACTATTAACCAAAAAACAAAC 3'	55	215 pb	(Borges, 2010)
RRAD	F 5' GGGTTGTGAAAAAAGGTAGAGTT 3' R 5' AAACCTAACCAACCACTACCC 3'	61	258 bp	Presente estudo
SNAPC2	F 5' GAGAAAGTTGGGAGTAGGATTT 3' R 5' ACTCTAACCTCAAATAATCCAC 3'	57,7	234 bp	Presente estudo
TFAP2C	F 5' GGGGGATTTTGGATTTAATT 3' R 5' TTACCATCTCTTCCAAACCT 3'	53,7	325 bp	Presente estudo
TFF	F 5' ATTAGTGGAGATTATTGTTTAGA 3' R 5' AAAAAAACATACCTTACCTATCT 3'	55	255 pb	(Sasiadek <i>et al.</i> , 2004)
TNFRSF1A	F 5' GGGYGTAGTTTTATTGAGAAG 3' R 5' ATAAAAACRTACCCCRIT 3'	55,7	292 pb	Presente estudo
TP73	F 5' GTTGGGGATAGTAGGGAGTT 3' R 5' ACCCTAAACCTCCTACCTACAAC 3'	63,6	552 pb	(Kawamata <i>et al.</i> , 2005)

Legenda: F: Foward, R: Reverso, Fext: Foward externo, Rext: Reverso externo, FI:

Foward interno, RI: Reverso Interno

Análise do padrão de metilação por sequenciamento direto (*bisulfite sequencing PCR – BSP*)

Os fragmentos amplificados na PCR foram sequenciados pelo método didesoxiterminal de acordo com a metodologia descrita por Sanger *et al.* (1977). A reação de sequenciamento foi feita utilizando o kit *BigDye Terminator Cycle Sequencing Standard (Applied Biosystems)* versão 3.1 e analisada no sequenciador automático *ABI 3130 (Applied Biosystems)* (Sanger *et al.*, 1977).

Para as reações de sequenciamento foram utilizados: 1 µL de DNA amplificado (100ng/ µL), 2 µL de *Big Dye Terminator v3.1 Cycle*, 2 µL de *5X Sequencing Buffer (Applied Biosystems)*, 1 µL de iniciador (5 pM/µL) e água ultrapura em quantidade suficiente para completar o volume de 10 µL. Os parâmetros de amplificação da reação de sequenciamento foram: 95°C por 1 minuto, seguido de 25 ciclos de 95°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos cada.

Para verificar a precisão do sequenciamento BSP, foram incluídos em cada reação os DNAs controles do kit *EpiTect PCR Control DNA Set (Qiagen)*, o qual possui tanto o DNA 100% metilado quanto o DNA 100% não metilado convertidos por bissulfito como controles positivos, e o DNA não convertido não metilado como controle negativo.

Crêterios de análise do perfil de metilação

Na literatura não há um consenso em relação a valores e cr terios utilizados para considerar fragmentos como metilados ou não-metilados.

Alguns estudos consideram casos metilados aqueles em que há mais de 5% de ilhas CpG metiladas, enquanto outros, consideram valores superiores a 15% das ilhas CpG para considerar metilação positiva (Mirmohammadsadeh *et al.*, 2006; Joo *et al.*, 2010). No presente estudo, consideramos um gene hipermetilado quando o mesmo apresentar mais de 20% do total de ilhas CpGs analisadas metiladas (Ferreira *et al.*, 2015).

Hibridização genômica comparativa em arrays (aCGH) para análises da variação do número de cópias e expressão

Para o aCGH foram utilizadas as seguintes matrizes da Agilent: SurePrint G3 Cancer CGH+SNP Microarray Kit, 4x180K (Agilent), que permite a análise simultânea de polimorfismos de nucle t deo  nico (SNPs) e a análise de alterações do número de cópias (CN) no genoma; SurePrint G3 Human Gene Expression Microarray Kit 8x60K v2 (Agilent), para a análise de expressão gênica. Em todas as matrizes, o tecido normal cerebral foi usado como referência.

O processamento do aCGH consiste em hibridização, lavagem e escaneamento. A Hibridização foi feita por 48 horas a 65 C. A lavagem da matriz, importante para a eliminação de qualquer material que não tenha se ligado, será feita com o uso dos reagentes Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 1 e Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-Chip Wash Buffer 2.

A obtenção das imagens dos microarranjos foi realizada no equipamento SureScan High Resolution (Agilent Technologies). As intensidades dos fluorocromos a partir das imagens obtidas com o scanner Agilent foram extraídas com o programa Feature Extraction v10.7.3.1 (Agilent Technologies). As intensidades dos fluorocromos a partir das imagens obtidas com o *scanner* Agilent foram extraídas com o programa Feature Extraction v10.7.3.1 (Agilent Technologies). A análise final foi realizada por intermédio do software Genomic Workbench 6.9 (Agilent Technologies) usando o algoritmo estatístico ADM-2 e limiar de sensibilidade 6,7. Para a avaliação de ganhos ou perdas no número de cópias de segmentos de DNA, foram consideradas como possíveis alterações de número de cópias (copy number alteration – CNA) apenas aquelas que abrangiam no mínimo cinco oligonucle t deos consecutivos com o log2 da razão teste/referência $\geq 0,3$ ou $\leq -0,3$, respectivamente ganhos e perdas. A resolução efetiva

média resultante foi de 100 Kb. Regiões com o log2 da razão teste/referência acima de 1,2 foram consideradas ganhos de alto número de cópias (amplicons) e abaixo de -1,2 foram considerados como perdas em homozigose.

Desconsideramos em nossa análise as variações descritas por três ou mais estudos no banco de dados de variações estruturais presentes em indivíduos controle (Database of Genomic Variants - DGV; <http://projects.tcag.ca/variation/>), assim como as chamadas para os cromossomos sexuais. Utilizamos a anotação do genoma humano GRCh37/hg19 proveniente do *Genome Browser* da University of California Santa Cruz (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>).

A anotação manual dos transcritos e dos CNVs foram feitas utilizando o banco de dados *Gene Ontology* (<http://www.geneontology.org/>), KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>), *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA), *Genetic Disease Association dataset* (GAD) e *Disease Ontology* (DO).

Síntese de cDNA e qPCR (RT-qPCR)

Para a síntese de cDNA, utilizamos o kit *GoScript™ Reverse Transcription System* (Promega Corporation), seguindo as instruções do fabricante.

A PCR em tempo real (qPCR) foi realizada conforme descrito por Ferreira *et al.* (2015), utilizando o kit GoTaq® Probe qPCR Master Mix (Promega Corporation), seguindo o protocolo do fabricante. Todas as reações foram feitas em triplicatas em placas de PCR de 96 poços no equipamento CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) com volume final de 10 µL. A análise dos dados foi realizada usando o software Bio-Rad CFX Manager™ 3.1 (Bio-Rad).

Para aderir às diretrizes do MIQE (Bustin *et al.*, 2009), os níveis de expressão foram normalizados usando *GAPDH*, *TBP* e *RPL13A* em astrócitos humanos normais (NHA). A expressão gênica relativa foi calculada usando a fórmula $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (p < 0,05) (Livak e Schmittgen, 2001).

A determinação da expressão dos genes *MYC*, *ATM*, *BCL2*, *BMI1*, *CASP3*, *CDK1*, *CDKN1A*, *CDKN2A*, *CDKN2B*, *CHEK1*, *MDM2*, *p14^{ARF}* e *TP53* foi utilizando os ensaios *Taqman® Gene Expression Assays* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) (Tabela 6).

Tabela 6 | Genes alvo e *housekeeping* usados na presente tese.

Símbolo Oficial do Gene*	Nome oficial*	Ensaio (Assay ID)
<i>MYC</i>	MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor	Hs00153408_m1
<i>ATM</i>	ATM serine/threonine kinase	Hs00175892_m1
<i>BCL2</i>	BCL2, apoptosis regulator	Hs00608023_m1
<i>BMI1</i>	BMI1 proto-oncogene, polycomb ring finger	Hs00180411_m1
<i>CASP3</i>	Caspase 3	Hs00234387_m1
<i>CDK1</i>	Cyclin dependent kinase 1	Hs00938777_m1
<i>CDKN1A</i>	Cyclin dependent kinase inhibitor 1A	Hs00355782_m1
<i>CDKN2A</i>	Cyclin dependent kinase inhibitor 2A	Hs00923894_m1
<i>CDKN2B</i>	Cyclin dependent kinase inhibitor 2B	Hs00793225_m1
<i>CHEK1</i>	Checkpoint kinase 1	Hs00967506_m1
<i>MDM2</i>	MDM2 proto-oncogene	Hs00540450_s1
<i>p14^{ARF}</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	Hs99999189_m1
<i>TP53</i>	Tumor protein p53	Hs01034249_m1
<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Hs02786624_g1
<i>RPL13A</i>	Ribosomal protein L13a	Hs04194366_g1
<i>TBP</i>	TATA-box binding protein	Hs00427620_m1

* Símbolos e nomes oficiais dos genes foram baseados no comitê de nomenclatura de genes HUGO (HGNC).

Análises estatísticas

As sequências obtidas foram alinhadas no programa BioEdit 7.0.9 e analisadas nos programas BISMA (*Bisulfite Sequence DNA Methylation Analysis*) e BiQ Analyzer, com o objetivo de inferir a porcentagem de metilação da região promotora de cada gene.

Para analisar os dados de BSP, diferenças nas frequências de metilação entre os diferentes tratamentos e a associação entre a metilação da região promotora e RNAm e os tratamentos utilizados foram avaliados usando o teste de qui-quadrado.

Os valores de expressão e metilação para cada gene da via *AHR* nas linhagens celulares, antes e pós-tratamento com pisosterol, serão analisados usando o teste Exato de Fisher e *Odds Ratio*.

A associação do nível de expressão entre os genes estudados será analisada usando o teste não paramétrico de Spearman. O coeficiente de correlação (r) ≥ 0.7 indicará uma correlação forte, $r < 0.7$ e $r \geq 0.3$ indicará uma correlação moderada e $r < 0.3$ indicará uma correlação fraca.

Todas as análises estatísticas serão feitas usando o software *GraphPad Prism 5 version 5.01* (GraphPad Software, Inc., USA), onde os valores serão considerados estatisticamente significativos quando $p < 0.05$.

Pesquisa de drogas *in silico* que têm como alvos os CNVs

Potenciais drogas que têm como alvos os CNVs foram pesquisadas usando o banco de dados de Interação Droga-Gene (DGIdb, <http://dgidb.genome.wustl.edu/>) (Cotto *et al.*, 2018), que contêm vários bancos de dados de interação droga-gene comuns, incluindo o DrugBank (Wishart *et al.*, 2006), *therapeutic target database* (Zhu *et al.*, 2012) e PharmGKB (*pharmacogenetics knowledge base*) (Hewett *et al.*, 2002).

RESULTADOS

Para melhor compreensão da presente tese, os resultados foram divididos em duas partes. A primeira tratará especificamente de todos os resultados obtidos dos experimentos realizados com as linhagens de gliomas tratadas com pisosterol, e por fim, a segunda parte tratará dos resultados obtidos dos experimentos realizados com as biópsias dos pacientes diagnosticados com gliomas.

Como parte dos resultados, publiquei um artigo no periódico “*Epigenomics*” intitulado “*An update on the epigenetics of glioblastomas*”, o qual discute os recentes avanços na pesquisa da epigenética dos GBMs, envolvendo a modificação de histonas, células-tronco de GBM, metilação do DNA, expressão de RNAs não-codificantes e o uso da terapia epigenética como uma opção válida para o tratamento de GBM (Capítulo 1).

Um segundo artigo, intitulado “*Pisosterol induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis via the ATM/ATR signaling pathway in human glioma cells*” foi submetido para o periódico “*European Journal of Pharmacology*”, e estamos aguardando a decisão do editor chefe e dos revisores (Capítulo 3).

CAPÍTULO 1

AN UPDATE ON THE EPIGENETICS OF GLIOBLASTOMAS

Review

For reprint orders, please contact: reprints@futuremedicine.com

An update on the epigenetics of glioblastomas

Glioblastomas, also known as glioblastoma multiforme (GBM), are the most aggressive and malignant type of primary brain tumor in adults, exhibiting notable variability at the histopathological, genetic and epigenetic levels. Recently, epigenetic alterations have emerged as a common hallmark of many tumors, including GBM. Considering that a deeper understanding of the epigenetic modifications that occur in GBM may increase the knowledge regarding the tumorigenesis, progression and recurrence of this disease, in this review we discuss the recent major advances in GBM epigenetics research involving histone modification, glioblastoma stem cells, DNA methylation, noncoding RNAs expression, including their main alterations and the use of epigenetic therapy as a valid option for GBM treatment.

First draft submitted 11 April 2016; Accepted for publication: 6 July 2016; Published online: 2 September 2016

Keywords: astrocytomas • biomarkers • brain tumors • cancer • DNA methylation • epigenetic regulation • genetic • glioblastoma • gliomas • targeted therapy

Glioblastomas, also known as glioblastoma multiforme (GBM), are the most aggressive and malignant type of primary brain tumor in adults [1], representing up to 69% of all gliomas [2].

GBM exhibits notable variability at the histopathological level and is characterized by its propensity to infiltrate throughout the brain parenchyma, robust angiogenesis and necrogenesis, intense resistance to apoptosis and genomic instability [3].

GBMs can arise by two pathogenically distinct routes, either emerging from a pre-existing WHO grade II or III astrocytoma (secondary GBM) or, more commonly, emerging *de novo* in a fully malignant state (primary GBM) [4]. Although histologically similar, primary and secondary GBMs have different patterns of genetic and epigenetic alterations [5].

Primary GBMs affect elderly patients with a brief clinical history and are characterized by rapid progression and short survival time.

Secondary GBM occurs in approximately 5% of GBM patients, and it usually can be diagnosed with clinical (neuroimaging) or histological evidence of its evolution from a less malignant glioma. Recent evidence suggests that mutations in the metabolism-related genes *IDH1* and *IDH2* are common in secondary GBMs but are rare in primary GBM cases [6–9].

The current standard conventional treatment for both GBM entities encompasses surgical tumor resection followed by different chemotherapeutic and radiotherapeutic approaches [10], but even these aggressive treatments are not effective in controlling the disease, and the prognosis remains poor [11]. Recurrent tumors are usually treated with repeat surgery and concomitant treatment with antiangiogenic drugs, such as bevacizumab. The median survival for patients with GBM is 12–18 months [12], and the survival of older patients (>60 years of age) is typically somewhat shorter than the median.

Epigenomics



Wallax Augusto Silva Ferreira¹, Danilo do Rosário Pinheiro¹, Carlos Antonio da Costa Junior¹, Symara Rodrigues-Antunes¹, Mariana Diniz Araújo¹, Mariceli Baia Leão Barros¹, Adriana Corrêa de Souza Teixeira¹, Thamirys Aline Silva Faro¹, Rommel Rodríguez Burbano², Edivaldo Herculano Correa de Oliveira³, Maria Lúcia Harada¹ & Bárbara do Nascimento Borges^{*1}

¹Molecular Biology Laboratory, Institute of Biological Sciences, Federal University of Pará (Universidade Federal do Pará–UFPA)–Belém, Pará, Brazil

²Human Cytogenetics Laboratory, Institute of Biological Sciences, UFPA–Belém, Pará, Brazil

³Tissue Culture & Cytogenetics Laboratory, Evandro Chagas Institute (Instituto Evandro Chagas), Belém, Pará, Brazil

*Author for correspondence:
Tel.: +55 913 201 7585
Fax: +55 913 201 7585
bnborges@ufpa.br

Future
Medicine part of **fsg**

Although the classical histological classification of GBM is predominant in most studies, recent studies using gene expression profiling [13–15], DNA methylation [16,17], miRNA expression [18] or proteomics [19] have divided primary GBM into four subgroups: proneural, mesenchymal, classical and neural. However, in some of the deep molecular analyses mentioned above, some samples may show more or fewer than four subtypes.

The existence of different primary GBM subtypes may indicate that, in addition to genetic alterations, epigenetic modifications could be involved in the development and progression of each subtype [20].

Epigenetic alterations have emerged as a common hallmark of many tumors, including GBM [21]. A deeper understanding of epigenetic modifications in GBM may increase our knowledge regarding tumorigenesis, progression and recurrence. In this review, we discuss recent major advances in GBM molecular research concerning epigenetics, including the main alterations and the use of epigenetic therapy as an option for GBM treatment.

Histone acetylation/deacetylation

Chromatin constitution has become one of the most studied factors influencing DNA replication, transcription, repair and recombination in recent years. Histone proteins play essential structural and functional roles in maintaining the dynamic equilibrium between chromatin and gene regulation [22].

Core histones play structural roles in chromatin assembly and compaction by forming nucleosome. These core histones can be reversibly modified by several hundred types of modifications such as methylation, phosphorylation, acetylation, ADP ribosylation, sumoylation, ubiquitylation and deamination. All of these modifications can be found either in the amino acids constituting part of the histone core or in their amino-terminal tails [23,24], and each can directly or indirectly affect the chromatin structure, leading to alterations in DNA repair, replication and gene transcription. Moreover, numerous studies have reported that these post-translational modifications may be applied sequentially or in combination to achieve distinct functional consequences, which explains the proposal of an existing histone code [23,25–26]; however, this subject is still a matter of much debate and controversy.

Of all the post-translational modifications, histone acetylation has been the most extensively studied and appreciated [27]. Histone acetylation involves the addition of an acetyl group to the lysine residues in the tail domain of the core histones, mainly H3 and H4. This addition alters the charge of the lysine residues by weakening the electrostatic interactions between the

histone and nucleosomal DNA, linker DNA or adjacent histones and thus increasing the accessibility of DNA to the transcription machinery [28].

The acetylation of lysines at a given chromatin locus is highly dynamic and regulated by two classes of antagonistic histone-modifying enzymes, namely, histone acetyltransferases and histone deacetylases (HDACs). These enzymes add or remove acetyl groups to or from lysine residues of target histones, respectively [29]. In general, histone acetylation facilitates the ‘open’ chromatin configuration and is closely associated with active gene transcription, whereas histone deacetylation facilitates compacted chromatin and transcriptional repression [29,30]. Experimental evidence has clearly shown that this well-tuned balance between histone acetyltransferases and HDACs is a prerequisite for correct gene expression [27].

An imbalance between acetylating agents in conjunction with a gain in HDAC expression leads to gene transcription deregulation and promotes tumor development [31]. Of all of the known epigenetic modulators, HDACs occupy a central position in current research due to their association with the development of various types of tumors through different mechanisms [32], which include inactivating mutations in HDAC genes, the aberrant recruitment of HDACs to target genes and the deregulation of HDAC expression [31,33].

HDACs remove acetyl groups from ϵ -amino groups of histone lysine residues and from nonhistone proteins, such as hormone receptors, transcription factors, DNA repair enzymes, inflammation mediators, chaperone proteins and cytoskeleton proteins, causing the condensation of chromatin structure and thereby repressing gene expression [34]. Currently, HDACs are classified into two groups based on their co-enzyme requirements and sequence that are similar to yeast HDACs. These groups are classic HDACs and Sir2-related HDACs (class III HDACs or sirtuins), which are activated by Zn^{2+} and NAD^+ , respectively. Three smaller classes form the classic HDAC group: HDAC-I (Ia, Ib and Ic), HDAC-II (IIa and IIb) and HDAC-IV. Each of these consists of functional HDAC enzymes (HDAC1 to HDAC11), which are targeted by different HDAC inhibitors (HDACi) [35].

HDACi in GBM

Many HDACi have demonstrated preclinical activity against GBM cell lines and glioma models. In preclinical models, HDACs have been shown to sensitize cells to chemotherapy, to have antiproliferative activity by increasing PTEN and AKT expression, to increase apoptosis by activating the JNK pathway and reducing telomerase activity, and to sensitize cells to radiation [36].

Several laboratories have used vorinostat (suberoyl-anilide hydroxamic acid [SAHA]) *in vitro* in human and murine GBM cell lines and primary GBM explants and *in vivo* in mice. This substance is a small-molecule inhibitor of most human class I and class II HDACs that binds directly to the enzyme's active site in the presence of Zn^{2+} [37].

In vitro treatment with vorinostat induced a biologically relevant G2 cell cycle arrest in glioma cells, which was associated with an increase in p21 levels and reduced cyclin B1, and associated with a dose-dependent decrease in anchorage-independent growth. This event led to the accumulation of cells in the G2-M phase of the cell cycle, increased expression of the antiproliferative genes *p21^{WAF1}*, *p27^{KIP1}*, *DR5* and *TNFA*, and decreased levels of the progrowth genes *CDK2*, *CDK4*, cyclin D1 and cyclin D2 [38]. Furthermore, other studies showed that cells treated with vorinostat had a significant upregulation of PRC2 target genes and a downregulation of the PRC2 subunit EZH2, which is amplified and overexpressed in a variety of solid tumors [39,40]. The combination of vorinostat with tranylcypromine had a robust effect, reducing glioma stem cell viability, displaying efficacy in the U87 xenograft model and affecting *TP53* and *TP73* gene expression [41].

A Phase I study conducted by the North American Brain Tumor Consortium determined the maximum tolerated dose, safety and pharmacokinetics in patients with high-grade glioma treated with vorinostat in combination with temozolomide (TMZ). There were no apparent pharmacokinetic interactions between vorinostat and TMZ, and no dose-limiting toxicities were encountered; however, vorinostat dosing could not be increased further due to thrombocytopenia. The most common serious adverse effects were fatigue, lymphopenia, thrombocytopenia and thromboembolic events. Furthermore, vorinostat treatment resulted in the hyperacetylation of histones H3 and H4 in peripheral mononuclear cells [42].

In a Phase II trial in patients with recurrent GBM, vorinostat showed modest single-agent activity and was well tolerated. Postvorinostat treatment tumor samples showed an increase in histone acetylation, which was consistent with the expected target effect [43].

A Phase I/II trial for GBM with the oncolytic adenovirus Delta24-RGD was recently completed. Berghauer *et al.* [44] combined the HDACi SAHA, valproic acid, scriptaid, MS275 and LBH589 with Delta24-RGD in 14 distinct GBM stem cells (GSCs). In this study, scriptaid and LBH589 acted synergistically with Delta24-RGD in approximately 50% of the GSCs, increasing $\alpha v \beta 3$ integrin levels and viral infection in responding, but not nonresponding, GSCs.

This study concluded that this drug combination can differentially activate multiple cell death pathways.

Trichostatin A (TSA) is a hydroxamate with high HDAC-inhibiting activity in nanomolar concentrations, which is structurally similar to vorinostat and other compounds of the hydroxamate group (belinostat, panobinostat and dacinostat) [45]. TSA can significantly reduce proliferation rates and can activate apoptosis in human GBM cell lines [46,47]. *In vitro* treatment of GBM cells with TSA results in an upregulation of the natural killer group-2 member-D (NKG2D) ligand major histocompatibility complex class I-related chain (MIC)-A and the UL16-binding protein (ULBP)-2 at both the mRNA and protein levels, rendering them susceptible to NK-cell-mediated lysis [48].

Another strategy for GBM therapy is to stimulate the (re)expression of ligands of NK-cell-stimulatory receptors. An effective antitumor immune response depends on the interaction between the activating receptor NKG2D, which is expressed on NK, CD8+ and $\gamma \delta$ T cells, and its ligands (NKG2DLs) on the surface of target cells, including MHC class I related chain A and B MICA/B and multiple UL16-binding proteins (ULBP1-4). NKG2DLs are upregulated by cells, including malignant cells, in response to stress. Through NKG2D, NK cells prevent the growth of malignant cells expressing NKG2DLs, and the blockade of NKG2D impairs this process [49]. Finally, HDACs enhance the NK cell-mediated lysis of tumor cells and reduce tumor growth *in vivo* [50]. Numerous studies have demonstrated that a variety of HDACi induce the expression of NKG2DLs in tumor cells, facilitating their recognition and destruction by cytotoxic lymphocytes [51].

Phenylbutyrate (PBA) is an HDACi that is known for inducing differentiation, cell cycle arrest and apoptosis in various cancer cells. Using two GBM cell lines (LN-229 and LN-18), Kusaczuk *et al.* [52] found that LN-18 cells were PBA-insensitive, even at high concentrations of PBA, whereas in LN-229 cells, 5 and 15 mmol/l PBA inhibited cell growth and proliferation, mainly by causing prominent changes in cell morphology and promoting S- and G2/M-dependent cell cycle arrest. Additionally, PBA upregulated the expression of *p21^{WAF1}* and downregulated the expression of the antiapoptotic genes *Bcl-2*/*Bcl-X L*.

Recently, Hazane-Puch *et al.* [53] demonstrated that the compound sodium selenite exhibited interesting dose- and time-dependent antitumor properties in GBM cells, which resulted in a decrease in HDAC activity, blocking cell proliferation and cell cycle at the G2 phase, triggering caspase-3-dependent apoptotic cell death and reducing MMP2 activity.

Currently, only two HDACi have been approved by the US FDA, SAHA (Vorinostat, ZolinzaTM) and

FK228 (Romidepsin, Istodax™), with many others at various stages of testing. These clinical validations have sustained a wave of research efforts aimed at synthesizing naturally occurring HDACi, synthesizing new synthetic HDACi compounds, resolving the crystal structures of various isoforms of HDAC, determining structure–activity relationships in terms of HDAC inhibition potency, isoform selectivity and/or anticancer activity and evaluating HDACi in the clinic as both standalone and combination anticancer therapies [54].

The use of HDACi as novel therapeutic agents has shown great promise in a variety of diseases, suggesting the need for further research to develop therapeutic agents for clinical trials [34].

Histone methylation in GBM

Together with histone acetylation, histone methylation is one of the most important and well-studied mechanisms of histone modification. Unlike acetylation, histone methylation does not alter the charge of the histone protein, and the best characterized sites of histone methylation occur on the side chains of lysine and arginine (R). Lysine residues may be mono-, di- or tri-methylated, whereas R residues may be mono- or symmetrically or asymmetrically di-methylated [55].

All of the histone residues can be methylated; however, some of them are targeted more frequently than others. Commonly methylated sites are H3K4, H3K9, H3K27, H3K36, H3K79 and H4K20 [55–57]. Furthermore, H3K4 met and H3K4 me3 are associated with both active enhancers and genes, respectively [58,59].

Histone residue methylation is mediated by a set of enzymes called histone methyltransferases, whereas demethylation is performed by histone demethylases. Both enzymes appear to have specific targets and catalyze specific degrees of methylation and demethylation at lysine and arginine sites [20,60–61].

Currently, little is known about the mechanisms that deregulate histone methylation in GBM. However, GBM is characterized by recurrent H3F3A mutations at or near critical regulatory histone residues, mainly affecting two critical amino acids (K27 and G34) on the amino-terminal tail of histone H3.3, which consequently reprograms the epigenetic landscape and gene expression [62,63]. Of those, K27M mutants resulted in a significant decrease of EZH2 (a catalytic member of PRC2) enzymatic activity and a global DNA hypomethylation through inhibition of SET-domain enzymes [64–66]. It is known that PRC2 is a key mediator of tumor cell plasticity, cell proliferation and invasiveness and a PRC2-targeted therapy may be a new paradigm for glioblastoma treatment [67,68].

Alterations on the methylation pattern of R residues are catalyzed by a family of proteins known as protein

arginine methyltransferases (PRMT) that covalently modify both histone and nonhistone proteins that are critical to the maintenance of several cellular regulatory networks [69,70]. Of those, PRMT5, which leads to symmetric dimethylation of histone proteins H3 (S2Me-H4R3) and H4 (S2Me-H3R8), is the most studied in GBM as its expression increases during malignant progression as well as the proliferation rate, survival and migratory capacity of GBM cells [70,71]. Recently, it was demonstrated that this PRMT5 overexpression in glioblastomas may be triggered by c-Myc as this protein recruits PRMT5 and its co-factor Methylosome Protein 50 (MEP50), inducing H4R3 symmetric dimethylation [72].

Mutations in other histone-modifying methylation enzymes have been identified in GBM, such as the histone demethylases JMJD1A and JMJD1B, as well as the histone methyltransferases SET7, SETD7, MLL, MLL4 and MBD1 [60].

Histone methylation and demethylation have central role in drug resistance due to their influence in many aspects of cell physiology and pathology [73]. Lysine histone demethylases (KDMs) are a complex class of proteins, subdivided into amine oxidase (lysine-specific demethylase 1/2) and the Jumonji domain-containing protein family. They are involved in many diseases, and some of them can act as putative oncogenes on tumor suppressor genes, determining the response to anticancer drugs [74]. Banelli *et al.* [73] evaluated the role of histone demethylase *KDM5A* in the resistance of GBM cells to TMZ, and showed that *KDM5A* is transiently expressed at high levels not only in drug resistant cells derived from a human GBM cell line but also in GBM cancer stem cells (CSC) primary cultures derived from human tumors. Additionally, the authors suggested that the high expression of *KDM5A* may be related to the intrinsic high resistance to therapy of GBM.

Furthermore, the histone demethylase Jumonji D3 (JMJD3), a H3K27 me3 demethylase, is induced during the differentiation of GSCs, promoting a differentiation-like phenotype via chromatin-dependent (INK4A/ARF locus activation) and chromatin-independent (nuclear p53 protein stabilization) mechanisms, indicating that the deregulation of JMJD3 may contribute to gliomagenesis via the inhibition of the p53 pathway, which results in the inhibition of terminal differentiation [75]. Overexpressing wild-type JMJD3 (JMJD3wt) activates senescence-associated secretory phenotype (SASP)-associated genes, enhances senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal) activity and induces nuclear blebbing, which contributes to tumorigenesis and tumor progression [76].

Liu *et al.* [77] used a recursive partitioning analysis to demonstrate that multiple modifications of histones

might predict a better prognosis for glioma patients. Using recursive partitioning analysis, the authors divided GBM patients into primary and secondary GBM groups, with the former having a better prognosis. The trimethylation of H4K20 significantly influenced the survival of the secondary GBM patients, with better survival for patients whose tumors expressed higher levels ($\geq 75\%$ of tumor cells) of H4K20triMe. The type of approach adopted by this study highlights the prognostic value of epigenetic changes involving multiple histone modifications, which may help to identify glioma patients with different prognoses and to select patients for optimal adjuvant treatments.

Another common feature of GBM is the depletion of the lysine-specific demethylase 1, which increases the trimethylation of histone 3 lysine 4 at the *MYC* locus, thereby elevating *MYC* expression. In turn, *MYC* regulates *OLIG2*, *SRY*, *SOX2* and *POU3F2*, a core set of transcription factors that are required for reprogramming GBM cells into stem-like states [78].

It is worth mentioning that some drugs have been reported to affect the methylation state of histones in GBM. One example of these drugs is the common PI3K inhibitor known as LY294002. In GBM cell lines, LY294002 reduces the expression of *HOXA9* and H3K4 trimethylation (a mark of active chromatin), and it concomitantly increases H3K27 trimethylation (a mark of repressive chromatin) in three different regions near the *HOXA9* promoter [79].

DNA hypermethylation in GBM

Our understanding of the epigenome has improved substantially in the last decade. Epigenetic biomarkers, such as DNA methylation, and their effects on tumor biology have been analyzed in a number of GBM studies [80–83].

In recent years, GBM has been subjected to the most extensive genomic profiling of any type of tumor, and a great number of DNA methylation markers have been identified through the use of target candidate gene and whole-genome approaches [84,85].

DNA hypermethylation refers mainly to an increase in methylation at specific sites that are unmethylated under normal conditions, and it is typically present at imprinted genes, repetitive elements and in genes on the inactivated X chromosome in females [86,87]. Silencing by DNA hypermethylation in GBM affects genes that are associated with tumor suppression [88,89], DNA repair [90], cell cycle regulation [91], apoptosis [92,93], invasion [94,95] and migration (Table 1) [96].

One well-studied example of a hypermethylated gene in GBM with a substantial impact on clinical practice is the DNA repair gene *MGMT*, located on chromosome 10q26 and encoding a DNA repair pro-

tein that removes alkyl adducts from the O6-position of guanine, which are commonly produced by chemotherapeutic alkylating agents [105,106].

The methylation status of the *MGMT* promoter has been identified as a strong and independent predictive factor for therapy response, and it is associated with significantly longer survival in GBM patients undergoing chemotherapy with alkylating agents [107,108]. This gene is methylated at a high frequency in GBM patients [109,110] and is present in approximately 40–68% of GBM cases [111,112]. However, a higher frequency of *MGMT* hypermethylation is more frequently associated with secondary GBMs and with females [5,91,113]. A recent study by Brennan *et al.* [114], which described the landscape of somatic genomic alterations based on a multidimensional and comprehensive characterization of more than 500 GBMs, provided evidence that *MGMT* DNA methylation is a predictive biomarker only in the classical subtype of GBM but not in other subtypes.

Another important factor that has been described as an independent significant negative prognostic factor for survival in GBM is advanced age [115–117]. However, the reason why senescence is such a negative prognostic factor remains unclear. Recently, Bozdag *et al.* [103] integrated gene expression, exon expression, microRNA expression, copy number alteration, SNP, whole exome sequence and DNA methylation datasets of a cohort of GBM patients into The Cancer Genome Atlas (TCGA) project to search for age-specific signatures at the transcriptional, genetic, and epigenetic levels. They found major age-specific signatures at all levels, including age-specific hypermethylation in polycomb group protein target genes and the upregulation of angiogenesis-related genes in older GBM patients. These age-specific differences in GBM, which are independent of molecular subtypes, may partly explain the preferential effects of antiangiogenic agents in older GBM patients and may allow clinicians to develop age-specific therapeutic clinical trials for GBM.

High-throughput platforms for genome-wide DNA methylation analyses have contributed to the establishment of the methylome from large series of patient samples [118]. Pattern analyses of respective datasets have identified CpG island methylator phenotypes (CIMPs), which are characterized by large numbers of methylated CpG islands in a tumor. CIMP was first described in colorectal cancers [119–121] and was subsequently associated with other cancers, such as gastric cancer [122], non-small-cell lung cancer [123], liver cancer [118], pancreatic cancer [124], ovarian cancer [125], leukemias [126] and gliomas [16].

A subset of GBM tumors exhibits a hypermethylation phenotype, which was named the glioma-CpG

Table 1. Genes that are abnormally hypermethylated in glioblastoma.

Genes	Process or function	Ref.
<i>MGMT</i>	DNA repair	[97]
<i>RB1, HIC1, CDKN2A, p14, p16INK4, PTEN, RRP22, TP53, TES, BEX1, BEX2, BLU, TUSC3, BTG4, PRKCDP</i>	Tumor suppressors	[2,81,97–102]
<i>EMP3, DLX5, HEX, TENC1, ATP8A2, BNC1, VHL, TSPYL5</i>	Cell proliferation	[80,103]
<i>CNTNAP3, ITGA8, SLIT2</i>	Cell adhesion	[103]
<i>VAMP5, ADRA1D, TYMP, BOLL</i>	Cell differentiation	[103]
<i>RASGEF1A, BARHL2</i>	Cell migration	[103]
<i>MYO1B, ESPN</i>	Cell locomotion	[103]
<i>RASFF1A, CASP8, TNFRSF10A, TMS1, PRKCB1, BCL2, DAPK1, DR4, GATA6, CASP2</i>	Apoptosis	[81,97,100,103]
<i>SLC25A21, SLC13A5, AP3 M2, TSCOT, CHMP4C, ZP3</i>	Cellular transport	[103,104]
<i>SOC1, SOCS2, SOCS3</i>	JAK–STAT cascade	[97]
<i>VRK2, ADRB3</i>	MAPK cascade	[103]
<i>DLK1, EGFL9</i>	Notch signaling pathway	[103]
<i>SFRP1, SFRP2, NKD2, FZD6, FZD9, GATA4, NDRG2</i>	WNT signaling pathway	[103]
<i>CXCL6, RFX1, ADCY5, HLA-A, CXCL6, CD81</i>	Immune response	[103]
<i>EBPL</i>	Sterol metabolic process	[103]
<i>GSTM5</i>	Glutathione metabolic process	[104]
<i>ME1</i>	Cellular lipid metabolic process	[104]
<i>FAAH</i>	Fatty acid catabolic process	[104]
<i>PCSK6</i>	Glycoprotein metabolic process	[103]
<i>CYB5R3</i>	Vitamin metabolic process	[103]
<i>SULT1A1</i>	Estrogen metabolic process	[103]
<i>MEST</i>	Regulation of lipid storage	[100]
<i>NPTX2</i>	Synaptic transmission	[103]
<i>ABO</i>	Protein glycosylation	[103]
<i>CDKL2, RASGRF1</i>	Signal transduction	[103]
<i>DDX24, DDX43</i>	RNA metabolic process	[103]
<i>RUNX3, HOXD11, HOXA9, HOXA11, FERD3 L, SNAI1, NCOA2, FHIT</i>	Regulation of transcription	[103,100]
<i>DIRAS3</i>	Regulation of gene expression	[103]
<i>THBD, CD59, CD47</i>	Blood coagulation	[103]
<i>CMTM8</i>	Chemotaxis	[103]
<i>ACTL6B, BMP8A, FBN2, FOXC1, FOXE3, GCM2 GDA, GPR6, KCNC4, KIAA0980, KLF14, MLNR, NEF3, NPTX2, PENK, SFRP1, SLC10A4</i>	Polycomb group protein target genes	[103]

island methylator phenotype (G-CIMP) by TCGA [16]. Noushmehr *et al.* [16] describe two distinct subgroups defined as G-CIMP positive and G-CIMP negative. G-CIMP-positive GBMs belong to the proneural subgroup, and are strongly associated with *IDH1* mutations and younger patients with an improved prognosis. Furthermore, G-CIMP tumors also show a relative lack of the copy number variation commonly observed in GBM, including EGFR amplification, gain of chromosome 7 and loss of chromosome 10. The authors also

suggest that the highly concerted nature of G-CIMP methylation may be caused by a defect in a transacting factor that is normally involved in protecting a defined subset of CpG island promoters from DNA methylation. Loss of function of this factor would result in widespread changes in concerted DNA methylation.

The molecular basis of G-CIMP was confirmed by Turcan *et al.* [127], who showed that a mutation in the *IDH1* gene could lead to G-CIMP by altering specific histone marks, inducing extensive DNA hypermeth-

ylation, and reshaping the methylome. Furthermore, they showed that these epigenomic alterations resulted from mutant *IDH1* activation of key gene expression programs and were characteristic of G-CIMP-positive proneural GBM but not other GBMs.

In a recent study, Mazar *et al.* [128] analyzed the methylomes of 19 clinically annotated grade II gliomas and their rates of recurrence. From the data obtained, they confirmed that all of the initial tumors had methylation patterns that were consistent with G-CIMP and that these tumors always maintained such patterns at recurrence, highlighting the fact that these epigenetic changes arise very early and are potentially tumor-initiating.

Unfortunately, few clinical or even research laboratories generate whole-genome methylation data on tumor specimens, which impedes the identification of G-CIMP tumors. As a less expensive alternative, Bayzan *et al.* [129] established a method to classify GBM samples into G-CIMP subtypes based on gene-expression data. They observed a high concordance between the TCGA G-CIMP groups and the Neuro-Oncology Branch. This result suggests that the identification of G-CIMP will have significant clinical relevance for clinical trial design stratification, patient prognosis and potential treatment in the future.

Regarding prognosis, several research groups have recently begun performing genome-wide methylation profiling studies in gliomas, and G-CIMP+ tumors are considered prognostically favorable [130]. Additionally, through a methylation profile analysis, Kloosterhof *et al.* [17] identified at least three prognostically relevant subtypes of glioma that can aid diagnosis and potentially guide treatment for patients.

DNA hypomethylation in GBM

Genome-wide hypomethylation is a hallmark of many cancers and is thought to contribute to tumorigenesis independently of CpG island hypermethylation [131,132]. The hypomethylation process generally arises earlier and is associated with chromosomal instability and loss of imprinting. In several tumors including glioblastoma, the hypomethylation mostly occurs in repetitive elements localized in satellite sequences or pericentromeric regions, thus resulting in genomic instability and the reactivation of transposable elements [100,131]. Until now, little is known about if hypomethylation induce the activation of genes silenced in cancer cells that have hypermethylated promoters.

Although an increasing interest about aberrant DNA methylation in gliomas exists, the epigenetic profile of GBM tumors remains only partially devised [100,133]. Genome-wide hypomethylation occurs at a high frequency (~80%) in primary GBMs, affecting up to an

estimated 10 million CpG dinucleotides per tumor cell, leading to tumor development through activation of oncogenes, loss of imprinting or the promotion of genomic instability [100,131].

The GBMs have a remarkable hypomethylation of the tandem repeat satellite (Sat2) at the pericentromeric DNA on chromosomes 1, 9 and 16, and moderate hypomethylation at the subtelomeric repeat sequence D4Z4 on chromosomes 4q and 10q, and at interspersed Alu elements [131]. Furthermore, recurring gene body promoter hypomethylation events, along with histone H3K4 trimethylation, alter the transcriptional landscape of GBM through the activation of a limited number of normally silenced promoters within gene bodies, leading to the expression of an oncogenic protein in at least one case [66].

According to the results of Lai *et al.* [134], which validated a total of 1548 CpG sites (1307 genes) that were differentially methylated in GBM compared with controls, GBM can be classified in five tumor methylation classes. Furthermore, they demonstrated that there were more than twice as many hypomethylated genes as hypermethylated ones. The most differentially hypomethylated genes found in this study are presented in Table 2.

Moreover, regional hypomethylation at single-copy loci in GBM is associated with the activation of some tumor-associated genes, such as *MAGE1* [135], *IGF2* [136], *Rab27b* [137], *F10* [138], *POTEH* [139], *Sox2* [140], *OCT4* [141] and *CPEB1* [142].

miRNA in glioblastoma

miRNAs represent one of the largest families of genes, corresponding to ~1% of the entire genome, and more than a third of human genes are regulated by miRNAs [143]. As a new layer of gene-regulation mechanism, miRNA have diverse functions, including the influence on cellular differentiation, proliferation and apoptosis and organogenesis. A single miRNA may bind and regulate different mRNAs and, conversely, a single mRNA can be controlled by several miRNAs, forming a complex regulatory network [144,145].

Research into miRNAs is becoming increasingly important because miRNAs play important roles in cancer development [146]. Moreover, problems in miRNA processing may increase cell transformation and tumorigenesis [147,148], showing that a global reduction in miRNA expression occurs in several tumor types compared with normal tissue [149].

The location of miRNAs at fragile sites of the genome provides evidence for the etiological role of miRNAs in tumor formation. miRNAs are usually negative regulators of gene expression, and any change in their expression can be tumorigenic, depending on

Table 2. The ten most differentially hypomethylated genes in glioblastoma multiforme.

Gene symbol	Genomic location	Biological function
<i>LTC4S</i>	5q35.3	Production of leukotrienes from arachidonic acid
<i>TNFRSF1A</i>	12p13.31	Receptor for TNF; activation of NF- κ B
<i>TMEM71</i>	8q24.22	Transmembrane protein localized to the ER with unknown function
<i>CCL8</i>	17q12	Mediates chemotactic activity for leukocytes
<i>PYGM</i>	11q13.1	Enzyme involved in glycogenolysis
<i>PDCD1 LG2</i>	9p24.1	Regulates activated T-cell functions
<i>PPP1R3B</i>	8p23.1	Regulates glycogen synthesis
<i>GUCY2D</i>	17p13.1	Membrane guanylyl cyclases
<i>MMP14</i>	14q11.2	Activates MMP2 and mediates oncogenesis
<i>WNT4</i>	1p36.12	Involved in inflammation, development and oncogenesis

Data taken with permission from [129].

whether a tumor suppressor or an oncogene is affected. For example, an increase in a miRNA that targets a tumor suppressor gene reduces the miRNA's protective function. In contrast, a reduction in the accumulation of a miRNA that targets a proto-oncogene can lead to excessive production of an oncogenic protein and tumorigenesis [150]. In addition to genomic deletions and transcriptional regulation that change a single miRNA or small groups of miRNAs, errors in the miRNA processing machinery tend to lead to larger changes at a larger scale [148].

Several studies have performed large-scale miRNA expression analyses reporting both the upregulation and downregulation of some miRNAs in patient GBM tumour tissue compared with normal brain tissue [151–162]. However, a specific GBM miRNA expression signature is not yet well established, due to inconsistencies in the reported subset of either miRNAs that are up or down-regulated [151].

The most common overexpressed miRNAs in GBM are miR-9, miR-10a, miR-10b, miR-15b, miR-17-5p, miR-25, miR-21, miR-25, miR-26a, miR-92b, miR-93, miR-106a, miR-106b, miR-130a, miR-130b, miR-155, miR-182, miR-196b, miR-210, miR-221/222, miR-296 and miR-451 while the most common downregulated are miR-7, miR-34a, miR-124, miR-125b, miR-128, miR-129-5p, miR-132, miR-136, miR-137, miR-139-5p, miR-146b, miR-153, miR-181, miR-184, miR-218, miR-323, miR-326, miR-328 and miR-495 [163,164].

Another focus of current studies has been in the identification of specific miRNA or miRNA profiles that predict survival in GBM. Srinivasan *et al.* [165] using the miRNA expression data of GBM patients (n = 222) derived from TCGA dataset identified 7-miRNA that were overexpressed (miR-31, miR-146b, miR-148a, miR-193a, miR-200, miR-221, miR-222)

and 3-miRNA that were underexpressed (miR-17-5p, miR-20a, miR-106a) that could independently predict GBM patient survival. Another study using a cohort of Chinese patients with primary GBM (n = 82), identified 5-miRNA signature (miR-181d, miR-518b, miR-524-5p, miR-566, miR-1227) as an independent risk predictor that identified patients who had a high risk of unfavorable outcome, demonstrating its potential for personalizing tumor management [166]. Despite that, the scientific community has not extensively investigated the prognostic miRNA signatures of GBM.

The rationale of using miRNAs as therapeutic targets is based on the fact these molecules can function as oncogenes or tumor suppressors, shedding light on the possibility of use them to reduce the tumor growth, as well as the proliferation and metastatic potential. This molecular intervention is promising for the development of an optimal, reliable, less toxic and effective personalized treatment for GBM. However, modulating a single miRNA can affect many different oncogenic pathways [167].

Until now, there are two main strategies to modulate miRNA expression in cancer: silencing an oncogenic miRNA using pharmacological agents, miRNA masking, antisense miRNA nucleotides (antagomirs) and direct targeting by miRNA sponges; overexpressing a downregulated tumor suppressor miRNA.

One of the most critical issues though is how to deliver the agent (a miRNA mimic or inhibitor) that induces strong and stable binding to specific mRNA target in a specific tissue or cell while avoiding the blood–brain barrier [168,169] and other biological hurdles, such as intravascular degradation, reticuloendothelial system trapping and tissue penetrance [170]. For this reason, RNA carriers, such as liposomes, exosomes

or engineered oncolytic herpes simplex virus, are under investigation as a possible source of effective delivery strategies approaches [171–173].

Long noncoding RNA in glioblastoma

Long noncoding RNAs (lncRNAs) are characterized as transcript noncoding RNAs with more than 200 nucleotides. Once considered as ‘garbage’ transcripts of the genome, several studies have demonstrated that they assume an imperative part in gene expression and function regulations, and effectively take an interest in numerous processes in human malignancies [174]. The roles of dysregulated lncRNAs in human tumors have got significant consideration, as the expression pattern denotes the range of cancer progression and may serve as an indicator of patient outcome [175].

Although several studies have proposed that lncRNAs assume intricate and imperative roles in GBM progress and pathology, their identification as biomarkers is challenging. However, a microarray study identified several differentially expressed lncRNAs (654 upregulated and 654 downregulated) in GBM tissue when contrasted with typical brain tissue, expanding the proof that lncRNAs may assume a critical role in GBM pathogenesis [176]. Nevertheless, the exact functions in biological and disease processes have been reported for only a few lncRNAs [177,178].

Among the numerous lncRNAs linked to GBM, HOTAIR is one of the most well-studied. It is characterized as a ~2000bp lncRNA that is encoded antisense to the HOXC locus, one of the four chromosomal loci of the HOX cluster. This lncRNA participates in the control of the cell cycle in GBM, and an *in vivo* study demonstrated that its inhibition was therapeutically beneficial suggesting a possible gene therapy approach for GBM patients [179].

MALAT1, a long noncoding RNA and key positive controller of invasion, seems to assume an important role in GBM pathogenesis, as it knockdowns diminished GBM cells’ migration without any impact on proliferation [180]. On the other hand, the knockdown of lncRNA XIST, normally upregulated in GBM cells, exerted tumor suppressive functions by diminishing cell proliferation, migration and invasion as well as inducing apoptosis [181].

Thusly, clinical interpretation of lncRNAs, may help in the identification of new biomarkers in GBM, which may be helpful for RNA-based treatments in a near future of clinical oncology.

CSC of GBM

CSC also known as cancer stem-like cell, cancer-initiating cell or cancer-propagating cell [182], are an important focus in cancer research. Regarding those

CSCs found in GBM, several studies have adopted the term glioma stem cells or GBM stem cells (GSCs) [183].

GSCs were first identified by Ignatova *et al.* [184] and their presence has been confirmed in several other studies [185–190]. They can be categorized into two distinct groups: proneural and mesenchymal [191,192]. Infinite self-renewal, unlimited proliferative potential, angiogenesis, invasion and modulation of immune response, multilineage differentiation capacity, neurospheres formation and expression of neural stem cell markers (e.g., CD133, nestin, NANOG and KLF4) represent some of the specific features of GSCs [193–199]. Further, GSCs are also known to be resistant to radiotherapy and chemotherapy and have the ability to remain quiescent [200], resulting in tumor redevelopment [201–208].

GBM are thought to arise from astrocytes and their precursors, neural stem cells (NSCs) [209]. NSCs are more commonly concentrated in the subventricular zones (SVZ), playing an important role in maintaining homeostasis in the adult human brain through their ability to migrate from the SVZ to site of injury, replace endogenous cells affected by cortical injury, and to destroy migratory tumor cells [210]. Growing evidences indicates that the NSCs are involved in the origin and recurrence of GBMs [211–213] determining GBM resistance patterns to chemotherapy and radiation [203,214–215]. The key mechanism that GBM cells employ to maintain and perpetuate the tumor formation is through the release of some mitogens (PDGF, EGF and FGF-2) on the local microenvironment of the SVZ, that recruit NSCs to become CSCs. Thus, the NSC niches within the SVZ may serve as a nidus for continued GBM repopulation, which by virtue of its distance from the primary tumor may not be sufficiently treated by existing local therapies [210]. Furthermore, Lépinoux-Chambaud *et al.* [216] using NFL-TBS.40-63 peptide, which disrupts the microtubules and inhibits the proliferation of GBM cells, showed this peptide targets NSCs *in vitro* and *in vivo*, reducing the NSC self-renewal capacity and proliferation, being also associated with increased adhesion and differentiation, indicating this peptide could represent a new molecular tool to target NSCs and to develop new strategies for regenerative medicine and the treatment of GBM tumor.

The common cause for treatment failure in GBM is tumor resistance to multiple therapeutic drugs, radiotherapy and chemotherapy [203,214,217]. Recent studies have shown that GSCs are more resistant to conventional radiotherapy and chemotherapy than non-CSCs. One possible explanation is that GSCs can reduce drug uptake or expel cytotoxic drugs by increasing the expression of ATP-binding cassette

(ABC) transporters [218–220]. Bleau *et al.* [221] suggested that the PTEN/PI3K/Akt pathway could regulate ABCG2 (an ABC channel) activity in GSCs, and that the loss of PTEN or treatment with TMZ increased the GSC population. Yu *et al.* [222] found that combined treatment with TMZ and metformin (MET) synergistically inhibited GSCs self-renewal capability and partly eliminates GSCs *in vitro* and *in vivo* through downregulation of AKT-mTOR signaling pathway. Another possibility for chemoresistance of GSCs is that they may exhibit abnormalities in cell death pathways, such as overexpression of anti-apoptotic proteins or downregulation of proapoptotic factors [223]. Further efforts need to be devoted to understand the molecular mechanisms of chemoresistance in GSCs in order to develop novel and effective therapeutic approaches against GSCs [224].

Conclusion

This review summarizes the main findings regarding the epigenetic field of glioblastomas, including histone modifications, glioblastoma stem cells, DNA methylation and noncoding RNA expression. In our view, understanding this area is crucial in order to know several processes of the GBM tumorigenesis, progression and recurrence, which will allow the identification of biomarkers of diagnostic and prognostic

value. Besides, the characterization of the epigenetic alterations occurring in GBM is of great value in order to use of epigenetic therapy as a valid option for GBM treatment.

Future perspective

The comprehension of the several epigenetic mechanisms and how they interact with each other as well as with the genetic alterations will allow us to develop new strategies for GBM treatment and for diagnostic purposes. This may include the use of diagnostic biomarkers in body fluids, and the use of personalized drugs and their delivery in nanoparticles. This approach will be much less invasive, more specific and could substitute the surgery in many cases.

Financial & competing interests disclosure

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará (grant number: ICAAF 157/2014); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (grant number: 455078/2014-9); Universidade Federal do Pará. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Executive summary

- Cell lines studies and Phase II trials suggested that histone deacetylase inhibitors, such as trichostatin A and vorinostat, are promising in glioblastoma multiforme (GBM) treatment.
- Alterations on the histone methylation pattern are an important feature in GBM and influence in drug resistance.
- Several biomarkers are defined by their methylation pattern and those may be useful as predictive factors for therapy response and patient's prognosis.
- miRNAs and lncRNAs expression may be useful to predict the patient's outcome and are potential targets for RNA-based treatment.
- Glioblastoma stem cells are determinants of tumor resistance in GBM and considered as important targets for new drugs development.

References

Papers of special note have been highlighted as:

• of interest; •• of considerable interest

- 1 Adamson C, Kanu OO, Mehta AI *et al.* Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going. *Expert Opin. Investig. Drugs* 18, 1061–1083 (2009).
- 2 Wang LJ, Bai Y, Bao ZS *et al.* Hypermethylation of testis derived transcript gene promoter significantly correlates with worse outcomes in glioblastoma patients. *Chin. Med. J. (Engl.)* 126, 2062–2066 (2013).
- 3 Inda M-D-M, Bonavia R, Seoane J. Glioblastoma multiforme: a look inside its heterogeneous nature. *Cancers* 6, 226–239 (2014).
- 4 Sturm D, Bender S, Jones DTW *et al.* Paediatric and adult glioblastoma: multiform (epi)genomic culprits emerge. *Nat. Rev. Cancer* 14, 92–107 (2014).
- 5 Carén H, Pollard SM, Beck S. The good, the bad and the ugly: epigenetic mechanisms in glioblastoma. *Mol. Aspects. Med.* 34, 849–862 (2013).
- 6 Brennan CW, Verhaak RG, McKenna A *et al.* The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* 155, 462–477 (2013).
- 7 Ichimura K, Pearson DM, Kocalkowski S *et al.* IDH1 mutations are present in the majority of common adult gliomas but rare in primary glioblastomas. *Neuro Oncol.* 11, 341–347 (2009).

- 8 Yan H, Parsons DW, Jin G *et al.* *IDH1* and *IDH2* mutations in gliomas. *N. Engl. J. Med.* 360, 2248–2249 (2009).
- 9 Waitkus MS, Diplas BH, Yan H. Isocitrate dehydrogenase mutations in gliomas. *Neuro Oncol.* 18, 16–26 (2016).
- 10 Bastien JIL, Mcneill KA, Fine HA. Molecular characterizations of glioblastoma, targeted therapy, and clinical results to date. *Cancer* 121, 502–516 (2015).
- 11 Rankeillor KL, Cairns DA, Loughrey C *et al.* Methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification identifies promoter methylation events associated with survival in glioblastoma. *J. Neurooncol.* 117, 243–251 (2014).
- 12 Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults. *N. Engl. J. Med.* 359, 492–507 (2008).
- 13 Phillips HS, Kharbanda S, Chen R *et al.* Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* 9, 157–173 (2006).
- 14 Li A, Walling J, Ahn S *et al.* Unsupervised analysis of transcriptomic profiles reveals six glioma subtypes. *Cancer Res.* 69, 2091–2099 (2009).
- 15 Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E *et al.* Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in *PDGFRA*, *IDH1*, *EGFR*, and *NF1*. *Cancer Cell* 17, 98–110 (2010).
- 16 Noushmehr H, Weisenberger DJ, Diefes K *et al.* Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer Cell* 17, 510–522 (2010).
- 17 Kloosterhof NK, Rooi JJD, Kros M *et al.* Molecular subtypes of glioma identified by genome-wide methylation profiling. *Genes Chromosomes Cancer* 52, 665–674 (2013).
- 18 Kim T-M, Huang W, Park R *et al.* A developmental taxonomy of glioblastoma defined and maintained by microRNAs. *Cancer Res.* 71, 3387–3399 (2011).
- 19 Brennan C, Momota H, Hambardzumyan D *et al.* Glioblastoma subclasses can be defined by activity among signal transduction pathways and associated genomic alterations. *PLoS ONE* 4, e7752 (2009).
- 20 Maleszewska M, Kaminska B. Is glioblastoma an epigenetic malignancy? *Cancers* 5, 1120–1139 (2013).
- 21 Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell* 128, 683–692 (2007).
- **A very important revision about cancer epigenetics.**
- 22 Mariño-Ramírez L, Kann MG, Shoemaker BA, Landsman D. Histone structure and nucleosome stability. *Expert Rev. Proteomics* 2, 719–729 (2005).
- 23 Kim YZ. Altered histone modifications in gliomas. *Brain Tumor Res. Treat.* 2, 7–21 (2014).
- 24 Moreno NN, Giono LE, Botto AEC *et al.* Chromatin, DNA structure and alternative splicing. *FEBS Letters* 589, 3370–3378 (2015).
- 25 Galvani A, Thiriet C. Nucleosome dancing at the tempo of histone tail acetylation. *Genes* 6, 607–621 (2015).
- 26 Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science* 293, 1074–1080 (2001).
- 27 Parbin S, Kar S, Shilpi A *et al.* Histone deacetylases: a saga of perturbed acetylation homeostasis in cancer. *J. Histochem. Cytochem.* 62, 11–33 (2014).
- 28 Zentner GE, Henikoff S. Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 259–266 (2013).
- 29 Wang Z, Zang C, Cui K *et al.* Genome-wide mapping of HATs and HDACs reveals distinct functions in active and inactive genes. *Cell* 138, 1019–1031 (2009).
- 30 Kruhlak MJ, Hendzel MJ, Fischle W *et al.* Regulation of global acetylation in mitosis through loss of histone acetyltransferases and deacetylases from chromatin. *J. Biol. Chem.* 276, 38307–38319 (2001).
- 31 Montezuma D, Henrique RMF, Jeronimo C. Altered expression of histone deacetylases in cancer. *Crit. Rev. Oncog.* 20, 19–34 (2015).
- 32 Ropero S, Esteller M. The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. *Mol. Oncol.* 1, 19–25 (2007).
- 33 Barneda-Zahonero B, Parra M. Histone deacetylases and cancer. *Mol. Oncol.* 6, 579–589 (2012).
- 34 Tang J, Yan H, Zhuang S. Histone deacetylases as targets for treatment of multiple diseases. *Clin. Sci.* 124, 651–662 (2013).
- 35 Mohseni J, Zabidi-Hussin Z, Sasongko TH. Histone deacetylase inhibitors as potential treatment for spinal muscular atrophy. *Genet. Mol. Biol.* 36, 299–307 (2013).
- 36 Perry J, Okamoto M, Guiou M, Shirai K, Errett A, Chakravarti A. Novel therapies in glioblastoma. *Neurol. Res. Int.* 2012 1–14 (2012).
- 37 Friday BB, Anderson SK, Buckner J *et al.* Phase II trial of vorinostat in combination with bortezomib in recurrent glioblastoma: a North Central Cancer Treatment Group study. *Neuro Oncol.* 14, 215–221 (2012).
- 38 Xu J, Sampath D, Lang FF *et al.* Vorinostat modulates cell cycle regulatory proteins in glioma cells and human glioma slice cultures. *J. Neurooncol.* 105, 241–251 (2011).
- 39 Orzan F, Pellegatta S, Poliani PL *et al.* Enhancer of zeste 2 (EZH2) is up-regulated in malignant gliomas and in glioma stem-like cells. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 37, 381–394 (2011).
- 40 Xiao Y. Enhancer of zeste homolog 2: a potential target for tumor therapy. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 43, 474–477 (2011).
- 41 Singh MM, Johnson B, Venkatarayan A *et al.* Preclinical activity of combined HDAC and KDM1A inhibition in glioblastoma. *Neuro Oncol.* 17, 1463–1473 (2015).
- 42 Lee EQ, Puduvalli VK, Reid JM *et al.* Phase I study of vorinostat in combination with temozolomide in patients with high-grade gliomas: North American Brain Tumor Consortium Study 04–03. *Clin. Cancer Res.* 18, 6032–6039 (2012).
- 43 Galanis E, Jaeckle KA, Maurer MJ *et al.* Phase II trial of vorinostat in recurrent glioblastoma multiforme: a North Central Cancer Treatment Group study. *J. Clin. Oncol.* 27, 2052–2058 (2009).
- 44 Pont LMB, Kleijn A, Kloezeman JJ *et al.* The HDAC inhibitors scriptaid and LBH589 combined with the

- oncolytic virus Delta24-RGD exert enhanced anti-tumor efficacy in patient-derived glioblastoma cells. *PLoS ONE* 10, e0127058 (2015).
- 45 Dokmanovic M, Clarke C, Marks PA. Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives. *Mol. Cancer Res.* 5, 981–989 (2007).
- 46 Alvarez AA, Field M, Bushnev S et al. The effects of histone deacetylase inhibitors on glioblastoma-derived stem cells. *J. Mol. Neurosci.* 55, 7–20 (2015).
- 47 Ekström T, Almqvist P, Svechnikova I. HDAC inhibitors effectively induce cell type-specific differentiation in human glioblastoma cell lines of different origin. *Int. J. Oncol.* 32, 821–827 (2008).
- 48 Höring E, Podlech O, Silkenstedt B et al. The histone deacetylase inhibitor trichostatin A promotes apoptosis and antitumor immunity in glioblastoma cells. *Anticancer Res.* 33, 1351–1360 (2013).
- 49 Eisele G, Wischhusen J, Mittelbronn M et al. TGF-beta and metalloproteinases differentially suppress NKG2D ligand surface expression on malignant glioma cells. *Brain* 129, 2416–2425 (2006).
- 50 Armeanu S, Bitzer M, Lauer UM et al. Natural killer cell-mediated lysis of hepatoma cells via specific induction of NKG2D ligands by the histone deacetylase inhibitor sodium valproate. *Cancer Res.* 65, 6321–6329 (2005).
- 51 Adamopoulou E, Naumann U. HDAC inhibitors and their potential applications to glioblastoma therapy. *Oncoimmunology* 2, e25219 (2013).
- 52 Kusaczuk M, Kręćkowski R, Bartoszewicz M et al. Phenylbutyrate – a pan-HDAC inhibitor – suppresses proliferation of glioblastoma LN-229 cell line. *Tumour Biol.* 1–12 (2015).
- 53 Hazane-Puch F, Arnaud J, Trocmé C et al. Sodium selenite decreased HDAC activity, cell proliferation and induced apoptosis in three human glioblastoma cells. *Anticancer Agents Med. Chem.* 16, 490–500 (2016).
- 54 Gryder BE, Sodji QH, Oyeler AK. Targeted cancer therapy: giving histone deacetylase inhibitors all they need to succeed. *Future Med. Chem.* 4, 505–524 (2012).
- 55 Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 21, 381–395 (2011).
- 56 Cheung P, Lau P. Epigenetic regulation by histone methylation and histone variants. *Mol. Endocrinol.* 19, 563–573 (2005).
- 57 Kooistra SM, Helin K. Molecular mechanisms and potential functions of histone demethylases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 297–311 (2012).
- 58 Creighton MP, Cheng AW, Welstead GG et al. Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 107, 21931–21936 (2010).
- 59 Liang G, Lin JC, Wei V et al. Distinct localization of histone H3 acetylation and H3-K4 methylation to the transcription start sites in the human genome. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 101, 7357–7362 (2004).
- 60 Parsons DW, Jones S, Zhang X et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 321, 1807–1812 (2008).
- 61 Black JC, Van Rechem C, Whetstone JR. Histone lysine methylation dynamics: establishment, regulation, and biological impact. *Mol. Cell* 48, 491–507 (2012).
- 62 Chan KM, Fang D, Gan H et al. The histone H3.3K27M mutation in pediatric glioma reprograms H3K27 methylation and gene expression. *Genes Dev.* 27, 985–990 (2013).
- 63 Sturm D, Witt H, Hovestadt V et al. Hotspot mutations in *H3F3A* and *IDH1* define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma. *Cancer Cell* 22, 425–437 (2012).
- 64 Bender S, Tang Y, Lindroth AM et al. Reduced H3K27me3 and DNA hypomethylation are major drivers of gene expression in K27M mutant pediatric high-grade gliomas. *Cancer Cell* 24, 660–672 (2013).
- 65 Lewis PW, Müller MM, Koletsky MS et al. Inhibition of PRC2 activity by a gain-of-function H3 mutation found in pediatric glioblastoma. *Science* 340, 857–861 (2013).
- 66 Nagarajan RP, Zhang B, Bell RJ et al. Recurrent epimutations activate gene body promoters in primary glioblastoma. *Genome Res.* 24, 761–774 (2014).
- 67 Ott M, Litzenburger UM, Sahm F et al. Promotion of glioblastoma cell motility by enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) is mediated by AXL receptor kinase. *PLoS ONE* 7, e47663 (2012).
- 68 Natsume A, Ito M, Katsushima K et al. Chromatin regulator PRC2 is a key regulator of epigenetic plasticity in glioblastoma. *Cancer Res.* 73, 4559–4570 (2013).
- 69 Baldwin RM, Morettin A, Côté J. Role of PRMTs in cancer: could minor isoforms be leaving a mark? *World J. Biol. Chem.* 5, 115–129 (2014).
- 70 Yan F, Alinari L, Lustberg ME et al. Genetic validation of the protein arginine methyltransferase PRMT5 as a candidate therapeutic target in glioblastoma. *Cancer Res.* 74, 1752–1765 (2014).
- 71 Han X, Li R, Zhang W et al. Expression of PRMT5 correlates with malignant grade in gliomas and plays a pivotal role in tumor growth *in vitro*. *J. Neurooncol.* 118, 61–72 (2014).
- 72 Mongiardi MP, Savino M, Bartoli L et al. MYC and OMOMYC functionally associate with the protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5) in glioblastoma cells. *Sci. Rep.* 5, 15494 (2015).
- Describes the regulation of PRMT5 expression, one of the most altered arginine methyltransferase in glioblastoma multiforme (GBM), by MYC oncogene.
- 73 Banelli B, Carra E, Barbieri F et al. The histone demethylase KDM5A is a key factor for the resistance to temozolomide in glioblastoma. *Cell Cycle* 14, 3418–3429 (2015).
- Important paper that shows KDM5A overexpression is related with the resistance to temozolomide in GBM cells.
- 74 Cloos PA, Christensen J, Agger K et al. Erasing the methyl mark: histone demethylases at the center of cellular differentiation and disease. *Genes Dev.* 22, 1115–1140 (2008).
- 75 Ene CI, Edwards L, Riddick G et al. Histone demethylase Jumonji D3 (JMJD3) as a tumor suppressor by regulating p53 protein nuclear stabilization. *PLoS ONE* 7, e51407 (2012).

- 76 Perrigue PM, Silva ME, Warden CD *et al.* The histone demethylase Jumoni coordinates cellular senescence including secretion of neural stem cell-attracting cytokines. *Mol. Cancer Res.* 13, 636–650 (2015).
- 77 Liu BL, Cheng JX, Zhang X *et al.* Global histone modification patterns as prognostic markers to classify glioma patients. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 19, 2888–2896 (2010).
- 78 Kozono D, Li J, Nitta M *et al.* Dynamic epigenetic regulation of glioblastoma tumorigenicity through LSD1 modulation of MYC expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112, E4055–E4064 (2015).
- 79 Costa BM, Smith JS, Chen Y *et al.* Reversing *HOXA9* oncogene activation by PI3K Inhibition: epigenetic mechanism and prognostic significance in human glioblastoma. *Cancer Res.* 70, 453–462 (2010).
- 80 Alaminos M, Dávalos V, Ropero S *et al.* Emp3, a myelin-related gene located in the critical 19q13.3 region, is epigenetically silenced and exhibits features of a candidate tumor suppressor in glioma and neuroblastoma. *Cancer Res.* 65, 2565–2571 (2005).
- 81 Hesson L, Bièche I, Krex D *et al.* Frequent epigenetic inactivation of *RASSF1A* and *BLU* genes located within the critical 3p21.3 region in gliomas. *Oncogene* 23, 2408–2419 (2004).
- 82 Malzkorn B, Wolter M, Riemenschneider MJ *et al.* Unraveling the glioma epigenome: from molecular mechanisms to novel biomarkers and therapeutic targets. *Brain Pathol.* 21, 619–632 (2011).
- 83 Hyman G, Manglik V, Rousch JM *et al.* Epigenetic approaches in glioblastoma multiforme and their implication in screening and diagnosis. *Methods Mol. Biol.* 1238, 511–521 (2015).
- 84 Dunn GP, Rinne ML, Wykosky J *et al.* Emerging insights into the molecular and cellular basis of glioblastoma. *Genes Dev.* 26, 756–784 (2012).
- 85 Stratton MR, Campbell P, Futreal P. The cancer genome. *Nature* 458, 719–724 (2009).
- 86 Esteller M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* 21, 5427–5440 (2002).
- 87 Wolf SF, Jolly DJ, Lunnen KD *et al.* Methylation of the hypoxanthine phosphoribosyltransferase locus on the human X chromosome: implications for X-chromosome inactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81(9), 2806–2810 (1984).
- 88 Agnihotri S, Wolf A, Munoz DM *et al.* A GATA4-regulated tumor suppressor network represses formation of malignant human astrocytomas. *J. Exp. Med.* 208, 689–702 (2011).
- 89 Tepel M, Roerig P, Wolter M *et al.* Frequent promoter hypermethylation and transcriptional downregulation of the *NDRG2* gene at 14q11.2 in primary glioblastoma. *Int. J. Cancer* 123(9), 2080–2086 (2008).
- 90 Nakamura M, Watanabe T, Yonekawa Y *et al.* Promoter methylation of the DNA repair gene MGMT in astrocytomas is frequently associated with G:C → A:T mutations of the TP53 tumor suppressor gene. *Carcinogenesis* 22, 1715–1719 (2001).
- 91 Eoli M, Menghi F, Bruzzone MG *et al.* Methylation of O6-methylguanine DNA methyltransferase and loss of heterozygosity on 19q and/or 17p are overlapping features of secondary glioblastomas with prolonged survival. *Clin. Cancer Res.* 13, 2606–2613 (2007).
- 92 Stone AR, Bobo W, Brat DJ *et al.* Aberrant methylation and down-regulation of TMS1/ASC in human glioblastoma. *Am. J. Pathol.* 165, 1151–1161 (2004).
- 93 Kosla K, Pluciennik E, Kurzyk A *et al.* Molecular analysis of *WWOX* expression correlation with proliferation and apoptosis in glioblastoma multiforme. *J. Neurooncol.* 101, 207–213 (2011).
- 94 Waha A, Güntner S, Huang TH *et al.* Epigenetic silencing of the protocadherin family member PCDH-gamma-A11 in astrocytomas. *Neoplasia* 7, 193–199 (2005).
- 95 Lindemann C, Hackmann O, Delic S *et al.* SOCS3 promoter methylation is mutually exclusive to EGFR amplification in gliomas and promotes glioma cell invasion through *STAT3* and *FAK* activation. *Acta Neuropathol.* 122, 241–251 (2011).
- 96 Alonso MM, Diez-Valle R, Manterola L *et al.* Genetic and epigenetic modifications of Sox2 contribute to the invasive phenotype of malignant gliomas. *PLoS ONE* 6, e26740 (2011).
- 97 Dubuc AM, Mack S, Unterberger A *et al.* The epigenetics of brain tumors. *Methods in molecular biology cancer epigenetics. Methods Mol. Biol.* 863, 139–153 (2012).
- 98 Foltz G, Ryu GY, Yoon JG *et al.* Genome-wide analysis of epigenetic silencing identifies *BEX1* and *BEX2* as candidate tumor suppressor genes in malignant glioma. *Cancer Res.* 66, 6665–6674 (2006).
- 99 Laffaire J, Everhard S, Idbaih A *et al.* Methylation profiling identifies 2 groups of gliomas according to their tumorigenesis. *Neuro Oncol.* 13, 84–98 (2011).
- 100 Martinez R, Martin-Subero JI, Rohde V *et al.* A microarray-based DNA methylation study of glioblastoma multiforme. *Epigenetics* 4, 255–264 (2009).
- 101 Mueller W, Nutt CL, Ehrich M *et al.* Downregulation of *RUNX3* and *TES* by hypermethylation in glioblastoma. *Oncogene* 26, 583–593 (2007).
- 102 Schmidt N, Windmann S, Reifemberger G *et al.* DNA hypermethylation and histone modifications downregulate the candidate tumor suppressor gene *RRP22* on 22q12 in human gliomas. *Brain Pathol.* 22, 17–25 (2012).
- 103 Bozdag S, Li A, Riddick G *et al.* Age-specific signatures of glioblastoma at the genomic, genetic, and epigenetic levels. *PLoS ONE* 8, e62982 (2013).
- A paper that performed a joint analysis using genetic, epigenetic and RNA expression data in GBM, generating results that helped in a better understand of the tumor biology and treatment response in patients.
- 104 Etcheverry A, Aubry M, Tayrac MD *et al.* DNA methylation in glioblastoma: impact on gene expression and clinical outcome. *BMC Genomics* 11, 701 (2010).
- 105 McNamara MG, Sahebjam S, Mason WP. Emerging biomarkers in glioblastoma. *Cancers (Basel)* 5, 1103–1119 (2013).
- 106 Pegg AE. Repair of O(6)-alkylguanine by alkyltransferases. *Mutat. Res.* 462, 83–100 (2000).

- 107 Stupp R, Hegi ME, Mason WP *et al.* Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised Phase III study: 5 year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* 10, 459–466 (2009).
- 108 Weller M, Felsberg J, Hartmann C *et al.* Molecular predictors of progression-free and overall survival in patients with newly diagnosed glioblastoma: a prospective translational study of the German Glioma Network. *J. Clin. Oncol.* 27, 5743–5750 (2009).
- 109 Riemenschneider MJ, Hegi ME, Reifenberger G. MGMT promoter methylation in malignant gliomas. *Target Oncol.* 5, 161–165 (2010).
- 110 Ang C, Guiot MC, Ramanakumar AV *et al.* Clinical significance of molecular biomarkers in glioblastoma. *Can. J. Neurol. Sci.* 37: 625–630 (2010).
- 111 Blanc JL, Wager M, Guillhot J *et al.* Correlation of clinical features and methylation status of *MGMT* gene promoter in glioblastomas. *J. Neurooncol.* 68, 275–283 (2004).
- 112 Bleeker FE, Molenaar RJ, Leenstra S. Recent advances in the molecular understanding of glioblastoma. *J. Neurooncol.* 108, 11–27 (2012).
- 113 Zawlik I, Vaccarella S, Kita D *et al.* Promoter methylation and polymorphisms of the *MGMT* gene in glioblastomas: a population-based study. *Neuroepidemiology* 32, 21–29 (2009).
- 114 Brennan CW, Verhaak RGW, McKenna A *et al.* The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* 155, 462–477 (2013).
- 115 Buckner JC, Ballman KV, Michalak JC *et al.* Phase III trial of carmustine and cisplatin compared with carmustine alone and standard radiation therapy or accelerated radiation therapy in patients with glioblastoma multiforme: North Central Cancer Treatment Group 93-72-52 and Southwest Oncology Group 9503 Trials. *J. Clin. Oncol.* 24, 3871–2879 (2006).
- 116 Halperin EC, Herndon J, Schold SC *et al.* A Phase III randomized prospective trial of external beam radiotherapy, mitomycin C, carmustine, and 6-mercaptopurine for the treatment of adults with anaplastic glioma of the brain. CNS Cancer Consortium. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 34, 793–802 (1996).
- 117 Stewart LA. Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials. *Lancet* 359, 1011–1018 (2002).
- 118 Shen L, Ahuja N, Shen Y *et al.* DNA methylation and environmental exposures in human hepatocellular carcinoma. *J. Natl Cancer Inst.* 94, 755–761 (2002).
- 119 Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M *et al.* CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96, 8681–8686 (1999).
- 120 Hinoue T, Weisenberger DJ, Lange CP *et al.* Genome-scale analysis of aberrant DNA methylation in colorectal cancer. *Genome Res.* 22, 271–282 (2012).
- 121 Issa JP. CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 4, 988–993 (2004).
- 122 Toyota M, Ahuja N, Suzuki H *et al.* Aberrant methylation in gastric cancer associated with the CpG island methylator phenotype. *Cancer Res.* 59, 5438–5442 (1999).
- 123 Suzuki M, Shigematsu H, Iizasa T *et al.* Exclusive mutation in epidermal growth factor receptor gene, *HER-2*, and *KRAS*, and synchronous methylation of nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 106, 2200–2207 (2006).
- 124 Ueki T, Toyota M, Sohn T *et al.* Hypermethylation of multiple genes in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res.* 60, 1835–1839 (2000).
- 125 Strathdee G, Appleton K, Illand M *et al.* Primary ovarian carcinomas display multiple methylator phenotypes involving known tumor suppressor genes. *Am. J. Pathol.* 158, 1121–1127 (2001).
- 126 Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Agirre X *et al.* Lack of CpG island methylator phenotype defines a clinical subtype of T-cell acute lymphoblastic leukemia associated with good prognosis. *J. Clin. Oncol.* 23, 7043–7049 (2005).
- 127 Turcan S, Rohle D, Goenka A *et al.* *IDH1* mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature* 483, 479–483 (2012).
- 128 Mazar T, Pankov A, Johnson BE *et al.* DNA methylation and somatic mutations converge on the cell cycle and define similar evolutionary histories in brain tumors. *Cancer Cell* 28, 307–317 (2015).
- 129 Baysan M, Bozdag S, Cam MC *et al.* G-cimp status prediction of glioblastoma samples using mRNA expression data. *PLoS ONE* 7, e47839 (2012).
- 130 van den Bent MJ, Gravendeel LA, Gorlia T *et al.* A hypermethylated phenotype is a better predictor of survival than *MGMT* methylation in anaplastic oligodendroglial brain tumors: a report from EORTC study 26951. *Clin. Cancer Res.* 17, 7148–7155 (2011).
- 131 Cadieux B, Ching TT, VandenBerg SR *et al.* Genome-wide hypomethylation in human glioblastomas associated with specific copy number alteration, methylenetetrahydrofolate reductase allele status, and increased proliferation. *Cancer Res.* 66, 8469–8476 (2006).
- 132 Jackson K, Yu MC, Arakawa K *et al.* DNA hypomethylation is prevalent even in low-grade breast cancers. *Cancer Biol. Ther.* 3, 1225–1231 (2004).
- 133 Nagarajan RP, Costello JF. Epigenetic mechanisms in glioblastoma multiforme. *Semin. Cancer Biol.* 19, 188–197 (2009).
- 134 Lai RK, Chen Y, Guan X *et al.* Genome-wide methylation analyses in glioblastoma multiforme. *PLoS ONE* 9(2), e89376 (2014).
- 135 Alelu-Paz R1, Ashour N, González-Corpas A *et al.* DNA methylation, histone modifications, and signal transduction pathways: a close relationship in malignant gliomas pathophysiology. *J. Signal. Transduct.* 2012 956958 (2012).
- 136 Soroceanu L, Kharbanda S, Chen R *et al.* Identification of IGF2 signaling through phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 3 as a growth-promoting axis in glioblastoma. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 104, 3466–3471 (2007).
- 137 Wang H, Wang Y, Bao Z *et al.* Hypomethylated Rab27b is a progression-associated prognostic biomarker of glioma

- regulating MMP-9 to promote invasion. *Oncol. Rep.* 34, 1503–1509 (2015).
- 138 Liu X, Tang H, Wang Z *et al.* F10 gene hypomethylation, a putative biomarker for glioma prognosis. *J. Neurooncol.* 107, 479–485 (2012).
 - 139 Liu X, Tang H, Zhang Z *et al.* POTEH hypomethylation, a new epigenetic biomarker for glioma prognosis. *Brain Res.* 1391, 125–131 (2011).
 - 140 Alonso MM, Diez-Valle R, Manterola L *et al.* Genetic and epigenetic modifications of Sox2 contribute to the invasive phenotype of malignant gliomas. *PLoS ONE* 6, e26740 (2011).
 - 141 Shi J, Shi W, Ni L *et al.* OCT4 is epigenetically regulated by DNA hypomethylation of promoter and exon in primary gliomas. *Oncol. Rep.* 30, 201–206 (2013).
 - 142 Xiaoping L, Zhibin Y, Wenjuan L *et al.* CPEB1, a histone-modified hypomethylated gene, is regulated by miR-101 and involved in cell senescence in glioma. *Cell Death Dis.* 4, e675 (2013).
 - 143 Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 6, 376–385 (2005).
 - 144 Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120, 15–20 (2005).
 - 145 Green D, Dalmay T, Chapman T. Microguards and micromessengers of the genome. *Heredity (Edinb.)* 116(2), 125–134 (2015).
 - 146 Dews M, Homayouni A, Yu D *et al.* Augmentation of tumor angiogenesis by a MYC-activated microRNA cluster. *Nat. Genet.* 38, 1060–1065 (2006).
 - 147 Kumar MS, Lu J, Mercer KL *et al.* Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nat. Genet.* 39, 673–677 (2007).
 - 148 Ohtsuka M, Ling H, Doki Y *et al.* MicroRNA processing and human cancer. *J. Clin. Med.* 4, 1651–1667 (2015).
 - 149 Lu J, Getz G, Miska EA *et al.* MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435, 834–838 (2005).
 - 150 Somasundaram K, Rao SAM, Nawaz Z. MicroRNA (miRNA) regulation in glioma: implications in development, progression, grading, prognosis and therapy. *Molecular Targets of CNS Tumors*. InTech, 686 (2011).
 - 151 Areeb Z, Stylli SS, Koldej R, Ritchie DS *et al.* MicroRNA as potential biomarkers in glioblastoma. *J. Neurooncol.* 125, 237–248 (2015).
 - 152 Ciafre SA, Galardi S, Mangiola A *et al.* Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334, 1351–1358 (2005).
 - 153 Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res.* 65, 6029–6033 (2005).
 - 154 Silber J, Lim DA, Petritsch C *et al.* miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells. *BMC Med.* 6, 14 (2008).
 - 155 Lages E, Guttin A, El Atifi M *et al.* MicroRNA and target protein patterns reveal physiopathological features of glioma subtypes. *PLoS ONE* 6(5), e20600 (2011).
 - 156 Godlewski J, Nowicki MO, Bronisz A *et al.* Targeting of the Bmi-1 oncogene/stem cell renewal factor by microRNA-128 inhibits glioma proliferation and self-renewal. *Cancer Res.* 68, 9125–9130 (2008).
 - 157 Sasayama T, Nishihara M, Kondoh T *et al.* MicroRNA-10b is overexpressed in malignant glioma and associated with tumor invasive factors, uPAR and RhoC. *Int. J. Cancer* 125, 1407–1413 (2009).
 - 158 Hua D, Mo F, Ding D *et al.* A catalogue of glioblastoma and brain microRNAs identified by deep sequencing. *OMICS* 16, 690–699 (2012).
 - 159 Skalsky RL, Cullen BR. Reduced expression of brain-enriched microRNAs in glioblastomas permits targeted regulation of a cell death gene. *PLoS ONE* 6, e24248 (2011).
 - 160 Zhi F, Chen X, Wang S *et al.* The use of hsa-miR-21, hsa-miR-181b and hsa-miR-106a as prognostic indicators of astrocytoma. *Eur. J. Cancer* 46, 1640–1649 (2010).
 - 161 Qiu S, Lin S, Hu D *et al.* Interactions of miR-323/miR-326/miR-329 and miR-130a/miR-155/miR-210 as prognostic indicators for clinical outcome of glioblastoma patients. *J. Transl. Med.* 11:10 (2013).
 - 162 Zadran S, Remacle F, Levine R. Surprisal analysis of glioblastoma multiforme (GBM) microRNA dynamics unveils tumor specific phenotype. *PLoS ONE* 9(9), e108171(2014).
 - 163 Piwecka M, Rolle K, Wyszko E *et al.* Nucleic acid-based technologies in therapy of malignant gliomas. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 12, 1805–1822 (2011).
 - 164 Rolle K. miRNA multiplayers in glioma. From bench to bedside. *Acta Biochim. Pol.* 62, 353–365 (2015).
 - 165 Srinivasan S, Patric IR, Somasundaram K. A ten-microRNA expression signature predicts survival in glioblastoma. *PLoS ONE* 6, e17438 (2011).
 - 166 Zhang W, Zhang J, Yan W *et al.* Whole-genome microRNA expression profiling identifies a 5-microRNA signature as a prognostic biomarker in Chinese patients with primary glioblastoma multiforme. *Cancer* 119, 814–824 (2013).
 - 167 Garzon R, Marcucci G, Croce CM. Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9, 775–789 (2010).
 - 168 Gomes-da-Silva LC, Fernández Y, Abasolo I *et al.* Efficient intracellular delivery of siRNA with a safe multitargeted lipid-based nanoplateform. *Nanomedicine (Lond.)* 8, 1397–1413 (2013).
 - 169 Mizoguchi M, Guan Y, Yoshimoto K *et al.* Clinical implications of microRNAs in human glioblastoma. *Front. Oncol.* 3, 19 (2013).
 - 170 Mocellin S, Pasquali S, Pilati P. Oncomirs: from tumor biology to molecularly targeted anticancer strategies. *Mini Rev. Med. Chem.* 9, 70–80 (2009).
 - 171 Anesti AM, Simpson GR, Price T *et al.* Expression of RNA interference triggers from an oncolytic herpes simplex virus results in specific silencing in tumour cells *in vitro* and tumours *in vivo*. *BMC Cancer* 10, 486 (2010).
 - 172 Santos AO, da Silva LC, Bimbo LM *et al.* Design of peptide-targeted liposomes containing nucleic acids. *Biochim. Biophys. Acta* 1798, 433–441 (2010).

- 173 Ohno S, Takanashi M, Sudo K *et al.* Systemically injected exosomes targeted to EGFR deliver antitumor microRNA to breast cancer cells. *Mol. Ther.* 21, 185–191 (2013).
- 174 Yan Y, Zhang L, Jiang Y *et al.* LncRNA and mRNA interaction study based on transcriptome profiles reveals potential core genes in the pathogenesis of human glioblastoma multiforme. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 141, 827–838 (2014).
- 175 Prensner JR, Chinnaiyan AM. The emergence of lncRNAs in cancer biology. *Cancer Discov.* 1, 391–407 (2011).
- 176 Han L, Zhang K, Shi Z *et al.* LncRNA profile of glioblastoma reveals the potential role of lncRNAs in contributing to glioblastoma pathogenesis. *Int. J. Oncol.* 40, 2004–2012 (2012).
- 177 Cao Y, Wang P, Ning S *et al.* Identification of prognostic biomarkers in glioblastoma using a long non-coding RNA-mediated, competitive endogenous RNA network. *Oncotarget* doi:10.18632/oncotarget.9569 (2016) (Epub ahead of print).
- 178 Li Y, Wang Z, Wang Y *et al.* Identification and characterization of lncRNA mediated transcriptional dysregulation dictates lncRNA roles in glioblastoma. *Oncotarget* doi:10.18632/oncotarget.7801 (2016) (Epub ahead of print).
- 179 Zhang K, Sun X, Zhou X *et al.* Long non-coding RNA HOTAIR promotes glioblastoma cell cycle progression in an EZH2 dependent manner. *Oncotarget* 1, 537–546 (2014).
- Demonstrates how the lncRNA HOTAIR regulates the cell cycle progression in GBM.
- 180 Vassallo I, Zinn P, Lai M *et al.* WIF1 re-expression in glioblastoma inhibits migration through attenuation of non-canonical WNT signaling by downregulating the lncRNA MALAT1. *Oncogene* 35, 12–21 (2015).
- 181 Yao Y, Ma J, Xue Y *et al.* Knockdown of long non-coding RNA XIST exerts tumor-suppressive functions in human glioblastoma stem cells by up-regulating miR-152. *Cancer Lett.* 359, 75–86 (2015).
- 182 Lathia JD, Mack SC, Mulkearns-Hubert EE *et al.* Cancer stem cells in glioblastoma. *Genes Dev.* 29, 1203–1217 (2015).
- 183 Bradshaw A, Wickremsekera A, Tan ST *et al.* Cancer stem cell hierarchy in glioblastoma multiforme. *Front. Surg.* 3, 21 (2016).
- 184 Ignatova TN, Kukekov VG, Laywell ED *et al.* Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers *in vitro*. *Glia* 39, 193–206 (2002).
- 185 Singh SK, Clarke ID, Terasaki M *et al.* Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* 63, 5821–5828 (2003).
- 186 Yuan X, Curtin J, Xiong Y *et al.* Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene* 23, 9392–9400 (2004).
- 187 Beier D, Hau P, Proescholdt M *et al.* CD133 and CD133-glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res.* 67, 4010–4015 (2007).
- 188 Kelly JJP, Stechishin O, Chojnacki A *et al.* Proliferation of human glioblastoma stem cells occurs independently of exogenous mitogens. *Stem Cells* 27, 1722–1733 (2009).
- 189 Piccirillo SG, Binda E, Fiocco R *et al.* Brain cancer stem cells. *J. Mol. Med. (Berl.)* 87, 1087–1095 (2009).
- 190 Field M, Alvarez A, Bushnev S *et al.* Embryonic stem cell markers distinguishing cancer stem cells from normal human neuronal stem cell populations in malignant glioma patients. *Clin. Neurosurg.* 57, 151–159 (2010).
- 191 Bhat KP, Balasubramanian V, Vaillant B *et al.* Mesenchymal differentiation mediated by NF- κ B promotes radiation resistance in glioblastoma. *Cancer Cell* 24, 331–346 (2013).
- 192 Mao P, Joshi K, Li J *et al.* Mesenchymal glioma stem cells are maintained by activated glycolytic metabolism involving aldehyde dehydrogenase 1A3. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 110, 8644–8649 (2013).
- 193 Codrini E, Enciu A-M, Popescu I-D *et al.* Glioma stem cells and their microenvironments: providers of challenging therapeutic targets. *Stem Cells Int.* 2016, 1–20 (2016).
- 194 Singh SK, Hawkins C, Clarke ID *et al.* Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432, 396–401 (2004).
- 195 Gangemi RMR, Griffero F, Marubbi D *et al.* SOX2 silencing in glioblastoma tumor-initiating cells causes stop of proliferation and loss of tumorigenicity. *Stem Cells* 27, 40–48 (2009).
- 196 Kalkan R. Glioblastoma stem cells as a new therapeutic target for glioblastoma. *Clin. Med. Insights. Oncol.* 9, 95–103 (2015).
- 197 Olmez I, Shen W, McDonald H *et al.* Dedifferentiation of patient-derived glioblastoma multiforme cell lines results in a cancer stem cell-like state with mitogen-independent growth. *J. Cell. Mol. Med.* 19, 1262–1272 (2015).
- 198 Zhang L, Yan Y, Jiang Y *et al.* The expression of *SALL4* in patients with gliomas: high level of *SALL4* expression is correlated with poor outcome. *J. Neurooncol.* 121, 261–268 (2015).
- 199 Rahaman SO, Harbor PC, Chernova O *et al.* Inhibition of constitutively active Stat3 suppresses proliferation and induces apoptosis in glioblastoma multiforme cells. *Oncogene* 21, 8404–8413 (2002).
- 200 Li L, Bhatia R. Stem cell quiescence. *Clin. Cancer Res.* 17, 4936–4941 (2011).
- 201 Reya T, Morrison SJ, Clarke MF *et al.* Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 105–111 (2001).
- 202 Vescovi AL, Galli R, Reynolds BA. Brain tumour stem cells. *Nat. Rev. Cancer* 6, 425–436 (2006).
- 203 Bao S, Wu Q, McLendon RE *et al.* Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444, 756–760 (2006).
- 204 Rosen JM, Jordan CT. The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm. *Science* 324, 1670–1673 (2009).
- 205 Park DM, Rich JN. Biology of glioma cancer stem cells. *Mol. Cells* 28, 7–12 (2009).
- 206 Heddleston JM, Li Z, Lathia JD *et al.* Hypoxia inducible factors in cancer stem cells. *Br. J. Cancer* 102, 789–795 (2010).
- 207 Frank NY, Schatton T, Frank MH. The therapeutic promise of the cancer stem cell concept. *J. Clin. Invest.* 120, 41–50 (2010).

- 208 Kanno H, Miyake S, Nakanowatari S. Signaling pathways in glioblastoma cancer stem cells: a role of Stat3 as a potential therapeutic target. *Austin J. Cancer Clin. Res.* 2, 1030 (2015).
- 209 Jahani-Asl A, Yin H, Soleimani VD *et al.* Control of glioblastoma tumorigenesis by feed-forward cytokine signaling. *Nat. Neurosci.* 19, 798–806 (2016).
- 210 Smith AW, Mehta MP, Wernicke AG. Neural stem cells, the subventricular zone and radiotherapy: implications for treating glioblastoma. *J. Neurooncol.* 128, 207–216 (2016).
- 211 Sanai N, Alvarez-Buylla A, Berger MS. Neural stem cells and the origin of gliomas. *N. Engl. J. Med.* 353, 811–822 (2005).
- 212 Barani IJ, Benedict SH, Lin P-S. Neural stem cells: implications for the conventional radiotherapy of central nervous system malignancies. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 68, 324–333 (2007).
- 213 Kut C, Redmond KJ. New considerations in radiation treatment planning for brain tumors: neural progenitor cell-containing niches. *Semin. Radiat. Oncol.* 24, 265–272 (2014).
- 214 Wang J, Wakeman TP, Lathia JD *et al.* Notch promotes radioresistance of glioma stem cells. *Stem Cells* 28, 17–28 (2010).
- 215 Liu G, Yuan X, Zeng Z *et al.* Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133⁺ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol. Cancer* 5, 67 (2006).
- 216 Lepinoux-Chambaud C, Barreau K, Eyer J. The neurofilament-derived peptide NFL-TBS.40-63 targets neural stem cells and affects their properties. *Stem Cells Transl. Med.* 5(7), 901–913 (2016).
- 217 Seymour T, Nowak A, Kakulas F. Targeting aggressive cancer stem cells in glioblastoma. *Front. Oncol.* 5, 159 (2015).
- 218 Eramo A, Ricci-Vitiani L, Zeuner A *et al.* Chemotherapy resistance of glioblastoma stem cells. *Cell Death Differ.* 13, 1238–1241 (2006).
- 219 Xu ZY, Wang K, Li XQ *et al.* The ABCG2 transporter is a key molecular determinant of the efficacy of sonodynamic therapy with Photofrin in glioma stem-like cells. *Ultrasonics* 53, 232–238 (2013).
- 220 Li WQ, Li YM, Tao BB *et al.* Downregulation of *ABCG2* expression in glioblastoma cancer stem cells with miRNA-328 may decrease their chemoresistance. *Med. Sci. Monit.* 16, HY27–HY30 (2010).
- 221 Bleau A-M, Hambardzumyan D, Ozawa T *et al.* PTEN/PI3K/Akt pathway regulates the side population phenotype and *ABCG2* activity in glioma tumor stem-like cells. *Cell Stem Cell* 4, 226–235 (2009).
- 222 Yu Z, Zhao G, Xie G *et al.* Metformin and temozolomide act synergistically to inhibit growth of glioma cells and glioma stem cells *in vitro* and *in vivo*. *Oncotarget* 6, 32930–32943 (2015).
- 223 Shi L, Zhang S, Feng K *et al.* MicroRNA-125b-2 confers human glioblastoma stem cells resistance to temozolomide through the mitochondrial pathway of apoptosis. *Int. J. Oncol.* 40, 119–129 (2012).
- 224 Liebelt BD, Shingu T, Zhou X *et al.* Glioma stem cells: signalling, microenvironment, and therapy. *Stem Cells Int.* 2016, 7849890 (2016).

CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA E TRANSCRIPTÔMICA DA LINHAGEM AHOL1.

Caracterização genômica da linhagem *AHOL1*

A linhagem *AHOL1* (Hospital Ophir Loyola 1) foi estabelecida pelo Laboratório de Citogenética Humana da Universidade Federal do Pará, a partir de uma amostra cirúrgica de GBM secundário de paciente de 43 anos, tratado na Clínica Neurológica do Hospital Ophir Loyola (Belém, PA, Brasil) com diagnóstico histopatológico de GBM (grau IV), o qual evoluiu de um astrocitoma grau III. Apesar dessa linhagem ter sido bem estabelecida e caracterizada citogeneticamente por Pereira *et al.* (2011), até o presente momento, não havia nenhum estudo da caracterização genômica e do transcriptoma da mesma.

Para a caracterização genômica da linhagem *AHOL*, nós extraímos o DNA total de uma garrafa com a passagem 130 e utilizamos a lâmina *SurePrint G3 Cancer CGH+SNP Microarray Kit, 4x180K* (Agilent) para a análise simultânea dos SNPs e das alterações no número de cópias no genoma. A linhagem apresentou uma grande quantidade de CNVs em todo o genoma (Figura 21). Os cromossomos 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 19, X e Y foram os cromossomos os quais apresentaram as maiores CNVs (Apêndice B).

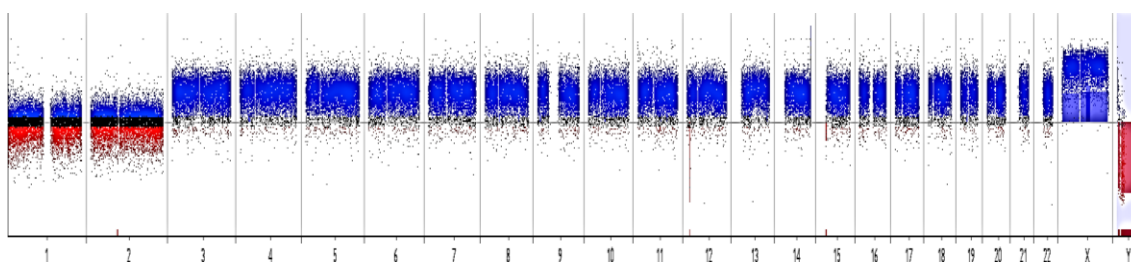


Figura 21 | Perfil dos CNVs de todos os cromossomos da linhagem *AHOL1*. Ganhos e perdas são mostrados em azul e vermelho, respectivamente.

Considerando que as amplificações e deleções gênicas são comuns no câncer e estão, respectivamente, relacionadas à ativação e inativação de genes e vias específicas (Voortman *et al.*, 2010), estudamos os cromossomos com maiores números de ganhos ($\log_2 \text{ratio} > 2.0$) e perdas ($\log_2 \text{ratio} < -2.0$) do número de cópias. A linhagem *AHOL* apresentou um maior número de ganhos no cromossomo 14 (citobanda q32.33) e um maior número de perdas no cromossomo 12 (citobanda p13.31) e cromossomo Y (citobandas p11.31-p11.2; q11.21-q12).

Ao analisarmos as principais vias gênicas alteradas decorrente das amplificações e deleções ocorridas no estabelecimento da linhagem *AHOL1*, percebemos que as amplificações influenciaram um total de 60 vias gênicas, sendo mais significante ($p <$

0.05) nas vias de degradação da putrescina III, degradação da melatonina II e a degradação de leucina (Apêndice 3). Já as deleções influenciaram apenas duas vias (IL9 e receptores de andrógenos), contudo, não houve significância.

Alterações genômicas compartilhadas entre a AHOL e outras linhagens de GBM

A análise genômica foi realizada em triplicata usando a linhagem AHOL1 e 3 linhagens comerciais de GBM (U343, U87 e 1321N1). O *heatmap* dos perfis genômicos demonstrou um padrão de semelhança entre as linhagens. O dendrograma sugeriu que o genoma da AHOL1 é mais basal em relação à todas as linhagens comerciais. Entretanto, há uma maior semelhança genômica entre AHOL1 e a 1321N1 e entre a U343 e U87 (Figura 22).

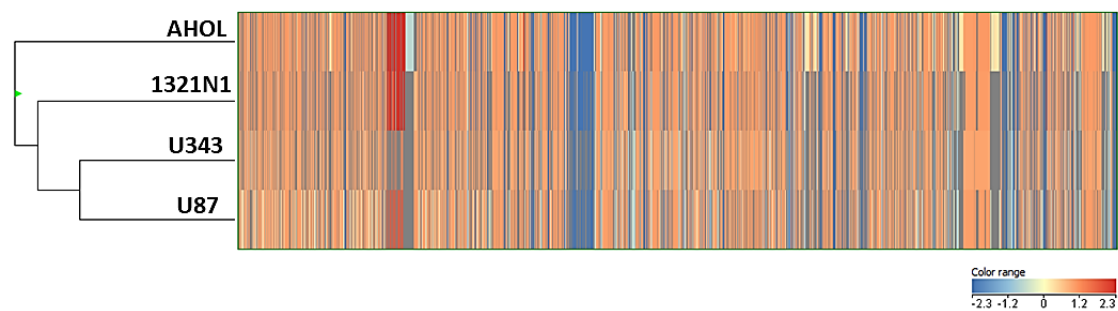


Figura 22 | *Heatmap* de todos os CNVs presentes em cada linhagem. ≥ 2.0 é considerado ganho do número de cópias (amplificação); $2.0 < \text{CNV} < 1.4$ é considerado diplóide normal e ≤ 1.4 é considerado perda do número de cópias (deleção) (Esses valores foram baseados (Zhou *et al.*, 2018).

Para identificar os CNVs que são alvos potenciais de drogas na AHOL1, utilizamos o banco de dados DGIdb. Encontramos nove genes que são alvos de drogas, incluindo o *HCRT2*, *ETV1*, *PTPRD*, *PRKX*, *STS*, *RPS6KA6*, *ZFY*, *USP9Y* e *KDM5D* (Tabela 7).

Tabela 7 | Genes alvos de drogas do DGIdb da linhagem AHOL. Cada gene foi apresentado mostrando sua localização cromossômica, citobanda, tamanho (kb), tipo de alteração encontrada na linhagem (Ganho ou deleção), drogas e o tipo de interação de cada droga.

Cromossomo	Citobanda	Tamanho(kb)	Tipo	Gene	Droga	Tipo de interação
6	p12.1	1,752	Ganho	HCRT2	SUVOREXANT SB-649868 LEMBOREXANT ALMOREXANT	Antagonista Antagonista Antagonista n/a

7	p21.3 - p21.2	3,393	Ganho	ETV1	TRAMETINIB	n/a
10	q21.1	3,864	Ganho	PTPRD	CUCURBITACIN I TEPROTUMUMAB CIXUTUMUMAB	n/a n/a n/a
X	p22.33 - p11.1	55,799	Ganho	PRKX	GSK-690693	Inibidor
			Ganho	STS	ESTRONE DANAZOL TRIPTORELIN PENICILLAMINE PROGESTERONE STS	n/a n/a n/a n/a n/a Inibidor
X	q21.1 - q21.33	13,545	Ganho	RPS6KA6	AT-9283 CHEMBL573107	Inibidor Inibidor
Y	p11.31 - p11.2	7,119	Deleção	ZFY	CHEMBL383208	n/a
Y	q11.21 - q12	45,327	Deleção	USP9Y KDM5D	TESTOSTERONE ASCORBATE	n/a n/a

Caracterização do transcriptoma da linhagem AHOL1

Para a caracterização do transcriptoma da linhagem AHOL1, utilizamos a lâmina *SurePrint G3 Human Gene Expression Microarray Kit 8x60K v2* (Agilent).

No total, identificamos 1837 genes diferencialmente expressos, considerando um Fold-Change ≥ 2 . Desses, 713 genes estavam com a expressão aumentada (*up-regulated*) e 1124 genes estavam com a expressão diminuída (*down-regulated*) (Tabela 8). A maioria dos genes que apresentaram alterações na expressão são classificados como lncRNAs.

Tabela 8 | Os 10 principais GDEs na linhagem AHOL1 (Fold-Change ≥ 2).

	Símbolo do Gene	Localização	Descrição	Fold-Change
Genes up-regulated	RFPL4AL1	Cr 19	Ret Finger Protein-like 4A-like 1	55.87
	lnc-WDR5-2	Cr 9	lncRNA	27.04
	ERICH1-AS1	Cr 8	lncRNA	26.70
	LRRN4	Cr 7	Leucine Rich Repeat Neuronal 4	21.44
	CMTR1	Cr 6	Cap Methyltransferase 1	21.38
	XLOC_l2_012743	Cr 6	lncRNA	11.53
	LINC01297	Cr 14	lncRNA	10.86
	KDM4E	Cr 11	Lysine demethylase 4E	9.08
	lnc-RBPJ-1:1	Cr 4	lncRNA	8.59

Genes down-regulated	<i>lnc-FBXO25-5:4</i>	Cr 8	lincRNA	6.21
	<i>lnc-CHIC1-2:1</i>	Cr X	lincRNA	-65.82
	<i>SHANK3</i>	Cr 22	<i>SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3</i>	-36.71
	<i>SNORD114-3</i>	Cr 14	<i>Small nucleolar RNA, C/D box 114-3</i>	-18.68
	<i>LOC403323</i>	Cr 9	<i>Uncharacterized LOC403323</i>	-12.19
	<i>ZFP57</i>	Cr 6	<i>ZFP57 zinc finger protein</i>	-10.78
	<i>CYP11A1</i>	Cr 15	<i>Cytochrome P450 family 11 subfamily A member 1</i>	-9.88
	<i>DSP</i>	Cr 6	<i>Desmoplakin</i>	-9.16
	<i>PLVAP</i>	Cr 19	<i>Plasmalemma vesicle associated protein</i>	-8.89
	<i>C4BPA</i>	Cr 1	<i>Complement component 4 binding protein alpha</i>	-8.72
	<i>lnc-ZNF100-2</i>	Cr 19	lincRNA	-7.92

Análise de enriquecimento do GO e de vias

Os transcritos foram funcionalmente anotados e classificados usando o *Gene Ontology* (GO), considerando um $p < 0.05$. A análise de enriquecimento funcional do GO para os genes com a expressão aumentada foi significativamente enriquecida para processos envolvendo a sinalização celular, transporte de íons, transcrição etc. (Tabela 9; Apêndice 4), enquanto que para os genes com a expressão diminuída foi significativamente enriquecida para processos envolvendo o transporte de íons, organização do citoesqueleto, migração celular, resposta à droga etc. (Tabela 9; Apêndice 5).

Tabela 9 | As 8 principais categorias da Ontologia Gênica (GO) dos GDEs da linhagem *AHOL1* (Fold-Change ≥ 2).

	Ontologia Gênica (GO)	Termos/Funções gênicas	Contagem de genes	p-value
Genes up-regulated	GO:0005886 GO:0005904	Membrana plasmática	101	1.16E-04
	GO:0071805 GO:0010163	Transporte transmembrana de íons de potássio	10	1.31E-04

<i>Genes down-regulated</i>	GO:0048468	Desenvolvimento celular	31	0.0390
	GO:0005576	Região extracelular	85	0.0126
	GO:0006357 GO:0006358 GO:0010551	Regulação da transcrição pela RNA polimerase II	35	0.0323
	GO:0007267	Sinalização célula-célula	30	0.0010
	GO:0023052 GO:0023046 GO:0044700	Sinalização	100	0.0018
	GO:0007154	Comunicação Celular	100	0.0032
	GO:0071944	Periferia Celular	164	0.0033
	GO:0005886 GO:0005904	Membrana plasmática	160	0.0048
	GO:0048522 GO:0051242	Regulação positiva do processo celular	130	0.0303
	GO:0006811	Transporte de íons	45	0.0417
	GO:0007010	Organização do citoesqueleto	34	0.0292
	GO:0016477	Migração celular	30	0.0204
	GO:0042493 GO:0017035	Resposta à droga	30	0.0309

Com respeito a análise de enriquecimento de vias usando o KEGG, oito vias chaves foram enriquecidas para os genes com a expressão aumentada, enquanto 6 vias foram enriquecidas significativamente para os genes com a expressão diminuída (Tabela 10).

Tabela 10 | Análise das vias dos GDEs os na linhagem *AHOL1* (Fold-Change ≥ 2).

	Vias	Número de genes em cada via	p-value
<i>up-regulated</i>	Biossíntese da trans, trans-farnesil difosfato	1	0.0262
	Biossíntese de geranylgeranildifosfato I (via mevalonato)	1	0.0391
	Via do mevalonato	1	0.0391
	IL1	2	0.0397
	4-hidroxi-2-nonenal	1	0.0414
	Glicogenólise	1	0.0311

<i>down-regulated</i>	mRNA capping	1	0.0417
	Vias no câncer	15	0.0091
	Biossíntese de prostanóides C20	2	0.0169
	Degradação de plasmalogênios	1	0.0229
	Via de Rapaport-Luebering (Via glicolítica)	1	0.0229
	Piridoxal 5 '-fosfato	1	0.0229
	Degradação da colina	1	0.0229

Alterações nos transcriptomas compartilhadas entre a AHOL e outras linhagens de GBM

Para determinar o número de genes compartilhados entre os transcriptomas das linhagens, dois diagramas de Venn foram criados: um contendo os genes com a expressão aumentada (Figura 23 A) e outro contendo genes com a expressão diminuída (Figura 23 B).

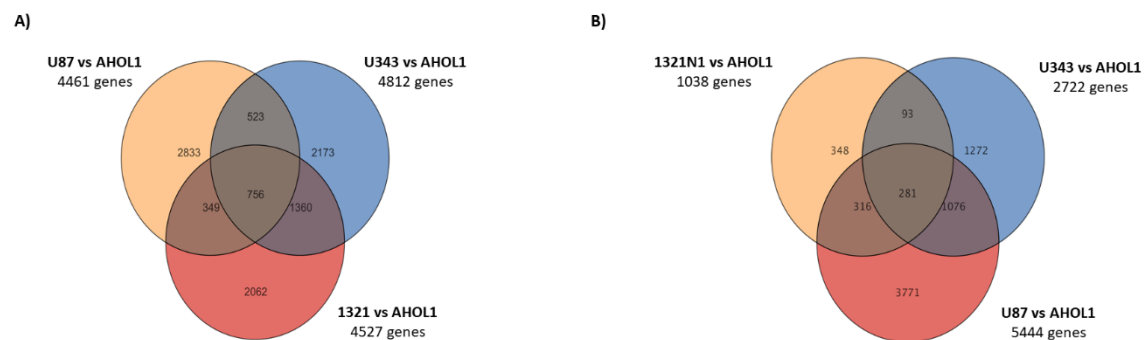


Figura 23 | Alterações comuns dos transcriptomas das linhagens AHOL1, 1321N1, U343 e U87. **A)** Diagrama de Venn para os genes com a expressão aumentada (*up-regulated*). **B)** Diagrama de Venn para os genes com a expressão diminuída (*down-regulated*). Em ambas análises, considerou-se Fold-Change ≥ 2 .

A análise dos transcriptomas evidenciou que a linhagem AHOL1 possui diversas alterações comuns as diferentes linhagens comerciais de GBM. No total, as quatro linhagens tiveram em comum 756 genes *up-regulated* e 281 genes *down-regulated*.

Análise integrada dos CNVs com o transcriptoma da linhagem *AHOL1*

Para determinar as vias cujos níveis de expressão correlacionam-se com o número de cópias, realizamos uma análise integrada dos dados de CNVs e do transcriptoma da linhagem *AHOL1*. Esta análise revelou que a expressão de 1320 vias se correlacionou com as alterações no número de cópias (Correlação de Pearson ajustada $P < 0.05$). Dessas, contudo, apenas 7 vias tiveram relações significativas (Tabela 11). Esta análise sugere que uma grande proporção dos genes expressos na *AHOL1* não são regulados por alterações no número de cópias.

Tabela 11 | Vias significativas da correlação do transcriptoma com os CNVs na linhagem *AHOL1* (Fold-Change ≥ 2).

Vias	p-value (CNV)	Genes (CNV)	p-value (Transcriptoma)	Genes (Transcriptoma)
Sinalização das Rho GTPases	0.0437	15	0.0015	64
Desregulação dos genes da família RAB	0.0204	4	0.0168	10
Transporte passivo por Aquaporinas	0.0446	3	0.0362	8
Biossíntese de D-mio-inositol (1,4,5,6) -tetraquisifosfato	0.0134	2	0.0378	3
Metabolismo de nucleotídeos	0.0077	5	0.0465	5
β -oxidação dos ácidos graxos	0.0234	3	0.0262	5
Proteínas tirosina fosfatases (PTP)	0.0012	5	0.0134	7

CAPÍTULO 3

PISOSTEROL INDUCES G2/M CELL CYCLE ARREST AND APOPTOSIS VIA THE ATM/ATR SIGNALING PATHWAY IN HUMAN GLIOMA CELLS.

Pisosterol induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis via the *ATM/ATR* signaling pathway in human glioma cells

Wallax Augusto Silva Ferreira^{1,4}; Rommel Rodriguez Burbano^{2,5,6}; Claudia do Ó Pessoa³; Maria Lúcia Harada¹; Bárbara do Nascimento Borges¹; Edivaldo Herculano Correa de Oliveira^{4,7*}.

¹ Laboratório de Biologia Molecular Francisco Mauro Salzano, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brazil.

² Laboratório de Citogenética Humana, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brazil.

³ Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

⁴ Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética, SAMAM, Instituto Evandro Chagas, Ananindeua, Pará, Brazil.

⁵ Núcleo de Pesquisas em Oncologia, Hospital Universitário João de Barros Barreto, Belém, Pará, Brazil.

⁶ Laboratório de Biologia Molecular, Hospital Ophir Loyola, Belém, Pará, Brazil.

⁷ Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Faculdade de Ciências Naturais, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brazil.

*Corresponding author

Dr. Edivaldo Herculano Correa de Oliveira

Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética, SAMAM,

Instituto Evandro Chagas, Rodovia BR-316 km 7, s/n, Levilândia, 67030-000,
Ananindeua, Pará, Brasil.

E-mail: edivaldodeoliveira@iec.pa.gov.br

Keywords: brain cancer; cell cycle; gliomas; methylation; triterpenes; DNA damage.

Abstract

Pisosterol, a triterpene derived from *Pisolithus tinctorius*, exhibits potential antitumor activity in various malignancies. However, the molecular mechanisms that mediate the pisosterol-specific effects on glioma cells remain unknown. In the present study, possible mechanisms by which pisosterol affects cell cycle progression were explored in glioma cells. Here, we reported that pisosterol markedly induced G2/M arrest and apoptosis and decreased the cell viability and proliferation potential of glioma cells in a dose-dependent manner by increasing the expression of *ATM*, *CASP3*, *CDK1*, *CDKN1A*, *CDKN2A*, *CDKN2B*, *CHEK1*, *p14ARF* and *TP53* and decreasing the expression of *MYC*, *BCL2*, *BMI1* and *MDM2*. Additionally, Pisosterol promotes apoptosis by modulating Bcl-2, caspase-3 and p53 expression. We, for the first time, confirmed that the ATM/ATR signaling pathway is a critical mechanism for G2/M arrest in pisosterol-induced glioma cell cycle arrest and suggest that this compound might be a promising anticancer candidate or chemopreventive agent for further investigation.

INTRODUCTION

Glioma is the second most common intracranial brain tumor developing in the neuroectoderm (Jovcevska et al., 2013; McNeill, 2016). It accounts for 24% of all intracranial tumors in adults (McNeill, 2016) and is characterized by high recurrence, high mortality and low cure rates (Jovcevska et al., 2013). The most malignant and aggressive glioma is glioblastoma multiforme (GBM) (Adamson et al., 2009), representing up to 69% of all gliomas (Ferreira et al., 2016; Wen and Kesari, 2008). Standard therapy options for malignant glioma include surgical tumor resection followed by several chemotherapeutic and radiotherapeutic approaches (Bastien et al., 2015), but even these aggressive treatments fail to efficiently control the disease, and therefore, the prognosis remains poor (Ferreira et al., 2016; Rankeillor et al., 2014). Since the 20th century, only three therapies have been approved for treating gliomas (Stupp et al., 2005; Stupp et al., 2017; Stupp et al., 2015; Vredenburgh et al., 2007). Hence, considerable effort has been put into exploring new agents with minimal side effects and an improved treatment efficacy (Fernandez and Sessel, 2009; Perfetti et al., 2007).

In recent years, the interest in the pharmaceutical potential of fungi has increased rapidly because several of the molecules that fungi produce are known to be bioactive (Valverde et al., 2015). The basidiomycete *Pisolithus tinctorius* is a ubiquitous ectomycorrhizal fungus that establishes successful symbiosis with a wide range of plants (Marx, 1977), and it is a model system to use in the analysis of ectomycorrhizal symbiotic interactions (Martin et al., 1999; Martin et al., 1994). Several studies report the pharmacological potential of this fungus (Ahn et al., 2007; Ameri et al., 2011; Tsantrizos et al., 1991). Regarding the production of compounds with anticancer properties, the triterpene pisosterol isolated from sporocarps (Montenegro et al., 2004) exhibits antitumor activity against a variety of human cancer cells (Burbano et al., 2009; Carvalho

Montenegro et al., 2008; Montenegro et al., 2007; Pereira et al., 2011; Silva et al., 2010), so this fungal species is considered a potential source of anticancer compounds. Nevertheless, whether pisosterol inhibits the growth and proliferation of glioma cells remains to be investigated. Moreover, the detailed mechanism underlying its effects on glioma cells remains largely unknown.

The main mechanism of action of genotoxic drugs is inhibiting enzymes that are involved in DNA replication. These drugs also induce DNA intercalation and damage, resulting in severe DNA lesions and forming double-stranded breaks (DSBs) (Annovazzi et al., 2017). In general, a cell's DNA damage response (DDR) involves DNA lesion recognition, followed by the initiation of a cellular signaling cascade to promote DNA repair, which is aided by a pause in cell-cycle progression (checkpoint activation) (Blackford and Jackson, 2017). DSBs are repaired by two mechanisms: non-homologous end joining (NHEJ) and homologous recombination (HR) (Annovazzi et al., 2017).

The protein kinase ATM (ataxia-telangiectasia mutated) is best known for its role as an apical activator responsible for regulating the cellular responses to DSBs, which include checkpoint activation, senescence, apoptosis, DNA repair and alterations in chromatin structure, transcription, and pre-mRNA splicing (Shiloh and Ziv, 2013). To achieve this, ATM, together with Rad3-related (ATR), phosphorylates the downstream targets involved in cell cycle arrest, DNA repair and apoptosis (Annovazzi et al., 2017; Blackford and Jackson, 2017). The main ATM targets include checkpoint kinase 1 (Chk1), checkpoint kinase 2 (Chk2), 53 binding protein 1 (53BP1) and H2AX histone. Furthermore, ATM determines the phosphorylation of the tumor suppressor protein p53, which in turn activates p21, leading to the cyclin-dependent inhibition of cycle progression (Annovazzi et al., 2017; Bolderson et al., 2009). If repair fails due to

extensive DNA damage, the mechanism of apoptosis is triggered (Golding et al., 2004; Kastan and Bartek, 2004).

Considering these factors and the lack of published reports on the anticancer effects of pisosterol in gliomas, in the present study, we investigated the antitumoral activity of pisosterol, isolated by us, from basidiomycetes of the *Pisolithus tinctorius* on glioma cells and explored the possible molecular mechanism underlying this effect.

MATERIAL AND METHODS

Drugs and materials

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), trypan blue, penicillin G and streptomycin were obtained from Gibco (Grand Island, NY, USA). Trypan Blue 0.4% solution was obtained from Sigma-Aldrich (Merck, UK – Catalog number: T8154). 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), dimethyl sulfoxide (DMSO), and propidium iodide (PI) were purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). The primary and secondary antibodies were from commercial sources and were used according to the recommendations by the supplier. Antibodies to ATM, CASP3, CDK1, CDKN1A, CDKN2A, CDKN2B, CHEK1, p14ARF, TP53, MYC, BCL2, BMI1 and MDM2 were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA). Antibodies specific to β -actin and all secondary antibodies were purchased from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA).

Pisosterol Isolation

Pisosterol was isolated from *Pisolithus tinctorius* samples that were collected from an Eucalyptus plantation at Brejo (Maranhão state) in the Northeast region of Brazil,

as previously described by Montenegro *et al.* (Montenegro et al., 2007; Montenegro et al., 2004).

Cell Lines and cell culture

The U343 cell line (derived from a primary GBM from an adult Caucasian) was obtained from the Cytogenetics and Mutagenesis Laboratory, University of São Paulo (Ribeirão Preto, SP, Brazil). The AHOL1 (astrocytoma Ophir Loyola Hospital) cell line was established by our group at the Human Cytogenetics Laboratory, Federal University of Pará (UFPA), from a secondary GBM obtained from the tumor resection of a 43-year-old multiracial male patient treated in the Neurological Clinic of the Ophir Loyola Hospital (Belém, PA, Brazil) with a histopathologic diagnosis of GBM (grade IV) that evolved from a grade III astrocytoma (Pereira et al., 2011). The human U-87 MG glioblastoma and 1321N1 astrocytoma cell lines were obtained from American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, USA). Normal human astrocytes (NHA) were obtained from ThermoFisher Scientific (Gibco™, catalog number N7805100).

All cell lines were cultured separately in 25-cm² tissue culture flasks using DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin at 37 °C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. The medium was changed every 2-3 days, and the cells were subcultured when confluency reached 70-80% using 0.25% trypsin at 37°C.

MTT proliferation assay

Cell proliferation was measured by the 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay (Denizot and Lang, 1986; Jordan et al., 1992; Mosmann, 1983; Tonn et al., 1993; Zhou et al., 1993). The cells (0.5×10^5 cells/well in

100 μ L of medium) were seeded in 96-well culture plates and placed at 37 °C in a CO₂ incubator. After 24 h, the cells reached 70-80% confluence and were incubated with pisosterol (dissolved in DMSO 1%) at 0.97 μ M, 1.94 μ M and 3.50 μ M for 48 h (Montenegro et al., 2004). Doxorubicin (0.01–5 mg/mL) was used as a positive control in this experiment. The control groups received the same amount of DMSO. Following treatment for 48 h, the plates were centrifuged, and the medium was replaced by fresh medium (200 μ L) containing 0.5 mg/mL MTT for 3 h at 37 °C. The absorbance measurement was conducted at 570 nm using a spectrophotometer DTX 880 Multimode Detector (Beckman Coulter, Inc. Fullerton, CA, USA). Three independent experiments were performed.

The concentrations of pisosterol mentioned before (0.97 μ M; 1.94 μ M; 3.50 μ M) were chosen based on the IC₅₀ previously demonstrated by our group for the U343 and AHOL1 cell lines (Pereira et al., 2011). In triplicate experiments, we observed, in this study, that the IC₅₀ was the same for the U-87 and 1321N1 cell lines (data not shown). For this reason, we set the maximum treatment dose at 3.50 μ M.

Trypan blue exclusion assay

Cell viability was assessed by the trypan blue exclusion assay as described previously (Kumar et al., 2017). After 48 h of each treatment (0.97 μ M, 1.94 μ M, and 3.50 μ M), the cells were trypsinized and suspended in cell culture medium. The number of trypan blue positive and negative cells for each concentration was counted in a Neubauer's hemocytometer, and the results are expressed as a percentage of the total cells using GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software; La Jolla, CA, USA) software. Three independent experiments were performed.

Cell cycle analysis

The effect of Pisosterol on the distribution of the cells in cell cycle was performed by flow cytometry and was analyzed by the Flowjo software. Briefly, the cells were seeded onto 6-well plates at a density of 1×10^6 cells/well (0; 0.97 μ M; 1.94 μ M and 3.50 μ M) and incubated for one day. After treatment with various concentrations of pisosterol for 48 h, the cells were then harvested and washed with $1\times$ PBS. The cell pellets were fixed in 70% cold ethanol overnight. The fixed cells were resuspended in $1\times$ PBS (Sigma-Aldrich, MO, USA) containing 1 mg/mL RNase A (Sigma-Aldrich, MO, USA), incubated for 1 h at 37 °C, and stained by adding 50 μ g/mL propidium iodide (PI) (Sigma-Aldrich, MO, USA) for 30 min at room temperature in the dark. The cells were then analyzed using flow cytometry (FACScan, Becton-Dickinson, NJ, USA). The results were presented as the mean values from three independent measurements.

Sample processing

RNA, DNA and protein extraction

Total RNA was isolated using the ReliaPrep™ RNA Cell Miniprep System (Promega Corporation) following the kit manual. Total proteins were isolated using Trizol (Invitrogen Life Technologies) following the manufacturer's instructions. Genomic DNA was obtained using the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega Corporation) following the kit manual. The protein pellet was dissolved following the protocol established by Leal et al., 2016.

DNA, RNA and protein were quantified with a Qubit™ 4 Fluorometer (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) and with a NanoDrop-2000 spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). The DNA, RNA and protein eluates were then stored at -80 °C until use.

Reverse transcription qPCR (RT-qPCR)

For the cDNA synthesis, we used the GoScript™ Reverse Transcription System (Promega Corporation) following the manufacturer's instructions. Real time PCR (qPCR) was performed as described previously (Ferreira et al., 2015), using the GoTaq® Probe qPCR Master Mix (Promega Corporation) following the manufacturer's protocol. All the reactions were carried out in triplicate on 96-well PCR plates in a CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) in a total volume of 10 µL, and the data analysis was performed using the Bio-Rad CFX Manager™ 3.1 software (Bio-Rad). To adhere to the MIQE guidelines (Bustin et al., 2009), the expression levels were normalized using *GAPDH*, *TBP* and *RPL13A* in normal human astrocytes (NHA). According to Aithal & Rajeswari (Aithal and Rajeswari, 2015), these genes were found to be most stable for gene expression analysis in human glioblastoma. The relative gene expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ formula (Livak and Schmittgen, 2001) ($p < 0.05$).

The expression of the genes *MYC*, *ATM*, *BCL2*, *BMI1*, *CASP3*, *CDK1*, *CDKN1A*, *CDKN2A*, *CDKN2B*, *CHEK1*, *MDM2*, *p14^{ARF}* and *TP53* was quantitated using Taqman® gene expression assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). (Table 1)

Treatment of DNA with sodium bisulfite and bisulfite sequencing PCR (BSP)

Sodium bisulfite conversion of 100 ng of genomic DNA was carried out using the EZ DNA Methylation-Lightning Kit (Zymo Research) following the manufacturer's instructions.

All primers were designed using the Methyl Primer Express® v1.0 software (Applied Biosystems). Each PCR was performed as described previously (Ferreira et al., 2015).

The amplification conditions and the primers used for each gene are detailed in Table 2.

All the PCR products were purified using the EZ-10 Spin Column PCR Product Purification kit (Bio Basic/Ludwig Biotec) following the manufacturer's instructions.

The purified PCR products were sequenced using the methodology described by Sanger et al. (Sanger et al., 1977). The sequencing reaction was performed using the BigDye Terminator Cycle Sequencing Standard kit (Applied Biosystems) version 3.1, purified using a BigDye X Terminator Purification Kit (Applied Biosystems), and analyzed on an ABI 3130 automated sequencer (Applied Biosystems).

All sequences were aligned using the software BioEdit version 7.0.9 (Hall, 1999). The methylation patterns of the gene sequences were analyzed using the BISMA software (Rohde et al., 2008) and a BiQ Analyzer (Bock et al., 2005).

Western blot analysis

Western blot analysis was performed as described previously by Leal et al. (Leal et al., 2016). First, the reduced protein (25 µg) from each cell line was separated by 12.5% homogeneous sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and electroblotted onto a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Hybond-P; GE Healthcare, USA). The PVDF membrane was blocked with phosphate-buffered saline containing 0.1% Tween 20 and 5% low-fat milk and incubated overnight at 4 °C with the corresponding primary antibodies as follows: Anti-c-Myc (ab32072-abcam); Anti-ATM (ab17995-abcam); Anti-Chk1 (CHEK1) (ab47574-abcam); Anti-Caspase-3 (ab13847-abcam); Anti-Bcl-2 (ab59348-abcam); Anti-p53 (ab1431-abcam); Anti-CDKN2A/p14ARF (ab3642-abcam); Anti-CDK1 (ab18-abcam); Anti-p21 (ab47300-abcam); Anti-Bmi1 (ab38295-abcam); Anti-p15 INK4b (ab53034-abcam); Anti-

CDKN2A/p16INK4a (ab189034-abcam); and Anti-MDM2 (ab38618-abcam). After extensive washing, a peroxidase-conjugated secondary antibody was added for 1 h at room temperature. Tubulin was used as a loading reference control.

The extraction of the proteins from the cultured cells was followed by immunoblotting with the relevant antibodies (primary antibodies: mouse anti- human monoclonal antibodies, 1:1000; secondary antibody: rabbit anti-mouse polyclonal antibody, 1:2000). Each experiment was repeated at least three times.

Statistical analysis

The statistical analysis was performed in all experiments using the GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software; La Jolla, CA) software, and the statistical significance of all tests was set at $p < 0.05$. Each experiment was set up in triplicate and repeated three times. The data obtained from multiple experiments were calculated as the mean $\pm$ SD. Differences in the methylation frequencies among the pisosterol treatments were evaluated using the chi-squared test. For the cytotoxicity experiments, a two-way ANOVA followed by a Bonferroni post hoc test was used to determine the effect of concentration and time on cell death.

For the qPCR analysis, we used the Bio-Rad CFX Manager™ 3.1 software (Bio-Rad) to determine the gene expression stabilities, adopting the pairwise variation strategy as in geNorm (Vandesompele et al., 2002). Differences among the groups were assessed with a one-way ANOVA with post hoc comparisons and Tukey's test. A Spearman correlation test was used to evaluate the possible correlation between mRNA and protein expression.

The cell cycle phases were compared between the groups using a Kruskal-Wallis non-parametric test followed by a Games-Howell post hoc test. In all analyses, the

confidence interval was 95%, and p values less than 0.05 were considered significant. The effect size for the Kruskal-Wallis analyses was based on Eta-squared (η^2), in which 0.15 and below was classified as a small effect size, 0.16-0.40 was a medium effect size, and above 0.40 was a large effect size.

RESULTS

Pisosterol inhibits the cell viability and proliferation of glioma cells

Although many beneficial properties of pisosterol have been reported, including anti-proliferative activity in different human cancer cell lines, its effects on human glioma cells are poorly described.

To determine whether pisosterol has an antiproliferative effect on glioma cells lines, we incubated U343, AHOL1, U-87 MG, 1321N1 cells with different concentrations (0.97 μ M, 1.94 μ M, and 3.50 μ M) of pisosterol for 48 h and determined cell viability using the trypan blue exclusion assay. As shown in Figure 1, treatment with pisosterol significantly decreased the cell viability of glioma cells in dose-dependent manner. Furthermore, most of the cell lines exhibited a similar sensitivity to all of the treatments with pisosterol. However, the 1321N1 cells were the most sensitive to pisosterol at 3.50 μ M.

Subsequently, to further verify these observations, we employed the MTT assay to determine the effects of pisosterol on the proliferation potential of the glioma cells lines. Our results showed that exposure to pisosterol markedly decreased the proliferation potential of the glioma cells in a dose-dependent manner (Figure 2). These results, therefore, demonstrate that pisosterol effectively reduced the proliferation and viability of the glioma cells and exhibited great therapeutic potential in glioma treatment.

Pisosterol induces G2/M phase arrest in glioma cells

To investigate the underlying mechanism that leads to the pisosterol-induced loss of cell proliferation, we observed the effects of pisosterol on glioma cells by a flow cytometric analysis. As shown in Tables 3-6 and Figure 3, treatment with 0.97 μ M of pisosterol for 48 h initially resulted in a higher accumulation of cells in the G1 phase compared with the positive control (DOXO 1) (Figure 3). In addition to the increase in the G1 phase, we observed a significant decrease in the proportion of cells in S phase of the cell cycle (Tables 3-6; Figure 3).

In all cell lines, we found that the proportion of the cell population in the G2/M phase increased in a dose-dependent manner compared with the negative and positive controls (Tables 3-6; Figure 3). These results clearly indicate the inhibitory effect of pisosterol on U343, AHOL, U-87 MG and 1321N1 cell proliferation via the accumulation of a G2/M phase population.

Pisosterol induces apoptosis by modulating apoptosis-associated genes

Based on the results that pisosterol induced G2/M phase arrest in glioma cells, we next investigated whether the pisosterol-induced inhibition of proliferation was due to a direct effect on apoptosis in the glioma cells. For this, the cells were treated with 0.97 μ M, 1.94 μ M, and 3.50 μ M of pisosterol for 48 h, and the sub-diploid DNA content (sub-G1 fraction) was measured by flow cytometry after double staining with Annexin V-FITC/PI as an indicator of the level of apoptosis (Henry et al., 2013; Nicoletti et al., 1991). As shown in Tables 3-6 and Figure 4, pisosterol treatment significantly increased the apoptotic cell rate in a dose-dependent manner. These results demonstrated that pisosterol induced apoptosis in the glioma cells.

To more precisely evaluate the role of pisosterol-induced glioma cell apoptosis, we examined the mRNA and protein expression levels of both caspase-independent and caspase-dependent apoptosis-related genes by qPCR and western blot.

Consistent with the flow cytometry results, pisosterol downregulated the Bcl-2 expression and upregulated the caspase-3 and p53 expression in a dose-dependent manner, indicating that both the caspase-associated and p53/Bcl-2 signaling pathways were activated following pisosterol treatment in the glioma cell lines (Figure 5).

Pisosterol modulates the ATM/ATR signaling pathway

To identify the potential mechanisms for the G1 and G2 phase arrests, the expression levels of *MYC*, *ATM*, *BCL2*, *BMI1*, *CASP3*, *CDK1*, *CDKN1A*, *CDKN2A*, *CDKN2B*, *CHEK1*, *MDM2*, *p14^{ARF}* and *TP53* were examined by qPCR. Treatment with pisosterol resulted in a clear, dose-dependent downregulation of the expression of *MYC*, *BCL2*, *BMI1* and *MDM2* (Figure 6). Concomitantly, there was a significant, dose-dependent upregulation of the gene expression levels of *ATM*, *CASP3*, *CDK1*, *CDKN1A*, *CDKN2A*, *CDKN2B*, *CHEK1*, *p14^{ARF}* and *TP53* (Figure 7).

Pisosterol does not change the methylation pattern of the genes

To verify whether the pisosterol treatment altered the methylation pattern of the genes, BSP was used to detect the methylation levels in the promoter region of the *BMI1*, *CDKN1A*, *CDKN2B*, *CDKN2A*, *p14^{ARF}*, *MYC*, *MDM2* and *TP53* genes. Our results indicated that all the fragments of the promoter regions evaluated were not methylated and, consequently, that there was no association between the methylation state and the pisosterol treatment.

DISCUSSION

Fungi are extremely diverse and abundant worldwide. Recent estimates show that the number of fungi species ranges from 500,000 to more than 5 million (Wasser, 2014), and to date, 3 million species of fungi have been accepted for general use (L., 2012).

A wide variety of fungi has been utilized traditionally in many cultures as alternative medicines for the maintenance of health, and they are thought to possess approximately 130 medicinal functions, including antineoplastic properties (Chang and Wasser, 2012; Finimundy et al., 2013; Valverde et al., 2015; Yu et al., 2009; Zhang et al., 2011). Over the last decade, the interest in the pharmaceutical potential of fungi has increased rapidly. Many of the molecules produced by fungi, including terpenoids, are known to be bioactive (Valverde et al., 2015).

Pisosterol, a triterpene isolated from the basidiomycete *Pisolithus tinctorius*, was identified by Montenegro et al. (Montenegro et al., 2004) and represents a promising lead structure in anti-cancer drug discovery due to its important pharmacological properties. Montenegro et al. (Montenegro et al., 2007; Montenegro et al., 2004) demonstrated that this triterpene is cytotoxic against tumor cells from different origins in a dose-dependent manner, especially against leukemia and melanoma cells. Further studies conducted by our group also demonstrated this antitumoral activity in vivo using the sarcoma 180 cell line in mice, and the tumor growth inhibition ratio was 43%. Recently, Alves *et al.* (2015) analyzed the anticancer potential of the crude extracts and fractions of *P. tinctorius* spores in the human osteosarcoma cell line MG63, the human breast carcinoma cell line T47D, the human colon adenocarcinoma cell line RKO, and the normal human brain capillary endothelial cell line hCMEC/D3. Their results showed a decrease in cell viability in cancer cell lines without a significant reduction in the viability of the normal cells. However, little is known about the antitumoral activity and molecular mechanisms mediating these effects in glioma.

In the current study, we investigated the effect of pisosterol on glioma cells. The MTT method and trypan blue exclusion assay were used to evaluate the effect of pisosterol on cell proliferation and viability in glioma cells. The drug effectively reduced the number of live cells in a dose-dependent manner. Our results are in agreement with the study by Montenegro et al. (Montenegro et al., 2007; Montenegro et al., 2004).

Cell cycle arrest and apoptosis are cell mechanisms that play key roles in preventing tumor development (Liu et al., 2017), and these mechanisms provided some important details about the mechanism of action of pisosterol. After a 48-h incubation with pisosterol, all of the glioma cell lines showed a significant elevation in the number of cells in the G2/M phase, indicating a cell cycle blockade at G2/M (Table 7). However, in the literature, only one study has described G2/M cell cycle arrest caused by a triterpene (JSI-124) in glioma cell lines (Su et al., 2008).

Accumulating evidence suggests that G2/M cell cycle arrest is often accompanied by DNA damage (Sharma et al., 2012). To protect their genome, cells depend on the action of DNA-damage checkpoints that ensure the detection and repair of DNA damage, thereby avoiding mutations that favor the development of a neoplasia (Andreassen et al., 2001). DNA damage checkpoints are usually intermediated by two pathways: the p53-dependent pathway (for irreversible and slower responses) and the ATM/ATR-Chk1/Chk2-Cdc25s pathway (for reversible and fast responses) (Dai and Grant, 2010).

The ATM/ATR signaling pathway acts in an early signal transmission through a G2/M checkpoint to phosphorylate and activate various downstream proteins (Abraham, 2001; Huang et al., 2008; Lukas et al., 2001; Molinari, 2000), such as the transducers CHK1 (CHEK1) and CHK2 (checkpoint kinase-1 and -2). DNA damage checkpoints are predominantly associated with the activation of ATM, whereas ATR is activated by a stalling of the replication fork induced by UV, nucleotide imbalance, and DNA cross-

linking (Chen et al., 2008; Lukas et al., 2001). The present study demonstrated that the mRNA and protein levels of ATM, as well as those of its downstream target, CHK1 (CHEK1), were all increased in the pisosterol-treated cells, indicating that the DNA damage induced by pisosterol might lead to the activation of ATM and initiate the subsequent signal transduction cascade associated with the G2/M checkpoint. In human cancers, dysfunction in this checkpoint is considered a serious pathological hallmark of neoplastic transformation (Chen et al., 2008; Sahu et al., 2009). In addition, several chemotherapeutic agents and ionizing radiation, both of which are used in cancer treatment, activate CHK1 (CHEK1) (Chen et al., 2008; Sahu et al., 2009).

The polycomb group protein BMI1 plays an important role in maintaining the self-renewal potential of neural and hematopoietic stem cells and acts as a transcriptional repressor of several genes via the methylation, acetylation, and mono-ubiquitination of histones and the methylation of chromatin (Ferreira et al., 2015; Wei et al., 2015). Furthermore, some evidence shows that BMI1 promotes tumorigenesis, including in GBM (Ferreira et al., 2015), as it stimulates and/or collaborates with multiple oncogenes, such as *c-Myc*, *Ras*, *Abel* and *hTERT* (Lin et al., 2015).

Recently, it was demonstrated that BMI1 contributes to the DNA damage response by enhancing the ionizing radiation-induced activation of ATM and its downstream targets CHK2 and γ H2AX (Pan et al., 2011), consistent with the activation of ATM contributing to the homologous recombination (HR)-mediated repair of double-stranded DNA breaks (DSBs) (Chagraoui et al., 2011). However, the relationship between BMI1 and DNA damage-induced ATM activation is complex.

Two models suggest that BMI1 contributes to DNA damage response regulation. In the first model, BMI1 facilitates ATM activation (by promoting DSB repair), which is expected to activate the checkpoints, a process in which BMI1-associated E3 ubiquitin

ligase conjugates ubiquitin to H2A/H2AX. This process contributes to chemoresistance in cancers. In the second model, BMI1 decreases ATM activation independently of the ligase activity and, thus, compromises the checkpoint activation, which consequently contributes to genomic instability and stimulates tumor progression (Lin et al., 2015). Our results demonstrate that pisosterol downregulated the mRNA and protein levels of both BMI1 and MYC in all pisosterol-treated cells (Figure 6), and this may consequently have induced the activation of the ATM pathway (in a concentration-dependent manner). However, the mechanism by which BMI1 enhances pisosterol-induced ATM activation requires further investigation.

The tumor suppressor TP53, a well-studied stress response factor, has also been shown to play a role in DNA damage-induced G₂ arrest. A sustained G₂/M-phase checkpoint requires the transcriptional induction of endogenous Cdk1 inhibitors (e.g., *CDKN1A*, *Gadd45*, and *14-3-3σ*) via TP53-dependent or TP53-independent (e.g., via *BRAC1*) mechanisms. Additionally, TP53 is negatively regulated by MDM2 either by direct binding to TP53 to repress the transcriptional activity of TP53 or through the degradation of TP53 by *UPS*. Activated TP53 transcribes a number of genes to induce cell cycle arrest, apoptosis, and senescence, all of which participate in suppressing tumorigenesis (Aylon and Oren, 2011; Speidel, 2010; Vousden and Prives, 2009).

As shown in Figure 7, our results indicate that pisosterol treatment significantly increases the expression of TP53 and *CDKN1A* (Cip1/p21 gene) and decreases MDM2 in a concentration-dependent manner. The upregulation of TP53 may be linked to the low expression of MDM2 and to the activation of *CDKN1A*. However, TP53 is not the only regulator that induced the upregulation of *CDKN1A*, as it was also stimulated in a TP53-independent manner. Several of the transcriptional inducers of *CDKN1A*, such as nerve growth factor, progesterone, Ca²⁺, and the transcription factors BETA2 and MYOD1,

cooperate with the transcriptional coactivator p300-CREBBP to activate the CDKN1A promoter (Abbas and Dutta, 2009).

In eukaryotes, the cell cycle is regulated by cyclins and cyclin-dependent kinases (CDKs). Among them, the cyclin B1/CDK1 complex is the primary regulator of the transition from the G2 to M phase. CDKN1A (p21) and p27 play a critical role in blocking the activation of the cyclin B1/CDK1 complex, while Cdc25c is activated by the dephosphorylation of cdc2 at the onset of mitosis (Peng et al., 1997; Singh et al., 2004). When we explored the effect of pisosterol on CDK1, a key regulator in the G2/M phase transition and mitosis, a significant, concentration-dependent increase in the mRNA expression levels of CDK1 was observed in all cell lines. The increased expression of both CDK1 and CDKN1A (p21) indicated that pisosterol inhibited the G2/M transition rather than causing M-phase arrest. Experimental evidence shows that triterpenes are associated with an inappropriate activation of ATM-Chk1-Cdc25C-Cdk1, resulting in the induction of G2/M phase arrest (Guo et al., 2014a). However, the mechanism underlying this phenomenon has largely remained elusive and needs to be further explored.

The arrest of cell cycle progression at the G2 phase provides an opportunity for cells to either undergo repair mechanisms or follow the apoptotic pathway. Apoptosis, or programmed cell death, is a key process for both the development and maintenance of tissue homeostasis, which is activated by the DDR to eliminate cells with intolerable amounts of DNA damage (Pollack et al., 2002; Shangguan et al., 2014). Two major pathways are reported to be associated with apoptotic cell death. One is the cell surface death receptor pathway, and the other is the mitochondrial pathway initiated by the upregulation of wild-type p53 followed by the suppression of BCL2 (Luo et al., 1998; Shangguan et al., 2014). Furthermore, these two pathways are connected via Bid, one of the Bcl-2 family members.

In this study, we demonstrated that pisosterol elicited apoptosis in cells by inducing DNA fragmentation, upregulating the expression of *CASP3* and *TP53*, and downregulating *BCL2* in a dose-dependent manner, which led us to infer that pisosterol activates both the caspase-independent and caspase-dependent apoptotic pathways. These findings suggest that changes in the ratio of the proapoptotic and antiapoptotic proteins of the Bcl-2 family might contribute to the apoptosis-promoting activity of pisosterol. Several stressors, such as inflammation, radiation (ultraviolet or X-rays), heavy metals, drugs, heat shock, and acidification, are inducers of apoptosis, and they are involved in opening the permeability transition pore, increasing the Bax/Bcl-2 ratio and generating ROS from mitochondria, which may cause the release of apoptogenic factors (Gossiau and Chen, 2004).

To the best of our knowledge, this is the first report to demonstrate that pisosterol-induced glioma cell cycle arrest occurs via the activation of the ATM/ATR signaling pathway. However, some limitations are present. Some of the downstream effector protein expression levels were not evaluated by qPCR and western blotting, which prevented the investigation of the detailed mechanisms underlying pisosterol-induced cell cycle arrest in glioma cells. Further experiments are required to address these questions.

In summary, the present study results indicated that (1) glioma cells lines (U343, AHOL1, U-87 MG and 1321N1) are highly sensitive to growth inhibition by pisosterol; (2) pisosterol does not change the methylation pattern of the promoter regions evaluated; (3) pisosterol blocks cell cycle progression in the G2/M phase, thereby inhibiting glioma cell proliferation; (4) pisosterol inhibits cell cycle progression in a concentration-dependent manner by increasing the expression of *ATM*, *CASP3*, *CDK1*, *CDKN1A*, *CDKN2A*, *CDKN2B*, *CHK1* (*CHEK1*), *p14ARF* and *TP53* and reducing the expression of *MYC*, *BCL2*, *BMI1* and *MDM2*; and (5) Pisosterol promotes apoptosis by modulating Bcl-

2, caspase-3 and p53 expression. These findings suggest that pisosterol may be an effective chemopreventive agent for glioma.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgements

This work was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes); the Fundação Amazônia Paraense de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA) (ICAAF N° 075/2014; N° 006/2014. ICAAF: 157/2014); the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (MCT/CNPq N° 14/2014- Universal Faixa C, Processo n° 455078/2014-9). Additionally, this study was supported by a Phd fellowship to Wallax Augusto Silva Ferreira provided by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

Figure Legends

Figure 1. Effect of pisosterol on the viability of glioma cells. The viability of the cells was determined by the trypan blue dye exclusion method after 0.97 μ M, 1.94 μ M, and 3.50 μ M pisosterol treatment in the U343, AHOL1, U-87 MG, 1321N1 cells for 48 h. The data are expressed as the means $\pm$ SE from 3 independent experiments. Significant differences compared with the untreated control are indicated by * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. The data were analyzed using a two-way ANOVA followed by a Bonferroni post hoc test.

Figure 2. Effects of pisosterol on the proliferation of glioma cells lines (U343, AHOL1, U-87 MG, and 1321N1) as measured by an MTT assay after 48 h of treatment (0.97 μ M, 1.94 μ M, and 3.50 μ M). The data are expressed as the means $\pm$ SE from 3 independent experiments. Significant differences compared with the untreated control are indicated by * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. The data were analyzed using a two-way ANOVA followed by a Bonferroni post hoc test.

Figure 3. The effect of pisosterol on cell cycle progression in glioma cell lines (U343, AHOL1, U-87 MG, and 1321N1) (A, B, C and D, respectively). The cultured cells were treated with pisosterol under various concentrations (0.97 μ M, 1.94 μ M, and 3.50 μ M). Forty-eight hours later, the cell cycle distribution was analyzed by flow cytometry. The data indicate the percentage of cells in the sub-G1, G1, S, and G2/M phases of the cell cycle. C-: control, non-treated cells; C+: cells treated with Doxorubicin. The results represent the average of three independent experiments $\pm$ S.D. * Significant differences compared with the untreated control are indicated by * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Figure 4. Effect of pisosterol on apoptosis. The glioma cells lines (U343, AHOL1, U-87 MG, and 1321N1) were treated with 0.97 μ M, 1.94 μ M and 3.50 μ M pisosterol for 48 h. The data are expressed as the means $\pm$ SE from 3 independent experiments. The

significant differences compared with the untreated control are indicated by * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. The data were analyzed using the Kruskal-Wallis test followed by a Games-Howell post hoc analysis.

Figure 5. Effect of pisosterol on apoptosis regulators in glioma cells. The glioma cells were treated with the indicated concentrations of pisosterol for 48 h. The expression of *BCL2* (A), *CASP3* (B) and *TP53* (C) was analyzed by qPCR and western blot analysis. The data are expressed as the means $\pm$ SE from 3 independent experiments. Significant differences compared with the untreated control are indicated by * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Figure 6. *MYC* (A), *BMI1* (B), *MDM2* (C) and *BCL2* (D) mRNA and protein expression in the U343, AHOL1, U-87 MG and 1321N1 cell lines. Statistical significance is denoted by * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

Figure 7. *ATM* (A), *CASP3* (B), *CDK1* (C), *CDKN1A* (D), *CDKN2A* (E), *CDKN2B* (F), *CHK1* (G), *p14ARF* (H) and *TP53* (I) mRNA and protein expression in the U343, AHOL1, U-87 MG and 1321N1 cell lines. The expression of these genes increased with the increased concentration of the pisosterol treatment. Statistical significance is denoted by * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

References

- Abbas, T., Dutta, A., 2009. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nature reviews. Cancer* 9, 400-414.
- Abraham, R.T., 2001. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes & development* 15, 2177-2196.
- Adamson, C., Kanu, O.O., Mehta, A.I., Di, C., Lin, N., Mattox, A.K., Bigner, D.D., 2009. Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going. *Expert opinion on investigational drugs* 18, 1061-1083.
- Ahn, M.Y., Jee, S.D., Lee, B.M., 2007. Antiobesity effects of *Isaria sinclairii* by repeated oral treatment in obese Zucker rats over a 4-month period. *Journal of toxicology and environmental health. Part A* 70, 1395-1401.
- Aithal, M.G., Rajeswari, N., 2015. Validation of housekeeping genes for gene expression analysis in glioblastoma using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Brain tumor research and treatment* 3, 24-29.
- Alves, R., Preto, M., Vasconcelos, V., Oliveira, R.S., Martins, R., 2015. Cytotoxicity Induced by Extracts of *Pisolithus tinctorius* Spores on Human Cancer and Normal Cell Lines-Evaluation of the Anticancer Potential. *Journal of toxicology and environmental health. Part A* 78, 840-847.
- Ameri, A., Ghadge, C., Vaidy, J.G., Deokule, S.S., 2011. Anti-Staphylococcus aureus activity of *Pisolithus albus* from Pune, India. *J Med Plants Res* 5, 527-532.
- Andreassen, P.R., Lacroix, F.B., Lohez, O.D., Margolis, R.L., 2001. Neither p21WAF1 nor 14-3-3sigma prevents G2 progression to mitotic catastrophe in human colon carcinoma cells after DNA damage, but p21WAF1 induces stable G1 arrest in resulting tetraploid cells. *Cancer research* 61, 7660-7668.
- Annovazzi, L., Mellai, M., Schiffer, D., 2017. Chemotherapeutic drugs: DNA damage and repair in glioblastoma. *Cancers* 9, E57.
- Araújo, M.D., 2013. Analysis of the methylation pattern and expression of genes involved in the p14 / mdm2 / p53 pathway in astrocytic tumors, Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas.
- Aylon, Y., Oren, M., 2011. New plays in the p53 theater. *Current opinion in genetics & development* 21, 86-92.
- Bastien, J.I., McNeill, K.A., Fine, H.A., 2015. Molecular characterizations of glioblastoma, targeted therapy, and clinical results to date. *Cancer* 121, 502-516.
- Blackford, A.N., Jackson, S.P., 2017. ATM, ATR, and DNA-PK: the trinity at the heart of the DNA damage response. *Molecular cell* 66, 801-817.
- Blaskovich, M.A., Sun, J., Cantor, A., Turkson, J., Jove, R., Sebt, S.M., 2003. Discovery of JSI-124 (cucurbitacin I), a selective Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway inhibitor with potent antitumor activity against human and murine cancer cells in mice. *Cancer research* 63, 1270-1279.
- Bock, C., Reither, S., Mikeska, T., Paulsen, M., Walter, J., Lengauer, T., 2005. BiQ Analyzer: visualization and quality control for DNA methylation data from bisulfite sequencing. *Bioinformatics* 21, 4067-4068.
- Bolderson, E., Richard, D.J., Zhou, B.B., Khanna, K.K., 2009. Recent advances in cancer therapy targeting proteins involved in DNA double-strand break repair. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 15, 6314-6320.
- Borkova, L., Adamek, R., Kalina, P., Drasar, P., Dzubak, P., Gurska, S., Rehulka, J., Hajdich, M., Urban, M., Sarek, J., 2017. Synthesis and cytotoxic activity of triterpenoid thiazoles derived from allobetulin, methyl betulonate, methyl oleanonate, and oleanonic acid. *ChemMedChem* 12, 390-398.
- Burbano, R.R., Lima, P.D., Bahia, M.O., Khayat, A.S., Silva, T.C., Bezerra, F.S., Andrade Neto, M., de Moraes, M.O., Montenegro, R.C., Costa-Lotufo, L.V., Pessoa, C., 2009. Cell cycle arrest

induced by pisosterol in HL60 cells with gene amplification. *Cell biology and toxicology* 25, 245-251.

Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T., 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry* 55, 611-622.

Carvalho Montenegro, R., Feio Farias, R.A., Pinho Pereira, M.R., Negreiros Nunes Alves, A.P., Silva Bezerra, F., Andrade-Neto, M., Pessoa, C., de Moraes, M.O., Veras Costa-Lotufo, L., 2008. Antitumor activity of pisosterol in mice bearing with S180 tumor. *Biological & pharmaceutical bulletin* 31, 454-457.

Chagraoui, J., Hebert, J., Girard, S., Sauvageau, G., 2011. An anticlastogenic function for the Polycomb Group gene Bmi1. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 5284-5289.

Chang, S.T., Wasser, S.P., 2012. The role of culinary-medicinal mushrooms on human welfare with a pyramid model for human health. *International journal of medicinal mushrooms* 14, 95-134.

Chen, C.Y., Hsu, Y.L., Tsai, Y.C., Kuo, P.L., 2008. Kotomolide A arrests cell cycle progression and induces apoptosis through the induction of ATM/p53 and the initiation of mitochondrial system in human non-small cell lung cancer A549 cells. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 46, 2476-2484.

Chen, W.J., Yu, C., Yang, Z., He, J.L., Yin, J., Liu, H.Z., Liu, H.T., Wang, Y.X., 2012. Tubeimoside-1 induces G2/M phase arrest and apoptosis in SKOV-3 cells through increase of intracellular Ca(2)(+) and caspase-dependent signaling pathways. *International journal of oncology* 40, 535-543.

Dai, Y., Grant, S., 2010. New insights into checkpoint kinase 1 in the DNA damage response signaling network. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 16, 376-383.

Deng, C., Zhang, B., Zhang, S., Duan, C., Cao, Y., Kang, W., Yan, H., Ding, X., Zhou, F., Wu, L., Duan, G., Shen, S., Xu, G., Zhang, W., Chen, M., Huang, S., Zhang, X., Lv, Y., Ling, T., Wang, L., Zou, X., 2016. Low nanomolar concentrations of Cucurbitacin-I induces G2/M phase arrest and apoptosis by perturbing redox homeostasis in gastric cancer cells in vitro and in vivo. *Cell death & disease* 7, e2106.

Denizot, F., Lang, R., 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of immunological methods* 89, 271-277.

Fernandez, A., Sessel, S., 2009. Selective antagonism of anticancer drugs for side-effect removal. *Trends in pharmacological sciences* 30, 403-410.

Ferreira, W.A., Araujo, M.D., Anselmo, N.P., de Oliveira, E.H., Brito, J.R., Burbano, R.R., Harada, M.L., Borges Bdo, N., 2015. Expression Analysis of Genes Involved in the RB/E2F Pathway in Astrocytic Tumors. *PLoS one* 10, e0137259.

Ferreira, W.A., Pinheiro Ddo, R., Costa Junior, C.A., Rodrigues-Antunes, S., Araujo, M.D., Leao Barros, M.B., Teixeira, A.C., Faro, T.A., Burbano, R.R., Oliveira, E.H., Harada, M.L., Borges Bdo, N., 2016. An update on the epigenetics of glioblastomas. *Epigenomics* 8, 1289-1305.

Finimundy, T.C., Gambato, G., Fontana, R., Camassola, M., Salvador, M., Moura, S., Hess, J., Henriques, J.A., Dillon, A.J., Roesch-Ely, M., 2013. Aqueous extracts of *Lentinula edodes* and *Pleurotus sajor-caju* exhibit high antioxidant capability and promising in vitro antitumor activity. *Nutrition research* 33, 76-84.

Golding, S.E., Rosenberg, E., Khalil, A., McEwen, A., Holmes, M., Neill, S., Povirk, L.F., Valerie, K., 2004. Double strand break repair by homologous recombination is regulated by cell cycle-independent signaling via ATM in human glioma cells. *The Journal of biological chemistry* 279, 15402-15410.

Gossiau, A., Chen, K.Y., 2004. Nutraceuticals, apoptosis, and disease prevention. *Nutrition* 20, 95-102.

Guo, J., Wu, G., Bao, J., Hao, W., Lu, J., Chen, X., 2014a. Cucurbitacin B induced ATM-mediated DNA damage causes G2/M cell cycle arrest in a ROS-dependent manner. *PloS one* 9, e88140.

Guo, J., Zhao, W., Hao, W., Ren, G., Lu, J., Chen, X., 2014b. Cucurbitacin B induces DNA damage, G2/M phase arrest, and apoptosis mediated by reactive oxygen species (ROS) in leukemia K562 cells. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry* 14, 1146-1153.

Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment Editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41, 95–98.

Henry, C.M., Hollville, E., Martin, S.J., 2013. Measuring apoptosis by microscopy and flow cytometry. *Methods* 61, 90-97.

Hsieh, Y.H., Lee, C.H., Chen, H.Y., Hsieh, S.C., Lin, C.L., Tsai, J.P., 2015. Induction of cell cycle arrest, DNA damage, and apoptosis by nimbolide in human renal cell carcinoma cells. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 36, 7539-7547.

Hsu, Y.C., Chen, M.J., Huang, T.Y., 2014a. Inducement of mitosis delay by cucurbitacin E, a novel tetracyclic triterpene from climbing stem of *Cucumis melo* L., through GADD45gamma in human brain malignant glioma (GBM) 8401 cells. *Cell death & disease* 5, e1087.

Hsu, Y.C., Huang, T.Y., Chen, M.J., 2014b. Therapeutic ROS targeting of GADD45gamma in the induction of G2/M arrest in primary human colorectal cancer cell lines by cucurbitacin E. *Cell death & disease* 5, e1198.

Huang, M., Miao, Z.H., Zhu, H., Cai, Y.J., Lu, W., Ding, J., 2008. Chk1 and Chk2 are differentially involved in homologous recombination repair and cell cycle arrest in response to DNA double-strand breaks induced by camptothecins. *Molecular cancer therapeutics* 7, 1440-1449.

Jiang, Q.W., Cheng, K.J., Mei, X.L., Qiu, J.G., Zhang, W.J., Xue, Y.Q., Qin, W.M., Yang, Y., Zheng, D.W., Chen, Y., Wei, M.N., Zhang, X., Lv, M., Chen, M.W., Wei, X., Shi, Z., 2015. Synergistic anticancer effects of triptolide and celastrol, two main compounds from thunder god vine. *Oncotarget* 6, 32790-32804.

Jordan, J.P., Hand, C.M., Markowitz, R.S., Black, P., 1992. Test for chemotherapeutic sensitivity of cerebral gliomas: use of colorimetric MTT assay. *Journal of neuro-oncology* 14, 19-35.

Jovcevska, I., Kocevar, N., Komel, R., 2013. Glioma and glioblastoma - how much do we (not) know? *Molecular and clinical oncology* 1, 935-941.

Kang, H.M., Lee, S.K., Shin, D.S., Lee, M.Y., Han, D.C., Baek, N.I., Son, K.H., Kwon, B.M., 2006. Dehydrotrametenolic acid selectively inhibits the growth of H-ras transformed rat2 cells and induces apoptosis through caspase-3 pathway. *Life sciences* 78, 607-613.

Kastan, M.B., Bartek, J., 2004. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432, 316-323.

Kausar, H., Munagala, R., Bansal, S.S., Aqil, F., Vadhanam, M.V., Gupta, R.C., 2013. Cucurbitacin B potently suppresses non-small-cell lung cancer growth: identification of intracellular thiols as critical targets. *Cancer letters* 332, 35-45.

Kawamata, N., Inagaki, N., Mizumura, S., Sugimoto, K.J., Sakajiri, S., Ohyanagi-Hara, M., Oshimi, K., 2005. Methylation status analysis of cell cycle regulatory genes (p16INK4A, p15INK4B, p21Waf1/Cip1, p27Kip1 and p73) in natural killer cell disorders. *European journal of haematology* 74, 424-429.

Kong, Y., Chen, J., Zhou, Z., Xia, H., Qiu, M.H., Chen, C., 2014. Cucurbitacin E induces cell cycle G2/M phase arrest and apoptosis in triple negative breast cancer. *PloS one* 9, e103760.

Ku, J.M., Kim, S.R., Hong, S.H., Choi, H.S., Seo, H.S., Shin, Y.C., Ko, S.G., 2015. Cucurbitacin D induces cell cycle arrest and apoptosis by inhibiting STAT3 and NF-kappaB signaling in doxorubicin-resistant human breast carcinoma (MCF7/ADR) cells. *Molecular and cellular biochemistry* 409, 33-43.

Kumar, A., Bhatkar, D., Jahagirdar, D., Sharma, N.K., 2017. Non-homologous end joining inhibitor SCR-7 to exacerbate low-dose doxorubicin cytotoxicity in HeLa cells. *Journal of cancer prevention* 22, 47-54.

L., H.D., 2012. Global species numbers of fungi: are tropical studies and molecular approaches contributing to a more robust estimate? *Biodivers Conserv* 21, 2425-2433.

Leal, M.F., Ribeiro, H.F., Rey, J.A., Pinto, G.R., Smith, M.C., Moreira-Nunes, C.A., Assumpcao, P.P., Lamarao, L.M., Calcagno, D.Q., Montenegro, R.C., Burbano, R.R., 2016. YWHAЕ silencing induces cell proliferation, invasion and migration through the up-regulation of CDC25B and MYC in gastric cancer cells: new insights about YWHAЕ role in the tumor development and metastasis process. *Oncotarget* 7, 85393-85410.

Lin, X., Ojo, D., Wei, F., Wong, N., Gu, Y., Tang, D., 2015. A Novel Aspect of Tumorigenesis-BMI1 Functions in Regulating DNA Damage Response. *Biomolecules* 5, 3396-3415.

Liu, J., Zhang, Y., Chen, L., Yu, F., Li, X., Dan, T., Zhao, J., Zhou, S., 2017. Polyphyllin I induces G2/M phase arrest and apoptosis in U251 human glioma cells via mitochondrial dysfunction and the JNK signaling pathway. *Acta biochimica et biophysica Sinica* 49, 479-486.

Liu, L., Zhao, J.L., Wang, J.G., 2015. [Oleanolic acid induces G(2)/M phase arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma Bel-7402 cells]. *Zhongguo Zhong yao za zhi = Zhongguo zhongyao zazhi = China journal of Chinese materia medica* 40, 4897-4902.

Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 25, 402-408.

Lohberger, B., Kretschmer, N., Bernhart, E., Rinner, B., Stundl, N., Kaltenegger, H., Kahl, S., Bauer, R., Leithner, A., 2015. 25-O-acetyl-23,24-dihydro-cucurbitacin F induces cell cycle G2/M arrest and apoptosis in human soft tissue sarcoma cells. *Journal of ethnopharmacology* 164, 265-272.

Lukas, C., Bartkova, J., Latella, L., Falck, J., Mailand, N., Schroeder, T., Sehested, M., Lukas, J., Bartek, J., 2001. DNA damage-activated kinase Chk2 is independent of proliferation or differentiation yet correlates with tissue biology. *Cancer research* 61, 4990-4993.

Luo, X., Budiardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., Wang, X., 1998. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94, 481-490.

Marostica, L.L., Silva, I.T., Kratz, J.M., Persich, L., Geller, F.C., Lang, K.L., Caro, M.S., Duran, F.J., Schenkel, E.P., Simoes, C.M., 2015. Synergistic antiproliferative effects of a new cucurbitacin B derivative and chemotherapy drugs on lung cancer cell line A549. *Chemical research in toxicology* 28, 1949-1960.

Martin, F., Laurent, P., de Carvalho, D., Voiblet, C., Balestrini, R., Bonfante, P., Tagu, D., 1999. Cell wall proteins of the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius*: identification, function, and expression in symbiosis. *Fungal genetics and biology : FG & B* 27, 161-174.

Martin, F., Tommerup, C., Tagu, D., 1994. Genetics of ectomycorrhizal fungi: progress and prospects. *Plant Soil* 159, 159-170.

Marx, D.H., 1977. Tree host range and world distribution of the extomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. *Canadian journal of microbiology* 23, 217-223.

McNeill, K.A., 2016. Epidemiology of Brain Tumors. *Neurologic clinics* 34, 981-998.

Molinari, M., 2000. Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer. *Cell proliferation* 33, 261-274.

Montenegro, R.C., de Vasconcellos, M.C., Silva Bezerra, F., Andrade-Neto, M., Pessoa, C., de Moraes, M.O., Costa-Lotufo, L.V., 2007. Pisosterol induces monocytic differentiation in HL-60 cells. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 21, 795-800.

Montenegro, R.C., Jimenez, P.C., Feio Farias, R.A., Andrade-Neto, M., Silva Bezerra, F., Moraes, M.E., de Moraes, M.O., Pessoa, C., Costa-Lotufo, L.V., 2004. Cytotoxic activity of pisosterol, a triterpene isolated from *Pisolithus tinctorius* (Michx.: Pers.) Coker & Couch, 1928. *Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of biosciences* 59, 519-522.

Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods* 65, 55-63.

Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M.C., Grignani, F., Riccardi, C., 1991. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Journal of immunological methods* 139, 271-279.

Pan, M.R., Peng, G., Hung, W.C., Lin, S.Y., 2011. Monoubiquitination of H2AX protein regulates DNA damage response signaling. *The Journal of biological chemistry* 286, 28599-28607.

Peng, C.Y., Graves, P.R., Thoma, R.S., Wu, Z., Shaw, A.S., Piwnica-Worms, H., 1997. Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science* 277, 1501-1505.

Pereira, E.L., Lima, P.D., Khayat, A.S., Bahia, M.O., Bezerra, F.S., Andrade-Neto, M., Montenegro, R.C., Pessoa, C., Costa-Lotufo, L.V., Moraes, M.O., Yoshioka, F.K., Pinto, G.R., Burbano, R.R., 2011. Inhibitory effect of pisosterol on human glioblastoma cell lines with C-MYC amplification. *Journal of applied toxicology : JAT* 31, 554-560.

Perfetti, V., Palladini, G., Brunetti, L., Sgarella, A., Brugnattelli, S., Gobbi, P.G., Corazza, G.R., 2007. Bortezomib-induced paralytic ileus is a potential gastrointestinal side effect of this first-in-class anticancer proteasome inhibitor. *European journal of gastroenterology & hepatology* 19, 599-601.

Piao, S., Kang, M., Lee, Y.J., Choi, W.S., Chun, Y.S., Kwak, C., Kim, H.H., 2014. Cytotoxic effects of escin on human castration-resistant prostate cancer cells through the induction of apoptosis and G2/M cell cycle arrest. *Urology* 84, 982 e981-987.

Pollack, M., Phaneuf, S., Dirks, A., Leeuwenburgh, C., 2002. The role of apoptosis in the normal aging brain, skeletal muscle, and heart. *Ann NY Acad Sci* 959, 93-107.

Rankeillor, K.L., Cairns, D.A., Loughrey, C., Short, S.C., Chumas, P., Ismail, A., Chakrabarty, A., Lawler, S.E., Roberts, P., 2014. Methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification identifies promoter methylation events associated with survival in glioblastoma. *Journal of neuro-oncology* 117, 243-251.

Ren, S., Ouyang, D.Y., Saltis, M., Xu, L.H., Zha, Q.B., Cai, J.Y., He, X.H., 2012. Anti-proliferative effect of 23,24-dihydrocucurbitacin F on human prostate cancer cells through induction of actin aggregation and cofilin-actin rod formation. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 70, 415-424.

Rohde, C., Zhang, Y., Jurkowski, T.P., Stamerjohanns, H., Reinhardt, R., Jeltsch, A., 2008. Bisulfite sequencing Data Presentation and Compilation (BDPC) web server--a useful tool for DNA methylation analysis. *Nucleic acids research* 36, e34.

Sahu, R.P., Batra, S., Srivastava, S.K., 2009. Activation of ATM/Chk1 by curcumin causes cell cycle arrest and apoptosis in human pancreatic cancer cells. *British journal of cancer* 100, 1425-1433.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74, 5463-5467.

Shangguan, W.J., Li, H., Zhang, Y.H., 2014. Induction of G2/M phase cell cycle arrest and apoptosis by ginsenoside Rf in human osteosarcoma MG63 cells through the mitochondrial pathway. *Oncology reports* 31, 305-313.

Sharma, A., Singh, K., Almasan, A., 2012. Histone H2AX phosphorylation: a marker for DNA damage. *Methods in molecular biology* 920, 613-626.

Shiloh, Y., Ziv, Y., 2013. The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nature reviews. Molecular cell biology* 14, 197-210.

Silva, T.C., Lima, P.D., Bahia, M.O., Khayat, A.S., Bezerra, F.S., Andrade-Neto, M., Seabra, A.D., Pontes, T.B., Moraes, M.O., Montenegro, R.C., Costa-Lotufo, L.V., Pessoa, C., Pinto, G.R., Burbano, R.R., 2010. Pisosterol induces interphase arrest in HL60 cells with c-MYC amplification. *Human & experimental toxicology* 29, 235-240.

Singh, S.V., Herman-Antosiewicz, A., Singh, A.V., Lew, K.L., Srivastava, S.K., Kamath, R., Brown, K.D., Zhang, L., Baskaran, R., 2004. Sulforaphane-induced G2/M phase cell cycle arrest involves checkpoint kinase 2-mediated phosphorylation of cell division cycle 25C. *The Journal of biological chemistry* 279, 25813-25822.

Speidel, D., 2010. Transcription-independent p53 apoptosis: an alternative route to death. *Trends in cell biology* 20, 14-24.

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., Eisenhauer, E., Mirimanoff, R.O., European Organisation for, R., Treatment of Cancer Brain, T., Radiotherapy, G., National Cancer Institute of Canada Clinical Trials, G., 2005. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England journal of medicine* 352, 987-996.

Stupp, R., Taillibert, S., Kanner, A., Read, W., Steinberg, D.M., Lhermitte, B., Toms, S., Idbaih, A., Ahluwalia, M.S., Fink, K., Di Meco, F., Lieberman, F., Zhu, J.J., Stragliotto, G., Tran, D.D., Brem, S., Hottinger, A.F., Kirson, E.D., Lavy-Shahaf, G., Weinberg, U., Kim, C.Y., Paek, S.H., Nicholas, G., Burna, J., Hirte, H., Weller, M., Palti, Y., Hegi, M.E., Ram, Z., 2017. Effect of tumor-treating fields plus maintenance temozolomide vs maintenance temozolomide alone on survival in patients with glioblastoma: a randomized clinical trial. *Jama* 318, 2306-2316.

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., 2015. Maintenance therapy with tumor-treating fields plus temozolomide vs temozolomide alone for glioblastoma: a randomized clinical trial. *Jama* 314, 2535-2543.

Su, Y., Li, G., Zhang, X., Gu, J., Zhang, C., Tian, Z., Zhang, J., 2008. JSI-124 inhibits glioblastoma multiforme cell proliferation through G(2)/M cell cycle arrest and apoptosis augment. *Cancer biology & therapy* 7, 1243-1249.

Tonn, J.C., Nikkhah, G., Darling, J.L., Schachenmayr, W., 1993. Test for chemotherapeutic sensitivity of cerebral gliomas: use of the colorimetric MTT assay. *Journal of neuro-oncology* 16, 177-180.

Tsantrizos, Y.S., Kope, H.H., Fortin, J.A., Ogilvie, K.K., 1991. Antifungal antibiotics from *Pisolithus tinctorius*. *Phytochemistry* 30, 1113-1118.

Valverde, M.E., Hernandez-Perez, T., Paredes-Lopez, O., 2015. Edible mushrooms: improving human health and promoting quality life. *International journal of microbiology* 2015, 376387.

Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology* 3, RESEARCH0034.

Vousden, K.H., Prives, C., 2009. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell* 137, 413-431.

Vredenburgh, J.J., Desjardins, A., Herndon, J.E., 2nd, Marcello, J., Reardon, D.A., Quinn, J.A., Rich, J.N., Sathornsumetee, S., Gururangan, S., Sampson, J., Wagner, M., Bailey, L., Bigner, D.D., Friedman, A.H., Friedman, H.S., 2007. Bevacizumab plus irinotecan in recurrent glioblastoma multiforme. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 25, 4722-4729.

Wang, L., Xu, J., Zhao, C., Zhao, L., Feng, B., 2013a. Antiproliferative, cell-cycle dysregulation effects of novel asiatic acid derivatives on human non-small cell lung cancer cells. *Chemical & pharmaceutical bulletin* 61, 1015-1023.

Wang, X., Bai, H., Zhang, X., Liu, J., Cao, P., Liao, N., Zhang, W., Wang, Z., Hai, C., 2013b. Inhibitory effect of oleanolic acid on hepatocellular carcinoma via ERK-p53-mediated cell cycle arrest and mitochondrial-dependent apoptosis. *Carcinogenesis* 34, 1323-1330.

Wasser, S.P., 2014. Medicinal mushroom science: Current perspectives, advances, evidences, and challenges. *Biomedical journal* 37, 345-356.

Wei, F., Ojo, D., Lin, X., Wong, N., He, L., Yan, J., Xu, S., Major, P., Tang, D., 2015. BMI1 attenuates etoposide-induced G2/M checkpoints via reducing ATM activation. *Oncogene* 34, 3063-3075.

Wen, P.Y., Kesari, S., 2008. Malignant gliomas in adults. *The New England journal of medicine* 359, 492-507.

Yu, S., Weaver, V., Martin, K., Cantorna, M.T., 2009. The effects of whole mushrooms during inflammation. *BMC immunology* 10, 12.

Yue, Q.X., Cao, Z.W., Guan, S.H., Liu, X.H., Tao, L., Wu, W.Y., Li, Y.X., Yang, P.Y., Liu, X., Guo, D.A., 2008. Proteomics characterization of the cytotoxicity mechanism of ganoderic acid D and

computer-automated estimation of the possible drug target network. Molecular & cellular proteomics : MCP 7, 949-961.

Zhang, L., Fan, C., Liu, S., 2011. Chemical composition and antitumor activity of polysaccharide from *Inonotus obliquus*. J Med Plants Res 5, 1251–1260.

Zhou, J.-J., Yue, X.-F., Han, J.-X., Yang, W.-Y., 1993. Improved MTT assay for activity of antitumor agents. Chin J Pharm 24, 455-455.

Tables

Table 1. Target and housekeeping genes used in this study.

Official Gene Symbol*	Official Full Name*	Assay ID
<i>MYC</i>	MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor	Hs00153408_m1
<i>ATM</i>	ATM serine/threonine kinase	Hs00175892_m1
<i>BCL2</i>	BCL2, apoptosis regulator	Hs00608023_m1
<i>BMI1</i>	BMI1 proto-oncogene, polycomb ring finger	Hs00180411_m1
<i>CASP3</i>	Caspase 3	Hs00234387_m1
<i>CDK1</i>	Cyclin dependent kinase 1	Hs00938777_m1
<i>CDKN1A</i>	Cyclin dependent kinase inhibitor 1A	Hs00355782_m1
<i>CDKN2A</i>	Cyclin dependent kinase inhibitor 2A	Hs00923894_m1
<i>CDKN2B</i>	Cyclin dependent kinase inhibitor 2B	Hs00793225_m1
<i>CHEK1</i>	Checkpoint kinase 1	Hs00967506_m1
<i>MDM2</i>	MDM2 proto-oncogene	Hs00540450_s1
<i>p14^{ARF}</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	Hs99999189_m1
<i>TP53</i>	Tumor protein p53	Hs01034249_m1
<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Hs02786624_g1
<i>RPL13A</i>	Ribosomal protein L13a	Hs04194366_g1
<i>TBP</i>	TATA-box binding protein	Hs00427620_m1

*Official symbols and names of the genes were based on HUGO gene nomenclature committee (HGNC).

Table 2. Primers used in this study, with their respective sequences, annealing temperatures, amplicon size and references.

Official Gene Symbol	Primer sequences (5'–3')	Annealing temperature (°C)	Amplicon size	Source
<i>BMI1</i>	F 5'TGTAGAAAGGTTTTTAGATGTTGG 3' R 5'CCTCAAACAAAACATAACACCTT 3'	57	377 pb	(Ferreira et al., 2015)
<i>CDKN1A</i>	F 5'GTTAGTTGAGGTGTGAGTAGTTGT 3' R 5'AAACACCTATAAACACACACACACCCC 3'	62,8	224 pb	(Kawamata et al., 2005)
<i>CDKN2B</i>	F:5'GGTTGGTTTTTTTATTTTGTAGAG 3' R: 5'CCTTCCTAAAAACCTAAACTCAA 3' Fext: 5'GGGGTTAGGGTTAGGTAGG 3' Rext: 5'AACTACACCAATACAACCACATA 3'	55	210 pb	(Kawamata et al., 2005)
<i>CDKN2A</i>	F1: 5'GAGGGATAGGGTCGGAGGGGGTTT 3' R2: 5'TACAAACCCTCTACCCACCT 3' F2: 5'GAAGAAAGAGGAGGGGTTGGTTGG 3' R1: 5'TAAACAACGCCCCCGCCTCCAACAA 3'	58	178 pb	(Ferreira et al., 2015)
<i>p14^{ARF}</i>	F 5' AGTTTGTAGTTAAGGGGGTA 3' R 5' CTAACCTCCTCAATAACATCA 3'	56	152 pb	(Araújo, 2013)
<i>MYC</i>	F 5' GGGAGGAGATATGGTGAATTAG 3' R 5' TCCTCATAAAACACCAAAAACCTC 3'	54	441 pb	(Araújo, 2013)
<i>MDM2</i>	F 5' GGTTGTTTTTGGGGTTTGT 3' R 5' AACCAATACCTACTCCTCACCA 3'	57	350 pb	(Araújo, 2013)
<i>TP53</i>	F 5' TTTTGGGAGTAGGTAGAAGATTT 3' R 5' CAAACTACAACCTCCCAACAAC 3'	57	250 pb	(Araújo, 2013)

F: Forward, **R:** Reverse, **Fext:** External forward, **Rext:** External reverse.

Table 3. Pisosterol suppresses cell cycle progression in U343 cells. Representative flow cytometry of the cell cycle distribution after treatment with DOXO 1 or various concentrations (0.97 μ M, 1.94 μ M and 3.50 μ M) of pisosterol for 48 h.

Groups (μ M)	Sub-G ₁	DNA content (%)		
		G ₁	S	G ₂ /M
Negative control	4.42 $\pm$ 0.46	66.33 $\pm$ 0.51	13.72 $\pm$ 0.49	16.31 $\pm$ 0.48
0.97	7.97 $\pm$ 0.77* [†]	51.27 $\pm$ 0.68* [†]	18.91 $\pm$ 0.65* [†]	20.99 $\pm$ 0.64* [†]
1.94	7.88 $\pm$ 0.89* [†]	28.99 $\pm$ 0.91* [†]	25.16 $\pm$ 0.93* [†]	34.16 $\pm$ 0.95* [†]
3.50	9.98 $\pm$ 0.69* [†]	21.66 $\pm$ 0.60* [†]	21.65 $\pm$ 0.73*	45.13 $\pm$ 0.72* [†]
Positive control (DOXO 1)	15.35 $\pm$ 1.08	47.64 $\pm$ 1.12	21.77 $\pm$ 1.07	14.91 $\pm$ 1.19

*Significantly different from the negative control, $p < 0.05$; [†]Significantly different from the positive control, $p < 0.05$. The data are presented as the median values $\pm$ interquartile range of five independent experiments performed in triplicate. Five thousand events were analyzed in each experiment.

Table 4. Pisosterol suppresses cell cycle progression in AHOL cells. Representative flow cytometry of the cell cycle distribution after treatment with DOXO 1 or various concentrations (0.97 μ M, 1.94 μ M, and 3.50 μ M) of pisosterol for 48 h.

Groups (μ M)	DNA content (%)			
	Sub-G ₁	G ₁	S	G ₂ /M
Negative control	4.51 $\pm$ 0.46	64.04 $\pm$ 0.56	14.19 $\pm$ 0.45	16.56 $\pm$ 0.66
0.97	5.64 $\pm$ 0.46 [†]	64.44 $\pm$ 0.51 [†]	14.01 $\pm$ 0.41 [†]	16.99 $\pm$ 0.69 [†]
1.94	7.99 $\pm$ 0.66 ^{*†}	51.01 $\pm$ 0.46 ^{*†}	17.11 $\pm$ 0.49 ^{*†}	22.19 $\pm$ 0.91 ^{*†}
3.50	8.23 $\pm$ 0.73 ^{*†}	22.75 $\pm$ 0.65 ^{*†}	26.80 $\pm$ 0.51 ^{*†}	42.22 $\pm$ 0.89 ^{*†}
Positive control (DOXO 1)	16.22 $\pm$ 0.76	47.64 $\pm$ 1.52	22.32 $\pm$ 0.45	13.01 $\pm$ 1.10

*Significantly different from the negative control, $p < 0.05$; [†]Significantly different from the positive control, $p < 0.05$. The data are presented as the median values $\pm$ interquartile range of five independent experiments performed in triplicate. Five thousand events were analyzed in each experiment.

Table 5. Pisosterol suppresses cell cycle progression in U-87 MG cells.

Representative flow cytometry of the cell cycle distribution after treatment with DOXO 1 or various concentrations (0.97 μ M, 1.94 μ M, and 3.50 μ M) of pisosterol for 48 h.

Groups (μ M)	Sub-G ₁	DNA content (%)		
		G ₁	S	G ₂ /M
Negative control	3.68 $\pm$ 0.88	69.57 $\pm$ 0.65	14.99 $\pm$ 0.89	15.38 $\pm$ 0.69
0.97	9.77 $\pm$ 1.03* [†]	48.65 $\pm$ 0.98* [†]	24.85 $\pm$ 1.07* [†]	21.00 $\pm$ 0.99* [†]
1.94	9.97 $\pm$ 0.67* [†]	20.33 $\pm$ 0.80* [†]	20.11 $\pm$ 0.69* [†]	48.44 $\pm$ 0.68* [†]
3.50	10.54 $\pm$ 0.78* [†]	18.43 $\pm$ 0.64* [†]	21.20 $\pm$ 0.61*	48.25 $\pm$ 0.79* [†]
Positive control (DOXO 1)	15.55 $\pm$ 0.45	48.47 $\pm$ 0.84	22.99 $\pm$ 0.12	16.67 $\pm$ 0.85

*Significantly different from the negative control, $p < 0.05$; [†]Significantly different from the positive control, $p < 0.05$. The data are presented as the median values $\pm$ interquartile range of five independent experiments performed in triplicate. Five thousand events were analyzed in each experiment.

Table 6. Pisosterol suppresses cell cycle progression in 1321N1 cells.

Representative flow cytometry of the cell cycle distribution after treatment with DOXO 1 or various concentrations (0.97 μ M, 1.94 μ M, and 3.50 μ M) of pisosterol for 48 h.

Groups (μ M)	Sub-G ₁	DNA content (%)		
		G ₁	S	G ₂ /M
Negative control	4.62 $\pm$ 0.77	70.34 $\pm$ 0.62	13.26 $\pm$ 0.47	14.21 $\pm$ 1.02 [†]
0.97	8.35 $\pm$ 1.02* [†]	49.10 $\pm$ 1.04* [†]	24.21 $\pm$ 0.90* [†]	20.99 $\pm$ 1.10 [†]
1.94	8.89 $\pm$ 1.22*	45.12 $\pm$ 0.98* [†]	20.00 $\pm$ 1.03 [†]	29.78 $\pm$ 0.97* [†]
3.50	11.88 $\pm$ 1.10* [†]	15.10 $\pm$ 1.17*	20.79 $\pm$ 1.11*	52.14 $\pm$ 0.93* [†]
Positive control (DOXO 1)	16.06 $\pm$ 0.95	47.55 $\pm$ 1.07	21.01 $\pm$ 1.02	17.00 $\pm$ 0.91

*Significantly different from the negative control, $p < 0.05$; [†]Significantly different from the positive control, $p < 0.05$. The data are presented as the median values $\pm$ interquartile range of five independent experiments performed in triplicate. Five thousand events were analyzed in each experiment.

Table 7. Studies using triterpene analogues that induce cell cycle blockade at G2/M in a number of human cancer cell lines.

Triterpenoids analogs	Function(s)	Reference
JSI-124 (cucurbitacin I)	Reduced the levels of phosphotyrosine of constitutively activated STAT3 in many human cancer cell lines including pancreatic, lung, and breast carcinomas.	Blaskovich et al., 2003
2-thiocyanooleanonic acid (5 c)	Leads to the accumulation of cells in the G2 phase of the cell cycle and inhibits RNA and DNA synthesis significantly at 1×IC50	Borkova et al., 2017
Tubeimoside-1 (TBMS1)	- Led to arrest in phase G2/M of the cell cycle and increased the levels of intracellular Ca²⁺; - Up-regulated the levels of the glucose-regulated protein 78/immunoglobulin heavy chain binding protein (GRP78/Bip), C/EBP homologous protein (CHOP), Bax, and cleaved caspase-3 and down-regulated the levels of Bcl-2	Chen et al., 2012
Cucurbitacin-I	- Inhibits gastric cancer cell growth by inducing G2/M phase cell cycle arrest and apoptosis at low nanomolar concentrations via a STAT3-independent mechanism; - Decreases intracellular GSH/GSSG ratio by inhibiting NRF2 pathway to break cellular redox homeostasis, and subsequently induces the expression of GADD45α in a p53-independent manner, and activates JNK/p38 MAPK signaling.	Deng et al., 2016

Cucurbitacin B	- Induced G2/M phase arrest in A549 cells; - Caused DNA double-strand breaks (DSBs) without affecting the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3); - Triggers ATM-activated Chk1-Cdc25C-Cdk1 and p53-14-3-3-σ pathways; - Increased intracellular reactive oxygen species (ROS) formation;	Guo et al., 2014a
Cucurbitacin B	- Caused DNA damage; - Increased γH2AX protein expression; - Induced G2/M phase arrest and apoptosis; - Increased intracellular reactive oxygen species (ROS)	Guo et al., 2014b
Nimbolide	- Had a cytotoxic effect on 786-O and A-498 RCC cells in a dose-dependent manner; - Induced G2/ M arrest in 786-O and A-498 cells accompanied with an increase in the phosphorylation status of p53, cdc2, cdc25c, and decreased expressions of cyclin A, cyclin B, cdc2, and cdc25c	Hsieh et al., 2015
Cucurbitacin E	- Cytotoxic activity against malignant glioma GBM 8401 cells and induced cell cycle G2/M arrest; - Reduced the expression of 558 genes and elevated the levels of 1354 genes, suggesting an existence of the	Hsu et al., 2014a

	common pathways involved in induction of G2/M arrest;	
Cucurbitacin E	- Inhibits tumor growth by arresting the cell cycle in the G2/M phase via GADD45 γ gene expression and the blockage of cyclin B1/CDC2 complex in primary CRC cells;	Hsu et al., 2014b
Triptolide and celastrol	The combination of triptolide with celastrol synergistically induced cell growth inhibition, cell cycle arrest at G2/M phase and apoptosis with the increased intracellular ROS accumulation in cancer cells.	Jiang et al., 2015
Dehydrotrametenolic acid	- Inhibited the growth of H-ras transformed cells with a GI(50) value of 40 microM; - Induced G2/M phase arrest and apoptosis;	Kang et al., 2006
Cucurbitacin B	- suppressed the growth of four non-small-cell lung cancer cells in vitro and the highly aggressive H1299 xenograft in vivo. - altered the actin cytoskeletal assembly, induced G2/M cell-cycle arrest and mitochondrial apoptosis through the modulation of several key molecular targets mediating the aforementioned processes.	Kausar et al., 2013
Cucurbitacin E	Inhibited Triple negative breast cancer cell growth by inducing cell cycle G2/M phase arrest and apoptosis.	Kong et al., 2014
Cucurbitacin D	- Induced apoptosis, and G2/M cell cycle arrest, and inhibited	Ku et al., 2015

	upregulated Stat3 by doxorubicin on MCF7/ADR cells; - Led to an increase in the IκBα level in the cytosol and a decrease in the p-NF-κB level in the nucleus; - Inhibited translocation of Stat3 and NF-κB and decreased transcriptional activity in the nucleus; - Decreases cell proliferation and induces apoptosis by inhibiting Stat3 and NF-κB signaling in doxorubicin-resistant breast cancer cells	
Oleanolic acid	- Induced apoptosis and G₂/M phase cell cycle arrest in a concentration-dependent manner; - Decreased the protein levels of cyclin B1, but increased the protein levels of p-Cdk1 (Tyr15) and p-Cdc25C (Ser 216). - OA modulated the phosphorylation of protein kinases Chk1 and p21; - Decrease of Bcl-2 protein expression and increase of Bax protein expression, the cytosol Cyt c level, cleaved-caspase-9 and cleaved-caspase-3 activity.	Liu et al., 2015
25-O-acetyl-23,24-dihydro-cucurbitacin F	- Reduced cell viability in a dose-dependent manner and arrested the cells at the G₂/M interface. - Decrease of the cell cycle checkpoint regulators cyclin B1, cyclin A, CDK1, and CDK2;	Lohberger et al., 2015

	- Induced apoptosis in liposarcoma and rhabdomyosarcoma cells caspase-3 dependently	
Cucurbitacin B (DACE) + Cisplatin (CIS) + irinotecan (IRI) + paclitaxel (PAC)	- Induced G2/M cell cycle arrest by modulating survivin and p53 expression, disruption of F-actin cytoskeleton, and cell death by apoptosis; - Antimigratory and anti-invasive effects	Marostica et al., 2015
Escin	- Reduced cell viability of CRPC cells in a dose- and time-dependent manner. - Induced apoptosis in a time-dependent manner; - Induced G2/M-phase cell cycle arrest and thus led to a significant decrease in the expression of cyclinB1 and its activating partner cyclin-dependent kinase 1, with the concomitant induction of p21	Piao et al., 2014
23,24-dihydrocucurbitacin F	- Inhibited cell growth and induced cell cycle arrest at G(2)/M phase, formation of binucleated cells, and increased levels of apoptosis in all PCa cell lines tested	Ren et al., 2012
Asiatic acid	- Induces inhibition of cell proliferation via downregulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway and cell cycle arrest at G1/S and G2/M.	Wang et al., 2013a
Oleanolic acid	- Exhibited inhibitory effect on hepatocellular carcinoma cells through induction of apoptosis and cell cycle arrest;	Wang et al., 2013b

- Induced apoptosis through mitochondrial pathway, evidenced by inhibition of Akt/mammalian target of rapamycin pathway, mitochondrial dysfunction, transient increase of adenosine triphosphate, increase of Bax/Bcl-2 ratio, increased release of cytochrome c and activation of caspase/poly (ADP-ribose) polymerase

Ganoderic acid D

- Induced G(2)/M cell cycle arrest and apoptosis

Yue et al., 2008

Figure 1

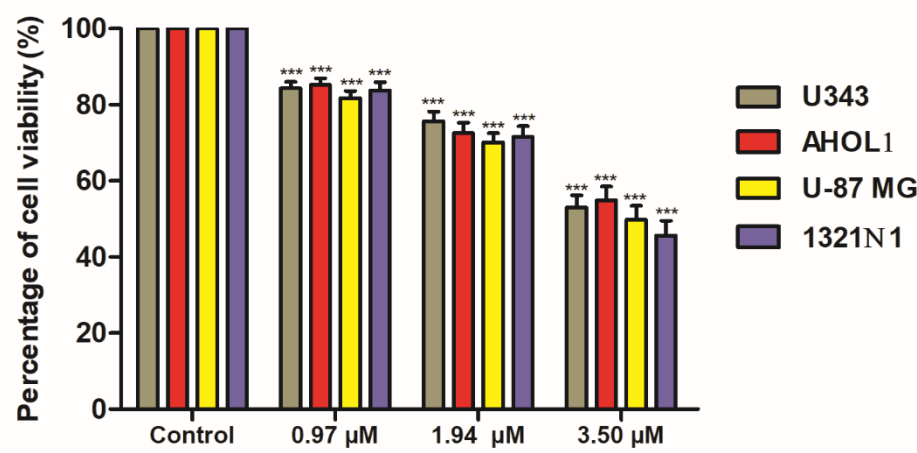


Figure 2

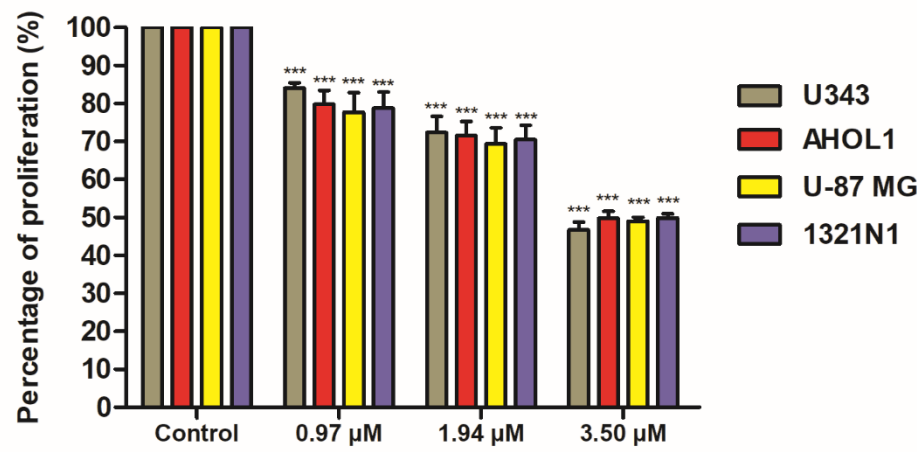


Figure 3

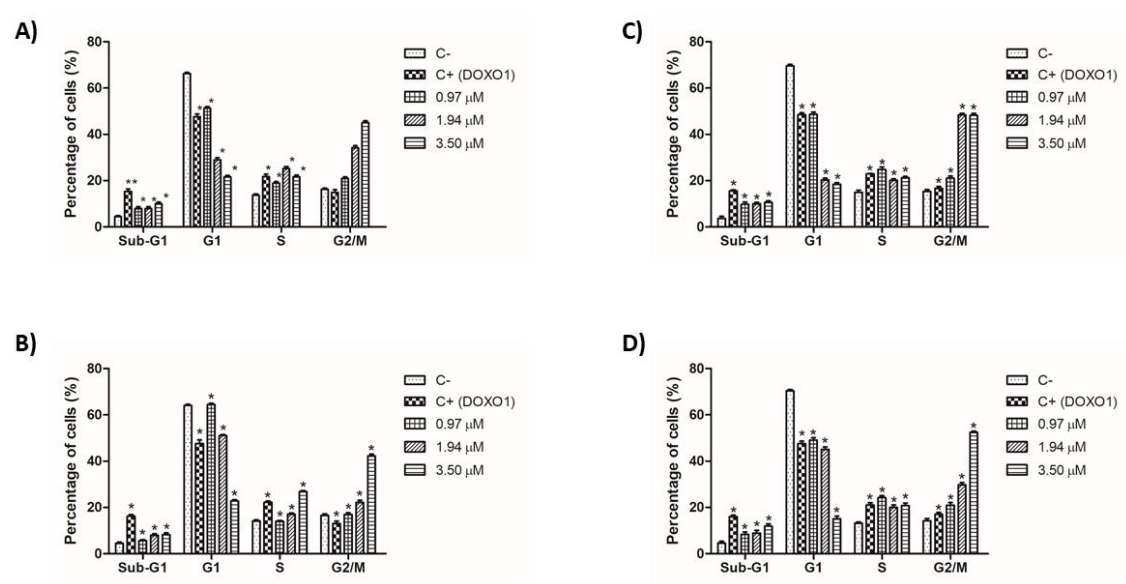


Figure 4

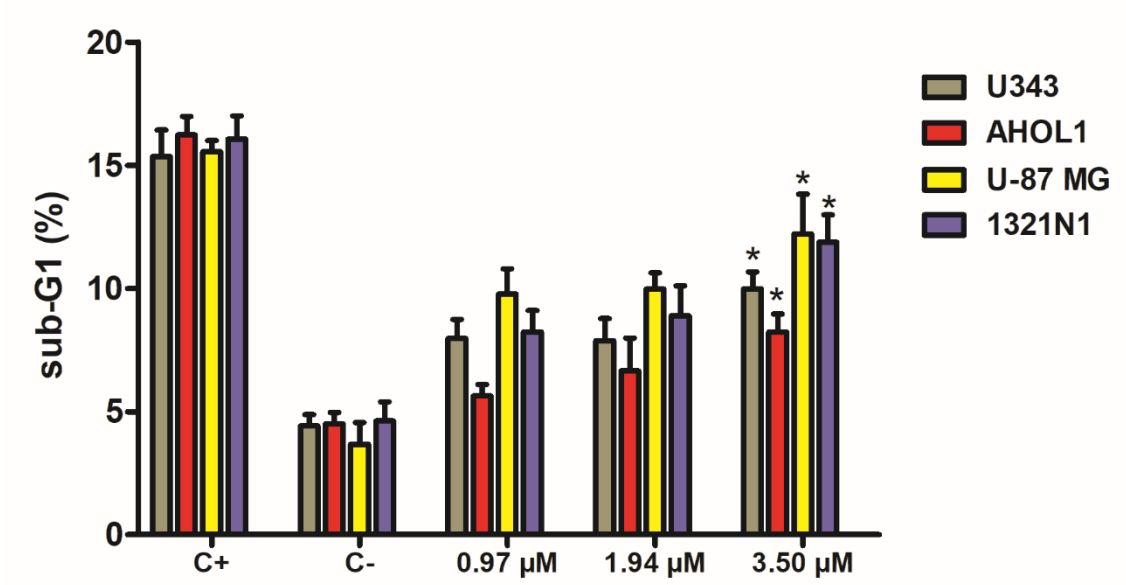


Figure 5

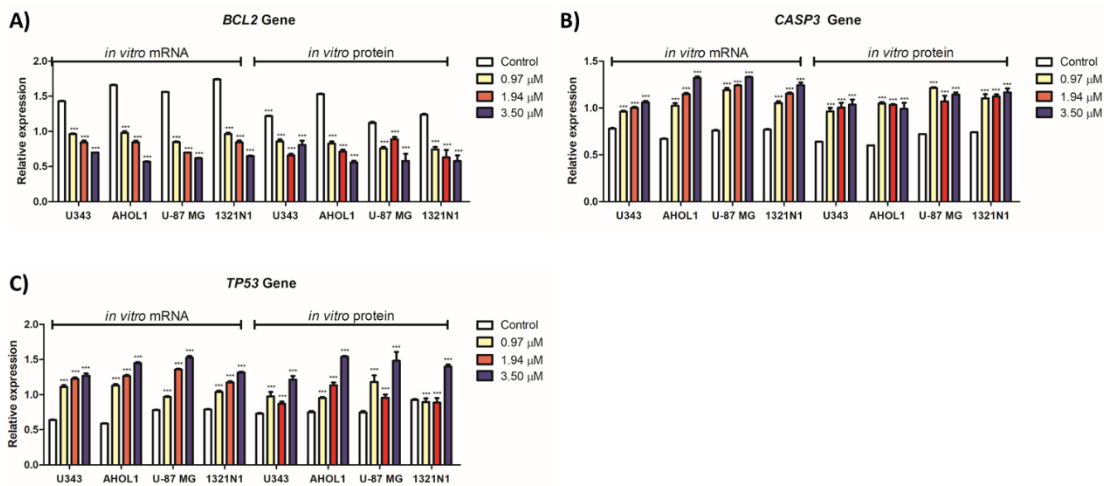


Figure 6

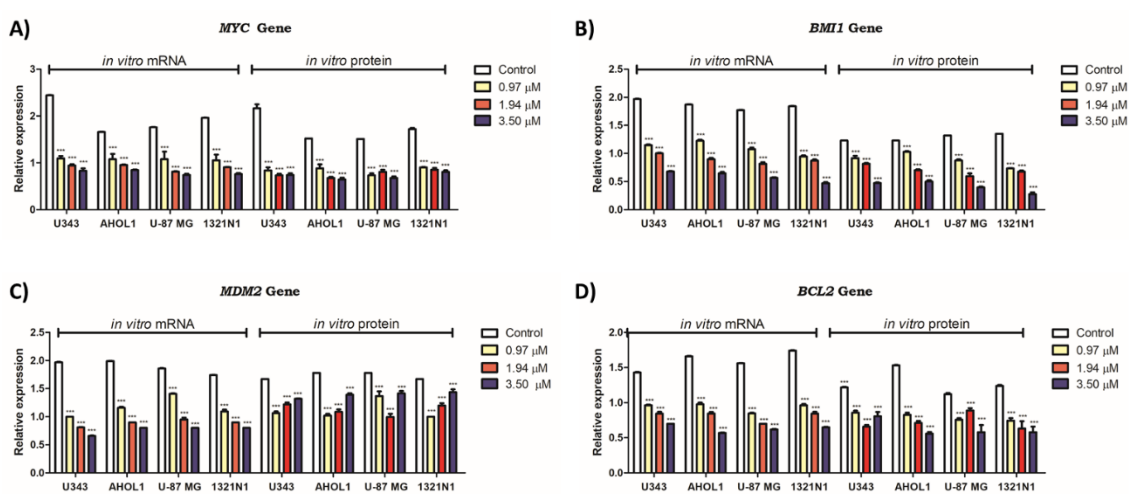
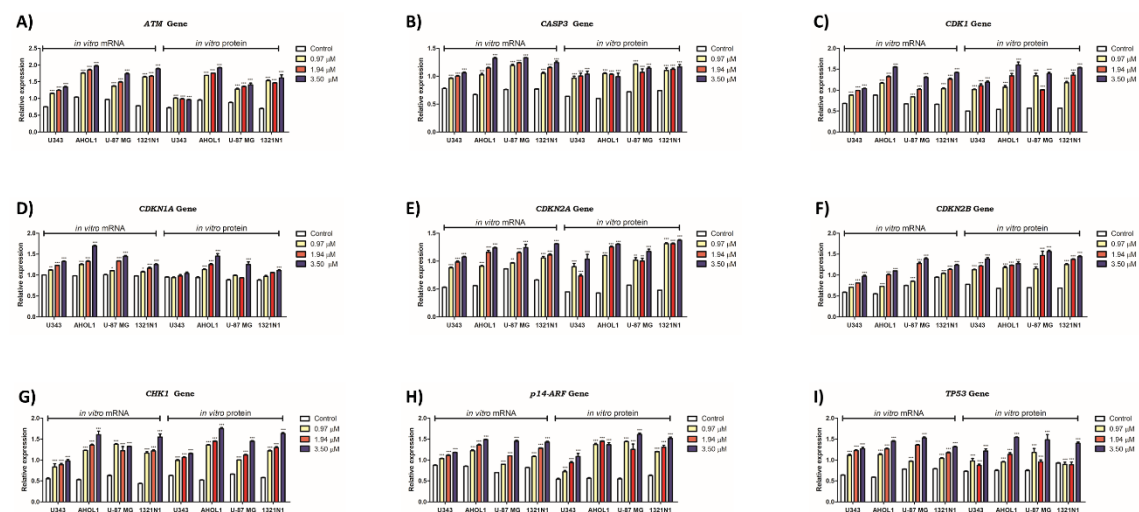


Figure 7



CAPÍTULO 4

ANÁLISE INTEGRADA DOS CNVs E TRANSCRIPTOMA DE LINHAGENS DE GLIOMAS TRATADAS COM PISOSTEROL.

1. Perfil dos CNVs das linhagens de gliomas expostas ao pisosterol

Para descobrir as consequências genômicas (CNVs) da exposição ao pisosterol, quatro linhagens de gliomas (U343, *AHOL1*, U87 e 1321N1) foram tratadas com 0.5 µg/mL, 1.0 µg/mL e 1.8 µg/mL de pisosterol por 48 horas e em seguida analisadas usando o *SurePrint G3 Cancer CGH+SNP Microarray Kit, 4x180K* (Agilent). Consideramos ganhos quando o $\log_2$ ratio >2.0 e perdas quando o $\log_2$ ratio < -2.0 .

Para determinar o número de genes exclusivos e compartilhados com os tratamentos, dois diagramas de Venn foram criados: um contendo genes que sofreram ganhos e outro contendo genes que sofreram perdas (Figura 24). No tratamento de 0.5 µg/mL, encontramos um total de 2458 CNVs, sendo 86 genes que sofreram ganhos exclusivos desse tratamento e 2372 genes comuns aos outros tratamentos. Com a exposição de 1.0 µg/mL de pisosterol, um total de 2451 genes foram afetados, sendo exclusivos desse tratamento, 16 genes sofreram ganhos e 3 genes sofreram perdas. Como esperado, um número maior de CNVs foi encontrado com a exposição de 1.8 µg/mL. Identificamos um total de 2485 genes alterados com esse tratamento, sendo exclusivos desse tratamento, 4 genes sofreram ganhos e 48 genes que sofreram perdas.

Ao analisarmos a quantidade total de CNVs comuns em todos os tratamentos (0.5 µg/mL; 1.0 µg/mL e 1.8 µg/mL), percebemos que o pisosterol induziu genômica mais ganhos (1911 genes) do que perdas (460 genes) (Figura 24).

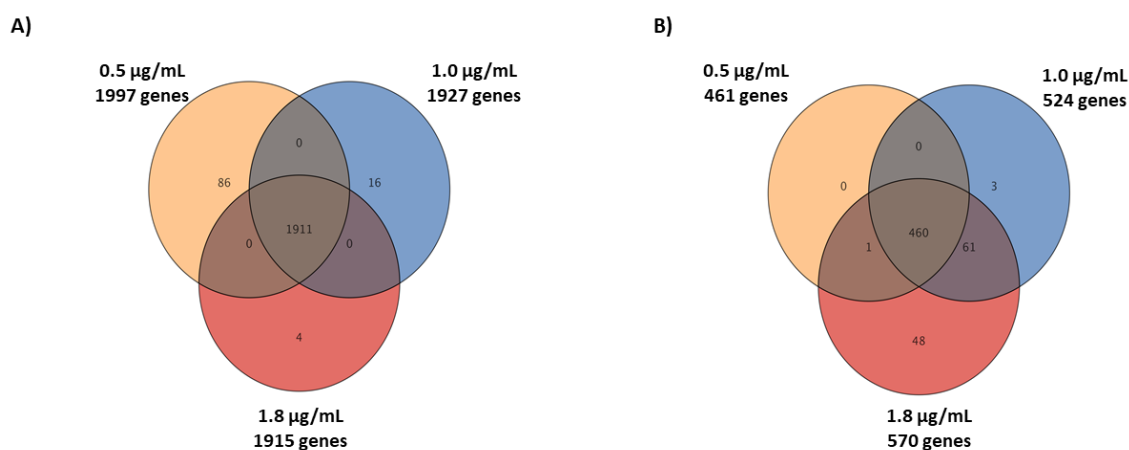


Figura 24 | Perfil de CNVs diferenciais de todas as linhagens de gliomas tratadas com 0.5 µg/mL, 1.0 µg/mL e 1.8 µg/mL de pisosterol. **A)** Diagrama de Venn mostrando o número de genes que sofreram ganhos únicos e comuns nas linhagens de gliomas tratadas com 0.5 µg/mL, 1.0 µg/mL e 1.8 µg/mL de pisosterol. **B)** Diagrama de Venn mostrando o número de genes que sofreram perdas únicas e comuns nas linhagens de gliomas tratadas com 0.5 µg/mL, 1.0 µg/mL e 1.8 µg/mL de pisosterol.

Anotação funcional e de vias dos CNVs modulados pelo pisosterol

Os CNVs comuns a todos os tratamentos (0.5 µg/mL; 1.0 µg/mL e 1.8 µg/mL) foram funcionalmente anotados e classificados usando o *Gene Ontology* (GO), considerando um $p < 0.05$. A análise de enriquecimento funcional do GO para os ganhos foi significativa para 315 termos (Tabela 12; Apêndice 6), enquanto que para as perdas foi significativa para 37 termos (Tabela 12; Apêndice 7).

Tabela 12 | Os termos mais enriquecidos da Ontologia Gênica (GO) dos CNVs das linhagens de gliomas tratadas com pisosterol.

	Ontologia Gênica (GO)	Termos	Contagem de genes	p-value
Ganhos	GO:0005634	Núcleo	252	0.0115
	GO:0044260 GO:0034960	Processo metabólico de macromoléculas celulares	229	0.0481
	GO:0006139 GO:0055134	Processo metabólico contendo bases nucleotídicas	170	0.0410
	GO:0010467	Expressão gênica	143	0.0406
	GO:0051252	Regulação do processo metabólico do RNA	142	0.0483
	GO:0051276 GO:0007001	Organização cromossômica	41	0.0120
	GO:0051277			
	GO:0031966	Membrana mitocondrial	27	0.0434
Perdas	GO:0097159	Ligação de compostos cíclicos orgânicos	34	0.0197
	GO:1901363	Ligação de compostos heterocíclicos	34	0.0161
	GO:0003676	Ligação dos ácidos nucleicos	33	1.81E-06
	GO:0006325 GO:0016568	Organização da cromatina	10	0.0039
	GO:0051276 GO:0007001	Organização cromossômica	10	0.0497
	GO:0051277			
	GO:0006323	Empacotamento do DNA	6	0.0035

Para a anotação das vias alteradas dos CNVs comuns a todos os tratamentos (0.5 µg/mL; 1.0 µg/mL e 1.8 µg/mL), usamos o KEGG. No total, 1330 vias gênicas foram enriquecidas para os ganhos. No entanto, somente 18 vias foram significativamente enriquecidas (Tabela 13; Apêndice 8). Para as perdas, foram enriquecidas no total 1000 vias. Contudo, apenas uma via foi significativamente enriquecida (Tabela 13).

Tabela 13 | Vias significativas comuns a todos os tratamentos com pisosterol (0.5 µg/mL; 1.0 µg/mL e 1.8 µg/mL) das linhagens de gliomas.

	Vias	p-value	Genes
Ganhos	Transporte de canais iônicos	0.0284	16
	miRNAs envolvidos na resposta a danos no DNA	2.18E-04	9
	Geranilgeranilação de RAB	0.0286	7
	Gama-Carboxilação, formação de hipusina e ativação de arilsulfatase	0.0094	6
	Metabolismo de nucleotídeos	0.0015	5
	Cascata dependente de MyD88 iniciada no endossomo	0.0067	5
	Via das pentoses-fosfato	0.0312	3
Perda	Defensinas	1.33E-05	6

2. GDEs das linhagens de gliomas expostas ao pisosterol.

Os GDEs são mostrados na figura 25 para todos os grupos de tratamento com pisosterol. Para o tratamento de 0.5 µg/mL de pisosterol, identificamos um total de 381 genes diferencialmente expressos, considerando um Fold-Change ≥ 2 . Desses, 75 genes estavam com a expressão aumentada (*up-regulated*) e 306 genes estavam com a expressão diminuída (*down-regulated*). Com o tratamento de 1.0 µg/mL, um total de 617 genes diferencialmente expressos, os quais estavam 329 com a expressão aumentada (*up-regulated*) e 288 genes estavam com a expressão diminuída (*down-regulated*). E por fim, a exposição de 1.8 µg/mL de pisosterol foi a que mais alterou a expressão gênica. No

total, 2004 genes foram diferencialmente expressos, sendo 304 *up-regulated* e 1700 *down-regulated*.

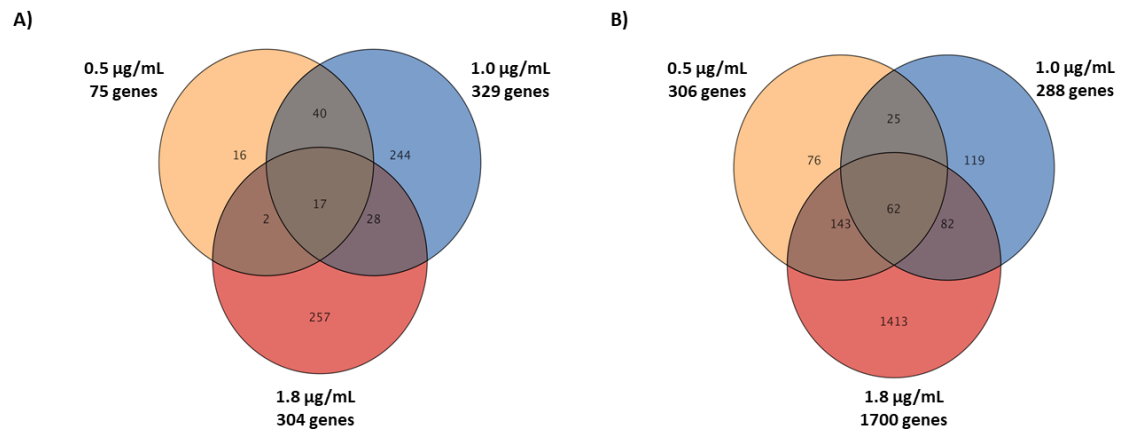


Figura 25 | Perfil dos transcriptomas das linhagens AHOL1, 1321N1, U343 e U87 expostas a 0.5 µg/mL, 1.0 µg/mL e 1.8 µg/mL de pisosterol por 48h. **A)** Diagrama de Venn para os genes com a expressão aumentada (*up-regulated*). **B)** Diagrama de Venn para os genes com a expressão diminuída (*down-regulated*). Em ambas análises, considerou-se Fold-Change ≥2.

Para explorar as funções dos GDEs, os mesmos foram submetidos a análises de enriquecimento do GO e de vias do KEGG. Para isso, exploramos apenas o GDEs comuns aos três tratamentos (0.5 µg/mL, 1.0 µg/mL e 1.8 µg/mL). A análise do GO para os genes *up-regulated* foi significativa para 17 termos (Tabela 14; Apêndice 8) e para os genes *down-regulated*, 284 termos (Tabela 14; Apêndice 9).

Tabela 14 | Termos enriquecidos da Ontologia Gênica (GO) dos genes *up-regulated* e *down-regulated* das linhagens de gliomas tratadas com pisosterol. Foram considerados significantes, termos enriquecidos com $p < 0.05$.

	Ontologia Gênica (GO)	Termos	Contagem de genes	p-value
Up-regulated	GO:0034711 GO:0034712	Inibição de ligação	1	0.0017
	GO:0048186 GO:0048187			
	GO:0015026 GO:0015027	Atividade de co-receptores	1	0.0135
	GO:0015028			
	GO:0030433	Via de degradação proteica associada ao retículo endoplasmático	1	0.0219

Down-regulated	GO:0005814	Centríolo	1	0.0236
	GO:0004527 GO:0008857	Atividade de exonuclease	1	0.0252
	GO:0006260 GO:0055133	Replicação do DNA	1	0.0465
	GO:0005488	Ligação	18	0.049993653
	GO:0050896 GO:0051869	Resposta à estímulo	14	0.0062
	GO:0031982 GO:0031988	Vesícula	13	4.56E-04
	GO:0010468	Regulação da expressão gênica	9	0.0482
	GO:0000785 GO:0005717	Cromatina	5	0.0011
	GO:0005694	Cromossomo	5	0.0064
	GO:0032776	Metilação do DNA na citosina	3	2.51E-04
	GO:0006342 GO:0016440	Silenciamento da cromatina	3	5.44E-04
	GO:0044728	Metilação ou desmetilação do DNA	3	7.16E-04
	GO:0044815	Complexo de empacotamento do DNA	3	0.0020
	GO:0034728	Organização dos nucleossomos	3	0.0027

Segundo a análise de vias dos GDEs feita pelo KEGG, três vias foram enriquecidas significativamente para os genes *up-regulated* e 21 vias para os genes *down-regulated* (Tabela 15).

Tabela 15 | Principais vias significativas comuns a todos os tratamentos com pisosterol (0.5 µg/mL; 1.0 µg/mL e 1.8 µg/mL) das linhagens de gliomas.

	Vias	p-value	Genes
Up-regulated	Via do sistema ubiquitina-proteassoma	0.0444	1
	Ubiquitinação proteica	0.0233	1

<i>Down-regulated</i>	Sinalização interferon-gama	0.0090	3
	Degradação pelo proteassoma	0.0308	2
	Modificações nas histonas	0.0128	2
	Atividade transcricional do heterotrímero <i>SMAD2-SMAD3-SMAD4</i>	0.0052	2
	Receptores do tipo Toll	0.0542	1

3. **Análise integrada dos CNVs com o transcriptoma**

Para determinar as vias cujos níveis de expressão correlacionam-se com o número de cópias, realizamos uma análise integrada dos dados de CNVs e do transcriptoma de todos os tratamentos em todas as linhagens. Esta análise revelou que a expressão de 1330 vias se correlacionou com as alterações no número de cópias (Correlação de Pearson ajustada $P < 0.05$). Dessas, contudo, apenas 64 vias foram significativas (Tabela 11).

CAPÍTULO 5

PERFIL DE METILAÇÃO DA REGIÃO PROMOTORA DE MÚLTIPLOS GENES DURANTE O DESENVOLVIMENTO DOS ASTROCITOMAS

Caracterização das biópsias utilizadas

Para estabelecer o perfil de metilação de vinte e seis genes durante o processo de desenvolvimento dos astrocitomas, obtivemos 98 biópsias de pacientes diagnosticados com astrocitomas (56 mulheres e 52 homens) do Hospital Ophir Loyola (Belém, Pará, Brasil) de janeiro de 2013 a março de 2018 (Apêndice 1). Onze biópsias foram patologicamente classificadas como astrocitomas pilocíticos (OMS grau I), com idades variando de 1-23 anos (média: 9,45; 5 homens, 6 mulheres), 10 astrocitomas difusos (OMS grau II), com idades variando de 2-64 anos de idade (média: 27,1; 5 homens e 5 mulheres), 23 astrocitomas anaplásicos (OMS grau III), com idades variando de 18-65 anos (média: 45,9; 15 homens e 8 mulheres) e 54 GBM (OMS grau IV), com idades variando de 7-84 anos (média: 55,8; 29 homens, 25 mulheres). Além disso, amostras não neoplásicas foram obtidas de 10 pacientes com traumatismo cranioencefálico (TCE) no mesmo hospital.

Frequência da metilação da região promotora de 26 genes em astrocitomas

No início do nosso estudo, os perfis de metilação dos 26 genes de todas as amostras de astrocitomas foram avaliados usando o ensaio BSP-PCR. Esses genes foram selecionados a partir de diferentes estudos de metilomas da literatura que mostraram a relação da alteração no padrão de metilação da região promotora com a carcinogênese humana.

Os genes selecionados atuam nas vias de sinalização NF-kappaB e MAPK (*TNFRSF1A*; *IRAK3*) (Wesche *et al.*, 1999; Matsuda *et al.*, 2003; Su *et al.*, 2007; Domon *et al.*, 2008; Saito *et al.*, 2016), transcrição de snRNA (*SNAPC2*) (Henry *et al.*, 1995; Yoon e Roeder, 1996; Ma *et al.*, 2015), via de sinalização apoptótica (*TNFRSF1A*; *CASP8*; *CDH1*) (Holler *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2007; Koncz *et al.*, 2012; Wong *et al.*, 2018), via de sinalização mediada por interleucina-1 (*IRAK3*) (Wesche *et al.*, 1999), metabolismo de glutatona (*GPX3*) (Brigelius-Flohe e Maiorino, 2013), via de sinalização Wnt (*FZD9*; *CDH1*) (Wang *et al.*, 2009; Ramirez *et al.*, 2016; Wong *et al.*, 2018), ativador transcricional e atividade repressora (*TFAP2C*) (Zhu *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2012), via de sinalização p53 (*RPRM*) (Saavedra *et al.*, 2015; Figueroa *et al.*, 2017), regulação da transcrição (*POU4F3*) (Clough *et al.*, 2004; Zhang, L. *et al.*, 2013), dano ao DNA e atividade de metiltransferase (*MGMT*) (Rydberg *et al.*, 1990).

Dentre todos os 26 genes investigados, apenas 11 exibiram mudanças no padrão de metilação na região promotora (Figura 26). Os níveis de metilação foram relativamente

altos para vários genes, incluindo o *TNFRSF1A* (Média = 84,46%), *SNAPC2* (Média = 73,28%), *CASP8* (Média = 72,06%), *IRAK3* (Média = 71,59%). Contudo, os genes *GPX3* (média = 42,53%), *FZD9* (média = 36,69%), *TFAP2C* (média = 33,29%), *CDH1* (Média = 23,68%), *RPRM* (Média = 23,39%), *POU4F3* (Média = 15,11%) e *MGMT* (Média = 13,78%) exibiram níveis mais baixos de metilação. Além disso, não observamos alterações no padrão de metilação em nenhum dos genes nos tecidos cerebrais normais.

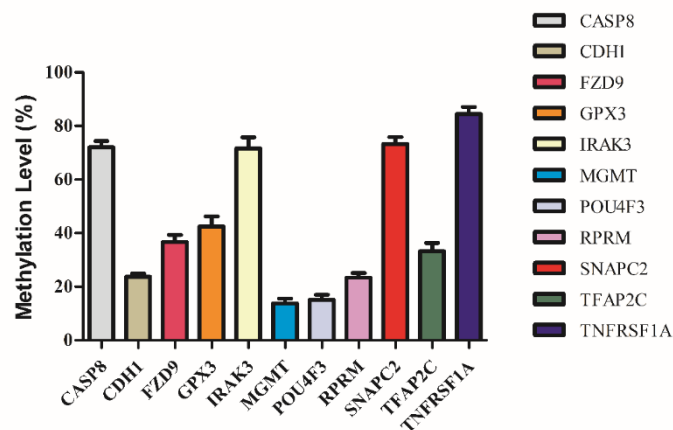


Figura 26 | Nível de metilação do DNA (%) da região promotora dos 11 genes em todas os graus de astrocitomas.

Correlação e frequência do padrão de metilação dos 11 genes nos diferentes graus de astrocitomas

Para avaliar a evolução do padrão de metilação e as correlações existentes em cada grau, analisamos o padrão de metilação dos 11 genes (*TNFRSF1A*; *SNAPC2*; *CASP8*; *IRAK3*; *GPX3*; *FZD9*; *TFAP2C*; *CDH1*; *RPRM*; *POU4F3* e *MGMT*) usando combinações pareadas.

Astrocitomas de Grau I

Nos astrocitomas de grau I, apenas nove genes apresentaram alterações no padrão de metilação. Os genes frequentemente metilados foram respectivamente o *TNFRSF1A* (Média = 97,55%), *SNAPC2* (Média = 78,96%), *CASP8* (Média = 72,70%) e *IRAK3* (Média = 66,05%), enquanto os menos frequentemente metilados foram o *FZD9* (Média = 17,00%), *CDH1* (Média = 11,37%), *MGMT* (Média = 7,945%), *RPRM* (Média = 7,100%) e *POU4F3* (Média = 0,8364%). Os genes *GPX3* e *TFAP2C* não estavam metilados (Figura 27)

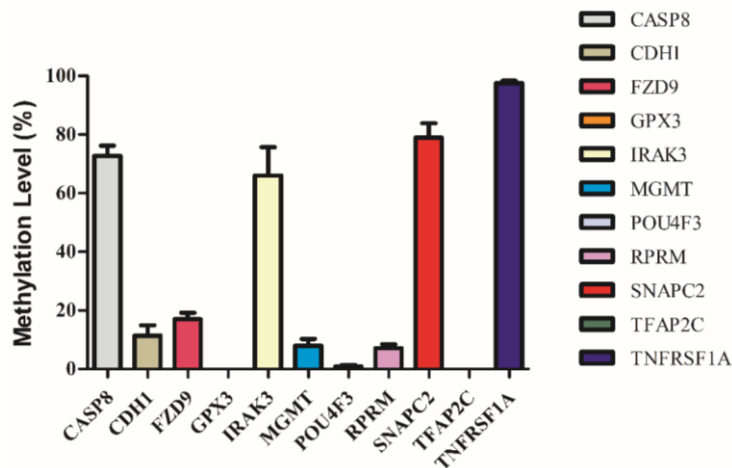


Figura 27 | Nível de metilação do DNA (%) da região promotora dos 11 genes em astrocitomas de grau I.

Correlações fortes foram observadas entre a metilação de *CASP8* e *CDH1* ($r = 0,8226$, $p < 0,001$), *CASP8* e *FZD9* ($r = 0,9580$, $p < 0,001$), *CASP8* e *TNFRSF1A* ($r = 0,7775$, $p < 0,01$), *CDH1* e *FZD9* ($r = 0,8646$, $p < 0,001$), *FZD9* e *TNFRSF1A* ($r = 0,7522$, $p < 0,01$), *MGMT* e *RPRM* ($r = 0,8373$, $p < 0,001$). Correlações moderadas foram observadas entre a metilação do *CDH1* e *RPRM* ($r = 0,5548$, $p \leq 0,05$), *CDH1* e *SNAPC2* ($r = 0,6597$, $p < 0,01$), *CDH1* e *TNFRSF1A* ($r = 0,6975$, $p < 0,01$), *FZD9* e *SNAPC2* ($r = 0,5422$, $p \leq 0,05$), *IRAK3* e *MGMT* ($r = -0,5649$, $p \leq 0,05$), *MGMT* e *SNAPC2* ($r = 0,6746$, $p < 0,01$) e *RPRM* e *TNFRSF1A* ($r = 0,5800$, $p \leq 0,05$) (Tabela 16).

Tabela 16 | Associações dos níveis de metilação avaliados por combinações pareadas em astrocitomas de grau I.

	<i>CASP8</i>	<i>CDH1</i>	<i>FZD9</i>	<i>GPX3</i>	<i>IRAK3</i>	<i>MGMT</i>	<i>POU4F3</i>	<i>RPRM</i>	<i>SNAPC2</i>	<i>TFAP2C</i>	<i>TNFRSF1A</i>
<i>CASP8</i>											
<i>CDH1</i>	0.8226***										
<i>FZD9</i>	0.9580***	0.8646***									
<i>GPX3</i>											
<i>IRAK3</i>	0.4568	0.1831	0.5057								
<i>MGMT</i>	0.3933	0.5548*	0.3156		-0.5649*						
<i>POU4F3</i>	0.3294	-0.0669	0.1709		0.1387	0.1767					
<i>RPRM</i>	0.4920	0.5548*	0.4165		-0.4612	0.8373***	0.2468				
<i>SNAPC2</i>	0.5193	0.6597*	0.5422*		-0.2285	0.6746**	-0.0623	0.4779			
<i>TFAP2C</i>											
<i>TNFRSF1A</i>	0.7775**	0.6976*	0.7523**		0.2309	0.4117	0.1469	0.5800*	0.2073		

Spearman's rho. (* $p \leq 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

Astrocitomas de Grau II

Nos astrocitomas de grau II, os genes frequentemente metilados foram respectivamente o *TNFRSF1A* (Média = 96,32%), *IRAK3* (Média = 77,92%), *CASP8* (Média = 57,35%) e *SNAPC2* (Média = 42,15%) e os genes menos frequentemente metilados foram respectivamente o *FZD9* (média = 20,67%), *CDH1* (média = 18,69%),

MGMT (média = 9,064%), *TFAP2C* (média = 4,291%), *RPRM* (média = 3,573%), *GPX3* (média = 2,909%) e *POU4F3* (Média = 0,4545%) (Figura 28).

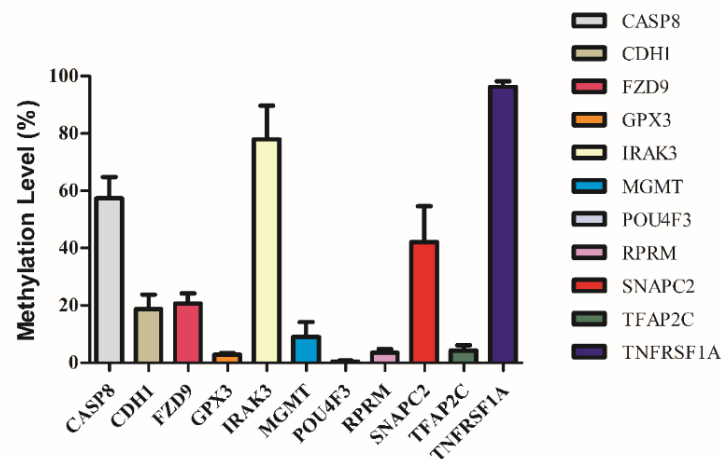


Figura 28 | Nível de metilação do DNA (%) da região promotora dos 11 genes em astrocitomas de grau II.

Correlações fortes foram observadas entre a metilação de *CASP8* e *CDH1* ($r = 0,9413$, $p < 0,001$), *CASP8* e *FZD9* ($r = 0,9382$, $p < 0,001$), *CASP8* e *IRAK3* ($r = 0,8006$, $p \leq 0,05$), *CDH1* e *FZD9* ($r = 0,9560$, $p < 0,05$), *CDH1* e *IRAK3* ($r = 0,8412$, $p < 0,01$), *FZD9* e *IRAK3* ($r = 0,7290$, $p < 0,05$), *POU4F3* e *TFAP2C* ($r = 0,9938$, $p < 0,05$). Correlações moderadas foram observadas entre a metilação do *MGMT* e *SNAPC2* ($r = 0,6667$, $p \leq 0,05$) (Tabela 17).

Tabela 17 | Associações dos níveis de metilação avaliados por combinações pareadas em astrocitomas de grau II.

	<i>CASP8</i>	<i>CDH1</i>	<i>FZD9</i>	<i>GPX3</i>	<i>IRAK3</i>	<i>MGMT</i>	<i>POU4F3</i>	<i>RPRM</i>	<i>SNAPC2</i>	<i>TFAP2C</i>	<i>TNFRSF1A</i>
<i>CASP8</i>											
<i>CDH1</i>	0.9413***										
<i>FZD9</i>	0.9382***	0.9560*									
<i>GPX3</i>	0.2033	0.2646	0.2936								
<i>IRAK3</i>	0.8006*	0.8412**	0.7290*	0.0863							
<i>MGMT</i>	0.3409	0.1923	0.3719	0.1513	-0.2001						
<i>POU4F3</i>	0.2343	0.2776	0.1895	-0.1673	0.0393	0.4042					
<i>RPRM</i>	0.2685	0.3636	0.2288	-0.1126	0.4752	-0.2493	0.3162				
<i>SNAPC2</i>	0.3814	0.3619	0.4381	-0.3030	0.0000	0.6667*	0.5115	-0.0063			
<i>TFAP2C</i>	0.1746	0.2217	0.1330	-0.2275	0.0000	0.3616	0.9938*	0.2652	0.4923		
<i>TNFRSF1A</i>	0.2619	0.3103	0.4433	0.2730	0.0000	0.6327	0.2485	-0.4861	0.4476	0.2500	

Spearman's rho. (* $p \leq 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

Astrocitomas de Grau III

Nos astrocitomas de grau III, os genes frequentemente metilados foram respectivamente o *TNFRSF1A* (Média = 98.92%), *IRAK3* (Média = 89.58%), *SNAPC2* (Média = 86.35%), *CASP8* (Média = 71.52%), *TFAP2C* (Média = 58.82%) e os genes menos frequentemente metilados foram respectivamente *POU4F3* (Média = 42.15%),

FZD9 (Média = 38.52%), *CDH1* (Média = 31.89%), *GPX3* (Média = 22.77%), *RPRM* (Média = 21.96%) e *MGMT* (Média = 16.79%) (Figura 29).

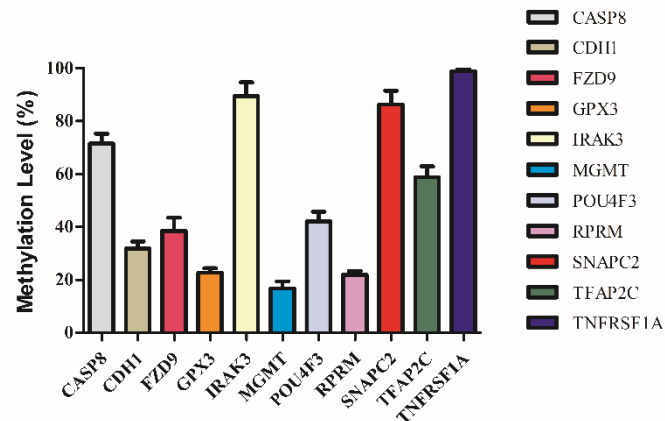


Figura 29 | Nível de metilação do DNA (%) da região promotora dos 11 genes em astrocitomas de grau III.

Correlações fortes foram observadas entre a metilação de *CASP8* e *CDH1* ($r = 0,9489$, $p < 0,001$), *CASP8* e *FZD9* ($r = 0,9886$, $p < 0,001$), *CDH1* e *FZD9* ($r = 0,9558$, $p < 0,001$), *CDH1* e *IRAK3* ($r = 0,7671$, $p < 0,001$), *FZD9* e *IRAK3* ($r = 0,7545$, $p < 0,001$). Correlações moderadas foram observadas entre a metilação de *CDH1* e *TNFRSF1A* ($r = 0,5360$, $p < 0,01$), *GPX3* e *TNFRSF1A* ($r = 0,5696$, $p < 0,01$), *IRAK3* e *TNFRSF1A* ($r = 0,5349$, $p \leq 0,05$), *POU4F3* e *SNAPC2* ($r = 0,5093$, $p \leq 0,05$), *CASP8* e *TNFRSF1A* ($r = 0,4514$, $p \leq 0,05$), *FZD9* e *TNFRSF1A* ($r = 0,4218$, $p \leq 0,05$) e *TFAP2C* e *TNFRSF1A* ($r = 0,4167$, $p \leq 0,05$) (Tabela 18).

Tabela 18 | Associações dos níveis de metilação avaliados por combinações pareadas em astrocitomas de grau III.

	<i>CASP8</i>	<i>CDH1</i>	<i>FZD9</i>	<i>GPX3</i>	<i>IRAK3</i>	<i>MGMT</i>	<i>POU4F3</i>	<i>RPRM</i>	<i>SNAPC2</i>	<i>TFAP2C</i>	<i>TNFRSF1A</i>
<i>CASP8</i>											
<i>CDH1</i>	0.9489***										
<i>FZD9</i>	0.9886***	0.9558***									
<i>GPX3</i>	0.3578	0.3252	0.3082								
<i>IRAK3</i>	0.7828***	0.7671***	0.7545***	0.3555							
<i>MGMT</i>	0.4820	0.4966	0.4630*	0.1410	0.1211						
<i>POU4F3</i>	0.0318	0.1204	0.0401	0.3496	0.1174	-0.1922					
<i>RPRM</i>	0.0442	0.0912	0.0843	-0.0470	-0.1242	0.0257	0.1172				
<i>SNAPC2</i>	0.3036	0.2797	0.2779	0.3648	0.1427	0.1423	0.5093*	0.1765			
<i>TFAP2C</i>	0.1058	0.1000	0.0759	0.3360	0.0534	0.2361	-0.0374	0.0431	-0.0575		
<i>TNFRSF1A</i>	0.4514*	0.5360**	0.4218*	0.5696**	0.5349**	0.2783	0.0570	0.1283	0.1566	0.4167*	

Spearman's rho. (* $p \leq 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

Glioblastoma (Grau IV)

Nos GBMs, os genes frequentemente metilados foram respectivamente o *TNFRSF1A* (Média = 97,60%), *SNAPC2* (Média = 80,08%), *CASP8* (Média = 74,51%), *IRAK3* (Média = 63,72%), *GPX3* (Média = 57,16%), *FZD9* (Média = 42,99%) e os genes menos frequentemente metilados foram respectivamente o *RPRM* (Média = 32,46%), *CDH1* (Média = 23,07%), *MGMT* (Média = 14,57%) e *POU4F3* (Média = 8,73%) (Figura 30).

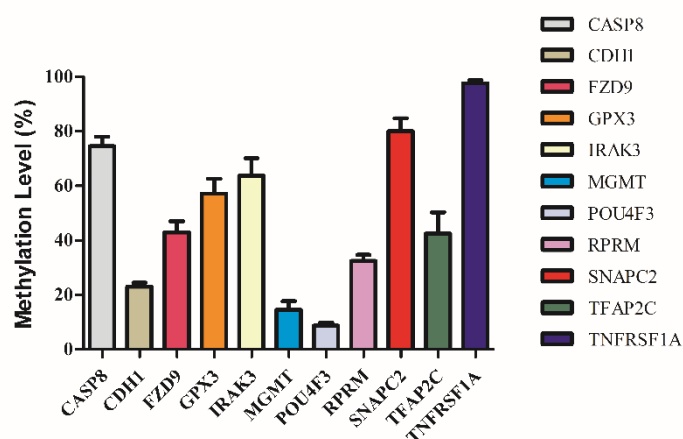


Figura 30 | Nível de metilação do DNA (%) da região promotora dos 11 genes em GBMs.

Correlações fortes foram observadas entre a metilação de *CASP8* e *CDH1* ($r = 0,9593$, $p < 0,001$), *CASP8* e *FZD9* ($r = 0,9689$, $p < 0,001$), *CASP8* e *GPX3* ($r = 0,8003$, $p < 0,001$), *CASP8* e *IRAK3* ($r = 0,8774$, $p < 0,001$), *CDH1* e *FZD9* ($r = 0,9719$, $p < 0,001$), *CDH1* e *GPX3* ($r = 0,7750$, $p < 0,001$), *CDH1* e *IRAK3* ($r = 0,8466$, $p < 0,001$), *FZD9* e *GPX3* ($r = 0,7952$, $p < 0,001$), *FZD9* e *IRAK3* ($r = 0,8799$, $p < 0,001$), *GPX3* e *IRAK3* ($r = 0,9060$, $p < 0,001$), *TFAP2C* e *TNFRSF1A* ($r = 0,7232$, $p < 0,001$) (Tabela 19).

Correlações moderadas foram observadas entre a metilação de *CASP8* e *POU4F3* ($r = -0.5043$, $p < 0.001$), *CASP8* e *RPRM* ($r = -0.4407$, $p < 0.001$), *CASP8* e *SNAPC2* ($r = 0.3428$, $p < 0.01$), *CDH1* e *POU4F3* ($r = -0.3375$, $p < 0.01$), *CDH1* e *RPRM* ($r = -0.3962$, $p < 0.01$), *CDH1* e *SNAPC2* ($r = 0.4264$, $p < 0.01$), *CDH1* e *TFAP2C* ($r = 0.3440$, $p < 0.01$), *FZD9* e *POU4F3* ($r = -0.3805$, $p < 0.01$), *FZD9* e *RPRM* ($r = -0.3815$, $p < 0.01$), *FZD9* e *SNAPC2* ($r = 0.4061$, $p < 0.01$), *FZD9* e *TFAP2C* ($r = 0.3563$, $p < 0.01$), *GPX3* e *POU4F3* ($r = -0.4377$, $p < 0.001$), *GPX3* e *TFAP2C* ($r = 0.3297$, $p < 0.01$), *IRAK3* e *POU4F3* ($r = -0.4173$, $p < 0.01$), *IRAK3* e *RPRM* ($r = -0.4732$, $p < 0.001$), *IRAK3* e *SNAPC2* ($r = 0.3390$, $p < 0.01$), *IRAK3* e *TFAP2C* ($r = 0.3840$, $p < 0.001$), *MGMT* e *POU4F3* ($r = 0.4562$, $p < 0.001$), *MGMT* e *RPRM* ($r = 0.6698$, $p < 0.001$), *MGMT* e

SNAPC2 ($r = 0.3863$, $p < 0.01$), *MGMT* e *TNFRSF1A* ($r = 0.4134$, $p < 0.01$), *POU4F3* e *RPRM* ($r = -0.3498$, $p < 0.01$), *POU4F3* e *TNFRSF1A* ($r = 0.4257$, $p < 0.01$), *SNAPC2* e *TFAP2C* ($r = 0.5264$, $p < 0.001$) e *SNAPC2* e *TNFRSF1A* ($r = 0.6177$, $p < 0.001$). E por fim, encontramos relações fracas entre a metilação de *CASP8* e *TFAP2C* ($r = 0,2699$, $p \leq 0,05$) e *MGMT* e *TFAP2C* ($r = 0,2638$, $p \leq 0,05$) (Tabela 19).

Tabela 19 | Associações dos níveis de metilação avaliados por combinações pareadas em GBMs.

	<i>CASP8</i>	<i>CDH1</i>	<i>FZD9</i>	<i>GPX3</i>	<i>IRAK3</i>	<i>MGMT</i>	<i>POU4F3</i>	<i>RPRM</i>	<i>SNAPC2</i>	<i>TFAP2C</i>	<i>TNFRSF1A</i>
<i>CASP8</i>											
<i>CDH1</i>	0.9593***										
<i>FZD9</i>	0.9689***	0.9719***									
<i>GPX3</i>	0.8003***	0.7750***	0.7952***								
<i>IRAK3</i>	0.8774***	0.8466***	0.8799***	0.9060***							
<i>MGMT</i>	-0.2659	-0.2023	-0.2016	-0.1161	-0.1260						
<i>POU4F3</i>	-0.5043***	-0.3375**	-0.3805**	-0.4377***	-0.4173**	0.4562***					
<i>RPRM</i>	-0.4407***	-0.3962**	-0.3815**	-0.4181**	-0.4732***	0.6698***	0.3498**				
<i>SNAPC2</i>	0.3428**	0.4264**	0.4061**	0.2632	0.3390**	0.3863**	0.2476	0.0841			
<i>TFAP2C</i>	0.2699*	0.3440*	0.3563**	0.3297**	0.3840***	0.2638*	0.2613	-0.0557	0.5264***		
<i>TNFRSF1A</i>	0.0699	0.1217	0.1083	0.1578	0.1594	0.4134**	0.4257**	0.1189	0.6177***	0.7232***	

Spearman's rho. (* $p \leq 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

Metilação e as correlações clinicopatológicas

Outro objetivo do presente estudo foi determinar se havia uma associação entre os padrões de metilação dos 11 genes (*TNFRSF1A*; *SNAPC2*; *CASP8*; *IRAK3*; *GPX3*; *FZD9*; *TFAP2C*; *CDH1*; *RPRM*; *POU4F3* e *MGMT*) com as características clinicopatológicas dos pacientes.

Dos 11 genes avaliados, apenas 7 tiveram uma correlação entre o padrão de metilação e a idade. Os genes *CASP8*, *FZD9*, *CDH1*, *GPX3*, *POU4F3* e *RPRM* tiveram uma correlação positiva com a idade, enquanto que a metilação do *MGMT* se correlacionou inversamente (Figura 31).

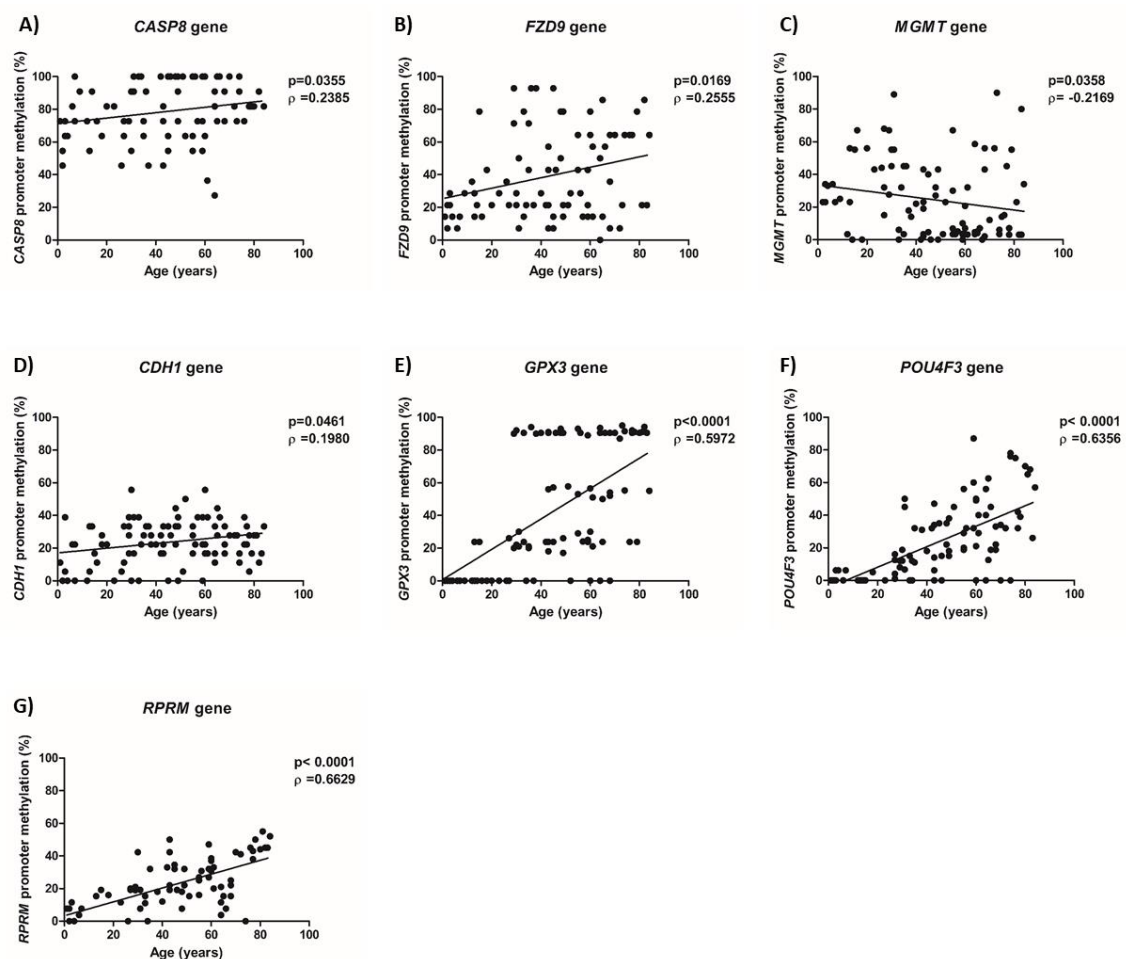


Figura 31 | Correlação entre o padrão de metilação da região promotora dos genes *CASP8* (A), *FZD9* (B), *MGMT* (C), *CDH1* (D), *GPX3* (E), *POU4F3* e *RPRM* (G) com a idade de todos os pacientes diagnosticados com astrocitomas.

Nossos resultados mostraram que apenas 9 dos 11 genes tiveram uma associação significativa entre os gêneros dos pacientes com o padrão de metilação. Houve uma tendência das regiões promotoras dos genes *CASP8*, *IRAK3*, *POUAF3* e *RPRM* serem mais metiladas em homens, enquanto os promotores dos genes *MGMT*, *GPX3*, *CDH1* e *FZD9* foram mais metilados em mulheres (Figura 32).

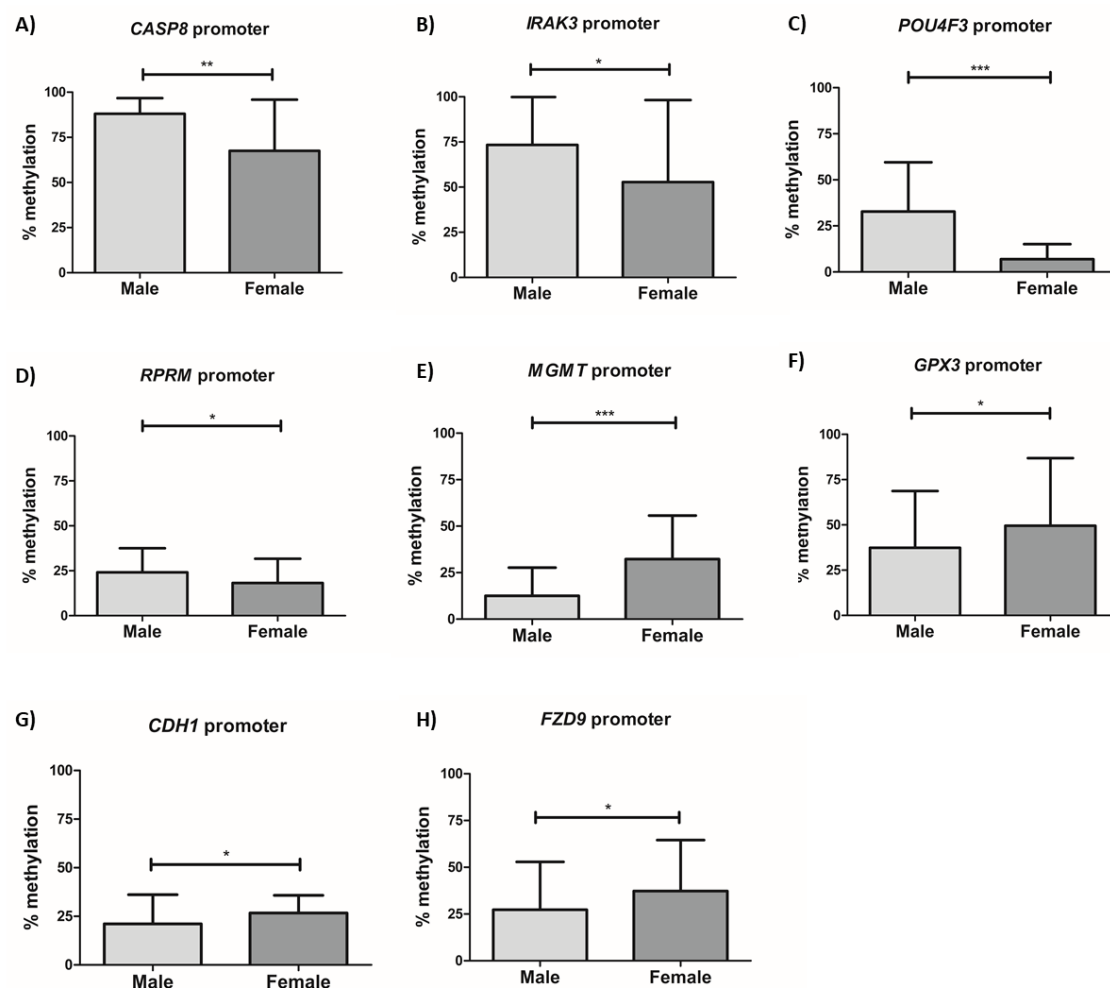


Figura 32 | Correlação entre o padrão de metilação da região promotora dos genes *CASP8* (A), *IRAK3* (B), *POU4F3* (C), *RPRM* (D), *MGMT* (E), *GPX3* (F), *CDH1* (G) e *FZD9* (H) com o sexo de todos os pacientes com astrocitomas.

Todos os 11 genes apresentaram correlações com os diferentes graus tumorais dos astrocitomas (I, II, III e IV). Entretanto, cada gene variou no padrão do número relações significativas (Figura 33).

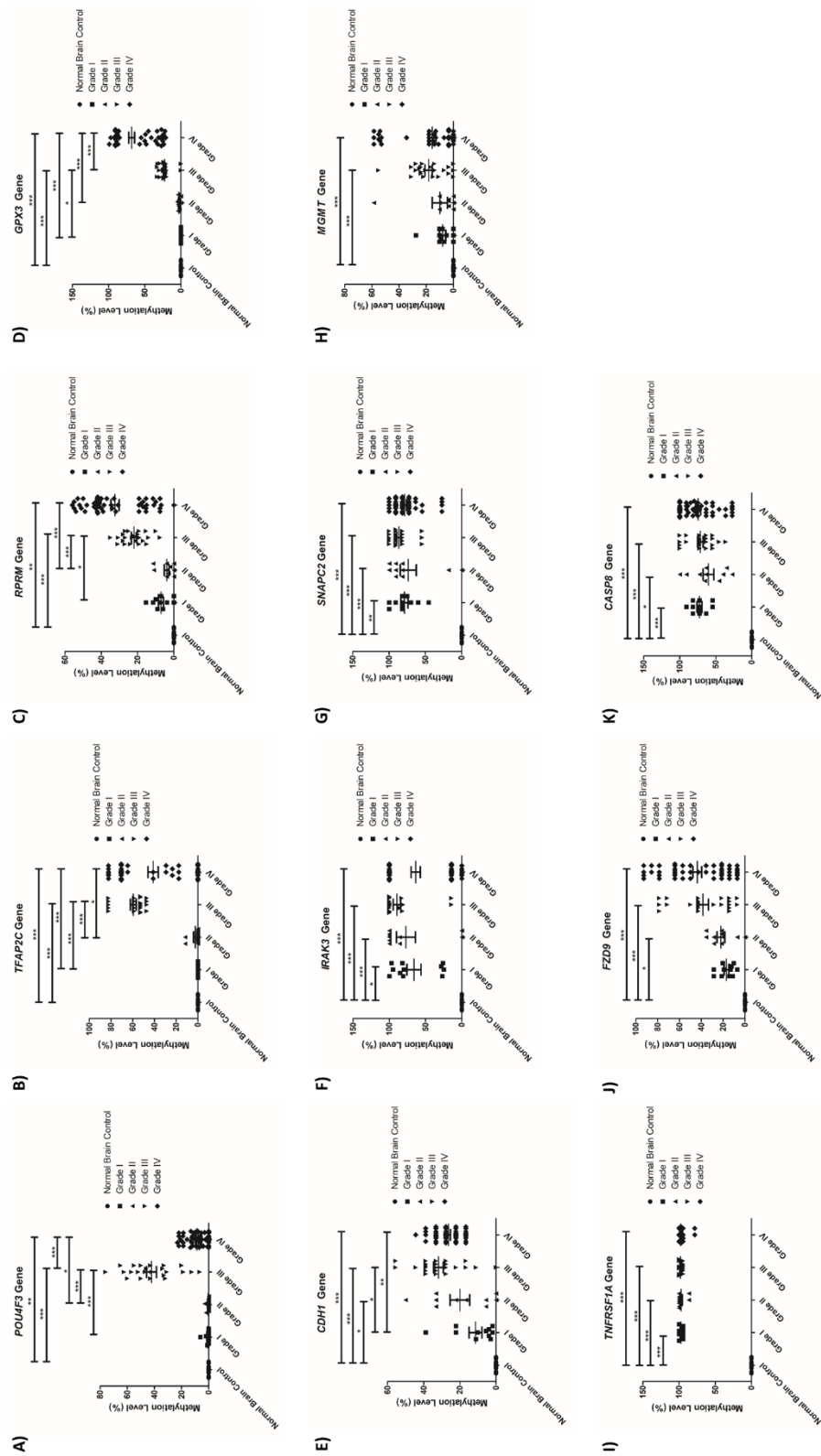


Figura 33 | Correlação entre o padrão de metilação da região promotora dos genes *POU4F3* (A), *TFAP2C* (B), *RPRM* (C), *GPX3* (D), *CDH1* (E), *IRAK3* (F), *SNAPC2* (G), *MGMT* (H), *TNFRSF1A* (I), *FZD9* (J) e *CASP8* (K) com os graus (I, II, III e IV) dos astrocitomas.

CAPÍTULO 6

INVESTIGAÇÃO DA VARIAÇÃO NO NÚMERO DE CÓPIAS (CNVS) EM PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM GLIOMAS DE BELÉM- PA.

Caracterização das biópsias utilizadas

No presente estudo foram analisadas 71 biópsias de pacientes diagnosticados com diferentes gliomas (29 mulheres e 42 homens) do Hospital Ophir Loyola (Belém, Pará, Brasil) de janeiro de 2013 a março de 2018 (Apêndice 1). Quatro biópsias foram patologicamente classificadas como astrocitomas anaplásicos (OMS grau III), com idades variando de 31-59 anos (média: 45; 2 homens, 2 mulheres), 4 astrocitomas difusos (OMS grau II), com idades variando de 34-66 anos (média: 50.25; 2 homens, 2 mulheres), 1 astrocitoma fibrilar (OMS grau II) do sexo feminino com 12 anos de idade, 1 astrocitoma gemistocíticos (OMS grau II) do sexo masculino com 65 anos de idade, 7 astrocitomas pilocíticos (OMS grau I) com idades variando de 7-27 anos (média: 8.85; 3 homens, 4 mulheres), 2 astrocitomas pilomixóides (OMS grau I) com idades de 2 e 3 anos (média: 2.5; 1 homem, 1 mulher), 4 ependimomas celulares (OMS grau II) com idades variando de 1-8 anos (média: 2.75; 2 homens, 2 mulheres), 2 ependimomas anaplásicos (OMS grau III) com idades de 19 e 62 anos (média: 40.5; 2 homens), 3 gangliogliomas com idades variando de 1-30 anos (média: 16; 2 homens, 1 mulher), 26 glioblastomas (OMS grau IV) com idades variando de 27-74 anos (média: 54.57; 17 homens, 9 mulheres), 1 Glioma pontino intrínseco difuso (OMS grau III) do sexo feminino de 64 anos de idade, 3 gliossarcomas (OMS grau IV) com idades variando de 64-77 anos (média: 69; 3 homens), 2 oligoastrocitomas (OMS grau II) com 2 e 35 anos de idade (média: 18.5; 2 homens), 3 oligoastrocitomas anaplásicos (OMS grau III) com idades variando de 24-63 anos (média: 37.66; 1 homem, 2 mulheres), 3 oligodendrogliomas (OMS grau II) com idades variando de 19-43 anos (média: 28.33; 1 homem, 2 mulheres), 1 xantroastrocitoma pleomórfico anaplásico (OMS grau III) do sexo masculino com 26 anos de idade e 4 gliomas de alto grau (OMS grau III) com idades variando de 36-55 anos (média: 44; 2 homens, 2 mulheres).

CNVs dos gliomas paraenses

Para a caracterização dos CNVs das biópsias, utilizamos a lâmina *SurePrint G3 Cancer CGH+SNP Microarray Kit, 4x180K* (Agilent).

Seguindo a nova classificação proposta pela OMS 2016 para os gliomas, todas as amostras foram divididas em 4 grandes grupos: Tumores oligodendrogliais e astrocíticos difusos, outros tumores astrocíticos e tumores ependimais (Tabela 3).

1. Tumores oligodendrogliais e astrocíticos difusos

Esse foi o maior grupo, composto por 53 amostras. Ao utilizarmos um *cut off* de 20%, ou seja, de CNVs que sejam comuns em pelo menos 11 amostras, descobrimos que as mesmas possuem ganhos do cromossomo 7 inteiro e em 1q, 4q e 12q. Além disso, esse grupo foi caracterizado pela perda do cromossomo 10 inteiro e em 9p, 13q e 14q (Figura 34).

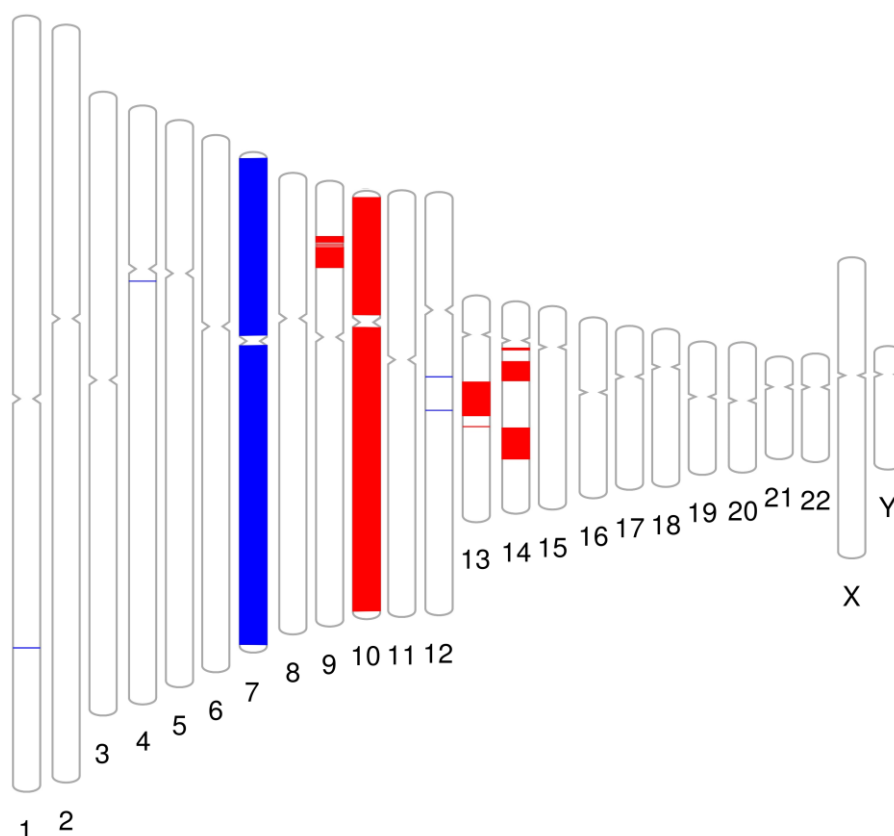


Figura 34 | Ideograma dos ganhos e perdas frequentes dos tumores oligodendrogliais e astrocíticos difusos. Azul: ganho. Vermelho: perda. *cut off* =20%.

Análise de enriquecimento do GO e de vias dos tumores oligodendrogliais e astrocíticos difusos

Para obter uma visão mais aprofundada dos CNVs e suas significâncias funcionais, analisamos os ganhos e as perdas cromossômicas nos tumores oligodendrogliais e astrocíticos difusos usando várias ferramentas e bancos de dados computacionais.

Ganhos nos tumores oligodendrogliais e astrocíticos difusos

Os CNVs foram funcionalmente anotados e classificados usando o *Gene Ontology* (GO), considerando um $p < 0.05$. A análise de enriquecimento funcional do GO para processos biológicos dos ganhos foi significativamente enriquecida para processos envolvendo respostas celulares, regulação do ciclo celular etc. (Figura 35).

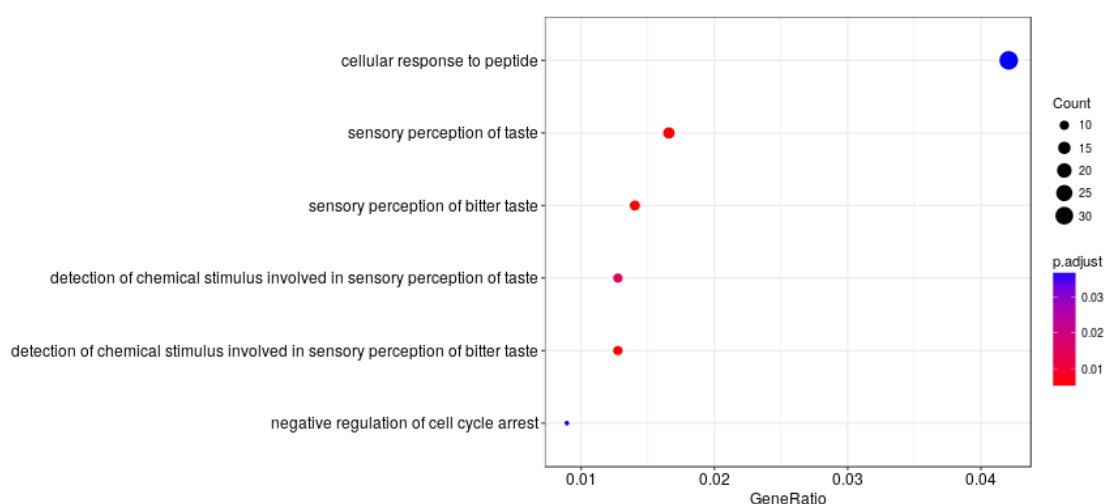


Figura 35 | Principais categorias da Ontologia Gênica (GO) de processos biológicos dos genes que sofreram ganhos nos tumores oligodendrogliais e astrocíticos difusos.

O GO para funções moleculares foi significativamente enriquecido para a atividade de metalocarboxipeptidase, transporte transmembranar etc (Figura 36).

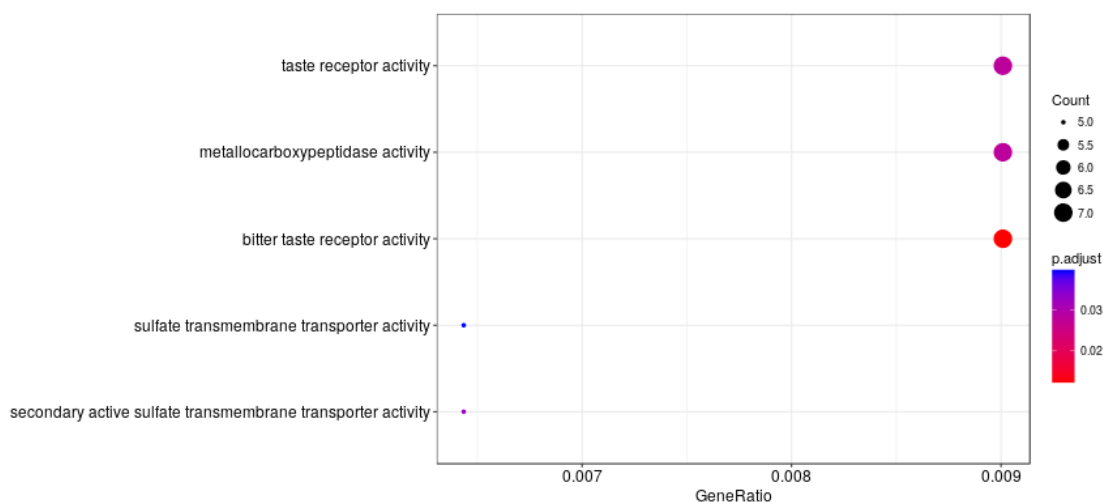


Figura 36 | Principais categorias da Ontologia Gênica (GO) de funções moleculares dos genes que sofreram ganhos nos tumores oligodendrogliais e astrocíticos difusos.

Ao fazermos uma análise usando o *Disease Ontology*, os ganhos foram enriquecidos para diversas doenças, incluindo o desenvolvimento de gliomas (Figura 37).

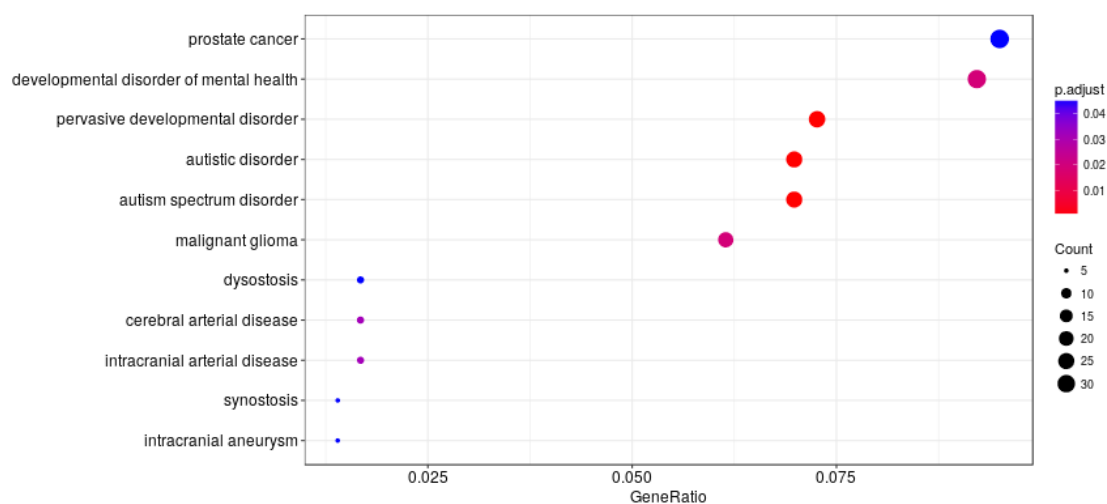


Figura 37 | Principais categorias do *Disease Ontology* dos genes que sofreram ganhos nos tumores oligodendrogliais e astrocíticos difusos.

Perdas nos tumores oligodendrogliais e astrocíticos difusos

A análise de enriquecimento funcional do GO para processos biológicos dos genes que sofreram perdas foi significativamente enriquecida para processos envolvendo resposta imune, regulação da cascata *JAK-STAT* etc. (Figura 38).

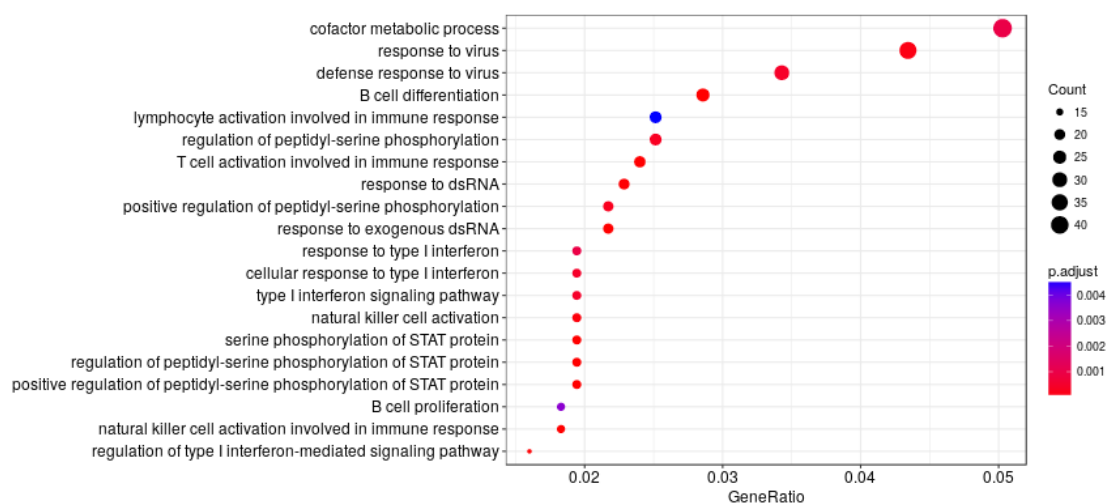


Figura 38 | Principais categorias da Ontologia Gênica (GO) de processos biológicos dos genes que sofreram perdas nos tumores oligodendrogliais e astrocíticos difusos.

O GO para funções moleculares foi significativamente enriquecido para a atividade oxidorreductase, a ligação do receptor de interferon tipo I e atividade da lipase (Figura 39).

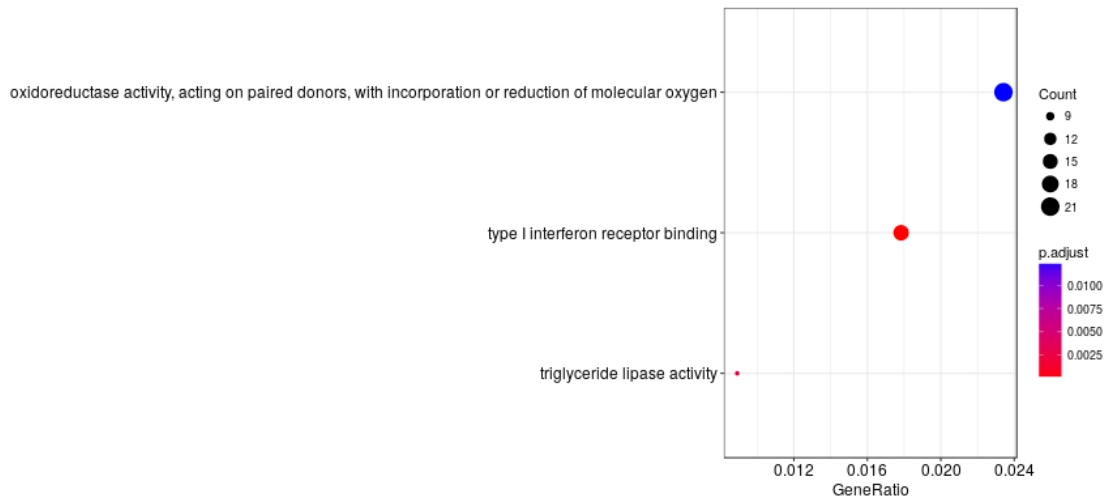


Figura 39 | Principais categorias da Ontologia Gênica (GO) de funções moleculares dos genes que sofreram perdas nos tumores oligodendrogliais e astrocíticos difusos.

Segundo a análise do KEGG, as principais vias afetadas com as perdas ocorridas no genoma dos tumores oligodendrogliais e astrocíticos difusos, foram: Via de sinalização do receptor RIG-I, via de sinalização do receptor Toll, via de sinalização do receptor NOD etc (Figura 40).

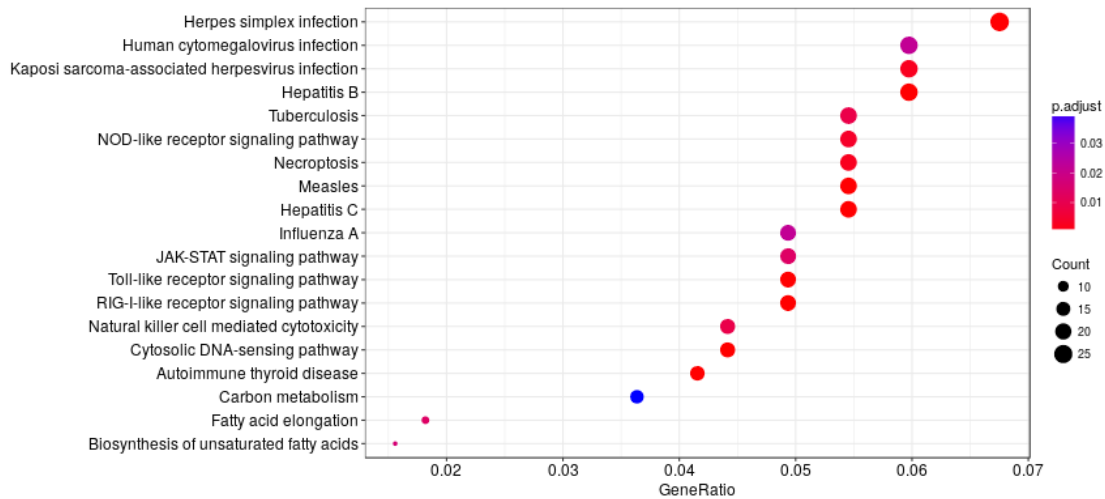


Figura 40 | Principais vias gênicas alteradas em consequência das perdas genômicas nos tumores oligodendrogliais e astrocíticos difusos.

Relação dos CNVs com os graus dos tumores oligodendrogliais e astrocíticos difusos.

Grau II da OMS

Esse grupo foi composto por 14 amostras classificadas histologicamente como grau II da OMS. Ao utilizarmos um *cut off* de 20%, descobrimos que essas amostras foram genomicamente caracterizadas por possuírem perdas nos cromossomos 1p, 9p, 10q e 19q, além de possuírem ganho do cromossomo 7 inteiro (Figura 41).

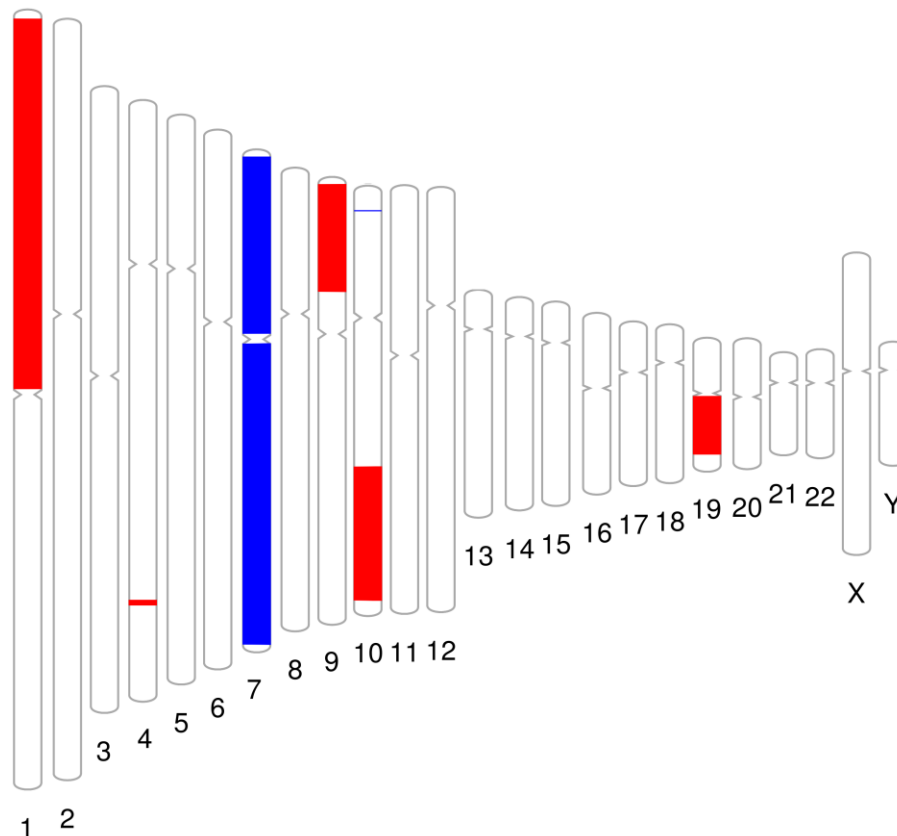


Figura 41 | Ideograma dos ganhos e perdas frequentes dos tumores oligodendrogliais e astrocíticos difusos de grau II. Azul: ganho. Vermelho: perda. *cut off* =20%.

Grau III da OMS

Esse grupo foi composto por 12 amostras classificadas histologicamente como grau III da OMS. Claramente é possível observar o aumento da distribuição de ganhos e perdas cromossômicas comparado com o grau II. Entretanto, alguns CNVs presentes no grau II mantiveram-se no grau III, como por exemplo o ganho do cromossomo 7 e as perdas dos cromossomos 10q e 19q.

Genomicamente, as amostras de grau II foram caracterizadas por possuírem perdas dos cromossomos 1p, 3p, 5q, 9p, 10, 11p, 13q, 18p, 19q, Xp além de possuírem ganhos dos cromossomos 4q, 7, 9q, 12, 17q e 19p. (Figura 42).

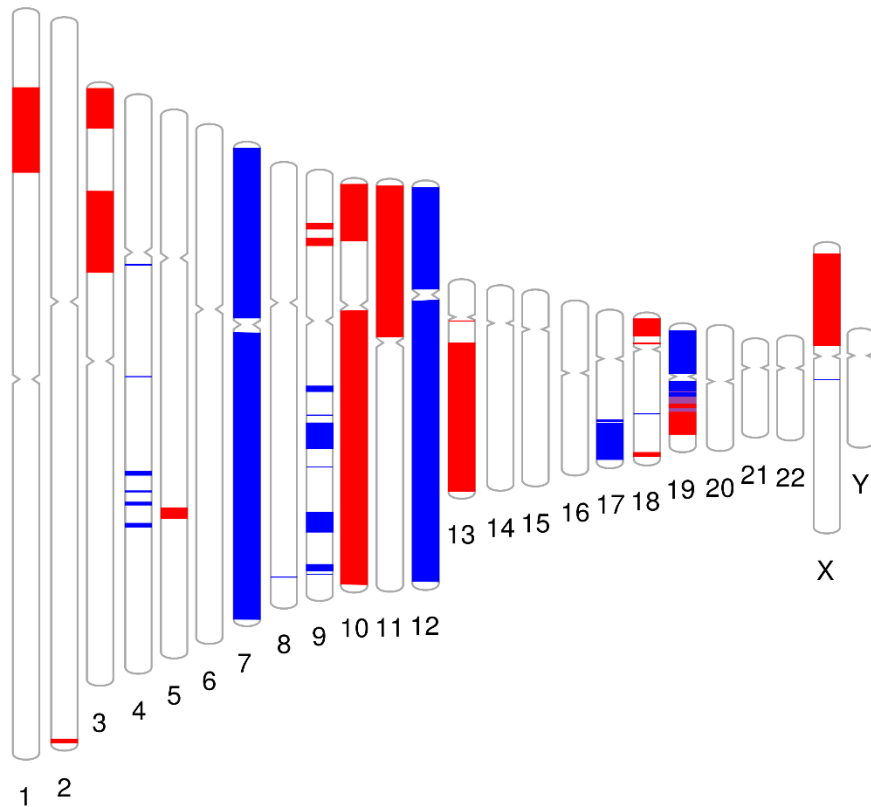


Figura 42 | Ideograma dos ganhos e perdas frequentes dos tumores oligodendrogliais e astrocíticos difusos de grau III. Azul: ganho. Vermelho: perda. *cut off* =20%.

Grau IV da OMS

Esse grupo foi composto por 29 amostras classificadas como grau IV da OMS. Comparando com os graus II e III, a perda do cromossomo 7 manteve-se no grau IV. Além disso, houve um aumento de perdas no cromossomo 10, quando comparamos com os graus inferiores (Figura 43).

Genomicamente, as amostras de grau IV foram caracterizadas por possuírem perdas dos cromossomos 9p, 10, 13q, 14q, 15q e 22q além de possuírem ganhos dos cromossomos 1q, 3q, 4q, 7, 12q e 20 (Figura 43).

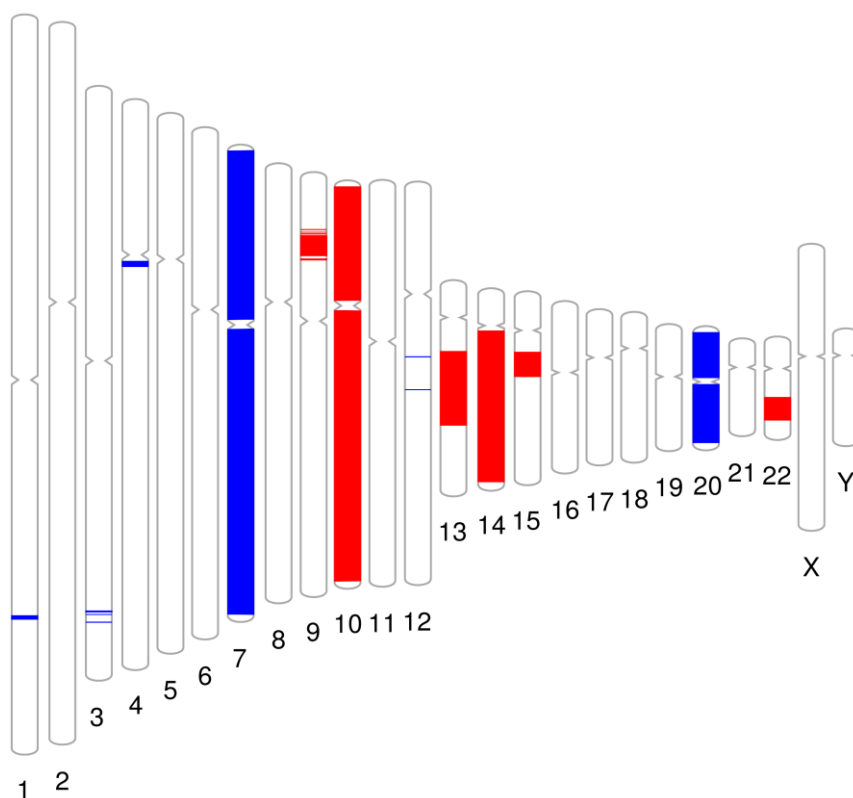


Figura 43 | Ideograma dos ganhos e perdas frequentes dos tumores oligodendrogiais e astrocíticos difusos de grau IV. Azul: ganho. Vermelho: perda. *cut off* =20%.

2. Outros tumores astrocíticos

Esse grupo foi composto por 10 amostras de astrocitomas pilocíticos (OMS grau I). Ao utilizarmos um *cut off* de 30%, descobrimos que esse grupo possui apenas um ganho frequente do cromossomo 7q (Figura 44).

A análise do KEEG demonstrou que 11 vias gênicas foram afetadas pelo ganho em 7q, sendo elas: via de sinalização *VEGF*, via *Ras*, ativação de linfócitos B, via de sinalização das integrinas, via de sinalização *PDGF*, via de sinalização de interleucinas, angiogênese, inflamação mediada pela via de sinalização de quimiocinas e citocinas, via de sinalização *EGF/EGFR* e ativação de células T.

As anotações das doenças baseadas na ontologia usando o *Disease Ontology* (DO), demonstraram um enriquecimento para o astrocitoma pilocítico, gliomas de baixo grau, tumor cerebral infantil e astrocitoma de baixo grau etc. Tais resultados são totalmente compatíveis com os dados histológicos de nossas biópsias (Figura 45).

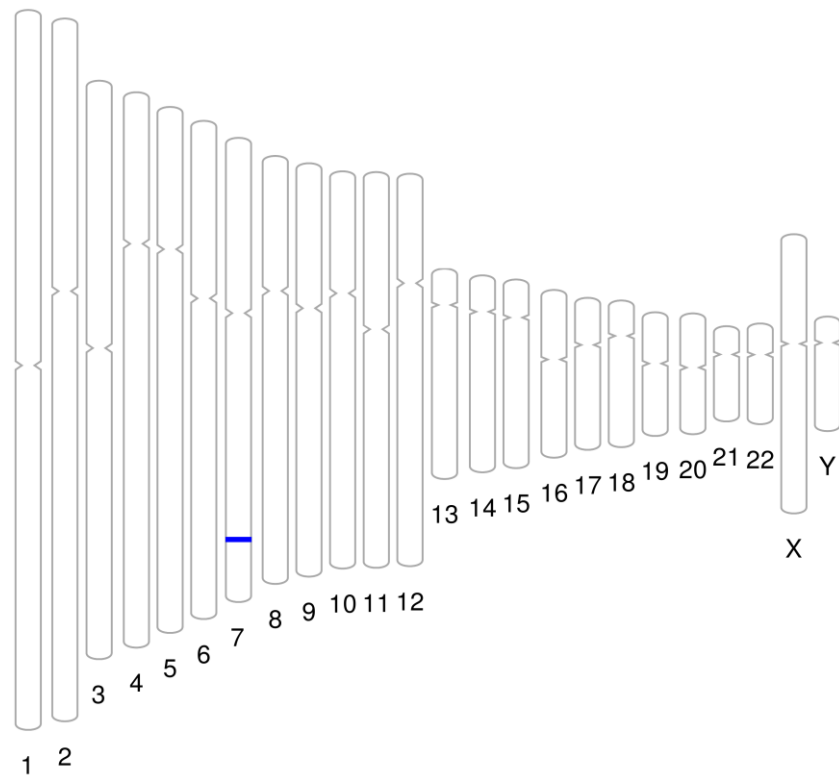


Figura 44 | Ideograma do ganho em 7q do grupo dos outros tumores astrocíticos. Azul: ganho. *cut off* =30%.

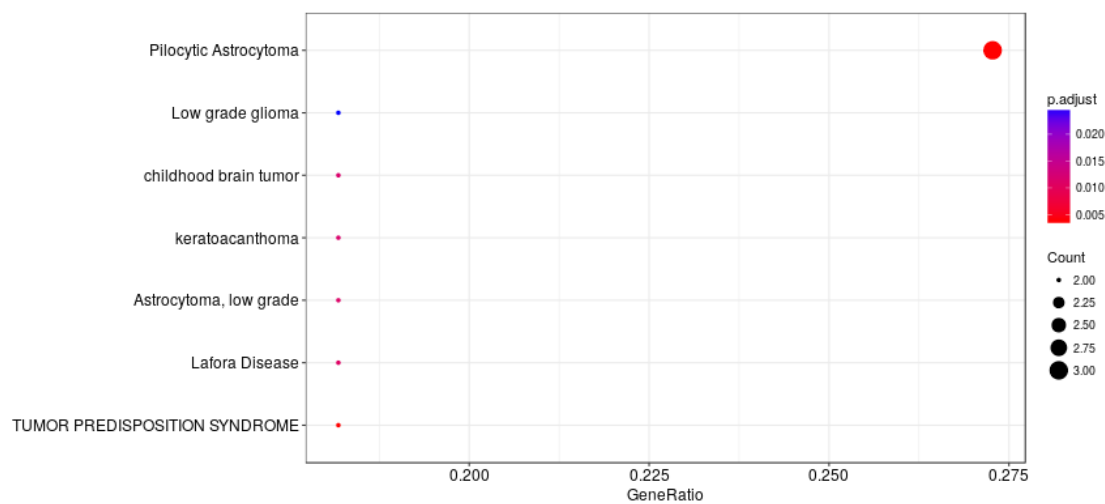


Figura 45 | Principais categorias do *Disease Ontology* relacionadas com o ganho do 7q do grupo dos outros tumores astrocíticos.

3. Tumores ependimais

Esse grupo foi composto por 3 ependimomas celulares (OMS grau II) e 3 ependimomas anaplásicos (OMS grau III). Ao utilizarmos um *cut off* de 50%, descobrimos que esse grupo possui ganhos frequentes nos cromossomos 1q e 19 e perda todo o cromossomo 3 (Figura 46).

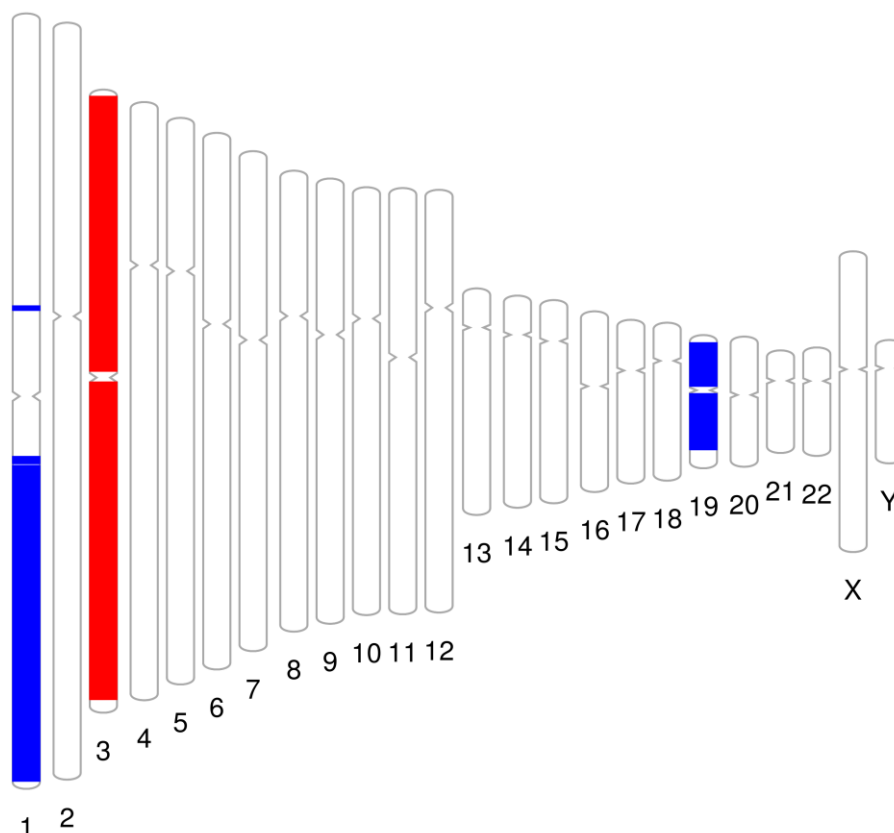


Figura 46 | Ideograma dos ganhos e perdas frequentes dos tumores ependimais. Azul: ganho. Vermelho: perda. *cut off* =50%.

Análise de enriquecimento do GO e de vias dos ganhos dos tumores ependimais

A análise de enriquecimento funcional do GO para processos biológicos dos ganhos foi significativamente enriquecida para processos envolvendo o silenciamento da cromatina, montagem dos nucleossomos, regulação do silenciamento de genes, regulação da expressão gênica, silenciamento de genes por miRNAs, metilação do DNA, replicação do DNA etc (Figura 47).

No total, 727 vias gênicas foram afetadas pelos ganhos. Dessas, as principais foram: via de sinalização dos receptores β -adrenérgicos, via do *P53*, via *PDGF*, via *TGF β* , via Notch, via JAK/STAT, via de sinalização da caderina, via de sinalização da apoptose etc.

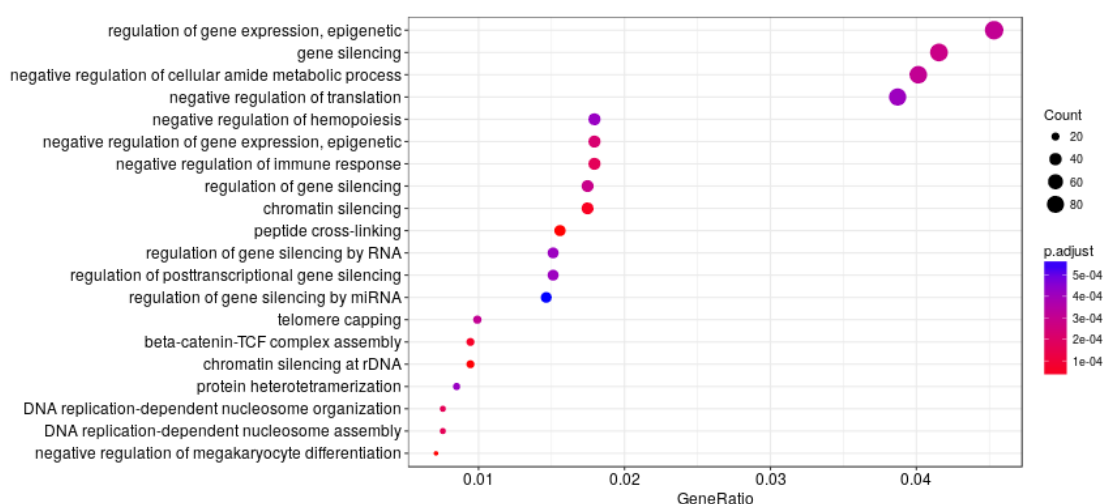


Figura 47 | Principais categorias da Ontologia Gênica (GO) dos processos biológicos relacionados com os ganhos dos tumores endodimais.

As principais funções moleculares afetadas pelos ganhos foram a atividade antioxidante, atividade catalítica, atividade dos receptores, atividade dos transdutores de sinais, estrutura das moléculas, atividade transportadora e a atividade da regulação da tradução.

Análise de enriquecimento do GO e de vias das perdas dos tumores endodimais

A anotação funcional dos processos biológicos no GO revelou o enriquecimento significativo dos seguintes termos: receptores purinérgicos acoplados à proteína G, regulação das sinapses, via de sinalização mediada por quimiocinas, sinalização purinérgica etc (Figura 48).

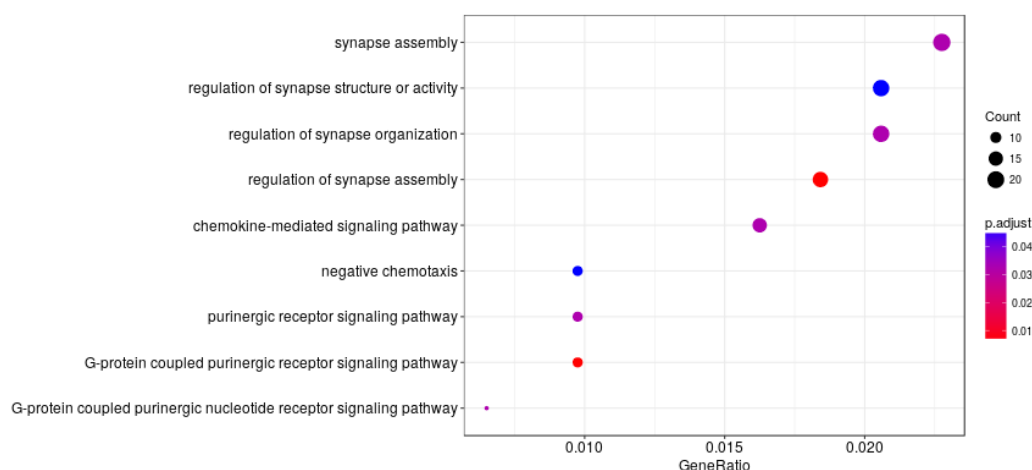


Figura 48 | Principais categorias dos processos biológicos do GO relacionados com as perdas dos tumores endodimais.

No total, 432 vias gênicas foram afetadas pelos ganhos. Dessas, as principais foram: via de sinalização da caderina, via de sinalização FAS, via de sinalização Hedgehog, via Notch, via *P53*, via da PI 3-quinase, via *TGFβ*, via de sinalização *Wnt*, via VEGF, via *Ras* etc.

As principais funções moleculares afetadas pelas perdas foram atividade dos receptores de citocinas, atividade dos receptores de quimiocinas, atividade antioxidante, atividade catalítica, atividade dos transdutores de sinais etc. (Figura 49).

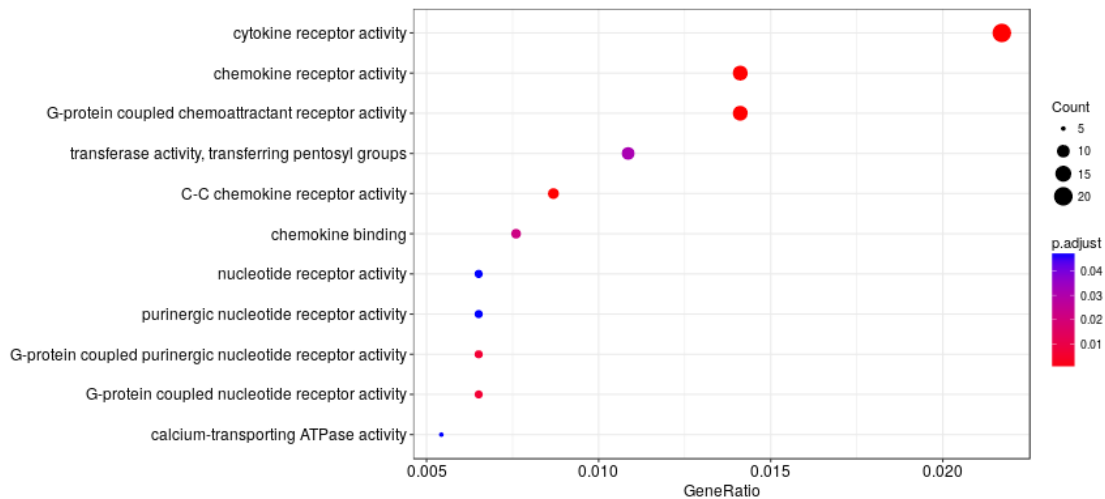


Figura 49 | Principais categorias das funções moleculares do GO relacionados com as perdas dos tumores endodimais.

DISCUSSÃO

Para melhor compreensão, a discussão da presente tese foi dividida conforme os capítulos apresentados no tópico dos resultados. Não discutirei o capítulo 1, tendo em vista que o mesmo é um artigo de revisão aceito no periódico “*Epigenomics*”, e do mesmo modo, não discutirei o capítulo 3, considerando que o mesmo é de um artigo que já foi submetido para a revista “*European Journal of Pharmacology*”.

Capítulo 2 - Caracterização genômica e transcriptômica da linhagem AHOL1

Os modelos de linhagens celulares são ferramentas essenciais para estudar os mecanismos moleculares subjacentes à progressão tumoral, metástase, recidivas e resistência ao tratamento (Domcke *et al.*, 2013). Vários estudos mostram que os subtipos de GBMs desenvolvem-se a partir de mecanismos moleculares diferentes, e por essa razão, a disponibilidade de linhagens bem caracterizadas e recém estabelecidas pode ter um alto impacto na compreensão da complexa biologia desse tumor, assim como pode contribuir para a identificação de novos alvos terapêuticos. Considerando isso, em 2015, (Xie *et al.*, 2015) desenvolveu uma das bibliotecas de linhagens de GBMs mais expressivas existentes. Esse biobanco possui 53 linhagens de GBMs anotadas e validadas derivadas de amostras cirúrgicas de pacientes com GBM, preservando ao máximo as características dos tumores primários.

Apesar da linhagem AHOL1 ter sido caracterizada citogeneticamente e morfolologicamente por Pereira *et al.* (2010), não havia nenhum estudo caracterizando-a molecularmente. Assim, no presente estudo apresentamos a caracterização molecular da mesma.

A AHOL1 apresentou uma grande quantidade de CNVs em todo o genoma similares aos descritos para glioblastomas (Furgason *et al.*, 2014; Cohen *et al.*, 2015; Nicolaidis, 2015; Ramkissoon *et al.*, 2015; Burbulis *et al.*, 2018). Algumas dessas alterações encontradas na linhagem AHOL1 por aCGH também foram compatíveis com as alterações citogenéticas encontradas por Pereira *et al.* (2010), tais como a deleção do braço curto do cromossomo 1 del(1)(p21) e a perda do cromossomo Y.

Nossos resultados demonstraram que os CNVs da AHOL1 são compartilhados com outras linhagens comerciais de gliomas, reforçando, portanto, que genomicamente, a ela é um glioma. Além disso, alguns desses CNVs são alvos de drogas, mostrando que nossa linhagem possui um grande potencial para estudos *in vitro*.

Na análise de enriquecimento de vias alteradas pelos CNVs, notamos que as ampliações ocorridas na *AHOL1* influenciaram principalmente as vias de degradação da putrescina III e melatonina II.

A putrescina é uma diamina de baixo peso molecular produzida naturalmente nas células. Ela é produto de uma decarboxilação enzimática da ornitina e serve como precursora para as poliaminas espermidina e espermina. É bem descrito na literatura que há uma associação entre o metabolismo da putrescina com o grau de malignidade dos gliomas, e alguns estudos demonstraram que a mesma pode ser utilizada como um marcador na avaliação da taxa de crescimento tumoral e também na avaliação dos efeitos de terapias antineoplásicas (Sobue e Nakajima, 1977; Hiesiger *et al.*, 1992; Redgate *et al.*, 2001; Genkinger *et al.*, 2006). As putrecinas são também, excelentes substratos para a formação de transglutaminases, as quais são moléculas importantes nos principais estágios da cascata da progressão do tumoral, angiogênese e metástase (Lentini *et al.*, 2013).

A desregulação de melatonina II nos gliomas pode retardar a progressão do ciclo celular, reduzir a sobrevivência dos gliomas ao agente quimioterápico temozolomida, alterar a transcrição do mtDNA, inibir a proliferação e invasão (Franco *et al.*, 2018).

A análise integrada das alterações do número de cópias no genoma e do perfil de expressão gênica indicou que somente alguns CNVs identificados poderiam contribuir para a alteração da expressão de alguns genes. Esse resultado é compatível com os estudos de Vazquez-Mena *et al.* (2012) e Yan *et al.* (2017), os quais usaram plataforma de array diferentes para detectar correlações entre CNVs e transcriptoma em linhagens de células de carcinoma cervical. Outros fatores, como alterações epigenéticas ou fatores de transcrição, também podem contribuir para a variação da expressão gênica em gliomas (Cohen *et al.*, 2015; Nicolaidis, 2015; Burbulis *et al.*, 2018).

As principais vias alteradas na análise integrada dos CNVs com o transcriptoma envolviam vias de sinalização das Rho GTPases, desregulação dos genes da família RAB, transporte passivo por aquaporinas, metabolismo de nucleotídeos e a β -oxidação dos ácidos graxos.

A expressão e a atividade das GTPases Rho, as quais coordenam vários processos celulares, incluindo a progressão do ciclo celular, migração celular e a transcrição, são comumente alteradas em muitos tipos de tumores do SNC (Khalil e El-Sibai, 2012). Nossos resultados mostraram que ela é a principal via alterada na linhagem *AHOL1*, possuindo um total de 15 genes amplificados e 64 genes *up-regulated*, sendo,

portanto, consistente com a literatura (Fritz *et al.*, 1999). Alguns estudos sugerem que dependendo do conjunto de genes que estão *up-regulated* na via das GTPases Rho, influenciará o modo de invasão dos GBMs (Hirata *et al.*, 2012). Nutt *et al.* (2003) objetivando classificar os gliomas baseado no perfil do transcriptoma, mostraram que os genes das GTPases Rho são altamente correlacionados com o GBM. Isso reforça, portanto, a identidade de GBM da nossa linhagem.

Em conclusão, caracterizamos de maneira extensiva a *AHOL1*, uma nova linhagem de GBM que representa uma contribuição valiosa para a pesquisa pré-clínica, tendo em vista a heterogeneidade dos glioblastomas.

Capítulo 4 - Análise integrada dos CNVs e transcriptoma de linhagens de gliomas tratadas com pisosterol.

No capítulo 3, demonstramos que as linhagens de gliomas (U343, AHOL1, U-87 MG e 1321N1) foram altamente sensíveis ao tratamento do pisosterol. O tratamento com a droga reduziu o número de células vivas de forma dose-dependente e esses resultados estão de acordo com Montenegro *et al.* (2004; 2007). Além disso, demonstramos que após 48h de exposição ao pisosterol, todas as linhagens foram bloqueadas em G2/M. E por fim, demonstramos ainda que o pisosterol é capaz de promover a apoptose modulando a expressão dos genes *BCL-2*, *CASP-3* e *P53*.

Nosso próximo passo foi então analisar os efeitos do pisosterol na modulação da expressão gênica em linhagens em uma escala maior. Para isso, fizemos uma análise integrada do perfil do transcriptoma e dos CNVs de linhagens de gliomas (U343, AHOL1, U-87 MG e 1321N1) expostas as mesmas concentrações do capítulo 3.

No geral, todas as linhagens tiveram mais genes que foram significativamente *down-regulated* do que *up-regulated* após o tratamento com pisosterol. Os GDEs aumentaram de forma dose-dependente, e a exposição com a concentração de 1.8 µg/mL foi a que mais alterou a expressão gênica em todas as linhagens (1700 *down-regulated* e 304 *up-regulated*), devida a mesma ser a dose letal segundo Montenegro *et al.* (2004) e Pereira *et al.* (2010).

Usando qualquer concentração (0.5 µg/mL, 1.0 µg/mL e 1.8 µg/mL), nossos resultados sugerem que o pisosterol diminua a expressão de genes importantes nos processos de empacotamento e organização dos nucleossomos, cromossomos, replicação do DNA, metilação do DNA etc. Se considerarmos apenas os termos enriquecidos dos genes *down-regulated* após a exposição de 1.8 µg/mL de pisosterol (dados não mostrados), é possível inferir que essa dose é capaz de alterar diversos processos biológicos, incluindo a transdução de sinal, resposta ao estresse, motilidade celular, resposta inflamatória, adesão celular etc.

A análise integrada nos deu um direcionamento maior da influência do pisosterol nas linhagens de gliomas. Nossos resultados demonstraram que a maioria dos GDEs encontrados não tiveram relação com os CNVs, mas sim, com a exposição ao pisosterol e consequentemente aos efeitos que o mesmo pode causar, inclusive mudanças epigenéticas. De acordo com a análise das vias do KEGG, as principais afetadas foram: via PI3K/AKT/mTOR (336 genes afetados), via ATM/ATR (318 genes afetados), via

MAPK (247 genes), vias relacionadas com a organização da cromatina (226 genes afetados), via TNF alpha/NF-kB (188 genes afetados), check points do ciclo celular (269 genes afetados), vias de transdução de sinais (176 genes afetados) etc.

Alguns genes das vias citadas acima, foram explorados, validados e discutidos no capítulo 3. Nesse capítulo, demonstramos que o pisosterol é capaz de modular a expressão de diversos genes da via *ATM/ATR*. De maneira dose-dependente, o pisosterol é capaz de aumentar a expressão gênica e proteica do *ATM*, *ATM*, *CDK1*, *CDKN1A*, *CHEK1* e *TP53*.

Esse é o primeiro trabalho a fornecer uma visão genômica sobre a atuação do pisosterol. Nosso trabalho forneceu novos *insights* sobre os mecanismos moleculares pelos quais o pisosterol atua reduzindo a viabilidade e proliferação celular dos gliomas.

Capítulo 5 - Perfil de metilação da região promotora de múltiplos genes durante o desenvolvimento dos astrocitomas

No presente capítulo, nós caracterizamos o padrão de metilação de 26 genes em 98 biópsias de pacientes diagnosticados com astrocitomas do Hospital Ophir Loyola (Belém, Pará, Brasil). Desses 26 genes, apenas 11 (*TNFRSF1A*, *SNAPC2*, *CASP8*, *IRAK3*, *GPX3*, *FZD9*, *TFAP2C*, *CDH1*, *RPRM*, *POU4F3* e *MGMT*) exibiram mudanças no padrão de metilação na região promotora em todos os graus analisados.

Genes que exibiram perfis não metilados uniformes nos astrocitomas

No total, 15 genes (*BIRC5*, *BMP4*, *CDKN1B*, *GATA6*, *HIPK2*, *HOXA9*, *HOXA11*, *LDB3*, *MAGEA1*, *MTSS1*, *PENK*, *RRAD*, *TFF* e *TP73*) não sofreram alterações no padrão de metilação em nenhum dos graus analisados.

A ausência de metilação encontrados nos genes *BIRC5*, *BMP4*, *GATA6*, *HOXA9*, *HOXA11*, *LDB3*, *MAGEA1*, *MTSS1*, *PENK*, *RRAD*, *TFF* e *TP73*, divergem da literatura (Yu *et al.*, 2004).

A ausência de metilação em *BIRC5* (*Survivin*) de nossas amostras foi consistente com o encontrado por Yu *et al.* (2004) para astrocitomas. Entretanto, em um estudo com 27 amostras de GBM, Hervouet *et al.*, 2010 mostraram que 8 amostras estavam metiladas, mas os mesmos concluíram que o perfil de metilação de *BIRC5* não teve associação com a sobrevida dos pacientes. Apesar de muitos estudos mostrarem que o aumento da expressão de *Survivin* esteja associada ao desenvolvimento de muitos tumores, incluindo os astrocitomas (Compostella *et al.*, 2007; Ohgaki e Kleihues, 2007), os mecanismos regulatórios da expressão de *BIRC5* não são totalmente compreendidos, pois os altos níveis de expressão de *Survivin* nem sempre se correlacionam com a hipometilação da região promotora (Lyu *et al.*, 2018).

O *BMP4* é um dos genes fundamentais para o início do desenvolvimento dos gliomas a partir de células-tronco neurais (Pfeifer *et al.*, 2011). Nossos resultados demonstraram que esse gene não está metilado nos astrocitomas, discordando dos achados de Wu *et al.* (2010). Muitos estudos mostram que a expressão de *BMP4* não tem os mesmos efeitos nos tumores do SNC e seu real papel no desenvolvimento dos gliomas é controverso. Tratamento com *BMP4* em células-tronco de GBM diminuiu a proliferação e induziu diferenciação celular. Já na linhagem de glioma U251, a expressão da *BMP4* inibiu o crescimento (Liu *et al.*, 2010). Em meningiomas, *BMP4* é expressa e estimula a

capacidade proliferativa por meio da fosforilação de Smad 1, mas não de p38 MAPK (Johnson *et al.*, 2009).

O *CDKN1B* (p27^{Kip1}) é um inibidor de quinases dependentes de ciclina que regula negativamente a proliferação celular através da parada do ciclo celular em G1. Esse gene não está metilado em nossas amostras sendo consistente com os achados de Yu *et al.* (2004) e (Watanabe *et al.*, 2007). Talvez, em astrocitomas, a expressão do gene *CDKN1B* não seja necessariamente regulada por processos epigenéticos, considerando que a expressão desse gene é inversamente relacionada ao grau tumoral e positivamente relacionada ao desfecho favorável dos pacientes (Mizumatsu *et al.*, 1999). O único estudo que demonstrou que *CDKN1B* pode estar hipermetilado em astrocitomas, foi o de Ohta *et al.* (2006). Entretanto, tais autores encontraram uma frequência muito baixa de metilação nesse gene (6% do total de amostras).

O *GATA6* é um dos membros da família GATA de fatores de transcrição de mamíferos que regula a proliferação, diferenciação celular e inibe a apoptose. Apesar de alguns estudos sugerirem que esse gene esteja frequentemente hipermetilado nos gliomas de alto grau (Skiriute, D. *et al.*, 2012; Majchrzak-Celinska *et al.*, 2015), nosso estudo mostrou que o mesmo não estava metilado em nenhum dos graus analisados. Isso pode estar associado à diferença entre as técnicas empregadas e também por conta da variabilidade epigenética populacional dos astrocitomas.

O *HIPK2* codifica uma proteína que interage com vários fatores de transcrição, podendo funcionar como uma supressora tumoral em algumas neoplasias (Deshmukh *et al.*, 2008). A ausência de metilação na região promotora do *HIPK2* nos astrocitomas encontrada em nossos resultados é pioneira na literatura. Nosso achado pode explicar parcialmente o aumento da expressão desse gene presente nos astrocitomas de baixo grau (Deshmukh *et al.*, 2008). Além disso, Deshmukh *et al.* (2008) demonstraram que a indução no aumento da expressão da HIPK2 em linhagens de gliomas confere às mesmas vantagens no crescimento.

A família de genes homeobox (HOX) consiste em 39 genes que codificam fatores de transcrição que desempenham um papel fundamental no desenvolvimento embrionário. Quatro grupos de genes HOX foram identificados em diferentes regiões cromossômicas em humanos, o HOXA em 7p15.3, HOXB em 17q21.3, HOXC em 12q13 e HOXD em 2q3. Todos esses quatro grupos são membros de famílias de genes altamente conservados que são essenciais para o desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) (Pezzani *et al.*, 2015). Nossos resultados mostraram que os genes *HOXA9* e *HOXA11* não

estão metilado nos astrocitomas, divergindo da literatura (Di Vinci *et al.*, 2012), possivelmente por conta da diferença entre as técnicas empregadas assim como diferenças entre o número de CpGs e regiões analisadas.

Genes que exibiram perfis metilados nos astrocitomas

Conforme mostrado em nossos resultados, 11 genes (*TNFRSF1A*, *SNAPC2*, *CASP8*, *IRAK3*, *GPX3*, *FZD9*, *TFAP2C*, *CDH1*, *RPRM*, *POU4F3* e *MGMT*) exibiram mudanças no padrão de metilação na região promotora em todos os graus analisados. Até o momento, a literatura só descrevia a hipermetilação desses genes para GBMs (OMS grau IV). Portanto, nossos resultados são únicos, tendo em vista que estudamos a metilação desses genes em todos os graus dos tumores astrocíticos.

Os altos níveis de metilação desses genes encontrados pelo nosso estudo foi consistente com os achados para os mesmos genes em outras neoplasias, tais como o câncer de pulmão (Shivapurkar *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2010; Yang e Wang, 2012; Saito *et al.*, 2016), GBM (Skiriute, Daina *et al.*, 2012; Lai *et al.*, 2014; Smith *et al.*, 2014; Gadaleta *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2015), câncer de tireoide (Stephen *et al.*, 2011; White *et al.*, 2016), câncer de cabeça e pescoço (Stephen *et al.*, 2012), câncer de vulva (Mcwhirter *et al.*, 2014), neuroblastoma (Astuti *et al.*, 2001; Banelli *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2007; Hoebeeck *et al.*, 2009), câncer de mama (Wu *et al.*, 2010), tumores epiteliais (Sánchez-Vega *et al.*, 2013), câncer colorretal (Leong *et al.*, 2011; Farkas *et al.*, 2014), câncer de ovário (Ozdemir *et al.*, 2012), câncer de fígado (Moribe *et al.*, 2009), câncer de bexiga (Malekzadeh *et al.*, 2009; Piao *et al.*, 2018), meduloblastoma (Ebinger *et al.*, 2004), câncer de próstata (Carvalho *et al.*, 2010; Angulo *et al.*, 2016) e carcinoma de células renais (Mcronald *et al.*, 2009).

Nosso estudo também mostrou que há diversas correlações dos padrões de metilação entre os 11 genes em cada grau. Essas combinações poderão ser utilizadas no futuro como possível biomarcadores.

Metilação e as correlações clinicopatológicas

Além do exposto acima, nossos resultados evidenciaram que alguns genes possuem correlações com algumas características clinicopatológicas, tais como idade, sexo e grau histológico.

O único gene que correlacionou inversamente com a idade, foi o *MGMT*. Esse resultado é discordante de Reifenberger *et al.* (2010). Tais autores sugerem que a metilação do promotor do *MGMT* em GBM pode ser mais prevalente em idosos (> 70 anos). Entretanto, os próprios autores reconheceram que esse padrão de hipermetilação em idosos possa está relacionada com a contaminação do tecido cerebral normal metilado. Outro fato a ser destacado, é que Reifenberger *et al.* (2010) utilizaram amostras de pacientes muito mais velhos que a média de idade do nosso estudo, o qual foi de 60 anos.

Mostramos também que os genes *CASP8*, *IRAK3*, *POUAF3* e *RPRM* tendem serem mais metilados em homens, enquanto que os *MGMT*, *GPX3*, *CDH1* e *FZD9* foram mais metilados em mulheres. E por fim, mostramos que os 11 genes possuem correlações diferentes com os graus tumorais dos astrocitomas (I, II, III e IV).

Os perfis de metilação destes onze genes podem fornecer pistas úteis para a seleção de biomarcadores epigenéticos para novos estudos de diagnóstico e prognóstico dos astrocitomas.

Capítulo 6 - Investigação da variação no número de cópias (CNVS) em pacientes diagnosticados com gliomas de Belém-PA.

Nesse capítulo, foi realizada uma caracterização molecular descrevendo as alterações genômicas dos gliomas originários de Belém-PA.

No geral, os CNVs encontrados em nossa análise de aCGH correspondem às alterações encontradas na literatura. Descobrimos que a maioria dos tumores oligodendrogliais e astrocíticos difusos apresentaram ganho de todo o cr7, no qual o *EGFR* está incluso, e perda de todo o cr10, no qual o *PTEN* está incluso. Deleções do cr10 estão entre as alterações genéticas mais frequentes dos astrocitomas, particularmente nos graus mais elevados (Hu, Jiang, *et al.*, 2002; Hu, Pang, *et al.*, 2002).

Curiosamente, as 29 amostras de GBM (Grau IV) apresentaram ganho de todo o cr7 e perda de todo chr10, mostrando a importância desses loci na gliomagenese. GBMs com a amplificação do *EGFR* e perda do cr10 apresentam uma melhor sobrevida global quando recebem terapia intensiva (quimioterapia e radioterapia concomitantes ou mais de três ciclos subsequentes de quimioterapia) (Smith *et al.*, 2001; Verhaak *et al.*, 2010). A perda do cr14q foi frequente em nossas amostras de GBMs (80%) e esse resultado é consistente a literatura (Hu, Jiang, *et al.*, 2002; Hu, Pang, *et al.*, 2002). Nos GBMs, também detectamos perdas do 9p e 13q. No 9p é possível encontrar o locus *INK/ARF* e em 13q o gene *RB1*, os quais são importantes para o controle do ciclo celular (Li *et al.*, 2011). O locus *INK/ARF* é alvo frequente de deleções homozigóticas durante o processo gliomagenese, e esse evento foi observado em 80% dos pacientes analisados (Sonoda *et al.*, 2001).

De todos os graus do grupo dos tumores oligodendrogliais e astrocíticos difusos, somente os tumores de grau II (80% dos casos) apresentaram a deleção 1p/19q. Essa codeleção é característica de oligodendrogliomas e está associada à maior resposta à procarbazina, quimioterapia com CCNU (lomustina), vincristina (PCV) e quimioterapia com temozolomida (Van Den Bent e Chang, 2018). Além disso, estudos recentes mostram que essa codeleção ocorre em tumores que já possuem mutações em *IDH1* (Cancer Genome Atlas Research *et al.*, 2015). Os mecanismos subjacentes às respostas favoráveis aos tratamentos acima citados e à alta sobrevivência a longo prazo dos pacientes com a codeleção 1p/19q e mutação em *IDH1* ainda são mal compreendidos.

O grupo dos “outros tumores astrocíticos” composto pelos astrocitomas pilocíticos pelo ganho frequente do cr7q (70% dos casos). Nosso resultado foi consistente

com vários estudos usando array na literatura (Agamanolis e Malone, 1995; Zattara-Cannoni *et al.*, 1998; Sanoudou *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2006). Possivelmente, o encontrado no 7q em nossos casos seja resultante de uma fusão entre os genes *KIAA1549* e *BRAF*, a qual é bastante comum em astrocitomas pilocítico, conforme descrito por muitos autores. Esta fusão provoca uma deleção do domínio amino-terminal do *BRAF* e ativando sua atividade de quinase. A maneira que essas alterações genéticas se correlacionam com a localização e o comportamento tumoral ainda não são totalmente compreendidas, embora todas elas levem à ativação das proteínas da via MEK/MAPK (Reis e Tihan, 2015).

O grupo dos ependimomas apresentaram ganhos frequentes nos cromossomos 1q e 19 e perda de todo o cromossomo 3. Os ganhos no 1q correlacionaram-se com a presença de anomalias cromossômicas estruturais, idade pediátrica, histologia de alto grau e comportamento clínico agressivo (Carter, M. *et al.*, 2002; Dyer, S. *et al.*, 2002; Mendrzyk, F. *et al.*, 2006). O ganho de todo o cromossomo 19 observado em nossas amostras é um evento raro dentro dos ependimomas (Pajtler *et al.*, 2015). Geralmente esse ganho do cr19 está associado com a trissomia do 19 em indivíduos mais jovens (menores que 18 anos) diagnosticados com ependimoma de células claras (Figarella-Branger *et al.*, 2016).

CONCLUSÕES

- A linhagem *AHOL1* apresentou uma grande quantidade de CNVs em todo o genoma similares aos descritos para glioblastomas.
- A análise integrada indicou que somente alguns CNVs identificados contribuíram para a alteração da expressão de alguns genes da AHOL.
- Todas as linhagens de gliomas tratadas com pisosterol tiveram mais genes que significativamente *down-regulated* do que *up-regulated*.
- Dos 26 genes analisados quanto ao perfil de metilação nas biópsias de gliomas, apenas 11 genes (*TNFRSF1A*, *SNAPC2*, *CASP8*, *IRAK3*, *GPX3*, *FZD9*, *TFAP2C*, *CDH1*, *RPRM*, *POU4F3* e *MGMT*) exibiram mudanças no padrão de metilação na região promotora em todos os graus analisados.
- Os padrões de metilação de alguns genes tiveram correlações com algumas características clinicopatológicas, tais como idade, sexo e grau histológico.
- De maneira geral, os CNVs descritos para os gliomas de Belém-PA. correspondem às alterações encontradas na literatura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABID, M. et al. Pleomorphic Xanthoastrocytoma; Clinicopathological spectrum of An Intriguing neoplasm. **Pak J Med Sci**, v. 34, n. 2, p. 277-281, Mar-Apr 2018. ISSN 1682-024X (Print)

1681-715X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29805393> >.

AGAMANOLIS, D. P.; MALONE, J. M. Chromosomal abnormalities in 47 pediatric brain tumors. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 81, n. 2, p. 125-34, Jun 1995. ISSN 0165-4608 (Print)

0165-4608 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7621408> >.

AHN, M. Y.; JEE, S. D.; LEE, B. M. Antiobesity effects of *Isaria sinclairii* by repeated oral treatment in obese Zucker rats over a 4-month period. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 70, n. 15-16, p. 1395-1401, 2007. ISSN 1528-7394.

ALBERTINI, I.; SCHWEINITZ, L. Conspectus fungorum in Lusatiae superioris. **Sumtibus Kummerianis, Leipzig, Germany Google Scholar**, 1805.

ALDAPE, K. et al. Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers. **Acta Neuropathol**, v. 129, n. 6, p. 829-48, Jun 2015. ISSN 1432-0533 (Electronic)

0001-6322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25943888> >.

ALEXANDER, V.; DIMARCO, J. H. Reappraisal of brain tumor risk among US nuclear workers: a 10-year review. **Occupational medicine (Philadelphia, Pa.)**, v. 16, n. 2, p. 289-315, 2001. ISSN 0885-114X.

ALEXANDRESCU, S. et al. Epithelioid Glioblastomas and Anaplastic Epithelioid Pleomorphic Xanthoastrocytomas--Same Entity or First Cousins? **Brain Pathol**, v. 26, n. 2, p. 215-23, Mar 2016. ISSN 1750-3639 (Electronic)

1015-6305 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26238627> >.

ALVES, R. et al. Cytotoxicity Induced by Extracts of *Pisolithus tinctorius* Spores on Human Cancer and Normal Cell Lines-Evaluation of the Anticancer Potential. **J Toxicol Environ Health A**, v. 78, n. 13-14, p. 840-7, 2015. ISSN 1528-7394 (Print)

0098-4108 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26167750> >.

AMERI, A. et al. Anti-Staphylococcus aureus activity of *Pisolithus albus* from Pune, India. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 4, p. 527-532, 2011. ISSN 1996-0875.

ANDERSON, I.; CHAMBERS, S.; CAIRNEY, J. Molecular determination of genetic variation in *Pisolithus* isolates from a defined region in New South Wales, Australia. **The New Phytologist**, v. 138, n. 1, p. 151-162, 1998. ISSN 1469-8137.

ANDERSON, I. C.; CHAMBERS, S. M.; CAIRNEY, J. W. ITS–RFLP and ITS sequence diversity in *Pisolithus* from central and eastern Australian sclerophyll forests. **Mycological Research**, v. 105, n. 11, p. 1304-1312, 2001. ISSN 1469-8102.

ANGULO, J. C. et al. Survival predictors in patients with prostate adenocarcinoma with hormonal blockade. **Pathology-Research and Practice**, v. 212, n. 10, p. 899-903, 2016. ISSN 0344-0338.

APARICIO, A. et al. LINE-1 methylation in plasma DNA as a biomarker of activity of DNA methylation inhibitors in patients with solid tumors. **Epigenetics**, v. 4, n. 3, p. 176-184, 2009. ISSN 1559-2294.

ASTUTI, D. et al. RASSF1A promoter region CpG island hypermethylation in pheochromocytomas and neuroblastoma tumours. **Oncogene**, v. 20, n. 51, p. 7573, 2001. ISSN 1476-5594.

AUNG, T. N. et al. Understanding the Effectiveness of Natural Compound Mixtures in Cancer through Their Molecular Mode of Action. **Int J Mol Sci**, v. 18, n. 3, Mar 17 2017. ISSN 1422-0067 (Electronic)

1422-0067 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28304343> >.

BAAN, R. et al. Carcinogenicity of radiofrequency electromagnetic fields. **Lancet Oncol**, v. 12, n. 7, p. 624-6, Jul 2011. ISSN 1474-5488 (Electronic)

1470-2045 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21845765> >.

BADY, P.; DELORENZI, M.; HEGI, M. E. Sensitivity Analysis of the MGMT-STP27 Model and Impact of Genetic and Epigenetic Context to Predict the MGMT Methylation Status in Gliomas and Other Tumors. **J Mol Diagn**, v. 18, n. 3, p. 350-61, May 2016. ISSN 1943-7811 (Electronic)

1525-1578 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26927331> >.

BALSS, J. et al. Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. **Acta Neuropathol**, v. 116, n. 6, p. 597-602, Dec 2008. ISSN 1432-0533 (Electronic)

0001-6322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18985363> >.

BANDOPADHAYAY, P. et al. MYB-QKI rearrangements in angiocentric glioma drive tumorigenicity through a tripartite mechanism. **Nat Genet**, v. 48, n. 3, p. 273-82, Mar 2016. ISSN 1546-1718 (Electronic)

1061-4036 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26829751> >.

BANDOPADHAYAY, P. et al. Myxopapillary ependymomas in children: imaging, treatment and outcomes. **J Neurooncol**, v. 126, n. 1, p. 165-74, Jan 2016. ISSN 1573-7373 (Electronic)

0167-594X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26468139> >.

BANELLI, B. et al. Expression and methylation of CASP8 in neuroblastoma: identification of a promoter region. **Nature medicine**, v. 8, n. 12, p. 1333, 2002. ISSN 1546-170X.

BATCHELOR, T. T. et al. Phase III randomized trial comparing the efficacy of cediranib as monotherapy, and in combination with lomustine, versus lomustine alone in patients with recurrent glioblastoma. **J Clin Oncol**, v. 31, n. 26, p. 3212-8, Sep 10 2013. ISSN 1527-7755 (Electronic)

0732-183X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23940216> >.

BAUMERT, A. et al. Triterpenoids from *Pisolithus tinctorius* isolates and ectomycorrhizas. **Phytochemistry**, v. 45, n. 3, p. 499-504, 1997. ISSN 0031-9422.

BAUMERT, B. G. et al. Temozolomide chemotherapy versus radiotherapy in high-risk low-grade glioma (EORTC 22033-26033): a randomised, open-label, phase 3 intergroup study. **Lancet Oncol**, v. 17, n. 11, p. 1521-1532, Nov 2016. ISSN 1474-5488 (Electronic)

1470-2045 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27686946> >.

BERNSTEIN, E.; ALLIS, C. D. RNA meets chromatin. **Genes Dev**, v. 19, n. 14, p. 1635-55, Jul 15 2005. ISSN 0890-9369 (Print)

0890-9369 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16024654> >.

BETTEGOWDA, C. et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. **Sci Transl Med**, v. 6, n. 224, p. 224ra24, Feb 19 2014. ISSN 1946-6242 (Electronic)

1946-6234 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24553385> >.

BHAT, K. P. et al. Mesenchymal differentiation mediated by NF-kappaB promotes radiation resistance in glioblastoma. **Cancer Cell**, v. 24, n. 3, p. 331-46, Sep 09 2013. ISSN 1878-3686 (Electronic)

1535-6108 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23993863> >.

BINDER, M.; HIBBETT, D. S. Molecular systematics and biological diversification of Boletales. **Mycologia**, v. 98, n. 6, p. 971-81, Nov-Dec 2006. ISSN 0027-5514 (Print)

0027-5514 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17486973> >.

BORGES, B. D. N. et al. Promoter polymorphisms and methylation of E-cadherin (CDH1) and KIT in gastric cancer patients from northern Brazil. **Anticancer research**, v. 30, n. 6, p. 2225-2233, 2010. ISSN 0250-7005.

BORGES, B. N. **Análise de polimorfismos genéticos e do padrão de hipermetilação como marcadores de tumores gástricos na população paraense**. 2010. (Doutorado). PPGBM - Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular., Universidade Federal do Pará

BRENNAN, C. W. et al. The somatic genomic landscape of glioblastoma. **Cell**, v. 155, n. 2, p. 462-77, Oct 10 2013. ISSN 1097-4172 (Electronic)

0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24120142> >.

BRIGELIUS-FLOHE, R.; MAIORINO, M. Glutathione peroxidases. **Biochim Biophys Acta**, v. 1830, n. 5, p. 3289-303, May 2013. ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23201771> >.

BROWN, L. et al. CDIP, a novel pro-apoptotic gene, regulates TNFalpha-mediated apoptosis in a p53-dependent manner. **EMBO J**, v. 26, n. 14, p. 3410-22, Jul 25 2007. ISSN 0261-4189 (Print)

0261-4189 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17599062> >.

BUCKNER, J. C. et al. Radiation plus Procarbazine, CCNU, and Vincristine in Low-Grade Glioma. **N Engl J Med**, v. 374, n. 14, p. 1344-55, Apr 7 2016. ISSN 1533-4406 (Electronic)

0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27050206> >.

BURBANO, R. R. et al. C-MYC locus amplification as metastasis predictor in intestinal-type gastric adenocarcinomas: CGH study in Brazil. **Anticancer research**, v. 26, n. 4B, p. 2909-2914, 2006. ISSN 0250-7005.

BURBANO, R. R. et al. Cell cycle arrest induced by pisosterol in HL60 cells with gene amplification. **Cell Biol Toxicol**, v. 25, n. 3, p. 245-51, Jun 2009. ISSN 1573-6822 (Electronic)

0742-2091 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18465199> >.

BURBULIS, I. E. et al. Improved molecular karyotyping in glioblastoma. **Mutat Res**, v. 811, p. 16-26, Jul 8 2018. ISSN 1873-135X (Electronic)

0027-5107 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30055482> >.

BUSTIN, S. A. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009. ISSN 0009-9147.

CAIRNCROSS, G. et al. Phase III trial of chemoradiotherapy for anaplastic oligodendroglioma: long-term results of RTOG 9402. **J Clin Oncol**, v. 31, n. 3, p. 337-43, Jan 20 2013. ISSN 1527-7755 (Electronic)

0732-183X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23071247> >.

CANCER GENOME ATLAS RESEARCH, N. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. **Nature**, v. 455, n. 7216, p. 1061-8, Oct 23 2008. ISSN 1476-4687 (Electronic)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18772890> >.

CANCER GENOME ATLAS RESEARCH, N. et al. Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas. **N Engl J Med**, v. 372, n. 26, p. 2481-98, Jun 25 2015. ISSN 1533-4406 (Electronic)

0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26061751> >.

CAPPER, D. et al. Monoclonal antibody specific for IDH1 R132H mutation. **Acta Neuropathol**, v. 118, n. 5, p. 599-601, Nov 2009. ISSN 1432-0533 (Electronic)

0001-6322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19798509> >.

CARTER, M. et al. Genetic abnormalities detected in ependymomas by comparative genomic hybridisation. **British journal of cancer**, v. 86, n. 6, p. 929, 2002. ISSN 1532-1827.

CARTER, M. et al. Genetic abnormalities detected in ependymomas by comparative genomic hybridisation. **Br J Cancer**, v. 86, n. 6, p. 929-39, Mar 18 2002. ISSN 0007-0920 (Print)

0007-0920 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11953826> >.

CARVALHO, J. R. et al. Detailed analysis of expression and promoter methylation status of apoptosis-related genes in prostate cancer. **Apoptosis**, v. 15, n. 8, p. 956-965, 2010. ISSN 1360-8185.

CAVENEE, W. et al. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System, Revised. **World Health Organization**, 2016.

CECCARELLI, M. et al. Molecular Profiling Reveals Biologically Discrete Subsets and Pathways of Progression in Diffuse Glioma. **Cell**, v. 164, n. 3, p. 550-63, Jan 28 2016. ISSN 1097-4172 (Electronic)

0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26824661> >.

CHAMBERLAIN, M. C. Salvage therapy with BRAF inhibitors for recurrent pleomorphic xanthoastrocytoma: a retrospective case series. **J Neurooncol**, v. 114, n. 2, p. 237-40, Sep 2013. ISSN 1573-7373 (Electronic)

0167-594X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23756728> >.

CHEN, Z. et al. Epigenetic Regulation: A New Frontier for Biomedical Engineers. **Annu Rev Biomed Eng**, v. 19, p. 195-219, Jun 21 2017. ISSN 1545-4274 (Electronic)

1523-9829 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28301736> >.

CLOUGH, R. L. et al. Brn-3c (POU4F3) regulates BDNF and NT-3 promoter activity. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 324, n. 1, p. 372-81, Nov 5 2004. ISSN 0006-291X (Print)

0006-291X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15465029> >.

COHEN, A. et al. DNA copy number analysis of Grade II-III and Grade IV gliomas reveals differences in molecular ontogeny including chromothripsis associated with IDH mutation status. **Acta Neuropathol Commun**, v. 3, p. 34, Jun 20 2015. ISSN 2051-5960 (Electronic)

2051-5960 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26091668> >.

COMPOSTELLA, A. et al. Prognostic factors for anaplastic astrocytomas. **J Neurooncol**, v. 81, n. 3, p. 295-303, Feb 2007. ISSN 0167-594X (Print)

0167-594X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17001519> >.

COSTA-LOTUFO, L. V. et al. A Contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no laboratório nacional de oncologia experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010. ISSN 1984-6835.

COTTO, K. C. et al. DGIdb 3.0: a redesign and expansion of the drug-gene interaction database. **Nucleic Acids Res**, v. 46, n. D1, p. D1068-D1073, Jan 4 2018. ISSN 1362-4962 (Electronic)

0305-1048 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29156001> >.

COUREAU, G. et al. Mobile phone use and brain tumours in the CERENAT case-control study. **Occup Environ Med**, v. 71, n. 7, p. 514-22, Jul 2014. ISSN 1470-7926 (Electronic)

1351-0711 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24816517> >.

DANIELS, T. B. et al. Validation of EORTC prognostic factors for adults with low-grade glioma: a report using intergroup 86-72-51. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 81, n. 1, p. 218-24, Sep 1 2011. ISSN 1879-355X (Electronic)

0360-3016 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21549518> >.

DE MATTOS-ARRUDA, L. et al. Cerebrospinal fluid-derived circulating tumour DNA better represents the genomic alterations of brain tumours than plasma. **Nat Commun**, v. 6, p. 8839, Nov 10 2015. ISSN 2041-1723 (Electronic)

2041-1723 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26554728> >.

DEICHMANN, U. Epigenetics: The origins and evolution of a fashionable topic. **Dev Biol**, v. 416, n. 1, p. 249-254, Aug 1 2016. ISSN 1095-564X (Electronic)

0012-1606 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27291929> >.

DESHMUKH, H. et al. High-resolution, dual-platform aCGH analysis reveals frequent HIPK2 amplification and increased expression in pilocytic astrocytomas. **Oncogene**, v. 27, n. 34, p. 4745-51, Aug 7 2008. ISSN 1476-5594 (Electronic)

0950-9232 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18408760> >.

DI STEFANO, A. L. et al. Detection, Characterization, and Inhibition of FGFR-TACC Fusions in IDH Wild-type Glioma. **Clin Cancer Res**, v. 21, n. 14, p. 3307-17, Jul 15 2015. ISSN 1078-0432 (Print)

1078-0432 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25609060> >.

DI VINCI, A. et al. Quantitative methylation analysis of HOXA3, 7, 9, and 10 genes in glioma: association with tumor WHO grade and clinical outcome. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 138, n. 1, p. 35-47, Jan 2012. ISSN 1432-1335 (Electronic)

0171-5216 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21947269> >.

DÍEZ, J. et al. Genetic variability of *Pisolithus* isolates associated with native hosts and exotic eucalyptus in the western Mediterranean region. **New Phytologist**, v. 149, n. 3, p. 577-587, 2001. ISSN 1469-8137.

DOMCKE, S. et al. Evaluating cell lines as tumour models by comparison of genomic profiles. **Nat Commun**, v. 4, p. 2126, 2013. ISSN 2041-1723 (Electronic)

2041-1723 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23839242> >.

DOMON, H. et al. Early and preferential induction of IL-1 receptor-associated kinase-M in THP-1 cells by LPS derived from *Porphyromonas gingivalis*. **J Leukoc Biol**, v. 83, n. 3, p. 672-9, Mar 2008. ISSN 0741-5400 (Print)

0741-5400 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18156187> >.

DRAPPATZ, J.; LIEBERMAN, F. Chemotherapy of Oligodendrogliomas. **Prog Neurol Surg**, v. 31, p. 152-161, 2018. ISSN 1662-3924 (Electronic)

0079-6492 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29393183> >.

DRUSCO, A. et al. A differentially expressed set of microRNAs in cerebro-spinal fluid (CSF) can diagnose CNS malignancies. **Oncotarget**, v. 6, n. 25, p. 20829-39, Aug 28 2015. ISSN 1949-2553 (Electronic)

1949-2553 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26246487> >.

DUBBINK, H. J. et al. Molecular classification of anaplastic oligodendroglioma using next-generation sequencing: a report of the prospective randomized EORTC Brain Tumor Group 26951 phase III trial. **Neuro Oncol**, v. 18, n. 3, p. 388-400, Mar 2016. ISSN 1523-5866 (Electronic)

1522-8517 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26354927> >.

DYER, S. et al. Genomic imbalances in pediatric intracranial ependymomas define clinically relevant groups. **The American journal of pathology**, v. 161, n. 6, p. 2133-2141, 2002. ISSN 0002-9440.

DYER, S. et al. Genomic imbalances in pediatric intracranial ependymomas define clinically relevant groups. **Am J Pathol**, v. 161, n. 6, p. 2133-41, Dec 2002. ISSN 0002-9440 (Print)

0002-9440 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12466129> >.

EBINGER, M. et al. Promoter methylation pattern of caspase-8, P16INK4A, MGMT, TIMP-3, and E-cadherin in medulloblastoma. **Pathol Oncol Res**, v. 10, n. 1, p. 17-21, 2004. ISSN 1219-4956 (Print)

1219-4956 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15029256> >.

EGEBLAD, M.; NAKASONE, E. S.; WERB, Z. Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. **Dev Cell**, v. 18, n. 6, p. 884-901, Jun 15 2010. ISSN 1878-1551 (Electronic)

1534-5807 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20627072> >.

ERNESTUS, R. I.; SCHRODER, R. [Clinical aspects and pathology of intracranial subependymoma-18 personal cases and review of the literature]. **Neurochirurgia (Stuttg)**, v. 36, n. 6, p. 194-202, Nov 1993. ISSN 0028-3819 (Print)

0028-3819 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8309495> >.

FALLON, K. B. et al. Prognostic value of 1p, 19q, 9p, 10q, and EGFR-FISH analyses in recurrent oligodendrogliomas. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 63, n. 4, p. 314-22, Apr 2004. ISSN 0022-3069 (Print)

0022-3069 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15099021> >.

FARKAS, S. A. et al. DNA methylation changes in genes frequently mutated in sporadic colorectal cancer and in the DNA repair and Wnt/ β -catenin signaling pathway genes. **Epigenomics**, v. 6, n. 2, p. 179-191, 2014. ISSN 1750-1911.

FEGAN, C. D.; WHITE, D.; SWEENEY, M. C-myc amplification, double minutes and homogenous staining regions in a case of AML. **Br J Haematol**, v. 90, n. 2, p. 486-8, Jun 1995. ISSN 0007-1048 (Print)

0007-1048 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7540858> >.

FERREIRA, W. A. S. et al. Expression analysis of genes involved in the RB/E2F pathway in astrocytic tumors. **PloS one**, v. 10, n. 8, p. e0137259, 2015. ISSN 1932-6203.

FIGARELLA-BRANGER, D. et al. Supratentorial clear cell ependymomas with branching capillaries demonstrate characteristic clinicopathological features and pathological activation of nuclear factor-kappaB signaling. **Neuro Oncol**, v. 18, n. 7, p. 919-27, Jul 2016. ISSN 1523-5866 (Electronic)

1522-8517 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26984744> >.

FIGUEROA, R. J. et al. Reprimo tissue-specific expression pattern is conserved between zebrafish and human. **PloS One**, v. 12, n. 5, p. e0178274, 2017. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28562620> >.

FISCHER, S. B. et al. TRPS1 gene alterations in human subependymoma. **J Neurooncol**, v. 134, n. 1, p. 133-138, Aug 2017. ISSN 1573-7373 (Electronic)

0167-594X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28528424> >.

FRANCO, D. G.; MORETTI, I. F.; MARIE, S. K. N. Mitochondria Transcription Factor A: A Putative Target for the Effect of Melatonin on U87MG Malignant Glioma Cell Line. **Molecules**, v. 23, n. 5, May 9 2018. ISSN 1420-3049 (Electronic)

1420-3049 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29747444> >.

FRIEDMAN, H. S. et al. Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. **J Clin Oncol**, v. 27, n. 28, p. 4733-40, Oct 1 2009. ISSN 1527-7755 (Electronic)

0732-183X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19720927> >.

FRITZ, G.; JUST, I.; KAINA, B. Rho GTPases are over-expressed in human tumors. **International journal of cancer**, v. 81, n. 5, p. 682-687, 1999. ISSN 0020-7136.

FUJIMOTO, H. et al. Isolation and characterization of immunosuppressive components of three mushrooms, *Pisolithus tinctorius*, *Microporus flabelliformis* and *Lenzites betulina*. **Chemical and pharmaceutical bulletin**, v. 42, n. 3, p. 694-697, 1994. ISSN 0009-2363.

FURGASON, J. M. et al. Whole genome sequencing of glioblastoma multiforme identifies multiple structural variations involved in EGFR activation. **Mutagenesis**, v. 29, n. 5, p. 341-50, Sep 2014. ISSN 1464-3804 (Electronic)

0267-8357 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25103728> >.

GADALETA, F.; BESSONOV, K.; VAN STEEN, K. Integration of Gene Expression Data and Methylation Reveals Genetic Networks for Glioblastoma. **arXiv preprint arXiv:1506.00080**, 2015.

GATENBY, R. A.; BROWN, J. Mutations, evolution and the central role of a self-defined fitness function in the initiation and progression of cancer. **Biochim Biophys Acta**, v. 1867, n. 2, p. 162-166, Apr 2017. ISSN 0006-3002 (Print)

0006-3002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28341421> >.

GATENBY, R. A.; CUNNINGHAM, J. J.; BROWN, J. S. Evolutionary triage governs fitness in driver and passenger mutations and suggests targeting never mutations. **Nat Commun**, v. 5, p. 5499, Nov 19 2014. ISSN 2041-1723 (Electronic)

2041-1723 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25407411> >.

GENKINGER, J. M. et al. Alcohol intake and ovarian cancer risk: a pooled analysis of 10 cohort studies. **Br J Cancer**, v. 94, n. 5, p. 757-62, Mar 13 2006. ISSN 0007-0920 (Print)

0007-0920 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16495916> >.

GERLINGER, M. et al. Cancer: evolution within a lifetime. **Annu Rev Genet**, v. 48, p. 215-36, 2014. ISSN 1545-2948 (Electronic)

0066-4197 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25292359> >.

GILBERT, M. R. et al. Dose-dense temozolomide for newly diagnosed glioblastoma: a randomized phase III clinical trial. **J Clin Oncol**, v. 31, n. 32, p. 4085-91, Nov 10 2013. ISSN 1527-7755 (Electronic)

0732-183X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24101040> >.

GILL, M. et al. The Structure and Absolute Stereochemistry of Pisosterol, the Principal Triterpenoid From Fruitbodies of the Fungus *Pisolithus tinctorius*. **Australian journal of Chemistry**, v. 42, n. 6, p. 995-1001, 1989. ISSN 1445-0038.

GILLIES, R. J.; VERDUZCO, D.; GATENBY, R. A. Evolutionary dynamics of carcinogenesis and why targeted therapy does not work. **Nat Rev Cancer**, v. 12, n. 7, p. 487-93, Jun 14 2012. ISSN 1474-1768 (Electronic)

1474-175X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22695393> >.

GLOBAL BURDEN OF DISEASE CANCER, C. et al. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-Years for 29 Cancer Groups, 1990 to 2016: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. **JAMA Oncol**, Jun 2 2018. ISSN 2374-2445 (Electronic)

2374-2437 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29860482> >.

GOMES, E. A. et al. ITS sequences and mitochondrial DNA polymorphism in *Pisolithus* isolates. **Mycological Research**, v. 104, n. 8, p. 911-918, 2000. ISSN 1469-8102.

GRASBON-FRODL, E. M. et al. Intratumoral homogeneity of MGMT promoter hypermethylation as demonstrated in serial stereotactic specimens from anaplastic astrocytomas and glioblastomas. **Int J Cancer**, v. 121, n. 11, p. 2458-64, Dec 01 2007. ISSN 1097-0215 (Electronic)

0020-7136 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17691113> >.

GREALLY, J. M. A user's guide to the ambiguous word 'epigenetics'. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 19, n. 4, p. 207-208, Apr 2018. ISSN 1471-0080 (Electronic)

1471-0072 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29339796> >.

GRIFFIN, C. A. et al. Identification of der(1;19)(q10;p10) in five oligodendrogliomas suggests mechanism of concurrent 1p and 19q loss. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 65, n. 10, p. 988-94, Oct 2006. ISSN 0022-3069 (Print)

0022-3069 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17021403> >.

HAIG, D. The (dual) origin of epigenetics. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, v. 69, p. 67-70, 2004. ISSN 0091-7451 (Print)

0091-7451 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16117634> >.

HAINFELLNER, J. et al. Letter in response to David N. Louis et al, International Society of Neuropathology-Haarlem Consensus Guidelines for Nervous System Tumor Classification and Grading, Brain Pathology, doi: 10.1111/bpa.12171. **Brain Pathol**, v. 24, n. 6, p. 671-2, Nov 2014. ISSN 1750-3639 (Electronic)

1015-6305 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25345897> >.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar 4 2011. ISSN 1097-4172 (Electronic)

0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230> >.

HARTMANN, C. et al. Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: a study of 1,010 diffuse gliomas. **Acta Neuropathol**, v. 118, n. 4, p. 469-74, Oct 2009. ISSN 1432-0533 (Electronic)

0001-6322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19554337> >.

HAWKINS, C. et al. BRAF-KIAA1549 fusion predicts better clinical outcome in pediatric low-grade astrocytoma. **Clin Cancer Res**, v. 17, n. 14, p. 4790-8, Jul 15 2011. ISSN 1078-0432 (Print)

1078-0432 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21610142> >.

HAWKSWORTH, D. L. [Fungi and biodiversity: international incentives]. **Microbiologia**, v. 13, n. 2, p. 221-6, Jun 1997. ISSN 0213-4101 (Print)

0213-4101 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9333300> >.

HEGI, M. E. et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. **N Engl J Med**, v. 352, n. 10, p. 997-1003, Mar 10 2005. ISSN 1533-4406 (Electronic)

0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15758010> >.

HENRY, R. W. et al. A TBP-TAF complex required for transcription of human snRNA genes by RNA polymerase II and III. **Nature**, v. 374, n. 6523, p. 653-6, Apr 13 1995. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7715707> >.

HEPPNER, G. H. Tumor cell societies. **J Natl Cancer Inst**, v. 81, n. 9, p. 648-9, May 3 1989. ISSN 0027-8874 (Print)

0027-8874 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2709420> >.

HERNANDEZ-DURAN, S.; YEH-HSIEH, T. Y.; SALAZAR-ARAYA, C. Pedunculated intraventricular subependymoma: Review of the literature and illustration of classical presentation through a clinical case. **Surg Neurol Int**, v. 5, p. 117, 2014. ISSN 2229-5097 (Print)

2152-7806 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25101212> >.

HERRLINGER, U. et al. Erratum to: Gliomatosis cerebri: no evidence for a separate brain tumor entity. **Acta Neuropathol**, v. 131, n. 2, p. 321-2, Feb 2016a. ISSN 1432-0533 (Electronic)

0001-6322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26744347> >.

_____. Gliomatosis cerebri: no evidence for a separate brain tumor entity. **Acta Neuropathol**, v. 131, n. 2, p. 309-19, Feb 2016b. ISSN 1432-0533 (Electronic)

0001-6322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26493382> >.

HEWETT, M. et al. PharmGKB: the Pharmacogenetics Knowledge Base. **Nucleic Acids Res**, v. 30, n. 1, p. 163-5, Jan 1 2002. ISSN 1362-4962 (Electronic)

0305-1048 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11752281> >.

HIESIGER, E. M. et al. Is [1-11C]putrescine useful as a brain tumor marker? **J Nucl Med**, v. 33, n. 2, p. 192-200, Feb 1992. ISSN 0161-5505 (Print)

0161-5505 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1732439> >.

HIRATA, E. et al. In vivo fluorescence resonance energy transfer imaging reveals differential activation of Rho-family GTPases in glioblastoma cell invasion. **J Cell Sci**, v. 125, n. Pt 4, p. 858-68, Feb 15 2012. ISSN 1477-9137 (Electronic)

0021-9533 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22399802> >.

HOEBEECK, J. et al. Aberrant methylation of candidate tumor suppressor genes in neuroblastoma. **Cancer letters**, v. 273, n. 2, p. 336-346, 2009. ISSN 0304-3835.

HOLLER, N. et al. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. **Nat Immunol**, v. 1, n. 6, p. 489-95, Dec 2000. ISSN 1529-2908 (Print)

1529-2908 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11101870> >.

HU, J. et al. Chromosome 14q may harbor multiple tumor suppressor genes in primary glioblastoma multiforme. **Chin Med J (Engl)**, v. 115, n. 8, p. 1201-4, Aug 2002. ISSN 0366-6999 (Print)

0366-6999 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12215292> >.

HU, J. et al. High-resolution genome-wide allelotype analysis identifies loss of chromosome 14q as a recurrent genetic alteration in astrocytic tumours. **Br J Cancer**, v. 87, n. 2, p. 218-24, Jul 15 2002. ISSN 0007-0920 (Print)

0007-0920 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12107846> >.

HUBNER, J. M. et al. Epidemiology, molecular classification and WHO grading of ependymoma. **J Neurosurg Sci**, v. 62, n. 1, p. 46-50, Feb 2018. ISSN 1827-1855 (Electronic)

0390-5616 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28895660> >.

HUMANS, I. W. G. O. T. E. O. C. R. T. Non-ionizing radiation, Part 2: Radiofrequency electromagnetic fields. **IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum**, v. 102, n. Pt 2, p. 1-460, 2013. ISSN 1017-1606 (Print)

1017-1606 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24772662> >.

IDBAIH, A. et al. Gene amplification is a poor prognostic factor in anaplastic oligodendrogliomas. **Neuro Oncol**, v. 10, n. 4, p. 540-7, Aug 2008. ISSN 1522-8517 (Print)

1522-8517 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18544654> >.

IDBAIH, A. et al. SNP array analysis reveals novel genomic abnormalities including copy neutral loss of heterozygosity in anaplastic oligodendrogliomas. **PLoS One**, v. 7, n. 10, p. e45950, 2012. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23071531> >.

INCA. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil.**: 128 p. 2018.

JENKINS, R. B. et al. A t(1;19)(q10;p10) mediates the combined deletions of 1p and 19q and predicts a better prognosis of patients with oligodendroglioma. **Cancer Res**, v. 66, n. 20, p. 9852-61, Oct 15 2006. ISSN 0008-5472 (Print)

0008-5472 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17047046> >.

JENUWEIN, T.; ALLIS, C. D. Translating the histone code. **Science**, v. 293, n. 5532, p. 1074-80, Aug 10 2001. ISSN 0036-8075 (Print)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11498575> >.

JEUKEN, J. W. et al. Correlation between localization, age, and chromosomal imbalances in ependymal tumours as detected by CGH. **The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland**, v. 197, n. 2, p. 238-244, 2002. ISSN 0022-3417.

JOHNSON, M. D. et al. Bone morphogenetic protein 4 and its receptors are expressed in the leptomeninges and meningiomas and signal via the Smad pathway. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 68, n. 11, p. 1177-83, Nov 2009. ISSN 1554-6578 (Electronic)

0022-3069 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19816200> >.

JOHNSON, T. B.; COGHILL, R. D. Researches on pyrimidines. C111. The discovery of 5-methylcytosine in tuberculinic acid, the nucleic acid of the tubercle bacillus1. **Journal of the American Chemical Society**, v. 47, n. 11, p. 2838-2844, 1925. ISSN 0002-7863.

JONES, D. T. et al. Recurrent somatic alterations of FGFR1 and NTRK2 in pilocytic astrocytoma. **Nat Genet**, v. 45, n. 8, p. 927-32, Aug 2013. ISSN 1546-1718 (Electronic)

1061-4036 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23817572> >.

JONES, D. T. et al. Genomic analysis of pilocytic astrocytomas at 0.97 Mb resolution shows an increasing tendency toward chromosomal copy number change with age. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 65, n. 11, p. 1049-58, Nov 2006. ISSN 0022-3069 (Print)

0022-3069 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17086101> >.

JOO, J. K. et al. CpG methylation of transcription factor 4 in gastric carcinoma. **Annals of surgical oncology**, v. 17, n. 12, p. 3344-3353, 2010. ISSN 1068-9265.

KALOTAS, A. C. Aboriginal knowledge and use of fungi. **Fungi of Australia**, v. 1, p. 269-298, 1996.

KAMMERER, S. et al. Subependymomas - Characteristics of a "Leave me Alone" Lesion. **Rofo**, Jun 18 2018. ISSN 1438-9010 (Electronic)

1438-9010 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29913520> >.

KARLSSON, P. et al. Intracranial tumors after radium treatment for skin hemangioma during infancy--a cohort and case-control study. **Radiat Res**, v. 148, n. 2, p. 161-7, Aug 1997. ISSN 0033-7587 (Print)

0033-7587 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9254735> >.

KAWAMATA, N. et al. Methylation status analysis of cell cycle regulatory genes (p16INK4A, p15INK4B, p21Waf1/Cip1, p27Kip1 and p73) in natural killer cell disorders. **European journal of haematology**, v. 74, n. 5, p. 424-429, 2005. ISSN 0902-4441.

KHALIL, B. D.; EL-SIBAI, M. Rho GTPases in primary brain tumor malignancy and invasion. **J Neurooncol**, v. 108, n. 3, p. 333-9, Jul 2012. ISSN 1573-7373 (Electronic)

0167-594X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22528793> >.

KILDAY, J. P. et al. Pediatric ependymoma: biological perspectives. **Mol Cancer Res**, v. 7, n. 6, p. 765-86, Jun 2009. ISSN 1557-3125 (Electronic)

1541-7786 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19531565> >.

KILLELA, P. J. et al. The genetic landscape of anaplastic astrocytoma. **Oncotarget**, v. 5, n. 6, p. 1452-7, Mar 30 2014. ISSN 1949-2553 (Electronic)

1949-2553 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24140581> >.

KLEINSCHMIDT-DEMASTERS, B. K. et al. Epithelioid GBMs show a high percentage of BRAF V600E mutation. **Am J Surg Pathol**, v. 37, n. 5, p. 685-98, May 2013. ISSN 1532-0979 (Electronic)

0147-5185 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23552385> >.

KOELSCHE, C. et al. BRAF-mutated pleomorphic xanthoastrocytoma is associated with temporal location, reticulin fiber deposition and CD34 expression. **Brain Pathol**, v. 24, n. 3, p. 221-9, Apr 2014. ISSN 1750-3639 (Electronic)

1015-6305 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24345274> >.

KONCZ, G. et al. Vesicles released by activated T cells induce both Fas-mediated RIP-dependent apoptotic and Fas-independent nonapoptotic cell deaths. **J Immunol**, v. 189, n. 6, p. 2815-23, Sep 15 2012. ISSN 1550-6606 (Electronic)

0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22891283> >.

KORSHUNOV, A. et al. Integrated analysis of pediatric glioblastoma reveals a subset of biologically favorable tumors with associated molecular prognostic markers. **Acta Neuropathol**, v. 129, n. 5, p. 669-78, May 2015. ISSN 1432-0533 (Electronic)

0001-6322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25752754> >.

KOSCHNY, R. et al. Comparative genomic hybridization pattern of non-anaplastic and anaplastic oligodendrogliomas--a meta-analysis. **Pathol Res Pract**, v. 202, n. 1, p. 23-30, 2006. ISSN 0344-0338 (Print)

0344-0338 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16356658> >.

KREISL, T. N. et al. Phase II trial of single-agent bevacizumab followed by bevacizumab plus irinotecan at tumor progression in recurrent glioblastoma. **J Clin Oncol**, v. 27, n. 5, p. 740-5, Feb 10 2009. ISSN 1527-7755 (Electronic)

0732-183X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19114704> >.

LAI, R. K. et al. Genome-wide methylation analyses in glioblastoma multiforme. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p. e89376, 2014. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24586730> >.

LAPERRIERE, N. et al. Optimal management of elderly patients with glioblastoma. **Cancer Treat Rev**, v. 39, n. 4, p. 350-7, Jun 2013. ISSN 1532-1967 (Electronic)

0305-7372 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22722053> >.

LAZARCZYK, M.; MATYJA, E.; LIPKOWSKI, A. Substance P and its receptors -- a potential target for novel medicines in malignant brain tumour therapies (mini-review). **Folia Neuropathol**, v. 45, n. 3, p. 99-107, 2007. ISSN 1641-4640 (Print)

1509-572X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17849359> >.

LEE, E. Q. et al. Successful Treatment of a Progressive BRAF V600E-Mutated Anaplastic Pleomorphic Xanthoastrocytoma With Vemurafenib Monotherapy. **J Clin Oncol**, v. 34, n. 10, p. e87-9, Apr 01 2016. ISSN 1527-7755 (Electronic)

0732-183X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25092772> >.

LEEPER, H.; FELICELLA, M. M.; WALBERT, T. Recent Advances in the Classification and Treatment of Ependymomas. **Curr Treat Options Oncol**, v. 18, n. 9, p. 55, Aug 10 2017. ISSN 1534-6277 (Electronic)

1534-6277 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28795287> >.

LENTINI, A. et al. Transglutaminases: key regulators of cancer metastasis. **Amino Acids**, v. 44, n. 1, p. 25-32, Jan 2013. ISSN 1438-2199 (Electronic)

0939-4451 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22302368> >.

LEONG, K. et al. Methylation profiling of rectal cancer identifies novel markers of early-stage disease. **British Journal of Surgery**, v. 98, n. 5, p. 724-734, 2011. ISSN 1365-2168.

LI, J.; POI, M. J.; TSAI, M. D. Regulatory mechanisms of tumor suppressor P16(INK4A) and their relevance to cancer. **Biochemistry**, v. 50, n. 25, p. 5566-82, Jun 28 2011. ISSN 1520-4995 (Electronic)

0006-2960 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21619050> >.

LI, Q. et al. CITED2 mutation links congenital heart defects to dysregulation of the cardiac gene VEGF and PITX2C expression. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 423, n. 4, p. 895-9, Jul 13 2012. ISSN 1090-2104 (Electronic)

0006-291X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22735262> >.

LIMA, E. M. et al. Conventional cytogenetic characterization of a new cell line, ACP01, established from a primary human gastric tumor. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 37, n. 12, p. 1831-1838, 2004. ISSN 0100-879X.

LINDBERG, S. et al. Cancer incidence after radiotherapy for skin haemangioma during infancy. **Acta Oncol**, v. 34, n. 6, p. 735-40, 1995. ISSN 0284-186X (Print)

0284-186X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7576739> >.

LITTLE, M. P. et al. Risks of brain tumour following treatment for cancer in childhood: modification by genetic factors, radiotherapy and chemotherapy. **International journal of cancer**, v. 78, n. 3, p. 269-275, 1998. ISSN 0020-7136.

LIU, B. et al. Effect of bone morphogenetic protein 4 in the human brain glioma cell line U251. **Cell Biochem Biophys**, v. 58, n. 2, p. 91-6, Nov 2010. ISSN 1559-0283 (Electronic)

1085-9195 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20730570> >.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method. **methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001. ISSN 1046-2023.

LOBO, A. M. et al. Triterpenoids of the fungus *Pisolithus tinctorius*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 11, p. 3569-3574, 1988. ISSN 0031-9422.

LOBO, A. M. et al. Novel triterpenoids from the fungus *Pisolithus tinctorius*. **Tetrahedron letters**, v. 26, n. 21, p. 2589-2592, 1985. ISSN 0040-4039.

LOBO, A. M. et al. Pisolactone, a novel triterpenoid isolated from the fungus *Pisolithus tinctorius*. **Tetrahedron letters**, 1983. ISSN 0040-4039.

LOUIS, D. N. et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta Neuropathol**, v. 114, n. 2, p. 97-109, Aug 2007. ISSN 0001-6322 (Print)

0001-6322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17618441> >.

LOUIS, D. N. et al. **WHO classification of tumours of the central nervous system, Revised 4th Edition**. IARC, Lyon. ISBN 978-92-832-4492-9 Google Scholar. 2016

LOUIS, D. N. et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Acta Neuropathol**, v. 131, n. 6, p. 803-20, Jun 2016. ISSN 1432-0533 (Electronic)

0001-6322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27157931> >.

LYU, H. et al. Epigenetic mechanism of survivin dysregulation in human cancer. **Sci China Life Sci**, v. 61, n. 7, p. 808-814, Jul 2018. ISSN 1869-1889 (Electronic)

1674-7305 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29318497> >.

MA, J. et al. Genome-wide methylation profiling reveals new biomarkers for prognosis prediction of glioblastoma. **J Cancer Res Ther**, v. 11 Suppl 2, p. C212-5, Oct 2015. ISSN 1998-4138 (Electronic)

1998-4138 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26506879> >.

MAJCHRZAK-CELINSKA, A. et al. The methylation of a panel of genes differentiates low-grade from high-grade gliomas. **Tumour Biol**, v. 36, n. 5, p. 3831-41, May 2015. ISSN 1423-0380 (Electronic)

1010-4283 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25563195> >.

MALEKZADEH, K. et al. Methylation patterns of Rb1 and Casp-8 promoters and their impact on their expression in bladder cancer. **Cancer investigation**, v. 27, n. 1, p. 70-80, 2009. ISSN 0735-7907.

MALMSTROM, A. et al. Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial. **Lancet Oncol**, v. 13, n. 9, p. 916-26, Sep 2012. ISSN 1474-5488 (Electronic)

1470-2045 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22877848> >.

MAMEDE, A. C. P. B. Avaliação da atividade antibacteriana de fungos do filo Ascomycota e Basidiomycota sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. 2012.

MARIANO, F. V. et al. Carcinoma ex-pleomorphic adenoma derived from recurrent pleomorphic adenoma shows important difference by array CGH compared to recurrent pleomorphic adenoma without malignant transformation. **Braz J Otorhinolaryngol**, v. 82, n. 6, p. 687-694, Nov - Dec 2016. ISSN 1808-8686 (Electronic)

1808-8686 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26971045> >.

MARTIN, F.; DELARUELLE, C.; IVORY, M. Genetic variability in intergenic spacers of ribosomal DNA in *Pisolithus* isolates associated with pine, eucalyptus and *Azelia* in lowland Kenyan forests. **The New Phytologist**, v. 139, n. 2, p. 341-352, 1998. ISSN 1469-8137.

MARTIN, F. et al. Phylogeography of the ectomycorrhizal *Pisolithus* species as inferred from nuclear ribosomal DNA ITS sequences. **New Phytologist**, v. 153, n. 2, p. 345-357, 2002. ISSN 0028-646X.

MARTIN, F. et al. Cell wall proteins of the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius*: identification, function, and expression in symbiosis. **Fungal Genetics and Biology**, v. 27, n. 2-3, p. 161-174, 1999. ISSN 1087-1845.

MARUSYK, A.; ALMENDRO, V.; POLYAK, K. Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? **Nat Rev Cancer**, v. 12, n. 5, p. 323-34, Apr 19 2012. ISSN 1474-1768 (Electronic)

1474-175X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22513401> >.

MARX, D. et al. Commercial vegetative inoculum of *Pisolithus tinctorius* and inoculation techniques for development of ectomycorrhizae on container-grown tree seedlings. **Forest Science**, v. 28, n. 2, p. 373-400, 1982. ISSN 0015-749X.

MARX, D. H. Tree host range and world distribution of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. **Can J Microbiol**, v. 23, n. 3, p. 217-23, Mar 1977. ISSN 0008-4166 (Print)

0008-4166 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/856419> >.

MASUI, K.; MISCHER, P. S.; REIFENBERGER, G. Molecular classification of gliomas. **Handb Clin Neurol**, v. 134, p. 97-120, 2016. ISSN 0072-9752 (Print)

0072-9752 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26948350> >.

MATHEWS, J. D. et al. Cancer risk in 680,000 people exposed to computed tomography scans in childhood or adolescence: data linkage study of 11 million Australians. **BMJ**, v. 346, p. f2360, May 21 2013. ISSN 1756-1833 (Electronic)

0959-8138 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23694687> >.

MATSUDA, A. et al. Large-scale identification and characterization of human genes that activate NF-kappaB and MAPK signaling pathways. **Oncogene**, v. 22, n. 21, p. 3307-18, May 22 2003. ISSN 0950-9232 (Print)

0950-9232 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12761501> >.

MAYER, R.; SMINIA, P. Reirradiation tolerance of the human brain. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 70, n. 5, p. 1350-60, Apr 1 2008. ISSN 0360-3016 (Print)

0360-3016 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18037587> >.

MCNEILL, K. A. Epidemiology of Brain Tumors. **Neurol Clin**, v. 34, n. 4, p. 981-998, Nov 2016. ISSN 1557-9875 (Electronic)

0733-8619 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27720005> >.

MCRONALD, F. E. et al. CpG methylation profiling in VHL related and VHL unrelated renal cell carcinoma. **Mol Cancer**, v. 8, p. 31, Jun 3 2009. ISSN 1476-4598 (Electronic)

1476-4598 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19493342> >.

MCWHIRTER, R. E. et al. Genetic and epigenetic variation in vulvar cancer: current research and future clinical practice. **Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 54, n. 5, p. 406-411, 2014. ISSN 1479-828X.

MENDRZYK, F. et al. Identification of gains on 1q and epidermal growth factor receptor overexpression as independent prognostic markers in intracranial ependymoma. **Clinical Cancer Research**, v. 12, n. 7, p. 2070-2079, 2006. ISSN 1078-0432.

MENDRZYK, F. et al. Identification of gains on 1q and epidermal growth factor receptor overexpression as independent prognostic markers in intracranial ependymoma. **Clin Cancer Res**, v. 12, n. 7 Pt 1, p. 2070-9, Apr 1 2006. ISSN 1078-0432 (Print)

1078-0432 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16609018> >.

MIRMOHAMMADSADEGH, A. et al. Epigenetic silencing of the PTEN gene in melanoma. **Cancer research**, v. 66, n. 13, p. 6546-6552, 2006. ISSN 0008-5472.

MIZUMATSU, S. et al. Expression of cell cycle regulator p27Kip1 is correlated with survival of patients with astrocytoma. **Clin Cancer Res**, v. 5, n. 3, p. 551-7, Mar 1999. ISSN 1078-0432 (Print)

1078-0432 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10100706> >.

MOLLEMANN, M. et al. Frequent promoter hypermethylation and low expression of the MGMT gene in oligodendroglial tumors. **Int J Cancer**, v. 113, n. 3, p. 379-85, Jan 20 2005. ISSN 0020-7136 (Print)

0020-7136 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15455350> >.

MONTENEGRO, R. C. et al. Pisosterol induces monocytic differentiation in HL-60 cells. **Toxicology in vitro**, v. 21, n. 5, p. 795-800, 2007. ISSN 0887-2333.

MONTENEGRO, R. C. et al. Antitumor activity of pisosterol in mice bearing with S180 tumor. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 3, p. 454-457, 2008. ISSN 0918-6158.

MONTENEGRO, R. C. et al. Cytotoxic activity of pisosterol, a triterpene isolated from *Pisolithus tinctorius* (Mich.: Pers.) Coker & Couch, 1928. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 59, n. 7-8, p. 519-522, 2004. ISSN 1865-7125.

MORGAN, H. D. et al. Epigenetic reprogramming in mammals. **Hum Mol Genet**, v. 14 Spec No 1, p. R47-58, Apr 15 2005. ISSN 0964-6906 (Print)

0964-6906 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15809273> >.

MORIBE, T. et al. Methylation of multiple genes as molecular markers for diagnosis of a small, well-differentiated hepatocellular carcinoma. **International journal of cancer**, v. 125, n. 2, p. 388-397, 2009. ISSN 1097-0215.

MUNZEL, M.; GLOBISCH, D.; CARELL, T. 5-Hydroxymethylcytosine, the sixth base of the genome. **Angew Chem Int Ed Engl**, v. 50, n. 29, p. 6460-8, Jul 11 2011. ISSN 1521-3773 (Electronic)

1433-7851 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21688365> >.

NAUEN, D. et al. Molecular Analysis of Pediatric Oligodendrogliomas Highlights Genetic Differences with Adult Counterparts and Other Pediatric Gliomas. **Brain Pathol**, v. 26, n. 2, p. 206-14, Mar 2016. ISSN 1750-3639 (Electronic)

1015-6305 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26206478> >.

NEGLIA, J. P. et al. New primary neoplasms of the central nervous system in survivors of childhood cancer: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. **J Natl Cancer Inst**, v. 98, n. 21, p. 1528-37, Nov 1 2006. ISSN 1460-2105 (Electronic)

0027-8874 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17077355> >.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **J Nat Prod**, v. 79, n. 3, p. 629-61, Mar 25 2016. ISSN 1520-6025 (Electronic)

0163-3864 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26852623> >.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **J Nat Prod**, v. 66, n. 7, p. 1022-37, Jul 2003. ISSN 0163-3864 (Print)

0163-3864 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12880330> >.

NICOLAIDIS, S. Biomarkers of glioblastoma multiforme. **Metabolism**, v. 64, n. 3 Suppl 1, p. S22-7, Mar 2015. ISSN 1532-8600 (Electronic)

0026-0495 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25468141> >.

NIKIFOROVA, M. N. et al. Targeted next-generation sequencing panel (GliSeq) provides comprehensive genetic profiling of central nervous system tumors. **Neuro Oncol**, v. 18, n. 3, p. 379-87, Mar 2016. ISSN 1523-5866 (Electronic)

1522-8517 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26681766> >.

NOELL, S. et al. Simultaneous subependymomas in monozygotic female twins: further evidence for a common genetic or developmental disorder background. **J Neurosurg**, v. 121, n. 3, p. 570-5, Sep 2014. ISSN 1933-0693 (Electronic)

0022-3085 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24655099> >.

NOUSHMEHR, H. et al. Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. **Cancer Cell**, v. 17, n. 5, p. 510-22, May 18 2010. ISSN 1878-3686 (Electronic)

1535-6108 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20399149> >.

NOWELL, P. C. The clonal evolution of tumor cell populations. **Science**, v. 194, n. 4260, p. 23-8, Oct 1 1976. ISSN 0036-8075 (Print)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/959840> >.

OHGAKI, H.; KLEIHUES, P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. **Am J Pathol**, v. 170, n. 5, p. 1445-53, May 2007. ISSN 0002-9440 (Print)

0002-9440 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17456751> >.

OHTA, T. et al. Aberrant promoter hypermethylation profile of cell cycle regulatory genes in malignant astrocytomas. **Oncol Rep**, v. 16, n. 5, p. 957-63, Nov 2006. ISSN 1021-335X (Print)

1021-335X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17016577> >.

OSTROM, Q. T. et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. **Neuro Oncol**, v. 17 Suppl 4, p. iv1-iv62, Oct 2015. ISSN 1523-5866 (Electronic)

1522-8517 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26511214> >.

OSTROM, Q. T. et al. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007-2011. **Neuro Oncol**, v. 16 Suppl 4, p. iv1-63, Oct 2014. ISSN 1523-5866 (Electronic)

1522-8517 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25304271> >.

OSUMI, N. The role of Pax6 in brain patterning. **Tohoku J Exp Med**, v. 193, n. 3, p. 163-74, Mar 2001. ISSN 0040-8727 (Print)

0040-8727 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11315763> >.

OZDEMIR, F. et al. Methylation of tumor suppressor genes in ovarian cancer. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 4, n. 6, p. 1092-1096, 2012. ISSN 1792-0981.

PAJTLER, K. W. et al. Molecular Classification of Ependymal Tumors across All CNS Compartments, Histopathological Grades, and Age Groups. **Cancer Cell**, v. 27, n. 5, p. 728-43, May 11 2015. ISSN 1878-3686 (Electronic)

1535-6108 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25965575> >.

PARSONS, D. W. et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. **Science**, v. 321, n. 5897, p. 1807-12, Sep 26 2008. ISSN 1095-9203 (Electronic)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18772396> >.

PATEL, A. P. et al. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. **Science**, v. 344, n. 6190, p. 1396-401, Jun 20 2014. ISSN 1095-9203 (Electronic)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24925914> >.

PEREIRA, E. L. et al. Inhibitory effect of pisosterol on human glioblastoma cell lines with C-MYC amplification. **J Appl Toxicol**, v. 31, n. 6, p. 554-60, Aug 2011. ISSN 1099-1263 (Electronic)

0260-437X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21061448> >.

PERRY, A.; WESSELING, P. Histologic classification of gliomas. **Handb Clin Neurol**, v. 134, p. 71-95, 2016. ISSN 0072-9752 (Print)

0072-9752 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26948349> >.

PERRY, J. R. et al. Phase II trial of continuous dose-intense temozolomide in recurrent malignant glioma: RESCUE study. **J Clin Oncol**, v. 28, n. 12, p. 2051-7, Apr 20 2010. ISSN 1527-7755 (Electronic)

0732-183X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20308655> >.

PERRY, J. R. et al. Short-Course Radiation plus Temozolomide in Elderly Patients with Glioblastoma. **N Engl J Med**, v. 376, n. 11, p. 1027-1037, Mar 16 2017. ISSN 1533-4406 (Electronic)

0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28296618> >.

PEZZANI, L. et al. HOXA genes cluster: clinical implications of the smallest deletion. **Ital J Pediatr**, v. 41, p. 31, Apr 10 2015. ISSN 1824-7288 (Electronic)

1720-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25881986> >.

PFEIFER, G. P.; WU, X.; RAUCH, T. A. **Dna hypermethylation brain cancer markers**: Google Patents 2011.

PHILLIPS, A. C. et al. ABT-414, an Antibody-Drug Conjugate Targeting a Tumor-Selective EGFR Epitope. **Mol Cancer Ther**, v. 15, n. 4, p. 661-9, Apr 2016. ISSN 1538-8514 (Electronic)

1535-7163 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26846818> >.

PIAO, X. M. et al. Unmasking molecular profiles of bladder cancer. **Investig Clin Urol**, v. 59, n. 2, p. 72-82, Mar 2018. ISSN 2466-054X (Electronic)

2466-0493 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29520382> >.

PIGNATTI, F. et al. Prognostic factors for survival in adult patients with cerebral low-grade glioma. **J Clin Oncol**, v. 20, n. 8, p. 2076-84, Apr 15 2002. ISSN 0732-183X (Print)

0732-183X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11956268> >.

POHL, U.; CAIRNCROSS, J. G.; LOUIS, D. N. Homozygous deletions of the CDKN2C/p18INK4C gene on the short arm of chromosome 1 in anaplastic oligodendrogliomas. **Brain Pathol**, v. 9, n. 4, p. 639-43, Oct 1999. ISSN 1015-6305 (Print)

1015-6305 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10517502> >.

PRESTON, D. L. et al. Solid cancer incidence in atomic bomb survivors: 1958-1998. **Radiat Res**, v. 168, n. 1, p. 1-64, Jul 2007. ISSN 0033-7587 (Print)

0033-7587 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17722996> >.

PREUSSER, M.; BIENKOWSKI, M.; BIRNER, P. BRAF inhibitors in BRAF-V600 mutated primary neuroepithelial brain tumors. **Expert Opin Investig Drugs**, v. 25, n. 1, p. 7-14, 2016. ISSN 1744-7658 (Electronic)

1354-3784 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26536389> >.

QADDOUMI, I. et al. Genetic alterations in uncommon low-grade neuroepithelial tumors: BRAF, FGFR1, and MYB mutations occur at high frequency and align with morphology. **Acta Neuropathol**, v. 131, n. 6, p. 833-45, Jun 2016. ISSN 1432-0533 (Electronic)

0001-6322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26810070> >.

QI, Y. K. et al. Total Chemical Synthesis of Modified Histones. **Front Chem**, v. 6, p. 19, 2018. ISSN 2296-2646 (Print)

2296-2646 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29473034> >.

RAHU, K. et al. Site-specific cancer risk in the Baltic cohort of Chernobyl cleanup workers, 1986-2007. **Eur J Cancer**, v. 49, n. 13, p. 2926-33, Sep 2013. ISSN 1879-0852 (Electronic)

0959-8049 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23683549> >.

RAHU, M. et al. Cancer risk among Chernobyl cleanup workers in Estonia and Latvia, 1986-1998. **Int J Cancer**, v. 119, n. 1, p. 162-8, Jul 1 2006. ISSN 0020-7136 (Print)

0020-7136 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16432838> >.

RAIBER, E.-A. et al. Mapping and elucidating the function of modified bases in DNA. **Nature Reviews Chemistry**, v. 1, p. 0069, 09/06/online 2017. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/s41570-017-0069> >.

RAMIREZ, V. T. et al. Wnt-5a/Frizzled9 Receptor Signaling through the Galphao-Gbetagamma Complex Regulates Dendritic Spine Formation. **J Biol Chem**, v. 291, n. 36, p. 19092-107, Sep 2 2016. ISSN 1083-351X (Electronic)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27402827> >.

RAMKISSOON, S. H. et al. Clinical implementation of integrated whole-genome copy number and mutation profiling for glioblastoma. **Neuro Oncol**, v. 17, n. 10, p. 1344-55, Oct 2015. ISSN 1523-5866 (Electronic)

1522-8517 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25754088> >.

REDGATE, E. S. et al. The effect of DFMO induced uptake of [3H] putrescine on human glioma cells. **J Neurooncol**, v. 55, n. 2, p. 71-80, Nov 2001. ISSN 0167-594X (Print)

0167-594X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11817704> >.

REIFENBERGER, G. et al. Advances in the molecular genetics of gliomas - implications for classification and therapy. **Nat Rev Clin Oncol**, Dec 29 2016. ISSN 1759-4782 (Electronic)

1759-4774 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28031556> >.

REIS, G. F.; TIHAN, T. Therapeutic targets in pilocytic astrocytoma based on genetic analysis. **Semin Pediatr Neurol**, v. 22, n. 1, p. 23-7, Mar 2015. ISSN 1558-0776 (Electronic)

1071-9091 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25976257> >.

REUSS, D. E. et al. Adult IDH wild type astrocytomas biologically and clinically resolve into other tumor entities. **Acta Neuropathol**, v. 130, n. 3, p. 407-17, Sep 2015. ISSN 1432-0533 (Electronic)

0001-6322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26087904> >.

RIEMENSCHNEIDER, M. J.; REIFENBERGER, G. Molecular neuropathology of gliomas. **Int J Mol Sci**, v. 10, n. 1, p. 184-212, Jan 2009. ISSN 1422-0067 (Electronic)

1422-0067 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19333441> >.

ROA, W. et al. Abbreviated course of radiation therapy in older patients with glioblastoma multiforme: a prospective randomized clinical trial. **J Clin Oncol**, v. 22, n. 9, p. 1583-8, May 1 2004. ISSN 0732-183X (Print)

0732-183X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15051755> >.

ROBINSON, G. W.; ORR, B. A.; GAJJAR, A. Complete clinical regression of a BRAF V600E-mutant pediatric glioblastoma multiforme after BRAF inhibitor therapy. **BMC Cancer**, v. 14, p. 258, Apr 12 2014. ISSN 1471-2407 (Electronic)

1471-2407 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24725538> >.

ROHLE, D. et al. An inhibitor of mutant IDH1 delays growth and promotes differentiation of glioma cells. **Science**, v. 340, n. 6132, p. 626-30, May 03 2013. ISSN 1095-9203 (Electronic)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23558169> >.

ROUSSEAU, A. et al. Specific chromosomal imbalances as detected by array CGH in ependymomas in association with tumor location, histological subtype and grade. **J Neurooncol**, v. 97, n. 3, p. 353-64, May 2010. ISSN 1573-7373 (Electronic)

0167-594X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19865800> >.

RUPPEL, W. Zur Chemie der Tuberkelbacillen. **Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie**, v. 26, n. 3-4, p. 218-232, 1899. ISSN 1437-4315.

RUSEVSKA, K. et al. DNA barcoding is an effective tool for differentiating *Pisolithus* species from Macedonia. **Mycotaxon**, v. 130, p. 1007-1016, 2015.

RYDBERG, B.; SPURR, N.; KARRAN, P. cDNA cloning and chromosomal assignment of the human O6-methylguanine-DNA methyltransferase. cDNA expression in *Escherichia coli* and gene expression in human cells. **J Biol Chem**, v. 265, n. 16, p. 9563-9, Jun 5 1990. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2188979> >.

SAAVEDRA, K. et al. Loss of Expression of Reprimo, a p53-induced Cell Cycle Arrest Gene, Correlates with Invasive Stage of Tumor Progression and p73 Expression in Gastric Cancer. **PLoS One**, v. 10, n. 5, p. e0125834, 2015. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25954972> >.

SADETZKI, S. et al. Long-term follow-up for brain tumor development after childhood exposure to ionizing radiation for tinea capitis. **Radiat Res**, v. 163, n. 4, p. 424-32, Apr 2005. ISSN 0033-7587 (Print)

0033-7587 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15799699> >.

SAHEBJAM, S.; MCNAMARA, M.; MASON, W. P. Management of glioblastoma in the elderly. **Clin Adv Hematol Oncol**, v. 10, n. 6, p. 379-86, Jun 2012. ISSN 1543-0790 (Print)

1543-0790 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22895239> >.

SAHM, F. et al. Next-generation sequencing in routine brain tumor diagnostics enables an integrated diagnosis and identifies actionable targets. **Acta Neuropathol**, v. 131, n. 6, p. 903-10, Jun 2016. ISSN 1432-0533 (Electronic)

0001-6322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26671409> >.

SAITO, Y. et al. Prognostic significance of CpG island methylator phenotype in surgically resected small cell lung carcinoma. **Cancer Sci**, v. 107, n. 3, p. 320-5, Mar 2016. ISSN 1349-7006 (Electronic)

1347-9032 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26748784> >.

SAMPSON, J. H. et al. Immunologic escape after prolonged progression-free survival with epidermal growth factor receptor variant III peptide vaccination in patients with newly diagnosed glioblastoma. **J Clin Oncol**, v. 28, n. 31, p. 4722-9, Nov 01 2010. ISSN 1527-7755 (Electronic)

0732-183X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20921459> >.

SÁNCHEZ-VEGA, F. et al. Recurrent patterns of DNA methylation in the ZNF154, CASP8, and VHL promoters across a wide spectrum of human solid epithelial tumors and cancer cell lines. **Epigenetics**, v. 8, n. 12, p. 1355-1372, 2013. ISSN 1559-2294.

SANDMANN, T. et al. Patients With Proneural Glioblastoma May Derive Overall Survival Benefit From the Addition of Bevacizumab to First-Line Radiotherapy and Temozolomide: Retrospective Analysis of the AVAglio Trial. **J Clin Oncol**, v. 33, n. 25, p. 2735-44, Sep 01 2015. ISSN 1527-7755 (Electronic)

0732-183X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26124478> >.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977. ISSN 0027-8424.

SANOUDOU, D. et al. Analysis of pilocytic astrocytoma by comparative genomic hybridization. **Br J Cancer**, v. 82, n. 6, p. 1218-22, Mar 2000. ISSN 0007-0920 (Print)

0007-0920 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10735509> >.

SASAKI, H. et al. PTEN is a target of chromosome 10q loss in anaplastic oligodendrogliomas and PTEN alterations are associated with poor prognosis. **Am J Pathol**, v. 159, n. 1, p. 359-67, Jul 2001. ISSN 0002-9440 (Print)

0002-9440 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11438483> >.

SASIADEK, M. et al. Impairment of MLH1 and CDKN2A in oncogenesis of laryngeal cancer. **British journal of cancer**, v. 90, n. 8, p. 1594, 2004. ISSN 1532-1827.

SCHINDLER, G. et al. Analysis of BRAF V600E mutation in 1,320 nervous system tumors reveals high mutation frequencies in pleomorphic xanthoastrocytoma, ganglioglioma and extra-cerebellar pilocytic astrocytoma. **Acta Neuropathol**, v. 121, n. 3, p. 397-405, Mar 2011. ISSN 1432-0533 (Electronic)

0001-6322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21274720> >.

SCHUMACHER, T. et al. A vaccine targeting mutant IDH1 induces antitumour immunity. **Nature**, v. 512, n. 7514, p. 324-7, Aug 21 2014. ISSN 1476-4687 (Electronic)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25043048> >.

SCHUSTER, J. et al. A phase II, multicenter trial of rindopepimut (CDX-110) in newly diagnosed glioblastoma: the ACT III study. **Neuro Oncol**, v. 17, n. 6, p. 854-61, Jun 2015. ISSN 1523-5866 (Electronic)

1522-8517 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25586468> >.

SENFT, C. et al. Intraoperative MRI guidance and extent of resection in glioma surgery: a randomised, controlled trial. **Lancet Oncol**, v. 12, n. 11, p. 997-1003, Oct 2011. ISSN 1474-5488 (Electronic)

1470-2045 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21868284> >.

SHI, R. et al. Exosomal levels of miRNA-21 from cerebrospinal fluids associated with poor prognosis and tumor recurrence of glioma patients. **Oncotarget**, v. 6, n. 29, p. 26971, 2015.

SHIVAPURKAR, N. et al. Differential inactivation of caspase-8 in lung cancers. **Cancer biology & therapy**, v. 1, n. 1, p. 65-69, 2002. ISSN 1538-4047.

SHORE, R. E. et al. Tumors and other diseases following childhood x-ray treatment for ringworm of the scalp (Tinea capitis). **Health Phys**, v. 85, n. 4, p. 404-8, Oct 2003. ISSN 0017-9078 (Print)

0017-9078 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13678280> >.

SILVA, T. C. et al. Pisosterol induces interphase arrest in HL60 cells with c-MYC amplification. **Hum Exp Toxicol**, v. 29, n. 3, p. 235-40, Mar 2010. ISSN 1477-0903 (Electronic)

0960-3271 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20071475> >.

SINGH, D. et al. Transforming fusions of FGFR and TACC genes in human glioblastoma. **Science**, v. 337, n. 6099, p. 1231-5, Sep 07 2012. ISSN 1095-9203 (Electronic)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22837387> >.

SKIRIUTE, D. et al. MGMT, GATA6, CD81, DR4, and CASP8 gene promoter methylation in glioblastoma. **BMC cancer**, v. 12, n. 1, p. 218, 2012. ISSN 1471-2407.

SKIRIUTE, D. et al. MGMT, GATA6, CD81, DR4, and CASP8 gene promoter methylation in glioblastoma. **BMC Cancer**, v. 12, p. 218, Jun 6 2012. ISSN 1471-2407 (Electronic)

1471-2407 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22672670> >.

SMITH, A. A. et al. A novel approach to the discovery of survival biomarkers in glioblastoma using a joint analysis of DNA methylation and gene expression. **Epigenetics**, v. 9, n. 6, p. 873-83, Jun 2014. ISSN 1559-2308 (Electronic)

1559-2294 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24670968> >.

SMITH, J. S. et al. PTEN mutation, EGFR amplification, and outcome in patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme. **J Natl Cancer Inst**, v. 93, n. 16, p. 1246-56, Aug 15 2001. ISSN 0027-8874 (Print)

0027-8874 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11504770> >.

SOBUE, K.; NAKAJIMA, T. Metabolism of putrescine in neuroblastoma and glioma cells during culture. **The Journal of Biochemistry**, v. 82, n. 4, p. 1121-1126, 1977. ISSN 0021-924X.

SONODA, Y. et al. Formation of intracranial tumors by genetically modified human astrocytes defines four pathways critical in the development of human anaplastic astrocytoma. **Cancer Res**, v. 61, n. 13, p. 4956-60, Jul 1 2001. ISSN 0008-5472 (Print)

0008-5472 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11431323> >.

STEPHEN, J. K. et al. Promoter methylation in head and neck tumorigenesis. In: (Ed.). **Cancer Epigenetics**: Springer, 2012. p.187-206.

STEPHEN, J. K. et al. DNA methylation in thyroid tumorigenesis. **Cancers**, v. 3, n. 2, p. 1732-1743, 2011.

STUMMER, W. et al. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. **Lancet Oncol**, v. 7, n. 5, p. 392-401, May 2006. ISSN 1470-2045 (Print)

1470-2045 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16648043> >.

STUPP, R. et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. **N Engl J Med**, v. 352, n. 10, p. 987-96, Mar 10 2005. ISSN 1533-4406 (Electronic)

0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15758009> >.

STUPP, R. et al. Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. **JAMA**, v. 318, n. 23, p. 2306-2316, Dec 19 2017. ISSN 1538-3598 (Electronic)

0098-7484 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29260225> >.

STUPP, R. et al. 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, Dec 15 2015. ISSN 1538-3598 (Electronic)

0098-7484 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26670971> >.

STURM, D. et al. Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma. **Cancer Cell**, v. 22, n. 4, p. 425-37, Oct 16 2012. ISSN 1878-3686 (Electronic)

1535-6108 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23079654> >.

SU, J. et al. Differential regulation and role of interleukin-1 receptor associated kinase-M in innate immunity signaling. **Cell Signal**, v. 19, n. 7, p. 1596-601, Jul 2007. ISSN 0898-6568 (Print)

0898-6568 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17379480> >.

SUCHORSKA, B. et al. Complete resection of contrast-enhancing tumor volume is associated with improved survival in recurrent glioblastoma-results from the DIRECTOR trial. **Neuro Oncol**, v. 18, n. 4, p. 549-56, Apr 2016. ISSN 1523-5866 (Electronic)

1522-8517 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26823503> >.

SUZUKI, H. et al. Mutational landscape and clonal architecture in grade II and III gliomas. **Nat Genet**, v. 47, n. 5, p. 458-68, May 2015. ISSN 1546-1718 (Electronic)

1061-4036 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25848751> >.

TABASSUM, D. P.; POLYAK, K. Tumorigenesis: it takes a village. **Nat Rev Cancer**, v. 15, n. 8, p. 473-83, Aug 2015. ISSN 1474-1768 (Electronic)

1474-175X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26156638> >.

TAYLOR, A. J. et al. Population-based risks of CNS tumors in survivors of childhood cancer: the British Childhood Cancer Survivor Study. **J Clin Oncol**, v. 28, n. 36, p. 5287-93, Dec 20 2010. ISSN 1527-7755 (Electronic)

0732-183X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21079138> >.

THOMAS, T. L. et al. Brain tumor mortality risk among men with electrical and electronics jobs: a case-control study. **J Natl Cancer Inst**, v. 79, n. 2, p. 233-8, Aug 1987. ISSN 0027-8874 (Print)

0027-8874 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3474455> >.

THOMPSON, D. E. et al. Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part II: Solid tumors, 1958-1987. **Radiat Res**, v. 137, n. 2 Suppl, p. S17-67, Feb 1994. ISSN 0033-7587 (Print)

0033-7587 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8127952> >.

TORRE, L. A. et al. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 25, n. 1, p. 16-27, Jan 2016. ISSN 1538-7755 (Electronic)

1055-9965 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26667886> >.

TROST, D. et al. Identification of genomic aberrations associated with shorter overall survival in patients with oligodendrogial tumors. **Int J Cancer**, v. 120, n. 11, p. 2368-76, Jun 1 2007. ISSN 0020-7136 (Print)

0020-7136 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17285580> >.

TSANTRIZOS, Y. S. et al. Antifungal antibiotics from *Pisolithus tinctorius*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 4, p. 1113-1118, 1991. ISSN 0031-9422.

VALVERDE, M. E.; HERNANDEZ-PEREZ, T.; PAREDES-LOPEZ, O. Edible mushrooms: improving human health and promoting quality life. **Int J Microbiol**, v. 2015, p. 376387, 2015. ISSN 1687-918X (Print). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25685150> >.

VAN DEN BENT, M. J. Interobserver variation of the histopathological diagnosis in clinical trials on glioma: a clinician's perspective. **Acta Neuropathol**, v. 120, n. 3, p. 297-304, Sep 2010. ISSN 1432-0533 (Electronic)

0001-6322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20644945> >.

VAN DEN BENT, M. J. et al. Long-term efficacy of early versus delayed radiotherapy for low-grade astrocytoma and oligodendroglioma in adults: the EORTC 22845 randomised trial. **Lancet**, v. 366, n. 9490, p. 985-90, Sep 17-23 2005. ISSN 1474-547X (Electronic)

0140-6736 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16168780> >.

VAN DEN BENT, M. J. et al. Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine chemotherapy in newly diagnosed anaplastic oligodendroglioma: long-term follow-up of EORTC brain tumor group study 26951. **J Clin Oncol**, v. 31, n. 3, p. 344-50, Jan 20 2013. ISSN 1527-7755 (Electronic)

0732-183X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23071237> >.

VAN DEN BENT, M. J.; CHANG, S. M. Grade II and III Oligodendroglioma and Astrocytoma. **Neurol Clin**, v. 36, n. 3, p. 467-484, Aug 2018. ISSN 1557-9875 (Electronic)

0733-8619 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30072066> >.

VAN DEN BENT, M. J. et al. Interlaboratory comparison of IDH mutation detection. **J Neurooncol**, v. 112, n. 2, p. 173-8, Apr 2013. ISSN 1573-7373 (Electronic)

0167-594X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23358936> >.

VAUBEL, R. A. et al. Recurrent copy number alterations in low-grade and anaplastic pleomorphic xanthoastrocytoma with and without BRAF V600E mutation. **Brain Pathol**, v. 28, n. 2, p. 172-182, Mar 2018. ISSN 1750-3639 (Electronic)

1015-6305 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28181325> >.

VERA-BOLANOS, E. et al. Clinical course and progression-free survival of adult intracranial and spinal ependymoma patients. **Neuro Oncol**, v. 17, n. 3, p. 440-7, Mar 2015. ISSN 1523-5866 (Electronic)

1522-8517 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25121770> >.

VERHAAK, R. G. et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. **Cancer Cell**, v. 17, n. 1, p. 98-110, Jan 19 2010. ISSN 1878-3686 (Electronic)

1535-6108 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20129251> >.

VOGAZIANOU, A. P. et al. Distinct patterns of 1p and 19q alterations identify subtypes of human gliomas that have different prognoses. **Neuro Oncol**, v. 12, n. 7, p. 664-78, Jul 2010. ISSN 1523-5866 (Electronic)

1522-8517 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20164239> >.

VOORTMAN, J. et al. Array comparative genomic hybridization-based characterization of genetic alterations in pulmonary neuroendocrine tumors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 29, p. 13040-5, Jul 20 2010. ISSN 1091-6490 (Electronic)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20615970> >.

VUORINEN, V. et al. Debulking or biopsy of malignant glioma in elderly people - a randomised study. **Acta Neurochir (Wien)**, v. 145, n. 1, p. 5-10, Jan 2003. ISSN 0001-6268 (Print)

0001-6268 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12545256> >.

WADDINGTON, C. H. The epigenotype. **Endeavour**, v. 1, p. 18-20, 1942.

WANG, H. X.; TEKPETEY, F. R.; KIDDER, G. M. Identification of WNT/beta-CATENIN signaling pathway components in human cumulus cells. **Mol Hum Reprod**, v. 15, n. 1, p. 11-7, Jan 2009. ISSN 1460-2407 (Electronic)

1360-9947 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19038973> >.

WANG, L. et al. Methylation markers for small cell lung cancer in peripheral blood leukocyte DNA. **J Thorac Oncol**, v. 5, n. 6, p. 778-85, Jun 2010. ISSN 1556-1380 (Electronic)

1556-0864 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20421821> >.

WANG, Y. et al. Detection of tumor-derived DNA in cerebrospinal fluid of patients with primary tumors of the brain and spinal cord. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 112, n. 31, p. 9704-9, Aug 4 2015. ISSN 1091-6490 (Electronic)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26195750> >.

WATANABE, T. et al. Aberrant hypermethylation of p14ARF and O6-methylguanine-DNA methyltransferase genes in astrocytoma progression. **Brain Pathol**, v. 17, n. 1, p. 5-10, Jan 2007. ISSN 1015-6305 (Print)

1015-6305 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17493032> >.

WEBER, R. et al. Frequent loss of chromosome 9, homozygous CDKN2A/p14 ARF/CDKN2B deletion and low TSC1 mRNA expression in pleomorphic xanthoastrocytomas. **Oncogene**, v. 26, n. 7, p. 1088, 2007. ISSN 1476-5594.

WEBER, R. G. et al. Frequent loss of chromosome 9, homozygous CDKN2A/p14(ARF)/CDKN2B deletion and low TSC1 mRNA expression in pleomorphic xanthoastrocytomas. **Oncogene**, v. 26, n. 7, p. 1088-97, Feb 15 2007. ISSN 0950-9232 (Print)

0950-9232 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16909113> >.

WELLER, M. et al. MGMT Promoter Methylation Is a Strong Prognostic Biomarker for Benefit from Dose-Intensified Temozolomide Rechallenge in Progressive Glioblastoma: The DIRECTOR Trial. **Clin Cancer Res**, v. 21, n. 9, p. 2057-64, May 1 2015. ISSN 1078-0432 (Print)

1078-0432 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25655102> >.

WELLER, M. et al. EANO guideline for the diagnosis and treatment of anaplastic gliomas and glioblastoma. **Lancet Oncol**, v. 15, n. 9, p. e395-403, Aug 2014. ISSN 1474-5488 (Electronic)

1470-2045 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25079102> >.

WELLER, M. et al. Molecular classification of diffuse cerebral WHO grade II/III gliomas using genome- and transcriptome-wide profiling improves stratification of prognostically distinct patient groups. **Acta Neuropathol**, v. 129, n. 5, p. 679-93, May 2015. ISSN 1432-0533 (Electronic)

0001-6322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25783747> >.

WELLER, M. et al. Glioma. **Nat Rev Dis Primers**, v. 1, p. 15017, Jul 16 2015. ISSN 2056-676X (Electronic)

2056-676X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27188790> >.

WESCHE, H. et al. IRAK-M is a novel member of the Pelle/interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family. **J Biol Chem**, v. 274, n. 27, p. 19403-10, Jul 2 1999. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10383454> >.

WHITE, M. G. et al. Epigenetic alterations and canonical pathway disruption in papillary thyroid cancer: a genome-wide methylation analysis. **Annals of surgical oncology**, v. 23, n. 7, p. 2302-2309, 2016. ISSN 1068-9265.

WICK, W. TTFIELDS: where does all the skepticism come from? **Neuro Oncol**, v. 18, n. 3, p. 303-5, Mar 2016. ISSN 1523-5866 (Electronic)

1522-8517 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26917587> >.

WICK, W. et al. Prognostic or predictive value of MGMT promoter methylation in gliomas depends on IDH1 mutation. **Neurology**, v. 81, n. 17, p. 1515-22, Oct 22 2013. ISSN 1526-632X (Electronic)

0028-3878 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24068788> >.

WICK, W. et al. Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial. **Lancet Oncol**, v. 13, n. 7, p. 707-15, Jul 2012. ISSN 1474-5488 (Electronic)

1470-2045 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22578793> >.

WICK, W. et al. Phase III study of enzastaurin compared with lomustine in the treatment of recurrent intracranial glioblastoma. **J Clin Oncol**, v. 28, n. 7, p. 1168-74, Mar 1 2010. ISSN 1527-7755 (Electronic)

0732-183X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20124186> >.

WICK, W. et al. MGMT testing--the challenges for biomarker-based glioma treatment. **Nat Rev Neurol**, v. 10, n. 7, p. 372-85, Jul 2014. ISSN 1759-4766 (Electronic)

1759-4758 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24912512> >.

WIESTLER, B. et al. Integrated DNA methylation and copy-number profiling identify three clinically and biologically relevant groups of anaplastic glioma. **Acta Neuropathol**, v. 128, n. 4, p. 561-71, Oct 2014. ISSN 1432-0533 (Electronic)

0001-6322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25008768> >.

WISHART, D. S. et al. DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. **Nucleic Acids Res**, v. 34, n. Database issue, p. D668-72, Jan 1 2006. ISSN 1362-4962 (Electronic)

0305-1048 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16381955> >.

WOLTER, M. et al. Oligodendroglial tumors frequently demonstrate hypermethylation of the CDKN2A (MTS1, p16INK4a), p14ARF, and CDKN2B (MTS2, p15INK4b) tumor suppressor genes. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 60, n. 12, p. 1170-80, Dec 2001. ISSN 0022-3069 (Print)

0022-3069 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11764089> >.

WONG, S. H. M. et al. E-cadherin: Its dysregulation in carcinogenesis and clinical implications. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 121, p. 11-22, Jan 2018. ISSN 1879-0461 (Electronic)

1040-8428 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29279096> >.

WRENSCH, M. et al. Familial and personal medical history of cancer and nervous system conditions among adults with glioma and controls. **Am J Epidemiol**, v. 145, n. 7, p. 581-93, Apr 1 1997. ISSN 0002-9262 (Print)

0002-9262 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9098174> >.

WRENSCH, M. et al. Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. **Neuro Oncol**, v. 4, n. 4, p. 278-99, Oct 2002. ISSN 1522-8517 (Print)

1522-8517 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12356358> >.

WU, J.; ARMSTRONG, T. S.; GILBERT, M. R. Biology and management of ependymomas. **Neuro Oncol**, v. 18, n. 7, p. 902-13, Jul 2016. ISSN 1523-5866 (Electronic)

1522-8517 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27022130> >.

WU, Y. et al. Caspase 8 and maspin are downregulated in breast cancer cells due to CpG site promoter methylation. **BMC cancer**, v. 10, n. 1, p. 32, 2010. ISSN 1471-2407.

XIE, Y. et al. The Human Glioblastoma Cell Culture Resource: Validated Cell Models Representing All Molecular Subtypes. **EBioMedicine**, v. 2, n. 10, p. 1351-63, Oct 2015. ISSN 2352-3964 (Electronic)

2352-3964 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26629530> >.

XU, W. et al. Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenases. **Cancer Cell**, v. 19, n. 1, p. 17-30, Jan 18 2011. ISSN 1878-3686 (Electronic)

1535-6108 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21251613> >.

YAN, H. et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. **N Engl J Med**, v. 360, n. 8, p. 765-73, Feb 19 2009. ISSN 1533-4406 (Electronic)

0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19228619> >.

YANG, P.; WANG, L. **Early detection and treatment of lung cancer**: Google Patents 2012.

YANG, Q. et al. Methylation of CASP8, DCR2, and HIN-1 in neuroblastoma is associated with poor outcome. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 11, p. 3191-3197, 2007. ISSN 1078-0432.

YE, C.; LI, L. 5-hydroxymethylcytosine: a new insight into epigenetics in cancer. **Cancer Biol Ther**, v. 15, n. 1, p. 10-5, Jan 2014. ISSN 1555-8576 (Electronic)

1538-4047 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24253310> >.

YEH, H. et al. Cancer incidence after childhood nasopharyngeal radium irradiation: a follow-up study in Washington County, Maryland. **Am J Epidemiol**, v. 153, n. 8, p. 749-56, Apr 15 2001. ISSN 0002-9262 (Print)

0002-9262 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11296146> >.

YOON, J. B.; ROEDER, R. G. Cloning of two proximal sequence element-binding transcription factor subunits (gamma and delta) that are required for transcription of small nuclear RNA genes by RNA polymerases II and III and interact with the TATA-binding protein. **Mol Cell Biol**, v. 16, n. 1, p. 1-9, Jan 1996. ISSN 0270-7306 (Print)

0270-7306 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8524284> >.

YU, J. et al. Methylation profiles of thirty four promoter-CpG islands and concordant methylation behaviours of sixteen genes that may contribute to carcinogenesis of astrocytoma. **BMC Cancer**, v. 4, p. 65, Sep 14 2004. ISSN 1471-2407 (Electronic)

1471-2407 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15367334> >.

ZACHER, A. et al. Molecular Diagnostics of Gliomas Using Next Generation Sequencing of a Glioma-Tailored Gene Panel. **Brain Pathol**, v. 27, n. 2, p. 146-159, Mar 2017. ISSN 1750-3639 (Electronic)

1015-6305 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26919320> >.

ZAHONERO, C. et al. Preclinical Test of Dacomitinib, an Irreversible EGFR Inhibitor, Confirms Its Effectiveness for Glioblastoma. **Mol Cancer Ther**, v. 14, n. 7, p. 1548-58, Jul 2015. ISSN 1538-8514 (Electronic)

1535-7163 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25939761> >.

ZAMUNER, M. et al. Lanostane triterpenes from the fungus *Pisolithus tinctorius*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 4, p. 863-867, 2005. ISSN 0103-5053.

ZATTARA-CANNONI, H. et al. Are juvenile pilocytic astrocytomas benign tumors? A cytogenetic study in 24 cases. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 104, n. 2, p. 157-60, Jul 15 1998. ISSN 0165-4608 (Print)

0165-4608 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9666811> >.

ZHANG, G.; HUANG, S.; WANG, Z. A meta-analysis of bevacizumab alone and in combination with irinotecan in the treatment of patients with recurrent glioblastoma multiforme. **J Clin Neurosci**, v. 19, n. 12, p. 1636-40, Dec 2012. ISSN 1532-2653 (Electronic)

0967-5868 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23047061> >.

ZHANG, J. et al. Whole-genome sequencing identifies genetic alterations in pediatric low-grade gliomas. **Nat Genet**, v. 45, n. 6, p. 602-12, Jun 2013. ISSN 1546-1718 (Electronic)

1061-4036 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23583981> >.

ZHANG, L. et al. RIT2, a neuron-specific small guanosine triphosphatase, is expressed in retinal neuronal cells and its promoter is modulated by the POU4 transcription factors. **Mol Vis**, v. 19, p. 1371-86, 2013. ISSN 1090-0535 (Electronic)

1090-0535 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23805044> >.

ZHOU, Q. H. et al. Molecular characterization and integrative genomic analysis of a panel of newly established penile cancer cell lines. **Cell Death Dis**, v. 9, n. 6, p. 684, Jun 7 2018. ISSN 2041-4889 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29880898> >.

ZHU, C. H. et al. A family of AP-2 proteins down-regulate manganese superoxide dismutase expression. **J Biol Chem**, v. 276, n. 17, p. 14407-13, Apr 27 2001. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11278550> >.

ZHU, F. et al. Therapeutic target database update 2012: a resource for facilitating target-oriented drug discovery. **Nucleic Acids Res**, v. 40, n. Database issue, p. D1128-36, Jan 2012. ISSN 1362-4962 (Electronic)

0305-1048 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21948793> >.

ANEXO A – Parecer Consubstanciado do CEP

HOSPITAL OPHIR LOYOLA -
HOL



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DE ALTERAÇÕES GÊNICAS E CROMOSSÔMICAS EM TUMORES DE SISTEMA NERVOSO HUMANO

Pesquisador: Edivaldo Herculano Correa de Oliveira

Área Temática: Genética Humana:

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

Versão: 2

CAAE: 01698912.7.3002.5550

Instituição Proponente: Instituto Evandro Chagas/SVS/MS

Patrocinador Principal: CONS NAC DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLÓGICO
Instituto Evandro Chagas/SVS/MS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 593.717-0

Data da Relatoria: 05/07/2012

Apresentação do Projeto:

Colocar CNPJ do Hospital Ophir Loyola como Instituição Co-participante

Objetivo da Pesquisa:

Objetivos bem definidos e de acordo com a resolução nº 340/2004

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

De acordo com o Inciso V da resolução CNS nº 196/1996, toda pesquisa envolvendo seres-humanos envolve riscos, portanto os pesquisadores devem explicitar e detalhar no projeto os eventuais riscos e benefícios da pesquisa de acordo com o inciso supracitado.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

a) Haverá grupo controle? Justificar a presença ou ausência deste grupo.

c) Colocar critérios de inclusão e exclusão da amostra, como por exemplo, pacientes que não concordem com o TCLE estão no grupo de exclusão.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Deve ser acrescentado no TCLE, segundo a resolução nº340/2004 do Conselho nacional de Saúde, os seguintes itens:

Endereço: GOVERNADOR MAGALHAES BARATA 523/1075

Bairro: SAO BRAS

CEP: 66.063-240

UF: PA

Município: BELEM

Telefone: (91)3265-6645

E-mail: cepophirloyola.pa@gmail.com

HOSPITAL OPHIR LOYOLA - HOL



Continuação do Parecer: 593.717-0

- a) Indicação dos Genes/segmentos do DNA ou produtos gênicos que serão estudados;
- b) Tipo e grau de acesso aos resultados por parte do sujeito, com opção de tomar conhecimento ou não dessas informações, bem como retirar o seu material da pesquisa a qualquer momento;
- c) Explicitar que ao ser realizado novos trabalhos com o material armazenado o sujeito será contatado para conceder ou não autorização nestes novos trabalhos;
- d) Informar que os resultados individuais da pesquisa só será acessível aos pesquisadores, não sendo permitido o acesso a terceiros.

Recomendações:

Segundo a resolução nº340/2004, os dados genéticos coletados nesta pesquisa só poderão ser utilizados para outros fins se for obtido o consentimento prévio do indivíduo doador ou representante legal e mediante uma nova elaboração de protocolo de pesquisa submetida a aprovação do CEP ou CONEP.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto é de grande interesse científico, devendo apenas adequar as pendências abaixo para a sua aprovação pelo CEP:

- a) Colocar CNPJ do Hospital Ophir Loyola como Instituição Co-participante;
- b) Explicitar Risco-benefícios;
- c) Justificar uso ou não de grupo controle;
- d) Colocar critérios de inclusão e exclusão da amostra;
- e) Adequar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Avaliação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Interessante observar que pesquisas relacionadas com genética humana devem estar de acordo não somente com a Resolução 196/1996, mas também com a Resolução nº 340/2004 do Ministério da Saúde.

Endereço: GOVERNADOR MAGALHAES BARATA 523/1075

Bairro: SAO BRAS

CEP: 66.063-240

UF: PA **Município:** BELEM

Telefone: (91)3265-6645

E-mail: cepophirloyola.pa@gmail.com

HOSPITAL OPHIR LOYOLA -
HOL



Continuação do Parecer: 593.717-0

BELEM, 11 de Abril de 2014

Assinador por:
Alberto Gomes Ferreira Junior
(Coordenador)

Este parecer reemitido substitui o parecer número 593717 gerado na data 10/04/2014 08:02:35, onde o número CAAE foi alterado de 01698912.7.0000.0019 para 01698912.7.3002.5550.

Endereço: GOVERNADOR MAGALHAES BARATA 523/1075

Bairro: SAO BRAS

CEP: 66.063-240

UF: PA

Município: BELEM

Telefone: (91)3265-6645

E-mail: cepophirloyola.pa@gmail.com

APÊNDICE 1 – Lista de amostras de tecidos de pacientes diagnosticados com diferentes tumores gliais.

Caso	Sexo	Idade	Histopatológico	Grau/WHO	Categoria
CSN/IEC03	M	7	Astrocitoma Pilocítico	1	Outros tumores astrocíticos
CSN/IEC04	M	19	Ependimoma Anaplásico	3	Tumores ependimários
CSN/IEC07	M	77	Gliosarcoma	4	Tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos
CSN/IEC11	M	2	Astrocitoma Pilocítico	1	Outros tumores astrocíticos
CSN/IEC12	M	65	Astrocitoma Gemistocítico	2	Tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos
CSN/IEC14	M	24	Oligoastrocitoma Anaplásico	3	Tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos
CSN/IEC21	M	35	Oligoastrocitoma	2	Tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos
CSN/IEC28	M	31	Astrocitoma anaplásico	3	Tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos
CSN/IEC31	M	34	Glioblastoma	4	Tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos
CSN/IEC33	F	4	Astrocitoma Pilocítico	1	Tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos
CSN/IEC35	M	1	Ependimoma Grau II	2	Tumores ependimários
CSN/IEC36	F	6	Astrocitoma Pilocítico	1	Outros tumores astrocíticos
CSN/IEC39	M	1	Ependimoma Grau II	3	Tumores ependimários
CSN/IEC42	F	68	Tecido Cérebro Normal		
CSN/IEC50	F	66	Astrocitoma difuso	2	Tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos
CSN/IEC52	M	17	Ganglioglioma	1	Tumores neurogliais mistos
CSN/IEC64	F	64	Glioma pontino intrínseco difuso	3	Tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos
CSN/IEC68	M	43	Glioblastoma	4	Tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos
CSN/IEC69	F	30	Glioblastoma	4	Tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos
CSN/IEC71	M	64	Glioblastoma	4	Tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos
CSN/IEC72	M	39	Oligodendroglioma	2	Tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos
CSN/IEC74	F	74	Glioblastoma	4	Tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos
CSN/IEC80	M	55	Glioma de alto grau	3	Tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos
CSN/IEC82	F	35	Astrocitoma Anaplásico	3	Tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos
CSN/IEC86	F	27	Glioblastoma	4	Tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos
CSN/IEC88	M	42	Glioma de alto grau	3	Tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos
CSN/IEC89	M	57	Glioblastoma	4	Tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos
CSN/IEC90	F	43	Glioma de alto grau	3	Tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos
CSN/IEC91	M	59	Glioblastoma	3	Tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos
CSN/IEC94	M	57	Tecido Cérebro Normal		
CSN/IEC101	F	36	Glioma de alto grau	3	Tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos
CSN/IEC102	F	73	Glioblastoma	4	Tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos
CSN/IEC103	F	48	Glioblastoma	4	Tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos
CSN/IEC104	F	60	Glioblastoma	4	Tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos
CSN/IEC106	F	26	Oligoastrocitoma anaplásico	3	Tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos
CSN/IEC107	M	66	Gliosarcoma	4	Tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos
CSN/IEC113	M	45	Glioblastoma	4	Tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos
CSN/IEC114	M	70	Glioblastoma	4	Tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos
CSN/IEC117	M	59	Glioblastoma	4	Tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos
CSN/IEC118	M	57	Glioblastoma	4	Tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos
CSN/IEC127	M	53	Oligodendroglioma	2	Tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos
CSN/IEC129	M	63	Glioblastoma	4	Tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos
CSN/IEC130	M	67	Glioblastoma	4	Tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos
CSN-10	F	12	Astrocitoma Fibrilar	2	Tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos
CSN-12	M	13	Astrocitoma Pilocítico	1	Outros tumores astrocíticos
CSN-17	F	64	Glioblastoma	4	Tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos
CSN-20	M	3	Astrocitoma Pilomixóide	1	Outros tumores astrocíticos
CSN-22	M	2	Oligoastrocitoma	2	Tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos
CSN-31	F	55	Astrocitoma Anaplásico	3	Tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos
CSN-47	M	64	Gliosarcoma	4	Tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos
CSN-58	M	37	Astrocitoma difuso	2	Tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos
CSN-73	M	43	Glioblastoma	4	Tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos
CSN-77	F	1	Ependimoma	2	Tumores ependimários
CSN-88	F	63	Oligoastrocitoma Anaplásico	3	Tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos
CSN-95	M	19	Oligodendroglioma	2	Tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos
CSN-96	F	43	Oligodendroglioma	2	Tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos
CSN-104	M	15	Glioblastoma	4	Tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos
CSN-115	M	26	Xantroastrocitoma Pleomórfico Anaplásico	3	Outros tumores astrocíticos
CSN-116	F	3	Astrocitoma pilocítico	1	Outros tumores astrocíticos
CSN-119	F	2	Astrocitoma Pilomixóide	1	Outros tumores astrocíticos
CSN-122	F	70	Glioblastoma	4	Tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos
CSN-126	F	34	Astrocitoma difuso	2	Tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos
CSN-130	M	51	Glioblastoma	4	Tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos
CSN-136	M	64	Astrocitoma difuso	2	Tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos
CSN-138	F	8	Ependimoma Celular	2	Tumores ependimários
CSN-141	M	62	Ependimoma Anaplásico (Grau III)	3	Tumores ependimários
CSN-145	F	27	Astrocitoma pilocítico	1	Outros tumores astrocíticos
CSN-153	M	60	Glioblastoma	4	Tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos
CSN-167	M	14	Astrocitoma difuso	2	Tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos
CSN-168	M	46	Glioblastoma	4	Tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos
CSN-169	F	49	Glioblastoma	4	Tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos
CSN-184	F	23	Oligodendroglioma	2	Tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos
CSN-190	M	59	Astrocitoma Anaplásico	3	Tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos
CSN-192	F	1	Ganglioglioma	1	Tumores neurogliais mistos
CSN-193	M	56	Glioblastoma	4	Tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos
CSN-194	M	30	Ganglioglioma	1	Tumores neurogliais mistos
CSN-198	M	74	Glioblastoma	4	Tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos
CSN-199	M	48	Glioblastoma	4	Tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos
CSN-200	M	66	Glioblastoma	4	Tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos

APÊNDICE 2 – Variação do número de cópias (CNVs) da linhagem AHOL.

Cromossomo	Citobanda	Tamanho(kb)	Tipo	Genes Afetados
2	p11.2	637	LOSS	
4	p15.1 - p14	7,800	GAIN	MIR4275, PCDH7, LOC102723778, LOC102723828, LOC105377651, LOC101927363, LOC101928622...
6	p12.1	1,752	GAIN	MLIP, TINAG, FAM83B, HCRTR2, GFRAL, HMGCLL1, BMP5...
7	p21.3 - p21.2	3,393	GAIN	ETV1, DGKB, AGMO, MEOX2, LOC105375166, MEOX2-AS1, ISPD, ISPD-AS1...
8	q11.21 - q11.22	2,798	GAIN	LOC101929268, LOC101929217, EFCAB1, SNAI2, C8orf22, LOC100507464, SNTG1, PXDNL...
8	q23.2 - q23.3	5,104	GAIN	LINC01608, LINC01609, CSMD3, MIR2053, TRPS1...
9	p24.1 - p23	3,426	GAIN	PTPRD, LOC105375972, PTPRD-AS2
10	q21.1	3,864	GAIN	PCDH15, LOC105378311, MTRNR2L5, ZWINT.
11	q13.5	28	GAIN	PAK1
11	q22.1	2,269	GAIN	CNTN5
12	p13.31	76	DEL	
13	q33.1 - q33.2	1,154	GAIN	
14	q32.33	471	AMP	KIAA0125, ADAM6, LINC00226
14	q32.33	50	AMP	ADAM6
14	q32.33	273	GAIN	LINC00221, MIR7641-2
15	q11.1 - q11.2	2,126	LOSS	CHEK2P2, HERC2P3, GOLGA6L6, GOLGA8CP, NBEAP1, MIR3118-4, MIR3118-3, MIR3118-2, POTEB3, POTE6, POTE8, NF1P2, MIR5701-3, MIR5701-1, MIR5701-2, LINC01193, LOC646214, CXADR2, LOC101927079, LOC727924, OR4M2, OR4N4, OR4N3P, MIR1268A, RERE3
17	q25.2 - q25.3	81	GAIN	
19	p12	3,577	GAIN	ZNF826P, MIR1270, ZNF737, ZNF626, ZNF85, ZNF430, ZNF714, ZNF431, ZNF708, ZNF738, ZNF493, LINC00664, ZNF429, ZNF100, LOC641367, ZNF43, ZNF208, ZNF257, ZNF676, ZNF729, ZNF98, LOC101929124, LINC01233, GOLGA2P9, LOC100996349, LOC374890, ZNF492, ZNF99, ZNF728, LOC101929164, LOC101929144, ZNF730, ZNF724P, IPO5P1, ZNF91, LINC01224, ZNF675, ZNF681, RPSAP58, ZNF726.
X	p22.33 - p11.1	55,799	GAIN	GYC2, ARSD, ARSE, ARSH, ARSF, LINC01546, MXRA5, PRKX, PRKX-AS1, LOC389906, LOC101928201, NLGN4X, MIR4770, VCX3A, PUDP, MIR4767, STS, VCX, PNPLA4, MIR651, VCX2, VCX3B, ANOS1, FAM9A, FAM9B, TBL1X, GPR143, SHROOM2, CLDN34, WWC3, CLCN4, MID1, HCSC, ARHGAP6, AMELX, MS13, FRMPD4, PRPS2, TLR7, TLR8-AS1, TLR8, TMSB4X, FAM9C, GS1-600G8.3, ATXN3L, LINC01203, EGFL6, MIR6086, TCEANC, RAB9A, TRAPPC2, OFD1, GPM6B, GEMIN8, UBE2E4P, GLRA2, FANCB, MOSPD2, ASB9, ASB11, PIGA, FIGF, PIR-FIGF, PIR, BMX, ACE2, GS1-594A7.3, TMEM27, CA5BP1, CA5B, INE2, ZRSR2, AP1S2, GRPR, MAGEB17, CTPS2, MIR548AM, S100G, SYAP1, TXLNG, RBBP7, REPS2, NHS, MIR4768, NHS-AS1, SCML1, RAI2, LINC01456, BEND2, SCML2, CDKL5, RS1, PPEF1-AS1, PPEF1, PHKA2-AS1, PHKA2, ADGRG2, PDHA1, MAP3K15, SH3KBP1, CXorf23, LOC729609, MAP7D2, MIR23C, EIF1AX, SCARNA9L, EIF1AX-AS1, RPS6KA3, CNKSR2, KLHL34, SMPX, MBTPS2, YY2, SMS, PHEX, PHEX-AS1, PTCHD1-AS, ZNF645, DDX53, PTCHD1, PRDX4, ACOT9, SAT1, APOO, CXorf58, KLHL15, EIF2S3, ZFX-AS1, ZFX, SUPT20HL2, SUPT20HL1, PDK3, PCYT1B, PCYT1B-AS1, POLA1, SCARNA23, ARX, MAGEB18, MAGEB6, MAGEB5, VENTXP1, PPP4R3CP, DCAF8L2, MAGEB10, DCAF8L1, MIR6134, ILIRAPL1, MIR4666B, MAGEB2, MAGEB3, MAGEB4, MAGEB1, NR0B1, CXorf21, GK, TAB3, FTHL17, DMD, MIR3915, FAM47A, TMEM47, FAM47B, MAGEB16, CFAP47, RP11-87M18.2, FAM47C, FTH1P18, PRRG1, LANCL3, XK, CYBB, DYNLT3, HYPM, SYTL5, SRPX, RPGR, OTC, TSPAN7, MID1P1-AS1, MID1P1, LINC01281, LINC01282, MIR3937, BCOR, LOC101927476, ATP6AP2, MPC1L, CXorf38, MED14, MED14OS, LOC100132831, USP9X, MIR7641-2, DDX3X, NYX, CASK, GPR34, GPR82, PPP1R2P9, LOC101927501, MAOA, MAOB, NDP, EFHC2, FUNDC1, DUSP21, KDM6A, CXorf36, LINC01204, LOC392452, MIR221, MIR222, LOC401585, LINC01186, KRBOX4, ZNF674, ZNF674-AS1, CHST7, SLC9A7, RP2, LINC01545, JADE3, RGN, NDUFB11, RBM10, UBA1, INE1, CDK16, USP11, ZNF157, SNORA11C, ZNF41, LINC01560, ARAF, SYN1, TIMP1, MIR4769, CFP, ELK1, UXT, UXT-AS1, CXXC1P1, ZNF81, ZNF182, SPACA5, SPACA5B, ZNF630-AS1, ZNF630, SSX6, SSX5, SSX1, SSX9, SSX3, SSX4B, SSX4, SLC38A5, FTSJ1, PORCN, EBP, TBC1D25, RBM3, WDR13, WAS, SUV39H1, GLOD5, GATA1, HDAC6, ERAS, PCSKIN, TIMM17B, PQBP1, SLC35A2, PIM2, OTUD5, KCND1, GRIPAP1, TFE3, CCDC120, PRAF2, WDR45, GPKOW, MAGIX, PLP2, PRICKLE3, SYP, SYP-AS1, CACNA1F, CCDC22, FOXP3, PPP1R3F, GAGE10, GAGE12I, GAGE2E, GAGE13, GAGE8, GAGE2D, GAGE2A, GAGE2C, GAGE4, GAGE5, GAGE12I, GAGE7, GAGE2B, GAGE12F, GAGE12D, GAGE12E, GAGE12G, GAGE12H, GAGE12C, GAGE12B, GAGE6, GAGE1, PAGE1, PAGE4, USP27X-AS1, USP27X, CLCN5, MIR532, MIR188, MIR500A, MIR362, MIR501, MIR500B, MIR660, MIR502, AKAP4, CCNB3, DGKK, SHROOM4, BMP15, LINC01284, NUDT10, CXorf67, NUDT11, LINC01496, CENPV2, CENPV1, GSPT2, MAGED1, MAGED4, MAGED4B, SNORA11E, SNORA11D, MIR8088, XAGE2, XAGE1E, XAGE1B, SSX8, SSX7, SSX2, SSX2B, SPANXN5, XAGE5, XAGE3, FAM156A, FAM156B, GPR173, TSPYL2, KANTR, KDM5C, MIR6895, MIR6894, IQSEC2, SMC1A, MIR6857, RIBC1, HSD17B10, HUWE1, MIR98, MIRLET1F2, PHF8, FAM120C, WNK3, TSR2, FGD1, GNL3L, ITIH6, MAGED2, SNORA11, TRO, PFKFB1, APEX2, ALAS2, PAGE2B, PAGE2, FAM104B, MTRNR2L10, SNORA109, PAGES, PAGE3, LOC100421746, MIR4536-2, MIR4536-1, MAGEH1, USP51, FOXR2, RRAGB, KLF8, UBQLN2, LINC01420, UQCRBP1, SPIN3, SPIN2B, SPIN2A, FAAH2, ZXDB, ZXDB, NLRP2P, ZXDA

X	q11.1 - q28	93,148	GAIN	SPIN4, LINC01278, ARHGEF9, ARHGEF9-IT1, MIR1468, AMER1, ASB12, MTMR8, ZC4H2, ZC3H12B, LAS1L, FRMD8P1, MSN, MIR223, VSIG4, HEPH, EDA2R, AR, OPHN1, YIPF6, STARD8, EFNB1, PJA1, LINC00269, FAM155B, EDA, MIR676, AWAT2, OTUD6A, IGBP1, DGAT2L6, AWAT1, P2RY4, ARR3, RAB41, PDZD11, KIF4A, GPPD2, DLG3, DLG3-AS1, TEX11, SLC7A3, SNX12, FOXO4, CXorf65, IL2RG, MED12, NLGN3, BCYRN1, GJB1, ZMYM3, NONO, ITGB1BP2, TAF1, INGX, OCT, ACRC, CXCR3, LINC00891, LOC100132741, CXorf49B, CXorf49, NHL12, RPS20P11, RGA4, FLJ4463, PIN4, ERCCCL, RPS4X, CITED1, HDAC8, PHKA1, LOC101928259, LINC00684, LOC100132304, DMRTC1, DMRTC1B, FAM226A, FAM226B, PABPC1L2B-AS1, PABPC1L2B, PABPC1L2A, NAP1L6, NAP1L2, CDX4, MAP2K4P1, CHIC1, TSIX, XIST, JPX, FTX, MIR421, MIR374B, MIR374C, MIR545, MIR374A, ZCCHC13, SLC16A2, RLIM, KIAA2022, ABCB7, UPR1, ZHHHC15, TTC3P1, MAGEF2, PBDC1, MAGEE1, MIR325HG, MIR384, MIR325, FGF16, ATRX, MAGT1, COX7B, ATP7A, PGAM4, PGK1, TAF9B, CYSLTR1, ZCCHC5, LPAR4, MIR4328, P2RY10, GPR174, ITM2A, TBX22, CHMP1B2P, FAM46D, BRWD3, HMGNS, SH3BGR1, POU3F4, CYLC1, RPS6KA6, HDX, UBE2DNL, APOOL, SATL1, LOC101928128, ZNF711, POF1B, MIR1321, CHM, MIR361, DACH2, KLHL4, CPXCR1, TGIF2LX, PABPC5-AS1, PABPC5, PCDH11X, MIR4454, NAP1L3, FAM133A, BRDTP1, DIAPH2, RPA4, DIAPH2-AS1, XRCC6P5, PCDH19, TNMD, TSPAN6, SRPX2, SYTL4, CSTF2, NOX1, XKRX, ARL13A, TRMT2B, TMEM35, CENPI, DRP2, TAF7L, TIMM8A, BTK, RPL36A, RPL36A-HNRNPH2, GLA, HNRNPH2, ARMCX4, ARMCX1, ARMCX6, ARMCX3, ARMCX2, NXF5, ZMAT1, TCEAL2, TCEAL6, BEX5, TCP11X2, NXF2B, NXF2, TMSB15A, NXF4, ARMCX5, ARMCX5-GPRASP2, GPRASP1, GPRASP2, BHLHB9, LINC00630, RAB40AL, BEX1, NXF3, BEX4, TCEAL8, TCEAL5, BEX2, TCEAL7, TCEAL9, BEX3, RAB40A, LOC105373300, TCEAL4, TCEAL3, TCEAL1, MORF4L2, MORF4L2-AS1, GLRA4, TMEM31, PLP1, RAB9B, TMSB15B, H2BFXP, LOC100101478, H2BFWT, H2BFM, SLC25A53, ZCCHC18, LOC286437, FAM199X, ESX1, IL1RAPL2, TEX13A, NRK, SERPINA7, MUM1L1, CXorf57, RNF128, TBC1D8B, RIPPLY1, CLDN2, MORC4, RBM41, NUP62CL, PIH1D3, FRMPD3-AS1, FRMPD3, PRPS1, TSC2D3, MID2, LOC101928335, TEX13B, VSIG1, PSMD10, ATG4A, COL4A6, COL4A5, IRS4, LOC101928358, MIR6087, GUCY2F, NXT2, KCNE5, ACSL4, TMEM164, MIR652, MIR3978, AMMECR1, SNORD96B, RGAG1, TDGF1P3, CHRD1L1, PAK3, CAPN6, DCX, LINC00890, ALG13, TRPC5, TRPC5OS, ZCCHC16, LHFP1L, AMOT, MIR4329, LOC101928437, XACT, HTR2C, SNORA35, MIR764, MIR1912, MIR1264, MIR1298, MIR1911, MIR448, IL13RA2, LRCH2, RBMXL3, LUZP4, PLS3-AS1, PLS3, DANT2, AGTR2, SLC6A14, CTB3, KLHL13, WDR44, MIR1277, DOKK1, IL13RA1, ZCCHC12, LINC01285, LONRF3, KIAA1210, PGRMC1, LOC101928336, SLC25A43, SLC25A5-AS1, SLC25A5, CXorf56, UBE2A, NKRF, SEPT6, MIR766, SOWAHD, RPL39, SNORA69, LUPF3B, RNF113A, NDUFA1, AKAP14, NKAP, RHOXF1P1, RHOXF1-AS1, RHOXF2, RHOXF2B, RHOXF1, LINC01402, NKAPP1, ZBTB33, TMEM255A, ATP1B4, LAMP2, CUL4B, MCTS1, C1GALT1C1, CT47B1, CT47A3, CT47A12, CT47A1, CT47A11, CT47A8, CT47A4, CT47A5, CT47A9, CT47A2, CT47A10, CT47A6, CT47A7, GLUD2, MIR3672, GRIA3, THOC2, XIAP, LOC101928402, STAG2, SH2D1A, TENM1, TEX13C, LOC101928495, DCAF12L2, DCAF12L1, PRR32, ACTRT1, SMARCA1, OCRL, APLN, XPNPEP2, SASH3, ZDHHC9, UPT14A, BCORL1, ELF4, AIFM1, RAB33A, ZNF280C, SLC25A14, GPR119, RBMX2, FAM45BP, ENOX2, LINC01201, ARHGAP36, IGSF1, OR13H1, FIRRE, STK26, FRMD7, RAP2C, RAP2C-AS1, MBNL3, HS6ST2, HS6ST2-AS1, USP26, TFDP3, GPC4, GPC3, MIR363, MIR92A2, MIR19B2, MIR20B, MIR18B, MIR106A, CCDC160, PHF6, HPRT1, MIR450B, MIR450A1, MIR450A2, MIR542, MIR503HG, MIR503, MIR424, LINC00629, PLAC1, LINC0122B, FAM122C, MOSPD1, LOC340581, SMIM10, FAM127C, FAM127A, FAM127B, SMIM10L2B, LINC00633, LOC100287728, CT55, ZNF75D, ZNF449, LINC100506790, SMIM10L2A, DDX26B-AS1, INTS6L, CT45A1, CT45A7, CT45A9, CT45A4, CT45A2, CT45A5, CT45A8, CT45A6, CT45A3, CT45A10, SAGE1, MMGT1, SLC9A6, FHL1, MAP7D3, ADGRG4, BRS3, HTATSF1, VGLL1, MIR934, LINC00892, CD40LG, ARHGEF6, RBMX, SNORD61, GPR101, ZIC3, LINC00889, FGF13, MIR504, FGF13-AS1, SRD5A1P1, F9, MCF2, ATP11C, MIR505, CXorf66, LOC389895, SOX3, LINC00632, CDR1, MIR320D2, SPANXB1, RNU6-2, LDOC1, SPANXA2-OT1, SPANXA1, SPANXA2, LOC645188, SPANXD, SPANXC, MAGEC3, MAGEC1, MAGEC2, SPANXN4, SPANXN3, SLITRK4, SPANXN2, UBE2NL, SPANXN1, SLITRK2, TMEM257, MIR892C, MIR890, MIR888, MIR892A, MIR892B, MIR891B, MIR891A, CXorf51A, CXorf51B, MIR513C, MIR513B, MIR513A1, MIR513A2, MIR506, MIR507, MIR508, MIR514B, MIR509-1, MIR509-2, MIR509-3, MIR510, MIR514A1, MIR514A3, MIR514A2, FMR1-AS1, FMR1, FMR1NB, AFF2, IDS, LINC00893, CXorf40A, MAGEA9, MAGEA9B, HSFX2, HSFX1, TMEM185A, MAGEA11, LINC00850, MAGEA8-AS1, MAGEA8, CXorf40B, LINC00894, MIR2114, MAMLD1, MTM1, MTMR1, CD99L2, HMG3, MIR4330, GPR50, VMA21, PASD1, PRRG3, FATE1, CNGA2, MAGEA4, GABRE, MIR224, MIR452, MAGEA10-MAGEA5, MAGEA5, MAGEA10, GABRA3, MIR105-1, MIR767, MIR105-2, GABRQ, MAGEA6, CSA3, MAGEA2, MAGEA2B, CSA4, MAGEA12, CSA1, MAGEA3, CETN2, NSDHL, ZNF185, PNMA5, PNMA3, PNMA6A, MAGEA1, ZNF275, ZFP92, TREX2, HAUS7, BGN, ATP2B3, FAM58A, LOC105373383, DUSP9, PNCK, SLC6A8, BCAP31, ABCD1, PLXNB3, SRPK3, IDH3G, SSR4, PDZD4, LICAM, LCA10, AVPR2, ARHGAP4, NAA10, RENBP, HCFC1, HCFC1-AS1, TMEM187, MIR3202-1, MIR3202-2, IRAK1, MIR718, MECPP2, OPN1LW, OPN1MW2, OPN1MW, TEX28, TKTL1, FLNA, EMD, RPL10, SNORA70, DNASE1L1, TAZ, CH17-340M243, ATP6AP1, GD11, FAM50A, MIR6858, PLXNA3, LAGE3, UBLA4, SLC10A3, FAM3A, G6PD, IKBKG, FAM223B, FAM223A, CTAG1A, CTAG1B, CTAG2, GAB3, DKC1, SNORA36A, MIR664B, SNORA56, MPP1, SMIM9, F8, H2AFB2, H2AFB3, H2AFB1, F8A1, F8A2, F8A3, MIR1184-3, MIR1184-2, MIR1184-1, FUNDC2, CMC4, MTCP1, BRCC3, VBP1, RAB39B, CLIC2, LOC101927830, TMLHE-AS1, TMLHE, SPRY3
X	q21.1 - q21.33	13,545	GAIN	POU3F4, CYLC1, RPS6KA6, HDX, UBE2DNL, APOOL, SATL1, LOC101928128, ZNF711, POF1B, MIR1321, CHM, MIR361, DACH2, KLHL4, CPXCR1, TGIF2LX, PABPC5-AS1, PABPC5, PCDH11X, MIR4454, NAP1L3, FAM133A...
Y	p11.31 - p11.2	7,119	DEL	SRV, RPS4Y1, ZFY, LINC00278, TGIF2LY, PCDH11Y, TTTY23B, TTTY23, TSPY2, LINC00280, TTTY1, TTTY1B, TTTY2, TTTY2B, TTTY21, TTTY21B, TTTY7B, TTTY7, TTTY8B, TTTY8, AMELY, TBL1Y, PRKY, TTTY16, TTTY12, TTTY18, TTTY19, TTTY11, RBMY1A3P, TTTY20, FAM197Y2P, FAM197Y5P, TSPY4, TSPY8, TSPY3, TSPY10, TSPY1, RBMY3AP, TTTY22...
Y	q11.21 - q12	45,327	DEL	GYG2P1, TTTY15, USP9Y, DDX3Y, UTY, TMSB4Y, VCY, VCY1B, NLGN4Y, NLGN4Y-AS1, FAM41AY1, FAM41AY2, FAM224B, FAM224A, XKRY2, XKRY, CDY2B, CDY2A, HSFY2, HSFY1, TTTY9B, TTTY9A, TTTY14, CD24, BCORP1, TXLNGY, KDM5D, TTTY10, EIF1AY, RPS4Y2, PRORY, RBMY2EP, RBMY1B, RBMY1A1, RBMY1E, RBMY1D, TTTY13, PRY2, PRY, LOC101929148, TTTY6, TTTY6B, RBMY1J, RBMY1F, TTTY5, RBMY2FP, LOC100652931, TTTY17B, TTTY17A, TTTY17C, TTTY4C, TTTY4B, TTTY4, BPY2B, BPY2, BPY2C, DAZ4, DAZ1, DAZ3, DAZ2, TTTY3B, TTTY3, CDY1, CDY1B, CSPG4P1Y, GOLGA2P2Y, GOLGA2P3Y...

APÊNDICE 3 – Vias gênicas influenciadas pelas amplificações ocorridas na linhagem AHOL.

Vias Gênicas	p-value
Degradação da putrescina III	0.0195
Degradação da melatonina II	0.0463
Degradação de leucina	0.0463
Biossíntese de D-mio-inositol (3,4,5,6) -tetraquisfosfato	0.0904
Degradação de anandamida	0.0904
IL9	0.1039
Degradação de dopamina	0.1325
Degradação de glicerol	0.1325
Biossíntese de D-mio-inositol (1,4,5,6) -tetraquisfosfato	0.1325
Biossíntese de Hexaquisfosfato 1D-mio-inositol V (de Ins (1,3,4) P3)	0.1325
Hidrólise de acil-CoA	0.1325
Beta-oxidação dos ácidos graxos	0.1349
Biossíntese de D-mio-inositol (1,3,4) -trifosfato	0.1511
Biossíntese de hexaquisfosfato de 1D-mio-inositol II (mamífero)	0.1511
Desfosforilação de UTP e CTP I	0.1727
Alfa-oxidação de ácidos graxos III	0.1727
IL5	0.1950
Metabolismo de D-mio-inositol (1,4,5) -trifosfato	0.2016
IL6	0.2097
Biossíntese de fosfatidilcolina	0.2110
Degradação de espermina e espermidina I	0.2110
Degradação da serotonina	0.2475
Biossíntese de zimosterol	0.2475
Glicosilação alfa-distroglicana	0.2823
Gliconeogênese	0.2823
Biossíntese de pirofosfatos de inositol	0.2823
Degradação de noradrenalina e adrenalina	0.2823
EGFR1	0.2987
IL1	0.3058
Biossíntese de sulfato de condroitina (estágios tardios)	0.3155
Ativação de ácidos graxos	0.3155
IL4	0.3461
Biossíntese UTP e CTP de novo	0.3472
Glicólise	0.3774
Biossíntese de plasmalogênio	0.4062
Conversão de glicose para acetil CoA e entrada no ciclo TCA	0.4062
Degradação de D-mio-inositol (1,4,5) -trifosfato	0.4062
Biossíntese de ribonucleotídeos de pirimidina (de novo)	0.4062
Beta-oxidação de ácidos graxos (peroxissoma)	0.4337
Biossíntese de estearato	0.4599
Biossíntese de desoxirribonucleotídeos de pirimidina (de novo)	0.4599
Biossíntese de icosapentaenoato II (metazoa)	0.4599
Degradação triacilglicerol	0.4599

Biossíntese de gama-linolenato	0.4849
IL-7	0.5315
Biossíntese de araquidonatos III (metazoa)	0.5315
Biossíntese de dolíclil-difosfoligosacarídeo	0.5739
BCR	0.6052
Degradação do 3-fosfoinositídeo	0.6124
IL3	0.6440
Alpha6Beta4Integrina	0.7003
identidade	0.7348
IL2	0.7473
Compostos de fosfato de inositol	0.7878
KitReceptor	0.8023
Receptor de andrógeno	0.8159
TCR	0.8307
NOTCH	0.8519
TNF alfa / NF-kB	0.8713
TGFBR	0.9504

APÊNDICE 4 – Análise de enriquecimento funcional do GO dos genes com a expressão aumentada da linhagem *AHOL1*. Foram considerados significantes, termos enriquecidos com $p < 0.05$

GO ACCESSION	GO Term	p-value	Count in Selection
GO:0005886 GO:0005904	plasma membrane	1.16E-04	101
GO:0071805 GO:0010163	potassium ion transmembrane transport	1.31E-04	10
GO:0071804	cellular potassium ion transport	1.31E-04	10
GO:0071944	cell periphery	1.53E-04	102
GO:0006813 GO:0015458	potassium ion transport	2.02E-04	10
GO:0021633	optic nerve structural organization	2.49E-04	2
GO:0015079 GO:0015388 GO:0022817	potassium ion transmembrane transporter activity	5.85E-04	9
GO:0005850	eukaryotic translation initiation factor 2 complex	7.39E-04	2
GO:0098632	cell-cell adhesion mediator activity	7.39E-04	2
GO:0086080	protein binding involved in heterotypic cell-cell adhesion	7.39E-04	2
GO:1903115	regulation of actin filament-based movement	9.93E-04	3
GO:0007267	cell-cell signaling	0.001045	30
GO:0001704	formation of primary germ layer	0.001316	7
GO:0051891	positive regulation of cardioblast differentiation	0.001462	2
GO:0098631	cell adhesion mediator activity	0.001462	2
GO:0060045	positive regulation of cardiac muscle cell proliferation	0.001543	3
GO:0023052 GO:0023046 GO:0044700	signaling	0.001853	100
GO:0050877	nervous system process	0.002158	31
GO:0045668	negative regulation of osteoblast differentiation	0.002174	4
GO:0055023	positive regulation of cardiac muscle tissue growth	0.002253	3
GO:0031013	troponin I binding	0.002412	2
GO:0035637	multicellular organismal signaling	0.003033	6
GO:0007154	cell communication	0.00323	100
GO:0030858	positive regulation of epithelial cell differentiation	0.00325	4
GO:0021631	optic nerve morphogenesis	0.00358	2
GO:0032754	positive regulation of interleukin-5 production	0.00358	2
GO:0051890	regulation of cardioblast differentiation	0.00358	2
GO:0045822	negative regulation of heart contraction	0.003648	3
GO:0055025	positive regulation of cardiac muscle tissue development	0.003648	3
GO:0007155 GO:0098602	cell adhesion	0.004199	23
GO:0060421	positive regulation of heart growth	0.004206	3
GO:0034113	heterotypic cell-cell adhesion	0.004206	3
GO:0022610	biological adhesion	0.004525	23
GO:0060043	regulation of cardiac muscle cell proliferation	0.004814	3
GO:0004908	interleukin-1 receptor activity	0.004959	2
GO:0045162	clustering of voltage-gated sodium channels	0.004959	2
GO:0031295	T cell costimulation	0.004987	5
GO:0044459	plasma membrane part	0.005182	51
GO:0031294	lymphocyte costimulation	0.005297	5
GO:1902495	transmembrane transporter complex	0.006133	11

GO:0030552	cAMP binding	0.006182	3
GO:0004114	3',5'-cyclic-nucleotide phosphodiesterase activity	0.006182	3
GO:1903523	negative regulation of blood circulation	0.006182	3
GO:0007614	short-term memory	0.006544	2
GO:0019227	neuronal action potential propagation	0.006544	2
GO:0060484	lung-associated mesenchyme development	0.006544	2
GO:0005861	troponin complex	0.006544	2
GO:0098870	action potential propagation	0.006544	2
GO:0046661	male sex differentiation	0.006903	7
GO:0004112	cyclic-nucleotide phosphodiesterase activity	0.006944	3
GO:1990351	transporter complex	0.006949	11
GO:0015812	gamma-aminobutyric acid transport	0.008326	2
GO:0098797	plasma membrane protein complex	0.008356	15
GO:0044304	main axon	0.008522	4
GO:0019226	transmission of nerve impulse	0.00912	4
GO:0046546	development of primary male sexual characteristics	0.009509	6
GO:0008037	cell recognition	0.009509	6
GO:0008584	male gonad development	0.009509	6
GO:0055021	regulation of cardiac muscle tissue growth	0.009552	3
GO:0003008	system process	0.009904	38
GO:0050852	T cell receptor signaling pathway	0.010145	5
GO:0007369	gastrulation	0.010254	7
GO:0070410	co-SMAD binding	0.010299	2
GO:0086004	regulation of cardiac muscle cell contraction	0.010299	2
GO:1905209	positive regulation of cardiocyte differentiation	0.010299	2
GO:0005391	sodium:potassium-exchanging ATPase activity	0.010299	2
GO:0043194	axon initial segment	0.010299	2
GO:0043491	protein kinase B signaling	0.010532	3
GO:0060485	mesenchyme development	0.012115	7
GO:0048646	anatomical structure formation involved in morphogenesis	0.012165	21
GO:2000738	positive regulation of stem cell differentiation	0.012458	2
GO:0005890	sodium:potassium-exchanging ATPase complex	0.012458	2
GO:0033270	paranode region of axon	0.012458	2
GO:0021604	cranial nerve structural organization	0.012458	2
GO:0021554	optic nerve development	0.012458	2
GO:0008556 GO:0015618	potassium-transporting ATPase activity	0.012458	2
GO:0004115	3',5'-cyclic-AMP phosphodiesterase activity	0.012458	2
GO:0034703	cation channel complex	0.012531	8
GO:0005576	extracellular region	0.012636	85
GO:0015662	ATPase activity, coupled to transmembrane movement of ions, phosphorylative mechanism	0.01266	3
GO:0002067	glandular epithelial cell differentiation	0.01266	3
GO:0046622	positive regulation of organ growth	0.01266	3
GO:0030856	regulation of epithelial cell differentiation	0.013445	5
GO:0005267	potassium channel activity	0.013487	6
GO:0120038	plasma membrane bounded cell projection part	0.013651	24
GO:0044463	cell projection part	0.013651	24

GO:0048566	embryonic digestive tract development	0.013809	3
GO:0034704	calcium channel complex	0.014076	4
GO:0001707	mesoderm formation	0.014076	4
GO:0007613	memory	0.014689	5
GO:0010092	specification of animal organ identity	0.014795	2
GO:0036066	protein O-linked fucosylation	0.014795	2
GO:0003016 GO:0010802	respiratory system process	0.014795	2
GO:0045161	neuronal ion channel clustering	0.014795	2
GO:0033391	chromatoid body	0.014795	2
GO:0030279	negative regulation of ossification	0.015751	4
GO:0046332	SMAD binding	0.015751	4
GO:2000119	negative regulation of sodium-dependent phosphate transport	0.015803	1
GO:0060464	lung lobe formation	0.015803	1
GO:0045720	negative regulation of integrin biosynthetic process	0.015803	1
GO:0003322	pancreatic A cell development	0.015803	1
GO:0060473	cortical granule	0.015803	1
GO:0060980	cell migration involved in coronary vasculogenesis	0.015803	1
GO:0001621	ADP receptor activity	0.015803	1
GO:0046361	2-oxobutyrate metabolic process	0.015803	1
GO:0046360	2-oxobutyrate biosynthetic process	0.015803	1
GO:0006683	galactosylceramide catabolic process	0.015803	1
GO:0060400	negative regulation of growth hormone receptor signaling pathway	0.015803	1
GO:0060979	vasculogenesis involved in coronary vascular morphogenesis	0.015803	1
GO:0061181	regulation of chondrocyte development	0.015803	1
GO:0061360	optic chiasma development	0.015803	1
GO:0031257	cell trailing edge membrane	0.015803	1
GO:0031259	uropod membrane	0.015803	1
GO:0004336	galactosylceramidase activity	0.015803	1
GO:0004339	glucan 1,4-alpha-glucosidase activity	0.015803	1
GO:0038172	interleukin-33-mediated signaling pathway	0.015803	1
GO:0071691	cardiac muscle thin filament assembly	0.015803	1
GO:0090527	actin filament reorganization	0.015803	1
GO:0097309	cap1 mRNA methylation	0.015803	1
GO:0030037	actin filament reorganization involved in cell cycle	0.015803	1
GO:0031723	CXCR4 chemokine receptor binding	0.015803	1
GO:0035037	sperm entry	0.015803	1
GO:0070002	glutamic-type peptidase activity	0.015803	1
GO:0004753	saccharopine dehydrogenase activity	0.015803	1
GO:0021919	BMP signaling pathway involved in spinal cord dorsal/ventral patterning	0.015803	1
GO:0005983	starch catabolic process	0.015803	1
GO:0021918	regulation of transcription from RNA polymerase II promoter involved in somatic motor neuron fate commitment	0.015803	1
GO:0021917	somatic motor neuron fate commitment	0.015803	1
GO:0021905	forebrain-midbrain boundary formation	0.015803	1
GO:0005982	starch metabolic process	0.015803	1

GO:0033925	mannosyl-glycoprotein endo-beta-N-acetylglucosaminidase activity	0.015803	1
GO:0071225	cellular response to muramyl dipeptide	0.015803	1
GO:0005914	spot adherens junction	0.015803	1
GO:0046980	tapasin binding	0.015803	1
GO:0070287	ferritin receptor activity	0.015803	1
GO:0002114	interleukin-33 receptor activity	0.015803	1
GO:0047130 GO:0010010	saccharopine dehydrogenase (NADP+, L-lysine-forming) activity	0.015803	1
GO:0047131	saccharopine dehydrogenase (NAD+, L-glutamate-forming) activity	0.015803	1
GO:0002113	interleukin-33 binding	0.015803	1
GO:0019516	lactate oxidation	0.015803	1
GO:0032972	regulation of muscle filament sliding speed	0.015803	1
GO:0060420	regulation of heart growth	0.016281	3
GO:0008527	taste receptor activity	0.016281	3
GO:0046058	cAMP metabolic process	0.016281	3
GO:0007548	sex differentiation	0.016615	9
GO:0060413 GO:0003287	atrial septum morphogenesis	0.017304	2
GO:0021520	spinal cord motor neuron cell fate specification	0.017304	2
GO:0010248	establishment or maintenance of transmembrane electrochemical gradient	0.017304	2
GO:0090533	cation-transporting ATPase complex	0.017304	2
GO:0017017	MAP kinase tyrosine/serine/threonine phosphatase activity	0.017304	2
GO:0048934	peripheral nervous system neuron differentiation	0.017304	2
GO:0048935	peripheral nervous system neuron development	0.017304	2
GO:0005523	tropomyosin binding	0.017304	2
GO:0048332	mesoderm morphogenesis	0.017547	4
GO:0055024	regulation of cardiac muscle tissue development	0.017603	3
GO:0050433	regulation of catecholamine secretion	0.017603	3
GO:0050808	synapse organization	0.017892	6
GO:0006493	protein O-linked glycosylation	0.018129	5
GO:0030324	lung development	0.019154	7
GO:0042101	T cell receptor complex	0.01998	2
GO:0033549	MAP kinase phosphatase activity	0.01998	2
GO:0032674	regulation of interleukin-5 production	0.01998	2
GO:0003181	atrioventricular valve morphogenesis	0.01998	2
GO:1901863	positive regulation of muscle tissue development	0.020423	3
GO:0030551	cyclic nucleotide binding	0.020423	3
GO:0045844	positive regulation of striated muscle tissue development	0.020423	3
GO:0048636	positive regulation of muscle organ development	0.020423	3
GO:0005891	voltage-gated calcium channel complex	0.021921	3
GO:0030323	respiratory tube development	0.02203	7
GO:0060008	Sertoli cell differentiation	0.022817	2
GO:0085029	extracellular matrix assembly	0.022817	2
GO:0006198	cAMP catabolic process	0.022817	2
GO:0030282	bone mineralization	0.023476	3
GO:0050851	antigen receptor-mediated signaling pathway	0.024669	5

GO:0004177	aminopeptidase activity	0.025091	3
GO:0050962	detection of light stimulus involved in sensory perception	0.025808	2
GO:0050908	detection of light stimulus involved in visual perception	0.025808	2
GO:0017160 GO:0034989	Ral GTPase binding	0.025808	2
GO:0008237	metallopeptidase activity	0.025861	7
GO:0034702	ion channel complex	0.026527	9
GO:0008201	heparin binding	0.026995	6
GO:0030510	regulation of BMP signaling pathway	0.027173	4
GO:0007338	single fertilization	0.027466	5
GO:0008406	gonad development	0.027938	7
GO:0000982	transcription factor activity, RNA polymerase II proximal promoter sequence-specific DNA binding	0.028225	9
GO:0001709	cell fate determination	0.028494	3
GO:0007600	sensory perception	0.028731	21
GO:1904893	negative regulation of STAT cascade	0.028949	2
GO:0061377	mammary gland lobule development	0.028949	2
GO:0009214	cyclic nucleotide catabolic process	0.028949	2
GO:0003283	atrial septum development	0.028949	2
GO:0003171	atrioventricular valve development	0.028949	2
GO:0010738	regulation of protein kinase A signaling	0.028949	2
GO:0009950	dorsal/ventral axis specification	0.028949	2
GO:0060749	mammary gland alveolus development	0.028949	2
GO:0015269	calcium-activated potassium channel activity	0.028949	2
GO:0060575	intestinal epithelial cell differentiation	0.028949	2
GO:0046426 GO:2000365	negative regulation of JAK-STAT cascade	0.028949	2
GO:0046873	metal ion transmembrane transporter activity	0.029417	12
GO:0001077	transcriptional activator activity, RNA polymerase II proximal promoter sequence-specific DNA binding	0.030125	7
GO:0032588	trans-Golgi network membrane	0.030283	3
GO:0009584	detection of visible light	0.030457	5
GO:0051015	actin filament binding	0.030457	5
GO:0030030	cell projection organization	0.030562	23
GO:0070011	peptidase activity, acting on L-amino acid peptides	0.03106	15
GO:0042623	ATPase activity, coupled	0.031222	9
GO:0001641	group II metabotropic glutamate receptor activity	0.031358	1
GO:0003218	cardiac left ventricle formation	0.031358	1
GO:0034667	integrin alpha3-beta1 complex	0.031358	1
GO:0036451	cap mRNA methylation	0.031358	1
GO:0050992	dimethylallyl diphosphate biosynthetic process	0.031358	1
GO:0004909 GO:0019967	interleukin-1, Type I, activating receptor activity	0.031358	1
GO:0014718	positive regulation of satellite cell activation involved in skeletal muscle regeneration	0.031358	1
GO:0002485	antigen processing and presentation of endogenous peptide antigen via MHC class I via ER pathway, TAP-dependent	0.031358	1
GO:0002488	antigen processing and presentation of endogenous peptide antigen via MHC class Ib via ER pathway	0.031358	1
GO:0002489	antigen processing and presentation of endogenous peptide antigen via MHC class Ib via ER pathway, TAP-dependent	0.031358	1
GO:0019244	lactate biosynthetic process from pyruvate	0.031358	1

GO:0046967	cytosol to ER transport	0.031358	1
GO:0032423	regulation of mismatch repair	0.031358	1
GO:0039003	pronephric field specification	0.031358	1
GO:0039017	pattern specification involved in pronephros development	0.031358	1
GO:0002591	positive regulation of antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class I	0.031358	1
GO:0048627	myoblast development	0.031358	1
GO:0060764	cell-cell signaling involved in mammary gland development	0.031358	1
GO:0007439	ectodermal digestive tract development	0.031358	1
GO:0009088	threonine biosynthetic process	0.031358	1
GO:0035544	negative regulation of SNARE complex assembly	0.031358	1
GO:0070602	regulation of centromeric sister chromatid cohesion	0.031358	1
GO:0015433	peptide antigen-transporting ATPase activity	0.031358	1
GO:0035566	regulation of metanephros size	0.031358	1
GO:0004419	hydroxymethylglutaryl-CoA lyase activity	0.031358	1
GO:0002086	diaphragm contraction	0.031358	1
GO:0004447	iodide peroxidase activity	0.031358	1
GO:0070905	serine binding	0.031358	1
GO:0045726	positive regulation of integrin biosynthetic process	0.031358	1
GO:0004452	isopentenyl-diphosphate delta-isomerase activity	0.031358	1
GO:0006478	peptidyl-tyrosine sulfation	0.031358	1
GO:0004483	mRNA (nucleoside-2'-O-)-methyltransferase activity	0.031358	1
GO:0002176	male germ cell proliferation	0.031358	1
GO:0031523	Myb complex	0.031358	1
GO:0008476	protein-tyrosine sulfotransferase activity	0.031358	1
GO:0033040	sour taste receptor activity	0.031358	1
GO:0030899	calcium-dependent ATPase activity	0.031358	1
GO:0060598	dichotomous subdivision of terminal units involved in mammary gland duct morphogenesis	0.031358	1
GO:0034988	Fc-gamma receptor I complex binding	0.031358	1
GO:0036093	germ cell proliferation	0.031358	1
GO:0016598 GO:0019130	protein arginylation	0.031358	1
GO:0001581	detection of chemical stimulus involved in sensory perception of sour taste	0.031358	1
GO:0021650	vestibulocochlear nerve formation	0.031358	1
GO:0004795	threonine synthase activity	0.031358	1
GO:0050993	dimethylallyl diphosphate metabolic process	0.031358	1
GO:0016160	amylase activity	0.031358	1
GO:0003290	atrial septum secundum morphogenesis	0.031358	1
GO:0019376	galactolipid catabolic process	0.031358	1
GO:0060435	bronchiole development	0.031358	1
GO:0072004	kidney field specification	0.031358	1
GO:0060750	epithelial cell proliferation involved in mammary gland duct elongation	0.031358	1
GO:0060751	branch elongation involved in mammary gland duct branching	0.031358	1
GO:0048611	embryonic ectodermal digestive tract development	0.031358	1
GO:0045137	development of primary sexual characteristics	0.031646	7
GO:0098590	plasma membrane region	0.032028	21

GO:0031290	retinal ganglion cell axon guidance	0.032233	2
GO:0048532	anatomical structure arrangement	0.032233	2
GO:0070207	protein homotrimerization	0.032233	2
GO:1905207	regulation of cardiocyte differentiation	0.032233	2
GO:0008076	voltage-gated potassium channel complex	0.032289	4
GO:0006357 GO:0006358 GO:0010551	regulation of transcription by RNA polymerase II	0.03235	35
GO:0071695	anatomical structure maturation	0.032561	5
GO:0005539	glycosaminoglycan binding	0.033217	7
GO:0030509	BMP signaling pathway	0.03365	4
GO:0003229	ventricular cardiac muscle tissue development	0.034034	3
GO:0007268	chemical synaptic transmission	0.034037	14
GO:0099536	synaptic signaling	0.034037	14
GO:0098916	anterograde trans-synaptic signaling	0.034037	14
GO:0099537	trans-synaptic signaling	0.034037	14
GO:0000132 GO:0030607 GO:0030609	establishment of mitotic spindle orientation	0.035656	2
GO:2000108	positive regulation of leukocyte apoptotic process	0.035656	2
GO:0014059	regulation of dopamine secretion	0.035656	2
GO:2000736	regulation of stem cell differentiation	0.035656	2
GO:0080154	regulation of fertilization	0.035656	2
GO:0010762	regulation of fibroblast migration	0.035656	2
GO:0050912	detection of chemical stimulus involved in sensory perception of taste	0.035996	3
GO:0003006	developmental process involved in reproduction	0.036424	15
GO:1901861	regulation of muscle tissue development	0.036471	4
GO:0016202	regulation of striated muscle tissue development	0.036471	4
GO:0031175	neuron projection development	0.036556	17
GO:0090263 GO:0035413	positive regulation of canonical Wnt signaling pathway	0.037034	5
GO:0048634	regulation of muscle organ development	0.037931	4
GO:0071322	cellular response to carbohydrate stimulus	0.038014	3
GO:0007601	visual perception	0.03824	7
GO:0060541	respiratory system development	0.03824	7
GO:0045944 GO:0010552 GO:0045817	positive regulation of transcription by RNA polymerase II	0.038668	21
GO:0048468	cell development	0.039044	31
GO:0030506	ankyrin binding	0.039213	2
GO:0008233	peptidase activity	0.039848	15
GO:0035036	sperm-egg recognition	0.04009	3
GO:0031253	cell projection membrane	0.040558	8
GO:0007015	actin filament organization	0.040796	6
GO:0010927	cellular component assembly involved in morphogenesis	0.040951	4
GO:0061458	reproductive system development	0.04105	11
GO:0048608	reproductive structure development	0.04105	11
GO:0050953	sensory perception of light stimulus	0.041852	7
GO:0048666	neuron development	0.041872	19
GO:0004879	nuclear receptor activity	0.042221	3
GO:0003743 GO:0003744 GO:0003745	translation initiation factor activity	0.042221	3
GO:0098531	transcription factor activity, direct ligand regulated sequence-specific DNA binding	0.042221	3

GO:0002065	columnar/cuboidal epithelial cell differentiation	0.042511	4
GO:0040001 GO:0018986 GO:0030605 GO:0030606 GO:0030608 GO:0030610	establishment of mitotic spindle localization	0.042898	2
GO:0098533	ATPase dependent transmembrane transport complex	0.042898	2
GO:0042287	MHC protein binding	0.042898	2
GO:0001228	transcriptional activator activity, RNA polymerase II transcription regulatory region sequence-specific DNA binding	0.04391	8
GO:0032501 GO:0044707 GO:0050874	multicellular organismal process	0.045224	109
GO:0090092	regulation of transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway	0.045679	7
GO:0034705	potassium channel complex	0.04573	4
GO:0071773	cellular response to BMP stimulus	0.04573	4
GO:0071772	response to BMP	0.04573	4
GO:0098662	inorganic cation transmembrane transport	0.046222	14
GO:0019829	cation-transporting ATPase activity	0.046652	3
GO:0022853	active ion transmembrane transporter activity	0.046652	3
GO:0042625	ATPase coupled ion transmembrane transporter activity	0.046652	3
GO:0000235	astral microtubule	0.046667	1
GO:0017159	pantetheine hydrolase activity	0.046667	1
GO:0060574	intestinal epithelial cell maturation	0.046667	1
GO:0045226	extracellular polysaccharide biosynthetic process	0.046667	1
GO:0023029	MHC class Ib protein binding	0.046667	1
GO:0009756	carbohydrate mediated signaling	0.046667	1
GO:0034141	positive regulation of toll-like receptor 3 signaling pathway	0.046667	1
GO:0071464	cellular response to hydrostatic pressure	0.046667	1
GO:0016909	SAP kinase activity	0.046667	1
GO:0033512	L-lysine catabolic process to acetyl-CoA via saccharopine	0.046667	1
GO:0003011	involuntary skeletal muscle contraction	0.046667	1
GO:0030172	troponin C binding	0.046667	1
GO:0002589	regulation of antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class I	0.046667	1
GO:0000023	maltose metabolic process	0.046667	1
GO:0004999	vasoactive intestinal polypeptide receptor activity	0.046667	1
GO:0051525 GO:0051526 GO:0051527 GO:0051528 GO:0051529 GO:0051530	NFAT protein binding	0.046667	1
GO:0032450	maltose alpha-glucosidase activity	0.046667	1
GO:0045113	regulation of integrin biosynthetic process	0.046667	1
GO:0046968	peptide antigen transport	0.046667	1
GO:0004966	galanin receptor activity	0.046667	1
GO:0045918	negative regulation of cytolysis	0.046667	1
GO:0002481	antigen processing and presentation of exogenous protein antigen via MHC class Ib, TAP-dependent	0.046667	1
GO:0016035	zeta DNA polymerase complex	0.046667	1
GO:0021912	regulation of transcription from RNA polymerase II promoter involved in spinal cord motor neuron fate specification	0.046667	1
GO:0002477	antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen via MHC class Ib	0.046667	1
GO:0004882	androgen receptor activity	0.046667	1
GO:0002476	antigen processing and presentation of endogenous peptide antigen via MHC class Ib	0.046667	1

GO:0042695	thelarche	0.046667	1
GO:0072003	kidney rudiment formation	0.046667	1
GO:0060744	mammary gland branching involved in thelarche	0.046667	1
GO:0051373 GO:0051374 GO:0051375 GO:0051376	FATZ binding	0.046667	1
GO:0003285	septum secundum development	0.046667	1
GO:0005818	aster	0.046667	1
GO:0042825	TAP complex	0.046667	1
GO:0002317	plasma cell differentiation	0.046667	1
GO:0004705	JUN kinase activity	0.046667	1
GO:0070996	type 1 melanocortin receptor binding	0.046667	1
GO:0021648	vestibulocochlear nerve morphogenesis	0.046667	1
GO:0008321 GO:0016220	Ral guanyl-nucleotide exchange factor activity	0.046667	1
GO:0047045	testosterone 17-beta-dehydrogenase (NADP+) activity	0.046667	1
GO:2000118	regulation of sodium-dependent phosphate transport	0.046667	1
GO:0060535	trachea cartilage morphogenesis	0.046667	1
GO:0035054	embryonic heart tube anterior/posterior pattern specification	0.046667	1
GO:0080019	fatty-acyl-CoA reductase (alcohol-forming) activity	0.046667	1
GO:0060468	prevention of polyspermy	0.046667	1
GO:0070318	positive regulation of G0 to G1 transition	0.046667	1
GO:0047374	methyumbelliferyl-acetate deacetylase activity	0.046667	1
GO:0021593	rhombomere morphogenesis	0.046667	1
GO:0046379	extracellular polysaccharide metabolic process	0.046667	1
GO:0032971	regulation of muscle filament sliding	0.046667	1
GO:0046005	positive regulation of circadian sleep/wake cycle, REM sleep	0.046667	1
GO:0014717	regulation of satellite cell activation involved in skeletal muscle regeneration	0.046667	1
GO:0060480	lung goblet cell differentiation	0.046667	1
GO:0035441	cell migration involved in vasculogenesis	0.046667	1
GO:0060481	lobar bronchus epithelium development	0.046667	1
GO:0005594	collagen type IX trimer	0.046667	1
GO:0021524	visceral motor neuron differentiation	0.046667	1
GO:0051294	establishment of spindle orientation	0.046706	2
GO:0023019	signal transduction involved in regulation of gene expression	0.046706	2
GO:0005865	striated muscle thin filament	0.046706	2
GO:0043403	skeletal muscle tissue regeneration	0.046706	2
GO:0021602	cranial nerve morphogenesis	0.046706	2
GO:0005249	voltage-gated potassium channel activity	0.047389	4
GO:0009583	detection of light stimulus	0.048422	5
GO:0031256	leading edge membrane	0.048422	5
GO:0035295	tube development	0.048476	19
GO:0001706	endoderm formation	0.04895	3
GO:0051213	dioxygenase activity	0.049081	4
GO:0051591	response to cAMP	0.049081	4
GO:1901681	sulfur compound binding	0.049724	7
GO:0015077	monovalent inorganic cation transmembrane transporter activity	0.049755	10

GO:0048812	neuron projection morphogenesis	0.049849	14
------------	---------------------------------	----------	----

APÊNDICE 5 – Análise de enriquecimento funcional do GO dos genes com a expressão diminuída da linhagem *AHOL1*. Foram considerados significantes, termos enriquecidos com $p < 0.05$.

GO ACCESSION	GO Term	p-value	Count in Selection
GO:0086069	bundle of His cell to Purkinje myocyte communication	1.05E-06	5
GO:0086005	ventricular cardiac muscle cell action potential	1.14E-05	6
GO:0055025	positive regulation of cardiac muscle tissue development	1.59E-05	6
GO:1901863	positive regulation of muscle tissue development	8.04E-05	7
GO:0048636	positive regulation of muscle organ development	8.04E-05	7
GO:0045844	positive regulation of striated muscle tissue development	8.04E-05	7
GO:0055023	positive regulation of cardiac muscle tissue growth	9.35E-05	5
GO:0030160	GKAP/Homer scaffold activity	9.51E-05	3
GO:0086002	cardiac muscle cell action potential involved in contraction	1.02E-04	6
GO:0005509	calcium ion binding	1.06E-04	36
GO:0086003	cardiac muscle cell contraction	1.56E-04	6
GO:0030534	adult behavior	1.67E-04	13
GO:0086065	cell communication involved in cardiac conduction	1.90E-04	6
GO:0098609 GO:0016337	cell-cell adhesion	2.78E-04	24
GO:0060421	positive regulation of heart growth	2.79E-04	5
GO:0007155 GO:0098602	cell adhesion	3.03E-04	41
GO:0050795	regulation of behavior	3.34E-04	7
GO:0022610	biological adhesion	3.44E-04	41
GO:0014704	intercalated disc	3.83E-04	7
GO:0086001	cardiac muscle cell action potential	3.91E-04	6
GO:0071625	vocalization behavior	4.07E-04	4
GO:0086091	regulation of heart rate by cardiac conduction	4.40E-04	5
GO:0048513	animal organ development	4.58E-04	104
GO:0055024	regulation of cardiac muscle tissue development	4.60E-04	6
GO:0007610 GO:0044708	behavior	4.75E-04	28
GO:0007416	synapse assembly	4.97E-04	7

GO:1901342	regulation of vasculature development	5.26E-04	15
GO:0007156	homophilic cell adhesion via plasma membrane adhesion molecules	5.35E-04	12
GO:0032501 GO:0044707 GO:0050874	multicellular organismal process	5.70E-04	210
GO:0030902	hindbrain development	5.72E-04	12
GO:0048706	embryonic skeletal system development	6.45E-04	11
GO:0051385	response to mineralocorticoid	6.63E-04	5
GO:0051781	positive regulation of cell division	6.91E-04	8
GO:0042742 GO:0042830	defense response to bacterium	7.10E-04	14
GO:0005576	extracellular region	7.39E-04	157
GO:0060045	positive regulation of cardiac muscle cell proliferation	7.42E-04	4
GO:0097117	guanylate kinase-associated protein clustering	8.41E-04	2
GO:0021658	rhombomere 3 morphogenesis	8.41E-04	2
GO:0050756	fractalkine metabolic process	8.41E-04	2
GO:0031960	response to corticosteroid	9.12E-04	11
GO:0098742	cell-cell adhesion via plasma-membrane adhesion molecules	9.32E-04	14
GO:0009653	anatomical structure morphogenesis	9.52E-04	80
GO:0016339	calcium-dependent cell-cell adhesion via plasma membrane cell adhesion molecules	9.60E-04	5
GO:0007275	multicellular organism development	9.74E-04	154
GO:0048731	system development	9.95E-04	136
GO:0009617 GO:0009618 GO:0009680	response to bacterium	0.001015	24
GO:0048704	embryonic skeletal system morphogenesis	0.001018	9
GO:0007059	chromosome segregation	0.00103	15
GO:0030326	embryonic limb morphogenesis	0.001042	11
GO:0035113	embryonic appendage morphogenesis	0.001042	11
GO:0070279	vitamin B6 binding	0.001127	7
GO:0030170	pyridoxal phosphate binding	0.001127	7
GO:0055021	regulation of cardiac muscle tissue growth	0.001141	5
GO:0022414 GO:0044702	reproductive process	0.001189	53
GO:0000003 GO:0019952 GO:0050876	reproduction	0.001189	53
GO:0051378	serotonin binding	0.00122	3
GO:0002934	desmosome organization	0.00122	3
GO:0031690	adrenergic receptor binding	0.001235	4

GO:0044291	cell-cell contact zone	0.001254	7
GO:0061337	cardiac conduction	0.001421	6
GO:0051216	cartilage development	0.001444	12
GO:0071709	membrane assembly	0.001551	4
GO:0001501	skeletal system development	0.001603	25
GO:0002062	chondrocyte differentiation	0.0017	7
GO:0021546	rhombomere development	0.001791	3
GO:0043176	amine binding	0.001791	3
GO:0030334	regulation of cell migration	0.001811	28
GO:0046622	positive regulation of organ growth	0.001837	5
GO:0016202	regulation of striated muscle tissue development	0.002043	8
GO:1901861	regulation of muscle tissue development	0.002043	8
GO:0048514	blood vessel morphogenesis	0.002083	21
GO:0048634	regulation of muscle organ development	0.002213	8
GO:0051270	regulation of cellular component movement	0.002307	30
GO:0008284	positive regulation of cell proliferation	0.00233	36
GO:0045765	regulation of angiogenesis	0.00234	13
GO:0042819	vitamin B6 biosynthetic process	0.002473	2
GO:0021593	rhombomere morphogenesis	0.002473	2
GO:0045794	negative regulation of cell volume	0.002473	2
GO:0071880	adenylate cyclase-activating adrenergic receptor signaling pathway	0.002473	2
GO:0035284	brain segmentation	0.002473	2
GO:0035283	central nervous system segmentation	0.002473	2
GO:0001692	histamine metabolic process	0.002473	2
GO:0048736	appendage development	0.002489	12
GO:0060173	limb development	0.002489	12
GO:0006560	proline metabolic process	0.002504	3
GO:0009887	animal organ morphogenesis	0.002557	39
GO:0060420	regulation of heart growth	0.002801	5
GO:0051412	response to corticosterone	0.002832	4
GO:0035107	appendage morphogenesis	0.00289	11
GO:0035108	limb morphogenesis	0.00289	11
GO:1903522	regulation of blood circulation	0.003111	13
GO:0008016	regulation of heart contraction	0.00322	11
GO:0071944	cell periphery	0.003351	164

GO:0021602	cranial nerve morphogenesis	0.003383	4
GO:0060043	regulation of cardiac muscle cell proliferation	0.003383	4
GO:0042474	middle ear morphogenesis	0.003383	4
GO:0042509 GO:0042510 GO:0042513 GO:0042516 GO:0042519 GO:0042522 GO:0042525 GO:0042528	regulation of tyrosine phosphorylation of STAT protein	0.003454	6
GO:2000145	regulation of cell motility	0.003472	28
GO:0005796	Golgi lumen	0.003485	8
GO:0030141	secretory granule	0.003622	18
GO:0005088	Ras guanyl-nucleotide exchange factor activity	0.003711	10
GO:0001525	angiogenesis	0.003737	17
GO:0021549	cerebellum development	0.003743	8
GO:0005901 GO:0016599	caveola	0.003799	7
GO:0044853	plasma membrane raft	0.003799	7
GO:0030057	desmosome	0.004003	4
GO:0044091	membrane biogenesis	0.004003	4
GO:0005539	glycosaminoglycan binding	0.004078	13
GO:0048701	embryonic cranial skeleton morphogenesis	0.004086	5
GO:0071875	adrenergic receptor signaling pathway	0.004396	3
GO:0030431	sleep	0.004396	3
GO:0086064	cell communication by electrical coupling involved in cardiac conduction	0.004396	3
GO:0017085	response to insecticide	0.004396	3
GO:0060688	regulation of morphogenesis of a branching structure	0.004595	5
GO:0048856	anatomical structure development	0.004673	158
GO:0051302	regulation of cell division	0.004736	9
GO:0005886 GO:0005904	plasma membrane	0.004838	160
GO:0014063	negative regulation of serotonin secretion	0.004851	2
GO:1901532	regulation of hematopoietic progenitor cell differentiation	0.004851	2
GO:1904861	excitatory synapse assembly	0.004851	2
GO:0021569	rhombomere 3 development	0.004851	2
GO:0002159	desmosome assembly	0.004851	2
GO:0051380	norepinephrine binding	0.004851	2
GO:1905456	regulation of lymphoid progenitor cell differentiation	0.004851	2
GO:0050755	chemokine metabolic process	0.004851	2

GO:0060665	regulation of branching involved in salivary gland morphogenesis by mesenchymal-epithelial signaling	0.004851	2
GO:0086018	SA node cell to atrial cardiac muscle cell signaling	0.004851	2
GO:0097114	NMDA glutamate receptor clustering	0.004851	2
GO:0060509	Type I pneumocyte differentiation	0.004851	2
GO:0098698	postsynaptic specialization assembly	0.004851	2
GO:0004735	pyrroline-5-carboxylate reductase activity	0.004851	2
GO:0007412	axon target recognition	0.004851	2
GO:0097107	postsynaptic density assembly	0.004851	2
GO:0086015	SA node cell action potential	0.004851	2
GO:0071229	cellular response to acid chemical	0.004891	10
GO:0000777	condensed chromosome kinetochore	0.004926	8
GO:1904018	positive regulation of vasculature development	0.005025	9
GO:0051966	regulation of synaptic transmission, glutamatergic	0.005148	5
GO:0009888	tissue development	0.005152	58
GO:0019842	vitamin binding	0.005437	10
GO:0050679	positive regulation of epithelial cell proliferation	0.005437	10
GO:0044295	axonal growth cone	0.005592	3
GO:0005916	fascia adherens	0.005592	3
GO:0070252	actin-mediated cell contraction	0.005602	7
GO:0071248	cellular response to metal ion	0.005615	8
GO:0008227	G-protein coupled amine receptor activity	0.005746	5
GO:0010464	regulation of mesenchymal cell proliferation	0.005746	5
GO:0001944	vasculature development	0.00583	23
GO:0050678	regulation of epithelial cell proliferation	0.005845	15
GO:0051384	response to glucocorticoid	0.005975	9
GO:0051100	negative regulation of binding	0.005986	8
GO:0070507	regulation of microtubule cytoskeleton organization	0.006375	8
GO:0043271	negative regulation of ion transport	0.006478	7

GO:0001568	blood vessel development	0.006805	22
GO:0043279	response to alkaloid	0.006952	7
GO:0002027	regulation of heart rate	0.006952	7
GO:0060788	ectodermal placode formation	0.006966	3
GO:0007210	serotonin receptor signaling pathway	0.006966	3
GO:0086019	cell-cell signaling involved in cardiac conduction	0.006966	3
GO:0071697	ectodermal placode morphogenesis	0.006966	3
GO:0098664	G-protein coupled serotonin receptor signaling pathway	0.006966	3
GO:0071696	ectodermal placode development	0.006966	3
GO:0042581	specific granule	0.006966	3
GO:0099589	serotonin receptor activity	0.006966	3
GO:0004993 GO:0001585 GO:0016609	G-protein coupled serotonin receptor activity	0.006966	3
GO:1901607	alpha-amino acid biosynthetic process	0.007118	6
GO:0060048	cardiac muscle contraction	0.007118	6
GO:0003014	renal system process	0.007211	8
GO:0017080	sodium channel regulator activity	0.007241	4
GO:0016645	oxidoreductase activity, acting on the CH-NH group of donors	0.007241	4
GO:0051155	positive regulation of striated muscle cell differentiation	0.007241	4
GO:0040012	regulation of locomotion	0.007336	28
GO:0072358	cardiovascular system development	0.00735	23
GO:0000779	condensed chromosome, centromeric region	0.007659	8
GO:0048306	calcium-dependent protein binding	0.00772	6
GO:0050805	negative regulation of synaptic transmission	0.007831	5
GO:0042816	vitamin B6 metabolic process	0.00793	2
GO:0042297	vocal learning	0.00793	2
GO:1900133	regulation of renin secretion into blood stream	0.00793	2
GO:2000794	regulation of epithelial cell proliferation involved in lung morphogenesis	0.00793	2
GO:0098598	learned vocalization behavior or vocal learning	0.00793	2
GO:0098597	observational learning	0.00793	2
GO:0098596	imitative learning	0.00793	2
GO:0034334	adherens junction maintenance	0.00793	2

GO:0090193	positive regulation of glomerulus development	0.00793	2
GO:0033622	integrin activation	0.00793	2
GO:0086070	SA node cell to atrial cardiac muscle cell communication	0.00793	2
GO:0086067	AV node cell to bundle of His cell communication	0.00793	2
GO:0031694	alpha-2A adrenergic receptor binding	0.00793	2
GO:0018879	biphenyl metabolic process	0.00793	2
GO:0061370	testosterone biosynthetic process	0.00793	2
GO:0051379	epinephrine binding	0.00793	2
GO:0021861	forebrain radial glial cell differentiation	0.00793	2
GO:0055129	L-proline biosynthetic process	0.00793	2
GO:0007417	central nervous system development	0.008117	36
GO:0022037	metencephalon development	0.008127	8
GO:1900024	regulation of substrate adhesion-dependent cell spreading	0.008258	4
GO:0030449	regulation of complement activation	0.008258	4
GO:0032947	protein-containing complex scaffold activity	0.008358	6
GO:0007340	acrosome reaction	0.008522	3
GO:0010996	response to auditory stimulus	0.008522	3
GO:0007158	neuron cell-cell adhesion	0.008522	3
GO:0010644	cell communication by electrical coupling	0.008522	3
GO:0042531 GO:0042511 GO:0042515 GO:0042517 GO:0042520 GO:0042523 GO:0042526 GO:0042529	positive regulation of tyrosine phosphorylation of STAT protein	0.008629	5
GO:1904888	cranial skeletal system development	0.008629	5
GO:0070613 GO:0010953	regulation of protein processing	0.009033	6
GO:0044057	regulation of system process	0.0092	19
GO:0000775 GO:0097521	chromosome, centromeric region	0.009229	11
GO:0061448	connective tissue development	0.009287	12
GO:0008201	heparin binding	0.009351	10
GO:0031069	hair follicle morphogenesis	0.009364	4
GO:0035295	tube development	0.009592	35
GO:1903317	regulation of protein maturation	0.009746	6
GO:0035239	tube morphogenesis	0.009902	28
GO:0014706	striated muscle tissue development	0.009908	14
GO:0051094	positive regulation of developmental process	0.01004	40

GO:1901605	alpha-amino acid metabolic process	0.010047	12
GO:0003205	cardiac chamber development	0.010169	9
GO:0000780	condensed nuclear chromosome, centromeric region	0.010265	3
GO:0005044	scavenger receptor activity	0.01039	5
GO:2000257	regulation of protein activation cascade	0.010562	4
GO:0043269	regulation of ion transport	0.010596	23
GO:0032879	regulation of localization	0.011116	69
GO:0071241	cellular response to inorganic substance	0.011401	8
GO:0044421	extracellular region part	0.011419	126
GO:0004630	phospholipase D activity	0.011667	2
GO:0018894	dibenzo-p-dioxin metabolic process	0.011667	2
GO:0018963	phthalate metabolic process	0.011667	2
GO:0060019	radial glial cell differentiation	0.011667	2
GO:0008131 GO:0004041 GO:0008122	primary amine oxidase activity	0.011667	2
GO:0014062	regulation of serotonin secretion	0.011667	2
GO:0021869	forebrain ventricular zone progenitor cell division	0.011667	2
GO:0060373	regulation of ventricular cardiac muscle cell membrane depolarization	0.011667	2
GO:2000727	positive regulation of cardiac muscle cell differentiation	0.011667	2
GO:0014877	response to muscle inactivity involved in regulation of muscle adaptation	0.011667	2
GO:0014894	response to denervation involved in regulation of muscle adaptation	0.011667	2
GO:0014870	response to muscle inactivity	0.011667	2
GO:0002430	complement receptor mediated signaling pathway	0.011667	2
GO:0035254	glutamate receptor binding	0.011854	4
GO:0006879	cellular iron ion homeostasis	0.012124	6
GO:0021675	nerve development	0.012124	6
GO:0045187	regulation of circadian sleep/wake cycle, sleep	0.012201	3
GO:0045109	intermediate filament organization	0.012201	3
GO:0071371	cellular response to gonadotropin stimulus	0.012201	3
GO:0051149	positive regulation of muscle cell differentiation	0.012383	5

GO:0014070	response to organic cyclic compound	0.012749	30
GO:0050731	positive regulation of peptidyl-tyrosine phosphorylation	0.012953	9
GO:0033993	response to lipid	0.013241	30
GO:0050730	regulation of peptidyl-tyrosine phosphorylation	0.013346	11
GO:0030335	positive regulation of cell migration	0.013422	16
GO:0006928	movement of cell or subcellular component	0.013546	53
GO:0006959	humoral immune response	0.013572	9
GO:0051345	positive regulation of hydrolase activity	0.014098	35
GO:0042127	regulation of cell proliferation	0.014098	54
GO:0006825	copper ion transport	0.01433	3
GO:0042749	regulation of circadian sleep/wake cycle	0.01433	3
GO:0035255	ionotropic glutamate receptor binding	0.01433	3
GO:0009404	toxin metabolic process	0.01433	3
GO:0043586	tongue development	0.01433	3
GO:0017075	syntaxin-1 binding	0.01433	3
GO:0010721	negative regulation of cell development	0.014599	12
GO:0070405	ammonium ion binding	0.01462	5
GO:0060537	muscle tissue development	0.014733	14
GO:0010038	response to metal ion	0.014733	14
GO:0098801	regulation of renal system process	0.014733	4
GO:0048730	epidermis morphogenesis	0.014733	4
GO:0008015 GO:0070261	blood circulation	0.014811	17
GO:0060047	heart contraction	0.014883	6
GO:0003015	heart process	0.014883	6
GO:0007399	nervous system development	0.014955	74
GO:0048568	embryonic organ development	0.015046	20
GO:0001101	response to acid chemical	0.015204	14
GO:0003013	circulatory system process	0.01522	17
GO:0051336	regulation of hydrolase activity	0.01536	49
GO:2000147	positive regulation of cell motility	0.015496	16
GO:0035637	multicellular organismal signaling	0.015704	7
GO:0030048	actin filament-based movement	0.015704	7
GO:0072359	circulatory system development	0.01577	32
GO:0008652	cellular amino acid biosynthetic process	0.015892	6
GO:0048671	negative regulation of collateral sprouting	0.016023	2

GO:0097106	postsynaptic density organization	0.016023	2
GO:0072578	neurotransmitter-gated ion channel clustering	0.016023	2
GO:0099068	postsynapse assembly	0.016023	2
GO:0099084	postsynaptic specialization organization	0.016023	2
GO:0032229	negative regulation of synaptic transmission, GABAergic	0.016023	2
GO:0046475	glycerophospholipid catabolic process	0.016023	2
GO:1900025	negative regulation of substrate adhesion-dependent cell spreading	0.016023	2
GO:0045294	alpha-catenin binding	0.016023	2
GO:0071372	cellular response to follicle-stimulating hormone stimulus	0.016023	2
GO:0003360	brainstem development	0.016023	2
GO:0006701	progesterone biosynthetic process	0.016023	2
GO:0007185	transmembrane receptor protein tyrosine phosphatase signaling pathway	0.016023	2
GO:0003256	regulation of transcription from RNA polymerase II promoter involved in myocardial precursor cell differentiation	0.016023	2
GO:0006561	proline biosynthetic process	0.016023	2
GO:0030061	mitochondrial crista	0.016023	2
GO:0043587	tongue morphogenesis	0.016023	2
GO:0060638	mesenchymal-epithelial cell signaling	0.016023	2
GO:0060371	regulation of atrial cardiac muscle cell membrane depolarization	0.016023	2
GO:0003057	regulation of the force of heart contraction by chemical signal	0.016023	2
GO:0014832	urinary bladder smooth muscle contraction	0.016023	2
GO:0090192	regulation of glomerulus development	0.016023	2
GO:0006941	striated muscle contraction	0.016602	7
GO:0016638	oxidoreductase activity, acting on the CH-NH2 group of donors	0.016657	3
GO:0009084	glutamine family amino acid biosynthetic process	0.016657	3
GO:0034394	protein localization to cell surface	0.016657	3

GO:0045216	cell-cell junction organization	0.017079	10
GO:0048562	embryonic organ morphogenesis	0.017102	15
GO:0007052 GO:0000071 GO:0030472 GO:0043148	mitotic spindle organization	0.017113	5
GO:0007519 GO:0048637	skeletal muscle tissue development	0.017159	8
GO:0030001	metal ion transport	0.017552	27
GO:0048545	response to steroid hormone	0.017603	15
GO:0022603	regulation of anatomical structure morphogenesis	0.017759	30
GO:0044703	multi-organism reproductive process	0.017769	35
GO:0009069	serine family amino acid metabolic process	0.018019	4
GO:0002053	positive regulation of mesenchymal cell proliferation	0.018019	4
GO:0038024	cargo receptor activity	0.01805	6
GO:0001942 GO:0001943	hair follicle development	0.01805	6
GO:0031226	intrinsic component of plasma membrane	0.018454	53
GO:0050830	defense response to Gram-positive bacterium	0.018458	5
GO:0000776 GO:0005699	kinetochore	0.018877	8
GO:0048565	digestive tract development	0.018877	8
GO:0000122 GO:0010553 GO:0045816	negative regulation of transcription by RNA polymerase II	0.019179	29
GO:0031430	M band	0.019183	3
GO:0071312	cellular response to alkaloid	0.019183	3
GO:0034332	adherens junction organization	0.019201	6
GO:0022404	molting cycle process	0.019201	6
GO:0098773	skin epidermis development	0.019201	6
GO:0022405	hair cycle process	0.019201	6
GO:0007422	peripheral nervous system development	0.019201	6
GO:0006937	regulation of muscle contraction	0.01978	8
GO:0032886	regulation of microtubule-based process	0.01978	8
GO:0048538	thymus development	0.019819	4
GO:0051272	positive regulation of cellular component movement	0.019844	16
GO:0034330	cell junction organization	0.020111	11
GO:0016477	cell migration	0.020439	30
GO:0005887	integral component of plasma membrane	0.020743	51
GO:0005506	iron ion binding	0.020747	10
GO:0051451	myoblast migration	0.020957	2
GO:0099054	presynapse assembly	0.020957	2
GO:0016342	catenin complex	0.020957	2

GO:0014854	response to inactivity	0.020957	2
GO:0060484	lung-associated mesenchyme development	0.020957	2
GO:0016264	gap junction assembly	0.020957	2
GO:0051895	negative regulation of focal adhesion assembly	0.020957	2
GO:0060992	response to fungicide	0.020957	2
GO:0005915	zonula adherens	0.020957	2
GO:0014848	urinary tract smooth muscle contraction	0.020957	2
GO:0051988	regulation of attachment of spindle microtubules to kinetochore	0.020957	2
GO:2000810	regulation of bicellular tight junction assembly	0.020957	2
GO:0097105	presynaptic membrane assembly	0.020957	2
GO:0031223	auditory behavior	0.020957	2
GO:1903392	negative regulation of adherens junction organization	0.020957	2
GO:1901889	negative regulation of cell junction assembly	0.020957	2
GO:0005113	patched binding	0.020957	2
GO:0030955	potassium ion binding	0.020957	2
GO:0009635	response to herbicide	0.020957	2
GO:0040011	locomotion	0.021005	45
GO:0017048 GO:0017031	Rho GTPase binding	0.021018	9
GO:0008277	regulation of G-protein coupled receptor protein signaling pathway	0.021018	9
GO:0042446	hormone biosynthetic process	0.021355	5
GO:0001952	regulation of cell-matrix adhesion	0.021651	6
GO:0006699	bile acid biosynthetic process	0.021908	3
GO:0002931	response to ischemia	0.021908	3
GO:0040017	positive regulation of locomotion	0.022052	16
GO:0032502 GO:0044767	developmental process	0.022553	161
GO:0042060	wound healing	0.023053	28
GO:0120031	plasma membrane bounded cell projection assembly	0.023096	14
GO:0043025	neuronal cell body	0.023606	17
GO:0015485	cholesterol binding	0.023741	4
GO:0001508	action potential	0.023927	7
GO:0007420	brain development	0.024041	27
GO:0009612	response to mechanical stimulus	0.024071	10
GO:0005089	Rho guanyl-nucleotide exchange factor activity	0.024303	6

GO:0010595	positive regulation of endothelial cell migration	0.024532	5
GO:1904894	positive regulation of STAT cascade	0.024532	5
GO:0048477 GO:0009993 GO:0048157	oogenesis	0.024532	5
GO:0046427 GO:2000366	positive regulation of JAK-STAT cascade	0.024532	5
GO:0060284	regulation of cell development	0.024601	26
GO:0044706	multi-multicellular organism process	0.024727	11
GO:0048870	cell motility	0.024772	32
GO:0007530	sex determination	0.024833	3
GO:2001259	positive regulation of cation channel activity	0.024833	3
GO:0098815	modulation of excitatory postsynaptic potential	0.024833	3
GO:0030159	receptor signaling complex scaffold activity	0.024833	3
GO:0043954 GO:0071956	cellular component maintenance	0.024833	3
GO:0005615	extracellular space	0.024941	117
GO:0098542	defense response to other organism	0.025068	16
GO:0009410 GO:0017104	response to xenobiotic stimulus	0.025126	14
GO:0051674	localization of cell	0.02517	32
GO:0005085 GO:0008433 GO:0016219 GO:0019839	guanyl-nucleotide exchange factor activity	0.025565	11
GO:0003006	developmental process involved in reproduction	0.025608	25
GO:0060538	skeletal muscle organ development	0.025854	8
GO:0042306	regulation of protein import into nucleus	0.025866	4
GO:1904589	regulation of protein import	0.025866	4
GO:0043392	negative regulation of DNA binding	0.025866	4
GO:0031012	extracellular matrix	0.026129	19
GO:0003094	glomerular filtration	0.026433	2
GO:0060693	regulation of branching involved in salivary gland morphogenesis	0.026433	2
GO:0051967	negative regulation of synaptic transmission, glutamatergic	0.026433	2
GO:1901213	regulation of transcription from RNA polymerase II promoter involved in heart development	0.026433	2
GO:0099172	presynapse organization	0.026433	2
GO:0097090	presynaptic membrane organization	0.026433	2
GO:0004716	signal transducer, downstream of	0.026433	2

	receptor, with protein tyrosine kinase activity		
GO:0030007 GO:0017079	cellular potassium ion homeostasis	0.026433	2
GO:0051984	positive regulation of chromosome segregation	0.026433	2
GO:0006703	estrogen biosynthetic process	0.026433	2
GO:0042364	water-soluble vitamin biosynthetic process	0.026433	2
GO:0006563	L-serine metabolic process	0.026433	2
GO:0052803	imidazole-containing compound metabolic process	0.026433	2
GO:0004935	adrenergic receptor activity	0.026433	2
GO:0035251	UDP-glucosyltransferase activity	0.026433	2
GO:0034765	regulation of ion transmembrane transport	0.026553	15
GO:0098813	nuclear chromosome segregation	0.026695	9
GO:0099503	secretory vesicle	0.026713	19
GO:0043087 GO:0032312 GO:0032313 GO:0032314 GO:0032315 GO:0032316 GO:0032317 GO:0032318 GO:0032319 GO:0043088	regulation of GTPase activity	0.027663	23
GO:0010810	regulation of cell-substrate adhesion	0.027737	9
GO:0030324	lung development	0.027763	10
GO:0043030	regulation of macrophage activation	0.027957	3
GO:0002446	neutrophil mediated immunity	0.027957	3
GO:0002828	regulation of type 2 immune response	0.027957	3
GO:0001953	negative regulation of cell-matrix adhesion	0.027957	3
GO:0030031	cell projection assembly	0.028036	14
GO:0010812	negative regulation of cell-substrate adhesion	0.028102	4
GO:0005272	sodium channel activity	0.028102	4
GO:0045776	negative regulation of blood pressure	0.028102	4
GO:0021545	cranial nerve development	0.028102	4
GO:0051703	intraspecies interaction between organisms	0.028102	4
GO:0060563	neuroepithelial cell differentiation	0.028102	4
GO:0035176	social behavior	0.028102	4
GO:1901888	regulation of cell junction assembly	0.028102	4
GO:0031764	type 1 galanin receptor binding	0.02902	1
GO:0071752	secretory dimeric IgA immunoglobulin complex	0.02902	1
GO:0071753	IgM immunoglobulin complex	0.02902	1

GO:0071754	IgM immunoglobulin complex, circulating	0.02902	1
GO:0071756	pentameric IgM immunoglobulin complex	0.02902	1
GO:0071757	hexameric IgM immunoglobulin complex	0.02902	1
GO:0071878	negative regulation of adenylate cyclase-activating adrenergic receptor signaling pathway	0.02902	1
GO:0032003	interleukin-28 receptor binding	0.02902	1
GO:0071881	adenylate cyclase-inhibiting adrenergic receptor signaling pathway	0.02902	1
GO:0006231	dTMP biosynthetic process	0.02902	1
GO:0071882	phospholipase C-activating adrenergic receptor signaling pathway	0.02902	1
GO:0052599	methylputrescine oxidase activity	0.02902	1
GO:0052600	propane-1,3-diamine oxidase activity	0.02902	1
GO:0052826	inositol hexakisphosphate 2-phosphatase activity	0.02902	1
GO:0022018	lateral ganglionic eminence cell proliferation	0.02902	1
GO:0022012	subpallium cell proliferation in forebrain	0.02902	1
GO:0006599	phosphagen metabolic process	0.02902	1
GO:0003061	positive regulation of the force of heart contraction by norepinephrine	0.02902	1
GO:0006603	phosphocreatine metabolic process	0.02902	1
GO:0006535	cysteine biosynthetic process from serine	0.02902	1
GO:0021666	rhombomere 5 formation	0.02902	1
GO:0021664	rhombomere 5 morphogenesis	0.02902	1
GO:0021660	rhombomere 3 formation	0.02902	1
GO:0051695	actin filament uncapping	0.02902	1
GO:0051673	membrane disruption in other organism	0.02902	1
GO:0051638	barbed-end actin filament uncapping	0.02902	1
GO:0006507	GPI anchor release	0.02902	1
GO:0021594	rhombomere formation	0.02902	1
GO:0061033	secretion by lung epithelial cell involved in lung growth	0.02902	1
GO:0002642	positive regulation of immunoglobulin biosynthetic process	0.02902	1

GO:0002640	regulation of immunoglobulin biosynthetic process	0.02902	1
GO:0061141	lung ciliated cell differentiation	0.02902	1
GO:0020021	immortalization of host cell	0.02902	1
GO:0070524	11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase (NADP+) activity	0.02902	1
GO:0006463	steroid hormone receptor complex assembly	0.02902	1
GO:0051265	diolein transacylation activity	0.02902	1
GO:0051264	mono-olein transacylation activity	0.02902	1
GO:0070856	myosin VI light chain binding	0.02902	1
GO:0019343	cysteine biosynthetic process via cystathionine	0.02902	1
GO:0019088	immortalization of host cell by virus	0.02902	1
GO:0071283	cellular response to iron(III) ion	0.02902	1
GO:0071373	cellular response to luteinizing hormone stimulus	0.02902	1
GO:0018733	3,4-dihydrocoumarin hydrolase activity	0.02902	1
GO:0071401	cellular response to triglyceride	0.02902	1
GO:0006797	polyphosphate metabolic process	0.02902	1
GO:0051022	Rho GDP-dissociation inhibitor binding	0.02902	1
GO:0071664	catenin-TCF7L2 complex	0.02902	1
GO:0071665	gamma-catenin-TCF7L2 complex	0.02902	1
GO:0071714	icosanoid transmembrane transporter activity	0.02902	1
GO:0071745	IgA immunoglobulin complex	0.02902	1
GO:0071746	IgA immunoglobulin complex, circulating	0.02902	1
GO:0071748	monomeric IgA immunoglobulin complex	0.02902	1
GO:0071749	polymeric IgA immunoglobulin complex	0.02902	1
GO:0002077	acrosome matrix dispersal	0.02902	1
GO:0071750	dimeric IgA immunoglobulin complex	0.02902	1
GO:0071751	secretory IgA immunoglobulin complex	0.02902	1
GO:0004040	amidase activity	0.02902	1
GO:0032762	mast cell cytokine production	0.02902	1
GO:0016642	oxidoreductase activity, acting on the CH-NH2 group of	0.02902	1

	donors, disulfide as acceptor		
GO:0004113	2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase activity	0.02902	1
GO:0004122	cystathionine beta-synthase activity	0.02902	1
GO:0001971	negative regulation of activation of membrane attack complex	0.02902	1
GO:0004375	glycine dehydrogenase (decarboxylating) activity	0.02902	1
GO:0004380	glycoprotein-fucosylgalactoside alpha-N-acetylglactosaminyltransferase activity	0.02902	1
GO:0004381	fucosylgalactoside 3-alpha-galactosyltransferase activity	0.02902	1
GO:0086053	AV node cell to bundle of His cell communication by electrical coupling	0.02902	1
GO:0004398	histidine decarboxylase activity	0.02902	1
GO:0004446	inositol-hexakisphosphate phosphatase activity	0.02902	1
GO:0015132	prostaglandin transmembrane transporter activity	0.02902	1
GO:0033212	iron assimilation	0.02902	1
GO:0086075	gap junction channel activity involved in cardiac conduction electrical coupling	0.02902	1
GO:0086077	gap junction channel activity involved in AV node cell-bundle of His cell electrical coupling	0.02902	1
GO:0033214	iron assimilation by chelation and transport	0.02902	1
GO:0090126	protein-containing complex assembly involved in synapse maturation	0.02902	1
GO:0033783	25-hydroxycholesterol 7alpha-hydroxylase activity	0.02902	1
GO:0090251	protein localization involved in establishment of planar polarity	0.02902	1
GO:0004621	glycosylphosphatidylinositol phospholipase D activity	0.02902	1
GO:0048561	establishment of animal organ orientation	0.02902	1
GO:0090362	positive regulation of platelet-derived growth factor production	0.02902	1

GO:0014804	terminal cisterna lumen	0.02902	1
GO:0097013	phagocytic vesicle lumen	0.02902	1
GO:0004648 GO:0004646	O-phospho-L-serine:2-oxoglutarate aminotransferase activity	0.02902	1
GO:0097112	gamma-aminobutyric acid receptor clustering	0.02902	1
GO:0097184	response to azide	0.02902	1
GO:0097185	cellular response to azide	0.02902	1
GO:0097241	hematopoietic stem cell migration to bone marrow	0.02902	1
GO:0034417	bisphosphoglycerate 3-phosphatase activity	0.02902	1
GO:0004799	thymidylate synthase activity	0.02902	1
GO:2000978	negative regulation of forebrain neuron differentiation	0.02902	1
GO:0014036	neural crest cell fate specification	0.02902	1
GO:0047962	glycine N-benzoyltransferase activity	0.02902	1
GO:0047856	dihydrocoumarin hydrolase activity	0.02902	1
GO:0047743	chlordecone reductase activity	0.02902	1
GO:0047391	alkylglycerophosphoethanolamine phosphodiesterase activity	0.02902	1
GO:0046680	response to DDT	0.02902	1
GO:2000974	negative regulation of pro-B cell differentiation	0.02902	1
GO:0004940	beta1-adrenergic receptor activity	0.02902	1
GO:0046601	positive regulation of centriole replication	0.02902	1
GO:0001626	nociceptin receptor activity	0.02902	1
GO:0106070	regulation of adenylate cyclase-activating G-protein coupled receptor signaling pathway	0.02902	1
GO:0106072	negative regulation of adenylate cyclase-activating G-protein coupled receptor signaling pathway	0.02902	1
GO:0005020	stem cell factor receptor activity	0.02902	1
GO:0010124	phenylacetate catabolic process	0.02902	1
GO:0046314	phosphocreatine biosynthetic process	0.02902	1
GO:0046271	phenylpropanoid catabolic process	0.02902	1
GO:0046226	coumarin catabolic process	0.02902	1
GO:0009852	auxin catabolic process	0.02902	1

GO:0046073	dTMP metabolic process	0.02902	1
GO:0009850	auxin metabolic process	0.02902	1
GO:0009443	pyridoxal 5'-phosphate salvage	0.02902	1
GO:1901533	negative regulation of hematopoietic progenitor cell differentiation	0.02902	1
GO:1901534	positive regulation of hematopoietic progenitor cell differentiation	0.02902	1
GO:0035701	hematopoietic stem cell migration	0.02902	1
GO:0035733	hepatic stellate cell activation	0.02902	1
GO:0005199	structural constituent of cell wall	0.02902	1
GO:0035874	cellular response to copper ion starvation	0.02902	1
GO:0009407	toxin catabolic process	0.02902	1
GO:0009386	translational attenuation	0.02902	1
GO:0008812	choline dehydrogenase activity	0.02902	1
GO:1903763	gap junction channel activity involved in cell communication by electrical coupling	0.02902	1
GO:0044302	dentate gyrus mossy fiber	0.02902	1
GO:0008613	diuretic hormone activity	0.02902	1
GO:0008569	ATP-dependent microtubule motor activity, minus-end-directed	0.02902	1
GO:1905063	regulation of vascular smooth muscle cell differentiation	0.02902	1
GO:1905065	positive regulation of vascular smooth muscle cell differentiation	0.02902	1
GO:0008478	pyridoxal kinase activity	0.02902	1
GO:0040032	post-embryonic body morphogenesis	0.02902	1
GO:1905457	negative regulation of lymphoid progenitor cell differentiation	0.02902	1
GO:0043418	homocysteine catabolic process	0.02902	1
GO:1905458	positive regulation of lymphoid progenitor cell differentiation	0.02902	1
GO:2001288	positive regulation of caveolin-mediated endocytosis	0.02902	1
GO:0043381	negative regulation of memory T cell differentiation	0.02902	1
GO:0008437	thyrotropin-releasing hormone activity	0.02902	1
GO:2000042	negative regulation of double-strand break	0.02902	1

	repair via homologous recombination		
GO:0042083	5,10-methylenetetrahydrofolate-dependent methyltransferase activity	0.02902	1
GO:0008386	cholesterol monooxygenase (side-chain-cleaving) activity	0.02902	1
GO:2000174	regulation of pro-T cell differentiation	0.02902	1
GO:2000176	positive regulation of pro-T cell differentiation	0.02902	1
GO:2000308	negative regulation of tumor necrosis factor (ligand) superfamily member 11 production	0.02902	1
GO:2000795	negative regulation of epithelial cell proliferation involved in lung morphogenesis	0.02902	1
GO:2000722	regulation of cardiac vascular smooth muscle cell differentiation	0.02902	1
GO:2000724	positive regulation of cardiac vascular smooth muscle cell differentiation	0.02902	1
GO:0042747	circadian sleep/wake cycle, REM sleep	0.02902	1
GO:2000775	histone H3-S10 phosphorylation involved in chromosome condensation	0.02902	1
GO:0042396	phosphagen biosynthetic process	0.02902	1
GO:0042571	immunoglobulin complex, circulating	0.02902	1
GO:0008116	prostaglandin-I synthase activity	0.02902	1
GO:0052598	histamine oxidase activity	0.02902	1
GO:0052597	diamine oxidase activity	0.02902	1
GO:0048705	skeletal system morphogenesis	0.029126	11
GO:0007010	cytoskeleton organization	0.029216	34
GO:0010001 GO:0007404 GO:0043360	glial cell differentiation	0.029333	8
GO:0007193	adenylate cyclase-inhibiting G-protein coupled receptor signaling pathway	0.029841	5
GO:0004252	serine-type endopeptidase activity	0.029905	9
GO:0060541	respiratory system development	0.030069	11
GO:0048646	anatomical structure formation involved in morphogenesis	0.030345	32
GO:0045766	positive regulation of angiogenesis	0.03035	7
GO:0048522 GO:0051242	positive regulation of cellular process	0.030399	130

GO:0045428	regulation of nitric oxide biosynthetic process	0.030449	4
GO:0061458	reproductive system development	0.030609	18
GO:0048608	reproductive structure development	0.030609	18
GO:0006936	muscle contraction	0.030834	12
GO:0042493 GO:0017035	response to drug	0.030917	30
GO:0048523 GO:0051243	negative regulation of cellular process	0.031033	124
GO:0014047	glutamate secretion	0.03128	3
GO:0060306	regulation of membrane repolarization	0.03128	3
GO:1904591	positive regulation of protein import	0.03128	3
GO:0034706	sodium channel complex	0.03128	3
GO:0042307	positive regulation of protein import into nucleus	0.03128	3
GO:0043277	apoptotic cell clearance	0.03128	3
GO:0043949	regulation of cAMP-mediated signaling	0.03128	3
GO:0042391	regulation of membrane potential	0.031731	15
GO:0055123	digestive system development	0.031823	8
GO:0035270	endocrine system development	0.031823	8
GO:0003073	regulation of systemic arterial blood pressure	0.031861	6
GO:0048598 GO:0048828	embryonic morphogenesis	0.032029	24
GO:0048148	behavioral response to cocaine	0.032415	2
GO:0002691	regulation of cellular extravasation	0.032415	2
GO:0021610	facial nerve morphogenesis	0.032415	2
GO:0046085	adenosine metabolic process	0.032415	2
GO:0045916	negative regulation of complement activation	0.032415	2
GO:0060379	cardiac muscle cell myoblast differentiation	0.032415	2
GO:0032354	response to follicle-stimulating hormone	0.032415	2
GO:0086004	regulation of cardiac muscle cell contraction	0.032415	2
GO:0021561	facial nerve development	0.032415	2
GO:0014874	response to stimulus involved in regulation of muscle adaptation	0.032415	2
GO:1905209	positive regulation of cardiocyte differentiation	0.032415	2
GO:0042834	peptidoglycan binding	0.032415	2
GO:0097205	renal filtration	0.032415	2

GO:0043547 GO:0032320 GO:0032321 GO:0032850 GO:0032851 GO:0032852 GO:0032853 GO:0032854 GO:0032855 GO:0043089	positive regulation of GTPase activity	0.032833	21
GO:0032934 GO:0005498	sterol binding	0.032908	4
GO:0048168	regulation of neuronal synaptic plasticity	0.032908	4
GO:0030323	respiratory tube development	0.032924	10
GO:2000026	regulation of multicellular organismal development	0.033061	51
GO:0048469	cell maturation	0.033121	8
GO:0004222	metalloendopeptidase activity	0.033215	7
GO:0008344	adult locomotory behavior	0.033536	6
GO:0098857	membrane microdomain	0.033649	12
GO:0045121	membrane raft	0.033649	12
GO:0036477	somatodendritic compartment	0.034406	24
GO:0072562	blood microparticle	0.034713	7
GO:0042537	benzene-containing compound metabolic process	0.034801	3
GO:0034698	response to gonadotropin	0.034801	3
GO:0019731 GO:0006961 GO:0019733	antibacterial humoral response	0.034801	3
GO:0010765	positive regulation of sodium ion transport	0.034801	3
GO:0098772	molecular function regulator	0.035039	56
GO:0010634	positive regulation of epithelial cell migration	0.035268	6
GO:0006956	complement activation	0.03548	4
GO:0030195	negative regulation of blood coagulation	0.03548	4
GO:0015800	acidic amino acid transport	0.03548	4
GO:0002444	myeloid leukocyte mediated immunity	0.03548	4
GO:1903426	regulation of reactive oxygen species biosynthetic process	0.03548	4
GO:0002040	sprouting angiogenesis	0.03548	4
GO:1900047	negative regulation of hemostasis	0.03548	4
GO:0009064	glutamine family amino acid metabolic process	0.035822	5
GO:0043588	skin development	0.036189	11
GO:0050880	regulation of blood vessel size	0.037229	8
GO:0005911	cell-cell junction	0.037494	17
GO:0050662	coenzyme binding	0.037652	13
GO:0017157	regulation of exocytosis	0.037842	7
GO:0048857	neural nucleus development	0.037968	5
GO:0072078	nephron tubule morphogenesis	0.037968	5

GO:0043627	response to estrogen	0.037968	5
GO:0045921	positive regulation of exocytosis	0.038165	4
GO:0021762	substantia nigra development	0.038165	4
GO:0016925 GO:0006485 GO:0016927	protein sumoylation	0.038517	3
GO:0042755	eating behavior	0.038517	3
GO:1903307	positive regulation of regulated secretory pathway	0.038517	3
GO:0045880 GO:0045878	positive regulation of smoothened signaling pathway	0.038517	3
GO:0035150	regulation of tube size	0.038671	8
GO:0097305	response to alcohol	0.038671	8
GO:0044297	cell body	0.038749	18
GO:2000258	negative regulation of protein activation cascade	0.03887	2
GO:0005092	GDP-dissociation inhibitor activity	0.03887	2
GO:2001044	regulation of integrin-mediated signaling pathway	0.03887	2
GO:0072189	ureter development	0.03887	2
GO:0007638	mechanosensory behavior	0.03887	2
GO:0090136	epithelial cell-cell adhesion	0.03887	2
GO:0005858	axonemal dynein complex	0.03887	2
GO:0045019	negative regulation of nitric oxide biosynthetic process	0.03887	2
GO:0009071	serine family amino acid catabolic process	0.03887	2
GO:0004000	adenosine deaminase activity	0.03887	2
GO:0034331	cell junction maintenance	0.03887	2
GO:0003993	acid phosphatase activity	0.03887	2
GO:2000725	regulation of cardiac muscle cell differentiation	0.03887	2
GO:1904406	negative regulation of nitric oxide metabolic process	0.03887	2
GO:0008199	ferric iron binding	0.03887	2
GO:0071379	cellular response to prostaglandin stimulus	0.03887	2
GO:0042303	molting cycle	0.038901	6
GO:0042633	hair cycle	0.038901	6
GO:0051239	regulation of multicellular organismal process	0.038909	76
GO:0061061	muscle structure development	0.038989	19
GO:1901654	response to ketone	0.039474	7
GO:0010959	regulation of metal ion transport	0.039556	11
GO:0009266	response to temperature stimulus	0.039763	9
GO:0042063	gliogenesis	0.039763	9

GO:0007626	locomotory behavior	0.039962	10
GO:0002673	regulation of acute inflammatory response	0.040191	5
GO:0072088	nephron epithelium morphogenesis	0.040191	5
GO:0072028	nephron morphogenesis	0.040191	5
GO:0045744	negative regulation of G-protein coupled receptor protein signaling pathway	0.040191	5
GO:0001669	acrosomal vesicle	0.040804	6
GO:0098589	membrane region	0.040922	12
GO:0002920	regulation of humoral immune response	0.040964	4
GO:0019748	secondary metabolic process	0.040964	4
GO:0006811	ion transport	0.041767	45
GO:0009605	response to external stimulus	0.042132	63
GO:0045907	positive regulation of vasoconstriction	0.042426	3
GO:0019730 GO:0006960 GO:0019735	antimicrobial humoral response	0.042426	3
GO:1900182	positive regulation of protein localization to nucleus	0.042426	3
GO:0071398	cellular response to fatty acid	0.042426	3
GO:0031111	negative regulation of microtubule polymerization or depolymerization	0.042426	3
GO:0060322	head development	0.042464	27
GO:0046620	regulation of organ growth	0.042492	5
GO:0061333	renal tubule morphogenesis	0.042492	5
GO:0001657	ureteric bud development	0.042764	6
GO:0072659 GO:0072661 GO:0090002	protein localization to plasma membrane	0.042874	7
GO:1901681	sulfur compound binding	0.043135	11
GO:0044459	plasma membrane part	0.043453	79
GO:0034109	homotypic cell-cell adhesion	0.043875	4
GO:0006939	smooth muscle contraction	0.043875	4
GO:0005913	cell-cell adherens junction	0.043875	4
GO:0048844	artery morphogenesis	0.043875	4
GO:0050819	negative regulation of coagulation	0.043875	4
GO:0007517	muscle organ development	0.043924	13
GO:0030336	negative regulation of cell migration	0.043968	9
GO:0008083	growth factor activity	0.043968	9
GO:1990778	protein localization to cell periphery	0.044642	7
GO:0072164	mesonephric tubule development	0.044783	6

GO:0072163	mesonephric epithelium development	0.044783	6
GO:0061351	neural precursor cell proliferation	0.04487	5
GO:0071396	cellular response to lipid	0.044953	16
GO:0001505	regulation of neurotransmitter levels	0.045037	13
GO:0000793	condensed chromosome	0.04519	10
GO:0021700	developmental maturation	0.04519	10
GO:0009611 GO:0002245	response to wounding	0.045419	29
GO:0031420	alkali metal ion binding	0.045764	2
GO:0036445	neuronal stem cell division	0.045764	2
GO:1901678	iron coordination entity transport	0.045764	2
GO:0051044	positive regulation of membrane protein ectodomain proteolysis	0.045764	2
GO:0009263	deoxyribonucleotide biosynthetic process	0.045764	2
GO:2001014	regulation of skeletal muscle cell differentiation	0.045764	2
GO:0046527	glucosyltransferase activity	0.045764	2
GO:1903427	negative regulation of reactive oxygen species biosynthetic process	0.045764	2
GO:0002921	negative regulation of humoral immune response	0.045764	2
GO:0055057	neuroblast division	0.045764	2
GO:0003093	regulation of glomerular filtration	0.045764	2
GO:0003012	muscle system process	0.046169	13
GO:0010632	regulation of epithelial cell migration	0.046442	8
GO:0099528	G-protein coupled neurotransmitter receptor activity	0.046527	3
GO:0003254	regulation of membrane depolarization	0.046527	3
GO:0032459	regulation of protein oligomerization	0.046527	3
GO:0046503	glycerolipid catabolic process	0.046527	3
GO:0001658	branching involved in ureteric bud morphogenesis	0.0469	4
GO:0031100	animal organ regeneration	0.0469	4
GO:0043169	cation binding	0.047777	132
GO:0001077	transcriptional activator activity, RNA polymerase II proximal promoter sequence-specific DNA binding	0.04797	10

GO:2000146	negative regulation of cell motility	0.048462	9
GO:0007613	memory	0.048996	6
GO:0042133	neurotransmitter metabolic process	0.048996	6
GO:0010863	positive regulation of phospholipase C activity	0.049861	5

APÊNDICE 6 – Análise de enriquecimento funcional do GO dos genes que sofreram ganhos nas linhagens de gliomas tratadas com pisosterol. Foram considerados significantes, termos enriquecidos com $p < 0.05$.

GO ACCESSION	GO Term	p-value	Count in Selection
GO:0005634	nucleus	0.0115 96	252
GO:0044260 GO:0034960	cellular macromolecule metabolic process	0.0481 98	229
GO:0006139 GO:0055134	nucleobase-containing compound metabolic process	0.0410 59	170
GO:0010467	gene expression	0.0406 12	143
GO:0051252	regulation of RNA metabolic process	0.0483 3	142
GO:1903506	regulation of nucleic acid-templated transcription	0.0341 72	140
GO:2001141	regulation of RNA biosynthetic process	0.0356 82	140
GO:0044271	cellular nitrogen compound biosynthetic process	0.0320 13	136
GO:0016070	RNA metabolic process	0.0356 77	134
GO:1901362	organic cyclic compound biosynthetic process	0.0189 29	127
GO:0019438	aromatic compound biosynthetic process	0.0120 39	124
GO:0018130	heterocycle biosynthetic process	0.0199 05	122
GO:0034654	nucleobase-containing compound biosynthetic process	0.0122 76	121
GO:0032774	RNA biosynthetic process	0.0121 97	107
GO:0006351 GO:0006350 GO:0061018 GO:0061022	transcription, DNA-templated	0.0144 29	106
GO:0097659	nucleic acid-templated transcription	0.0144 29	106
GO:0034220	ion transmembrane transport	0.0430 41	42
GO:0051276 GO:0007001 GO:0051277	chromosome organization	0.0120 88	41
GO:0006325 GO:0016568	chromatin organization	0.0044 99	33
GO:0045202	synapse	0.0465 52	28
GO:0031966	mitochondrial membrane	0.0434 84	27
GO:0034622 GO:0043623	cellular protein-containing complex assembly	0.0414 56	25
GO:0019866	organelle inner membrane	0.0215 51	23
GO:0006820 GO:0006822	anion transport	0.0407 65	23
GO:0005743	mitochondrial inner membrane	0.0270 22	21
GO:0019693	ribose phosphate metabolic process	0.0242 25	19
GO:0098656	anion transmembrane transport	0.0215 09	17
GO:0022839	ion gated channel activity	0.0393 65	17
GO:0022836	gated channel activity	0.0416 11	17
GO:0071103	DNA conformation change	0.0173 99	15

GO:0097060	synaptic membrane	0.0240 84	15
GO:0009161	ribonucleoside monophosphate metabolic process	0.0150 95	14
GO:0010639	negative regulation of organelle organization	0.0184 34	14
GO:0009123	nucleoside monophosphate metabolic process	0.0231 48	14
GO:0016746 GO:0008415	transferase activity, transferring acyl groups	0.0400 66	14
GO:0046390	ribose phosphate biosynthetic process	0.0144 53	13
GO:0006323	DNA packaging	0.0142 04	12
GO:0009167	purine ribonucleoside monophosphate metabolic process	0.0381 64	12
GO:0009126	purine nucleoside monophosphate metabolic process	0.0395 58	12
GO:0016747	transferase activity, transferring acyl groups other than amino-acyl groups	0.0395 58	12
GO:0017048 GO:0017031	Rho GTPase binding	0.0070 87	11
GO:0065004	protein-DNA complex assembly	0.0094 34	11
GO:0006333	chromatin assembly or disassembly	0.0151 19	11
GO:0071824	protein-DNA complex subunit organization	0.0274 3	11
GO:0006334	nucleosome assembly	0.0074 78	10
GO:0031497	chromatin assembly	0.0150 73	10
GO:0034728	nucleosome organization	0.0248 98	10
GO:0006821	chloride transport	0.0062 14	9
GO:0016052 GO:0006095 GO:0044276 GO:0044724	carbohydrate catabolic process	0.0155 03	9
GO:0006959	humoral immune response	0.0266 25	9
GO:0050808	synapse organization	0.0323 5	9
GO:0005254	chloride channel activity	0.0038 74	8
GO:0016358	dendrite development	0.0042 42	8
GO:1902904	negative regulation of supramolecular fiber organization	0.0055 06	8
GO:0005253	anion channel activity	0.0070 38	8
GO:0051494	negative regulation of cytoskeleton organization	0.0088 73	8
GO:0046939	nucleotide phosphorylation	0.0102 8	8
GO:0002755	MyD88-dependent toll-like receptor signaling pathway	0.0110 43	8
GO:0015108	chloride transmembrane transporter activity	0.0126 92	8
GO:1902476	chloride transmembrane transport	0.0126 92	8
GO:0072376	protein activation cascade	0.0135 82	8
GO:0009132	nucleoside diphosphate metabolic process	0.0198 96	8
GO:0098661	inorganic anion transmembrane transport	0.0312 35	8
GO:0009584	detection of visible light	0.0329 09	8

GO:0007249	I-kappaB kinase/NF-kappaB signaling	0.0022 36	7
GO:0009135	purine nucleoside diphosphate metabolic process	0.0108 35	7
GO:0009179	purine ribonucleoside diphosphate metabolic process	0.0108 35	7
GO:0045335	phagocytic vesicle	0.0126 97	7
GO:0009185	ribonucleoside diphosphate metabolic process	0.0137 09	7
GO:0097731	9+0 non-motile cilium	0.0147 78	7
GO:0097733	photoreceptor cell cilium	0.0147 78	7
GO:0034162	toll-like receptor 9 signaling pathway	0.0183 4	7
GO:0003073	regulation of systemic arterial blood pressure	0.0210 24	7
GO:0000123	histone acetyltransferase complex	0.0271 89	7
GO:0031248	protein acetyltransferase complex	0.0271 89	7
GO:1902493	acetyltransferase complex	0.0271 89	7
GO:0097730 GO:0031513	non-motile cilium	0.0306 89	7
GO:0009119	ribonucleoside metabolic process	0.0325 47	7
GO:0007603	phototransduction, visible light	0.0476 67	7
GO:0008484	sulfuric ester hydrolase activity	2.40E- 05	6
GO:0034707	chloride channel complex	0.0088 45	6
GO:0030670	phagocytic vesicle membrane	0.0107 55	6
GO:0016597	amino acid binding	0.0118 13	6
GO:0001750	photoreceptor outer segment	0.0129 41	6
GO:0006687	glycosphingolipid metabolic process	0.0230 14	6
GO:0008013	beta-catenin binding	0.0266 49	6
GO:0016579 GO:0006514	protein deubiquitination	0.0306 46	6
GO:0006956	complement activation	0.0327 83	6
GO:1901981	phosphatidylinositol phosphate binding	0.0476 28	6
GO:0048813	dendrite morphogenesis	0.0106 25	5
GO:1901068	guanosine-containing compound metabolic process	0.0148 03	5
GO:0046148	pigment biosynthetic process	0.0334 89	5
GO:0007416	synapse assembly	0.0361 85	5
GO:0005070	SH3/SH2 adaptor activity	0.0390 1	5
GO:0004065	arylsulfatase activity	7.70E- 04	4
GO:0042043 GO:0019963	neurexin family protein binding	0.0014 66	4
GO:0046037	GMP metabolic process	0.0039 76	4
GO:0043984	histone H4-K16 acetylation	0.0048 88	4

GO:0003081	regulation of systemic arterial blood pressure by renin-angiotensin	0.0084 38	4
GO:0042417	dopamine metabolic process	0.0084 38	4
GO:0044275	cellular carbohydrate catabolic process	0.0197 85	4
GO:0048487	beta-tubulin binding	0.0197 85	4
GO:0070461	SAGA-type complex	0.0222 87	4
GO:0048365	Rac GTPase binding	0.0278 44	4
GO:0006221	pyrimidine nucleotide biosynthetic process	0.0309 05	4
GO:0001990	regulation of systemic arterial blood pressure by hormone	0.0375 99	4
GO:1905268 GO:1903309	negative regulation of chromatin organization	0.0375 99	4
GO:0006584	catecholamine metabolic process	0.0490 77	4
GO:0009712	catechol-containing compound metabolic process	0.0490 77	4
GO:0042989	sequestering of actin monomers	0.0016 53	3
GO:0097090	presynaptic membrane organization	0.0025 71	3
GO:0097105	presynaptic membrane assembly	0.0025 71	3
GO:0099054	presynapse assembly	0.0025 71	3
GO:0099172	presynapse organization	0.0037 49	3
GO:0004385	guanylate kinase activity	0.0069 62	3
GO:0046710	GDP metabolic process	0.0090 25	3
GO:1901984	negative regulation of protein acetylation	0.0090 25	3
GO:0016594	glycine binding	0.0114 09	3
GO:0043601	nuclear replisome	0.0141 21	3
GO:0120111	neuron projection cytoplasm	0.0141 21	3
GO:0001991	regulation of systemic arterial blood pressure by circulatory renin-angiotensin	0.0171 67	3
GO:0005247	voltage-gated chloride channel activity	0.0171 67	3
GO:0030894	replisome	0.0171 67	3
GO:0043981	histone H4-K5 acetylation	0.0171 67	3
GO:0043982	histone H4-K8 acetylation	0.0171 67	3
GO:0071709	membrane assembly	0.0171 67	3
GO:0001976	neurological system process involved in regulation of systemic arterial blood pressure	0.0205 49	3
GO:0007026	negative regulation of microtubule depolymerization	0.0205 49	3
GO:0045072	regulation of interferon-gamma biosynthetic process	0.0205 49	3
GO:0060076	excitatory synapse	0.0205 49	3
GO:0030041	actin filament polymerization	0.0242 7	3
GO:0005980	glycogen catabolic process	0.0283 28	3

GO:0006301	postreplication repair	0.0283 28	3
GO:0016638	oxidoreductase activity, acting on the CH-NH2 group of donors	0.0283 28	3
GO:0031114	regulation of microtubule depolymerization	0.0283 28	3
GO:0032452	histone demethylase activity	0.0283 28	3
GO:0004890	GABA-A receptor activity	0.0327 23	3
GO:0009251	glucan catabolic process	0.0327 23	3
GO:0044247	cellular polysaccharide catabolic process	0.0327 23	3
GO:0004683 GO:0004684 GO:0004685 GO:0004688	calmodulin-dependent protein kinase activity	0.0374 51	3
GO:0008308 GO:0022844	voltage-gated anion channel activity	0.0374 51	3
GO:0044091	membrane biogenesis	0.0374 51	3
GO:0070076	histone lysine demethylation	0.0374 51	3
GO:0000272 GO:0044244	polysaccharide catabolic process	0.0425 08	3
GO:0051354	negative regulation of oxidoreductase activity	0.0425 08	3
GO:0052866	phosphatidylinositol phosphate phosphatase activity	0.0425 08	3
GO:0005547	phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate binding	0.0478 87	3
GO:0005669	transcription factor TFIID complex	0.0478 87	3
GO:0016917	GABA receptor activity	0.0478 87	3
GO:0043576	regulation of respiratory gaseous exchange	0.0478 87	3
GO:0045915	positive regulation of catecholamine metabolic process	0.0014 11	2
GO:0045964	positive regulation of dopamine metabolic process	0.0014 11	2
GO:0047196	long-chain-alcohol O-fatty-acyltransferase activity	0.0014 11	2
GO:0004946	bombesin receptor activity	0.0041 28	2
GO:0008241	peptidyl-dipeptidase activity	0.0041 28	2
GO:0031989	bombesin receptor signaling pathway	0.0041 28	2
GO:0042272	nuclear RNA export factor complex	0.0041 28	2
GO:0045113	regulation of integrin biosynthetic process	0.0041 28	2
GO:0045726	positive regulation of integrin biosynthetic process	0.0041 28	2
GO:0071557	histone H3-K27 demethylation	0.0041 28	2
GO:0071558	histone demethylase activity (H3-K27 specific)	0.0041 28	2
GO:0071598	neuronal ribonucleoprotein granule	0.0041 28	2
GO:0004689 GO:0008606	phosphorylase kinase activity	0.0080 5	2
GO:0006015	5-phosphoribose 1-diphosphate biosynthetic process	0.0080 5	2
GO:0008486	diphosphoinositol-polyphosphate diphosphatase activity	0.0080 5	2
GO:0032914	positive regulation of transforming growth factor beta1 production	0.0080 5	2

GO:0036020	endolysosome membrane	0.0080 5	2
GO:0045356	positive regulation of interferon-alpha biosynthetic process	0.0080 5	2
GO:0046391	5-phosphoribose 1-diphosphate metabolic process	0.0080 5	2
GO:0052840	inositol diphosphate tetrakisphosphate diphosphatase activity	0.0080 5	2
GO:0052841	inositol bisdiphosphate tetrakisphosphate diphosphatase activity	0.0080 5	2
GO:0052842	inositol diphosphate pentakisphosphate diphosphatase activity	0.0080 5	2
GO:0052843	inositol-1-diphosphate-2,3,4,5,6-pentakisphosphate diphosphatase activity	0.0080 5	2
GO:0052844	inositol-3-diphosphate-1,2,4,5,6-pentakisphosphate diphosphatase activity	0.0080 5	2
GO:0052845	inositol-5-diphosphate-1,2,3,4,6-pentakisphosphate diphosphatase activity	0.0080 5	2
GO:0052846	inositol-1,5-bisdiphosphate-2,3,4,6-tetrakisphosphate 1-diphosphatase activity	0.0080 5	2
GO:0052847	inositol-1,5-bisdiphosphate-2,3,4,6-tetrakisphosphate 5-diphosphatase activity	0.0080 5	2
GO:0052848	inositol-3,5-bisdiphosphate-2,3,4,6-tetrakisphosphate 5-diphosphatase activity	0.0080 5	2
GO:1903729	regulation of plasma membrane organization	0.0080 5	2
GO:0000788	nuclear nucleosome	0.0130 84	2
GO:0002035	brain renin-angiotensin system	0.0130 84	2
GO:0004749	ribose phosphate diphosphokinase activity	0.0130 84	2
GO:0008131 GO:0004041 GO:0008122	primary amine oxidase activity	0.0130 84	2
GO:0032876	negative regulation of DNA endoreduplication	0.0130 84	2
GO:0033240	positive regulation of cellular amine metabolic process	0.0130 84	2
GO:0045354	regulation of interferon-alpha biosynthetic process	0.0130 84	2
GO:0046101	hypoxanthine biosynthetic process	0.0130 84	2
GO:0000124	SAGA complex	0.0191 4	2
GO:0005587	collagen type IV trimer	0.0191 4	2
GO:0016188	synaptic vesicle maturation	0.0191 4	2
GO:0016778	diphosphotransferase activity	0.0191 4	2
GO:0021859	pyramidal neuron differentiation	0.0191 4	2
GO:0021860	pyramidal neuron development	0.0191 4	2
GO:0032908	regulation of transforming growth factor beta1 production	0.0191 4	2
GO:0035197	siRNA binding	0.0191 4	2
GO:0042788	polysomal ribosome	0.0191 4	2
GO:0046100	hypoxanthine metabolic process	0.0191 4	2
GO:0004438 GO:0016315	phosphatidylinositol-3-phosphatase activity	0.0261 35	2
GO:0032875	regulation of DNA endoreduplication	0.0261 35	2
GO:0045359	positive regulation of interferon-beta biosynthetic process	0.0261 35	2

GO:0052744	phosphatidylinositol monophosphate phosphatase activity	0.0261 35	2
GO:0070170	regulation of tooth mineralization	0.0261 35	2
GO:0070669	response to interleukin-2	0.0261 35	2
GO:0098642	network-forming collagen trimer	0.0261 35	2
GO:0098645	collagen network	0.0261 35	2
GO:0006273	lagging strand elongation	0.0339 9	2
GO:0007099 GO:0032054	centriole replication	0.0339 9	2
GO:0036019	endolysosome	0.0339 9	2
GO:0042756	drinking behavior	0.0339 9	2
GO:0045357	regulation of interferon-beta biosynthetic process	0.0339 9	2
GO:0045416	positive regulation of interleukin-8 biosynthetic process	0.0339 9	2
GO:0098534	centriole assembly	0.0339 9	2
GO:0098651	basement membrane collagen trimer	0.0339 9	2
GO:2000651	positive regulation of sodium ion transmembrane transporter activity	0.0339 9	2
GO:0015385 GO:0015502	sodium:proton antiporter activity	0.0426 3	2
GO:0016272	prefoldin complex	0.0426 3	2
GO:0032525	somite rostral/caudal axis specification	0.0426 3	2
GO:0043995	histone acetyltransferase activity (H4-K5 specific)	0.0426 3	2
GO:0043996	histone acetyltransferase activity (H4-K8 specific)	0.0426 3	2
GO:0046972	histone acetyltransferase activity (H4-K16 specific)	0.0426 3	2
GO:0060632	regulation of microtubule-based movement	0.0426 3	2
GO:1902307	positive regulation of sodium ion transmembrane transport	0.0426 3	2
GO:0000415	negative regulation of histone H3-K36 methylation	0.0375 94	1
GO:0001787	natural killer cell proliferation	0.0375 94	1
GO:0002033	angiotensin-mediated vasodilation involved in regulation of systemic arterial blood pressure	0.0375 94	1
GO:0002652	regulation of tolerance induction dependent upon immune response	0.0375 94	1
GO:0002654	positive regulation of tolerance induction dependent upon immune response	0.0375 94	1
GO:0002658	regulation of peripheral tolerance induction	0.0375 94	1
GO:0002660	positive regulation of peripheral tolerance induction	0.0375 94	1
GO:0002721	regulation of B cell cytokine production	0.0375 94	1
GO:0002849	regulation of peripheral T cell tolerance induction	0.0375 94	1
GO:0002851	positive regulation of peripheral T cell tolerance induction	0.0375 94	1
GO:0003681	bent DNA binding	0.0375 94	1
GO:0004341	gluconolactonase activity	0.0375 94	1

GO:0004408	holocytochrome-c synthase activity	0.0375 94	1
GO:0004423	iduronate-2-sulfatase activity	0.0375 94	1
GO:0004577	N-acetylglucosaminyldiphosphodolichol N-acetylglucosaminyltransferase activity	0.0375 94	1
GO:0004585	ornithine carbamoyltransferase activity	0.0375 94	1
GO:0004773	sterol-sulfatase activity	0.0375 94	1
GO:0005308	creatine transmembrane transporter activity	0.0375 94	1
GO:0005309	creatine:sodium symporter activity	0.0375 94	1
GO:0005898	interleukin-13 receptor complex	0.0375 94	1
GO:0006272	leading strand elongation	0.0375 94	1
GO:0006746	FADH2 metabolic process	0.0375 94	1
GO:0007624	ultradian rhythm	0.0375 94	1
GO:0008057 GO:0008059 GO:0045318 GO:0048751	eye pigment granule organization	0.0375 94	1
GO:0008127	quercetin 2,3-dioxygenase activity	0.0375 94	1
GO:0008709	cholate 7-alpha-dehydrogenase activity	0.0375 94	1
GO:0009348	ornithine carbamoyltransferase complex	0.0375 94	1
GO:0010286	heat acclimation	0.0375 94	1
GO:0010385	double-stranded methylated DNA binding	0.0375 94	1
GO:0010732	regulation of protein glutathionylation	0.0375 94	1
GO:0010734	negative regulation of protein glutathionylation	0.0375 94	1
GO:0015881 GO:1902598	creatine transmembrane transport	0.0375 94	1
GO:0015910	peroxisomal long-chain fatty acid import	0.0375 94	1
GO:0016768	spermine synthase activity	0.0375 94	1
GO:0019102	male somatic sex determination	0.0375 94	1
GO:0019808	polyamine binding	0.0375 94	1
GO:0019809	spermidine binding	0.0375 94	1
GO:0021627	olfactory nerve morphogenesis	0.0375 94	1
GO:0021629	olfactory nerve structural organization	0.0375 94	1
GO:0030283	testosterone dehydrogenase [NAD(P)] activity	0.0375 94	1
GO:0030696	tRNA (m5U54) methyltransferase activity	0.0375 94	1
GO:0030697 GO:0009021	S-adenosylmethionine-dependent tRNA (m5U54) methyltransferase activity	0.0375 94	1
GO:0031704 GO:0042569	apelin receptor binding	0.0375 94	1
GO:0032307	negative regulation of prostaglandin secretion	0.0375 94	1
GO:0032448	DNA hairpin binding	0.0375 94	1
GO:0034158	toll-like receptor 8 signaling pathway	0.0375 94	1

GO:0035375	zymogen binding	0.0375 94	1
GO:0035545	determination of left/right asymmetry in nervous system	0.0375 94	1
GO:0035643	L-DOPA receptor activity	0.0375 94	1
GO:0035931	mineralocorticoid secretion	0.0375 94	1
GO:0035932	aldosterone secretion	0.0375 94	1
GO:0043152	induction of bacterial agglutination	0.0375 94	1
GO:0043540	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase complex	0.0375 94	1
GO:0045030	UTP-activated nucleotide receptor activity	0.0375 94	1
GO:0045720	negative regulation of integrin biosynthetic process	0.0375 94	1
GO:0046167	glycerol-3-phosphate biosynthetic process	0.0375 94	1
GO:0047012	sterol-4-alpha-carboxylate 3-dehydrogenase (decarboxylating) activity	0.0375 94	1
GO:0047015	3-hydroxy-2-methylbutyryl-CoA dehydrogenase activity	0.0375 94	1
GO:0047394	glycerophosphoinositol inositolphosphodiesterase activity	0.0375 94	1
GO:0047676	arachidonate-CoA ligase activity	0.0375 94	1
GO:0050121	N-acylglucosamine 2-epimerase activity	0.0375 94	1
GO:0050353	trimethyllysine dioxygenase activity	0.0375 94	1
GO:0051542	elastin biosynthetic process	0.0375 94	1
GO:0052629	phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate 3-phosphatase activity	0.0375 94	1
GO:0052657	guanine phosphoribosyltransferase activity	0.0375 94	1
GO:0052692	raffinose alpha-galactosidase activity	0.0375 94	1
GO:0060016	granulosa cell development	0.0375 94	1
GO:0060422	peptidyl-dipeptidase inhibitor activity	0.0375 94	1
GO:0060520	activation of prostate induction by androgen receptor signaling pathway	0.0375 94	1
GO:0060816	random inactivation of X chromosome	0.0375 94	1
GO:0060857	establishment of glial blood-brain barrier	0.0375 94	1
GO:0070370	cellular heat acclimation	0.0375 94	1
GO:0070615	nucleosome-dependent ATPase activity	0.0375 94	1
GO:0070846	Hsp90 deacetylation	0.0375 94	1
GO:0070974	POU domain binding	0.0375 94	1
GO:0071105	response to interleukin-11	0.0375 94	1
GO:0072544	L-DOPA binding	0.0375 94	1
GO:0090214	spongiotrophoblast layer developmental growth	0.0375 94	1
GO:0097228	sperm principal piece	0.0375 94	1
GO:0099174	regulation of presynapse organization	0.0375 94	1

GO:1901033	positive regulation of response to reactive oxygen species	0.0375 94	1
GO:1901096 GO:1902452	regulation of autophagosome maturation	0.0375 94	1
GO:1901300	positive regulation of hydrogen peroxide-mediated programmed cell death	0.0375 94	1
GO:1905206	positive regulation of hydrogen peroxide-induced cell death	0.0375 94	1
GO:2000331	regulation of terminal button organization	0.0375 94	1

APÊNDICE 7 – Análise de enriquecimento funcional do GO dos genes que sofreram perdas nas linhagens de gliomas tratadas com pisosterol. Foram considerados significantes, termos enriquecidos com $p < 0.05$.

GO ACCESSION	GO Term	p-value	Count in Selection
GO:0097159	organic cyclic compound binding	1.48E-04	34
GO:1901363	heterocyclic compound binding	1.14E-04	34
GO:0003676	nucleic acid binding	5.11E-09	33
GO:0051704 GO:0051706	multi-organism process	1.96E-11	28
GO:0000003 GO:0019952 GO:0050876	reproduction	1.97E-09	20
GO:0022414 GO:0044702	reproductive process	1.94E-09	20
GO:0019953	sexual reproduction	1.12E-12	19
GO:0044703	multi-organism reproductive process	2.96E-11	19
GO:0007276 GO:0009552	gamete generation	4.36E-13	18
GO:0007283	spermatogenesis	5.42E-15	18
GO:0032504	multicellular organism reproduction	1.16E-11	18
GO:0048232	male gamete generation	9.63E-15	18
GO:0048609	multicellular organismal reproductive process	7.31E-12	18
GO:0003723 GO:0044822	RNA binding	1.25E-05	13
GO:0008270	zinc ion binding	3.36E-04	13
GO:0006325 GO:0016568	chromatin organization	2.53E-05	10
GO:0051276 GO:0007001 GO:0051277	chromosome organization	3.97E-04	10
GO:0003006	developmental process involved in reproduction	6.95E-04	8
GO:0007548	sex differentiation	2.83E-06	8
GO:0009617 GO:0009618 GO:0009680	response to bacterium	4.25E-05	8
GO:0042742 GO:0042830	defense response to bacterium	9.35E-08	8
GO:0098542	defense response to other organism	1.30E-05	8
GO:0008406	gonad development	5.17E-06	7
GO:0045137	development of primary sexual characteristics	6.15E-06	7
GO:0048608	reproductive structure development	4.59E-04	7
GO:0061458	reproductive system development	4.74E-04	7
GO:0006323	DNA packaging	2.17E-05	6
GO:0006333	chromatin assembly or disassembly	1.12E-05	6
GO:0006334	nucleosome assembly	2.72E-06	6
GO:0007498	mesoderm development	3.03E-06	6
GO:0007506	gonadal mesoderm development	1.33E-14	6
GO:0031497	chromatin assembly	5.02E-06	6
GO:0034728	nucleosome organization	7.96E-06	6
GO:0060485	mesenchyme development	3.09E-05	6
GO:0065004	protein-DNA complex assembly	7.62E-06	6
GO:0071103	DNA conformation change	1.41E-04	6
GO:0071824	protein-DNA complex subunit organization	1.87E-05	6

APÊNDICE 8 – Anotação das vias gênicas significativas dos ganhos comuns a todos os tratamentos com pisosterol (0.5 µg/mL; 1.0 µg/mL e 1.8 µg/mL) das linhagens de gliomas.

Pathway	p-value	Matched Entitie
Hs_Ion_channel_transport_WP4098_93525	0.028435389	16
Hs_Ectoderm_Differentiation_WP2858_94911	0.03226543	12
Hs_miRNAs_involved_in_DNA_damage_response_WP1545_98356	2.18E-04	9
Hs_Rett_syndrome_causing_genes_WP4312_98050	0.006228569	7
Hs_RAB_geranylgeranylation_WP4071_93401	0.028685424	7
Hs_Gamma_carboxylation_hypusine_formation_and_arylsulfatase_activation_WP2762_94013	0.009436557	6
Hs_Nucleotide_Metabolism_WP404_68960	0.001561238	5
Hs_MyD88_dependent_cascade_initiated_on_endosome_WP2768_93914	0.006711947	5
Hs_miR-targeted_genes_in_adipocytes_-_TarBase_WP2001_82942	0.051209047	4
Hs_Receptor-type_tyrosine-protein_phosphatases_WP4046_93303	0.002518701	4
Hs_Simplified_Depiction_of_MYD88_Distinct_Input-Output_Pathway_WP3877_89291	0.050543364	3
Hs_ACE_Inhibitor_Pathway_WP554_96328	0.04360719	3
Hs_Estrogen_metabolism_WP697_96367	0.050543364	3
Hs_Pentose_phosphate_pathway_(hexose_monophosphate_shunt)_WP4050_93312	0.031285178	3
Hs_Glial_Cell_Differentiation_WP2276_97827	0.05166792	2
Hs_Wax_biosynthesis_WP3790_93755	0.012558822	2
putrescine degradation III	0.020278089	2
melatonin degradation II	0.047245845	1

APÊNDICE 8 – Análise de enriquecimento funcional do GO dos genes *up-regulated* nas linhagens de gliomas tratadas com pisosterol. Foram considerados significantes, termos enriquecidos com $p < 0.05$.

GO ACCESSION	GO Term	p-value	Count in Selection
GO:0034711 GO:0034712 GO:0048186 GO:0048187	inhibin binding	0.001703	1
GO:0015026 GO:0015027 GO:0015028	coreceptor activity	0.013557	1
GO:0005930 GO:0035085 GO:0035086	axoneme	0.016922	1
GO:0097014	ciliary plasm	0.016922	1
GO:0036064 GO:0005932	ciliary basal body	0.018602	1
GO:0030433	ubiquitin-dependent ERAD pathway	0.020278	1
GO:0070936	protein K48-linked ubiquitination	0.021952	1
GO:0036503	ERAD pathway	0.021952	1
GO:0005814	centriole	0.023624	1
GO:0004527 GO:0008857	exonuclease activity	0.025294	1
GO:0032838	plasma membrane bounded cell projection cytoplasm	0.030288	1
GO:0044450	microtubule organizing center part	0.035261	1
GO:0018279	protein N-linked glycosylation via asparagine	0.043313	1
GO:0018196	peptidyl-asparagine modification	0.043313	1
GO:0006487	protein N-linked glycosylation	0.04494	1
GO:0006260 GO:0055133	DNA replication	0.046565	1
GO:0044441 GO:0044442	ciliary part	0.046565	1

APÊNDICE 9 – Análise de enriquecimento funcional do GO dos genes *down-regulated* nas linhagens de gliomas tratadas com pisosterol. Foram considerados significantes, termos enriquecidos com $p < 0.05$.

GO ACCESSION	GO Term	p-value	Count in Selection
GO:0005488	binding	0.0500	18
GO:0050896 GO:0051869	response to stimulus	0.0062	14
GO:0031982 GO:0031988	vesicle	0.0005	13
GO:1901363	heterocyclic compound binding	0.0074	12
GO:0097159	organic cyclic compound binding	0.0078	12
GO:0043228	non-membrane-bounded organelle	0.0036	11
GO:0043232	intracellular non-membrane-bounded organelle	0.0036	11
GO:0043230	extracellular organelle	0.0032	10
GO:0070062	extracellular exosome	0.0032	10
GO:1903561	extracellular vesicle	0.0032	10
GO:0005615	extracellular space	0.0072	10
GO:0044421	extracellular region part	0.0083	10
GO:0005576	extracellular region	0.0142	10
GO:2000112	regulation of cellular macromolecule biosynthetic process	0.0196	9
GO:0006950	response to stress	0.0220	9
GO:0010556	regulation of macromolecule biosynthetic process	0.0229	9
GO:0031326	regulation of cellular biosynthetic process	0.0274	9
GO:0009889	regulation of biosynthetic process	0.0280	9
GO:0010468	regulation of gene expression	0.0483	9
GO:0006355 GO:0032583 GO:0045449 GO:0061019	regulation of transcription, DNA-templated	0.0337	8
GO:1903506	regulation of nucleic acid-templated transcription	0.0362	8
GO:2001141	regulation of RNA biosynthetic process	0.0365	8
GO:0005886 GO:0005904	plasma membrane	0.0435	8
GO:0051252	regulation of RNA metabolic process	0.0469	8
GO:0000166	nucleotide binding	0.0173	7
GO:1901265	nucleoside phosphate binding	0.0175	7
GO:0036094	small molecule binding	0.0267	7
GO:0043412	macromolecule modification	0.0376	7
GO:0005524	ATP binding	0.0062	6
GO:0032559	adenyl ribonucleotide binding	0.0070	6
GO:0030554	adenyl nucleotide binding	0.0073	6
GO:0008144	drug binding	0.0106	6
GO:0031410 GO:0016023	cytoplasmic vesicle	0.0160	6
GO:0097708	intracellular vesicle	0.0160	6
GO:0035639	purine ribonucleoside triphosphate binding	0.0163	6
GO:0032555	purine ribonucleotide binding	0.0179	6
GO:0017076	purine nucleotide binding	0.0187	6
GO:0032553	ribonucleotide binding	0.0189	6
GO:0097367	carbohydrate derivative binding	0.0321	6
GO:0000785 GO:0005717	chromatin	0.0012	5
GO:0044427	chromosomal part	0.0041	5
GO:0005694	chromosome	0.0064	5

GO:0051276 GO:0007001 GO:0051277	chromosome organization	0.0082	5
GO:0046983	protein dimerization activity	0.0109	5
GO:1902679	negative regulation of RNA biosynthetic process	0.0133	5
GO:1903507	negative regulation of nucleic acid-templated transcription	0.0133	5
GO:0051253	negative regulation of RNA metabolic process	0.0174	5
GO:0065003 GO:0006461	protein-containing complex assembly	0.0188	5
GO:0045934	negative regulation of nucleobase-containing compound metabolic process	0.0217	5
GO:0010558	negative regulation of macromolecule biosynthetic process	0.0237	5
GO:0031327	negative regulation of cellular biosynthetic process	0.0274	5
GO:0009890	negative regulation of biosynthetic process	0.0283	5
GO:0046982	protein heterodimerization activity	0.0025	4
GO:0000228	nuclear chromosome	0.0039	4
GO:0007596	blood coagulation	0.0081	4
GO:0050817	coagulation	0.0081	4
GO:0007599	hemostasis	0.0087	4
GO:0005215 GO:0005478	transporter activity	0.0108	4
GO:0042060	wound healing	0.0140	4
GO:0050878	regulation of body fluid levels	0.0153	4
GO:0055085	transmembrane transport	0.0156	4
GO:0009611 GO:0002245	response to wounding	0.0165	4
GO:0034622 GO:0043623	cellular protein-containing complex assembly	0.0168	4
GO:0006325 GO:0016568	chromatin organization	0.0209	4
GO:0009628	response to abiotic stimulus	0.0261	4
GO:1901700	response to oxygen-containing compound	0.0482	4
GO:0005102	signaling receptor binding	0.0500	4
GO:0060968	regulation of gene silencing	0.0000	3
GO:0006335	DNA replication-dependent nucleosome assembly	0.0002	3
GO:0034723	DNA replication-dependent nucleosome organization	0.0002	3
GO:0000183	chromatin silencing at rDNA	0.0003	3
GO:0032776	DNA methylation on cytosine	0.0003	3
GO:0006342 GO:0016440	chromatin silencing	0.0005	3
GO:0006305	DNA alkylation	0.0006	3
GO:0006306	DNA methylation	0.0006	3
GO:0044728	DNA methylation or demethylation	0.0007	3
GO:0006304	DNA modification	0.0010	3
GO:0045814	negative regulation of gene expression, epigenetic	0.0015	3
GO:0016458	gene silencing	0.0017	3
GO:0000786 GO:0005718	nucleosome	0.0020	3
GO:0006334	nucleosome assembly	0.0021	3
GO:0044815	DNA packaging complex	0.0021	3
GO:0031497	chromatin assembly	0.0025	3
GO:0065004	protein-DNA complex assembly	0.0026	3
GO:0034728	nucleosome organization	0.0028	3
GO:0006323	DNA packaging	0.0034	3
GO:0071824	protein-DNA complex subunit organization	0.0034	3
GO:0006333	chromatin assembly or disassembly	0.0036	3

GO:0032993	protein-DNA complex	0.0037	3
GO:0043414	macromolecule methylation	0.0037	3
GO:0040029	regulation of gene expression, epigenetic	0.0049	3
GO:0071103	DNA conformation change	0.0070	3
GO:0032259	methylation	0.0078	3
GO:0051090	regulation of DNA binding transcription factor activity	0.0142	3
GO:0009617 GO:0009618 GO:0009680	response to bacterium	0.0176	3
GO:0022857 GO:0005386 GO:0015563 GO:0015646 GO:0022891 GO:0022892	transmembrane transporter activity	0.0285	3
GO:0034220	ion transmembrane transport	0.0291	3
GO:0033993	response to lipid	0.0340	3
GO:0042493 GO:0017035	response to drug	0.0380	3
GO:0031347	regulation of defense response	0.0482	3
GO:0060674	placenta blood vessel development	0.0003	2
GO:0070971	endoplasmic reticulum exit site	0.0003	2
GO:0070507	regulation of microtubule cytoskeleton organization	0.0032	2
GO:0001892	embryonic placenta development	0.0045	2
GO:0035872	nucleotide-binding domain, leucine rich repeat containing receptor signaling pathway	0.0045	2
GO:0032886	regulation of microtubule-based process	0.0065	2
GO:0005216	ion channel activity	0.0083	2
GO:0022838	substrate-specific channel activity	0.0089	2
GO:0016323	basolateral plasma membrane	0.0096	2
GO:0015267 GO:0015249 GO:0015268	channel activity	0.0117	2
GO:0022803 GO:0022814	passive transmembrane transporter activity	0.0117	2
GO:0001890	placenta development	0.0140	2
GO:0009612	response to mechanical stimulus	0.0140	2
GO:0030660	Golgi-associated vesicle membrane	0.0164	2
GO:0051606	detection of stimulus	0.0164	2
GO:0006611 GO:0097349	protein export from nucleus	0.0181	2
GO:0051168	nuclear export	0.0209	2
GO:0005798	Golgi-associated vesicle	0.0238	2
GO:0043433	negative regulation of DNA binding transcription factor activity	0.0238	2
GO:0007178	transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway	0.0268	2
GO:0030522	intracellular receptor signaling pathway	0.0322	2
GO:0048568	embryonic organ development	0.0393	2
GO:0005769	early endosome	0.0417	2
GO:0003714	transcription corepressor activity	0.0456	2
GO:0001568	blood vessel development	0.0482	2
GO:0001502	cartilage condensation	0.0054	1
GO:0002133	polycystin complex	0.0054	1
GO:0007161	calcium-independent cell-matrix adhesion	0.0054	1
GO:0015234 GO:0015402 GO:0015403	thiamine transmembrane transporter activity	0.0054	1
GO:0031871	proteinase activated receptor binding	0.0054	1
GO:0033687	osteoblast proliferation	0.0054	1
GO:0035359	negative regulation of peroxisome proliferator activated receptor signaling pathway	0.0054	1
GO:0035517	PR-DUB complex	0.0054	1
GO:0042723	thiamine-containing compound metabolic process	0.0054	1

GO:0060236	regulation of mitotic spindle organization	0.0054	1
GO:0071934	thiamine transmembrane transport	0.0054	1
GO:0072014	proximal tubule development	0.0054	1
GO:0072017	distal tubule development	0.0054	1
GO:0072021	ascending thin limb development	0.0054	1
GO:0072044	collecting duct development	0.0054	1
GO:0072070 GO:0072018	loop of Henle development	0.0054	1
GO:0072156	distal tubule morphogenesis	0.0054	1
GO:0072205	metanephric collecting duct development	0.0054	1
GO:0072218	metanephric ascending thin limb development	0.0054	1
GO:0072234	metanephric nephron tubule development	0.0054	1
GO:0072235	metanephric distal tubule development	0.0054	1
GO:0072236	metanephric loop of Henle development	0.0054	1
GO:0072237	metanephric proximal tubule development	0.0054	1
GO:0072243	metanephric nephron epithelium development	0.0054	1
GO:0072282	metanephric nephron tubule morphogenesis	0.0054	1
GO:0072287	metanephric distal tubule morphogenesis	0.0054	1
GO:0090224	regulation of spindle organization	0.0054	1
GO:0098743	cell aggregation	0.0054	1
GO:2000567	regulation of memory T cell activation	0.0054	1
GO:2000568	positive regulation of memory T cell activation	0.0054	1
GO:0002484	antigen processing and presentation of endogenous peptide antigen via MHC class I via ER pathway	0.0108	1
GO:0002486	antigen processing and presentation of endogenous peptide antigen via MHC class I via ER pathway, TAP-independent	0.0108	1
GO:0003338	metanephros morphogenesis	0.0108	1
GO:0005247	voltage-gated chloride channel activity	0.0108	1
GO:0031657	regulation of cyclin-dependent protein serine/threonine kinase activity involved in G1/S transition of mitotic cell cycle	0.0108	1
GO:0031659	positive regulation of cyclin-dependent protein serine/threonine kinase activity involved in G1/S transition of mitotic cell cycle	0.0108	1
GO:0035358	regulation of peroxisome proliferator activated receptor signaling pathway	0.0108	1
GO:0035521	monoubiquitinated histone deubiquitination	0.0108	1
GO:0035522	monoubiquitinated histone H2A deubiquitination	0.0108	1
GO:0045323	interleukin-1 receptor complex	0.0108	1
GO:0048386	positive regulation of retinoic acid receptor signaling pathway	0.0108	1
GO:0048387	negative regulation of retinoic acid receptor signaling pathway	0.0108	1
GO:0051412	response to corticosterone	0.0108	1
GO:0060716	labyrinthine layer blood vessel development	0.0108	1
GO:0070498	interleukin-1-mediated signaling pathway	0.0108	1
GO:0072170	metanephric tubule development	0.0108	1
GO:0072173	metanephric tubule morphogenesis	0.0108	1
GO:0072176	nephric duct development	0.0108	1
GO:0072177	mesonephric duct development	0.0108	1
GO:0072207	metanephric epithelium development	0.0108	1
GO:0072210	metanephric nephron development	0.0108	1
GO:0072273	metanephric nephron morphogenesis	0.0108	1
GO:0072531	pyrimidine-containing compound transmembrane transport	0.0108	1
GO:1901474 GO:0045118	azole transmembrane transporter activity	0.0108	1
GO:0004704	NF-kappaB-inducing kinase activity	0.0161	1

GO:0005797	Golgi medial cisterna	0.0161	1
GO:0007250	activation of NF-kappaB-inducing kinase activity	0.0161	1
GO:0008308 GO:0022844	voltage-gated anion channel activity	0.0161	1
GO:0009925	basal plasma membrane	0.0161	1
GO:0016460	myosin II complex	0.0161	1
GO:0017080	sodium channel regulator activity	0.0161	1
GO:0035461	vitamin transmembrane transport	0.0161	1
GO:0042270	protection from natural killer cell mediated cytotoxicity	0.0161	1
GO:0042975	peroxisome proliferator activated receptor binding	0.0161	1
GO:0048385	regulation of retinoic acid receptor signaling pathway	0.0161	1
GO:0051385	response to mineralocorticoid	0.0161	1
GO:0060136	embryonic process involved in female pregnancy	0.0161	1
GO:0060428	lung epithelium development	0.0161	1
GO:0072558	NLRP1 inflammasome complex	0.0161	1
GO:0090482 GO:0051183	vitamin transmembrane transporter activity	0.0161	1
GO:0005149	interleukin-1 receptor binding	0.0214	1
GO:0005246	calcium channel regulator activity	0.0214	1
GO:0030881	beta-2-microglobulin binding	0.0214	1
GO:0035520	monoubiquitinated protein deubiquitination	0.0214	1
GO:0042608	T cell receptor binding	0.0214	1
GO:0045737	positive regulation of cyclin-dependent protein serine/threonine kinase activity	0.0214	1
GO:0051180	vitamin transport	0.0214	1
GO:0060170 GO:0020017	ciliary membrane	0.0214	1
GO:1901682	sulfur compound transmembrane transporter activity	0.0214	1
GO:1904031	positive regulation of cyclin-dependent protein kinase activity	0.0214	1
GO:0001916	positive regulation of T cell mediated cytotoxicity	0.0267	1
GO:0002480	antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen via MHC class I, TAP-independent	0.0267	1
GO:0002716 GO:0030102	negative regulation of natural killer cell mediated immunity	0.0267	1
GO:0017081	chloride channel regulator activity	0.0267	1
GO:0019885 GO:0048004	antigen processing and presentation of endogenous peptide antigen via MHC class I	0.0267	1
GO:0032494	response to peptidoglycan	0.0267	1
GO:0032495	response to muramyl dipeptide	0.0267	1
GO:0034405	response to fluid shear stress	0.0267	1
GO:0042612	MHC class I protein complex	0.0267	1
GO:0045178	basal part of cell	0.0267	1
GO:0045953	negative regulation of natural killer cell mediated cytotoxicity	0.0267	1
GO:0046697	decidualization	0.0267	1
GO:0046977	TAP binding	0.0267	1
GO:0072348	sulfur compound transport	0.0267	1
GO:0001911	negative regulation of leukocyte mediated cytotoxicity	0.0319	1
GO:0002483	antigen processing and presentation of endogenous peptide antigen	0.0319	1
GO:0005254	chloride channel activity	0.0319	1
GO:0009268	response to pH	0.0319	1
GO:0031342	negative regulation of cell killing	0.0319	1
GO:0042994	cytoplasmic sequestering of transcription factor	0.0319	1
GO:0045117	azole transport	0.0319	1

GO:0050716	positive regulation of interleukin-1 secretion	0.0319	1
GO:0050718	positive regulation of interleukin-1 beta secretion	0.0319	1
GO:0050982	detection of mechanical stimulus	0.0319	1
GO:0060711	labyrinthine layer development	0.0319	1
GO:0061702	inflammasome complex	0.0319	1
GO:0001829	trophoblast cell differentiation	0.0372	1
GO:0001914	regulation of T cell mediated cytotoxicity	0.0372	1
GO:0005253	anion channel activity	0.0372	1
GO:0005262	calcium channel activity	0.0372	1
GO:0007156	homophilic cell adhesion via plasma membrane adhesion molecules	0.0372	1
GO:0015108	chloride transmembrane transporter activity	0.0372	1
GO:0015459	potassium channel regulator activity	0.0372	1
GO:0019883	antigen processing and presentation of endogenous antigen	0.0372	1
GO:0038061	NIK/NF-kappaB signaling	0.0372	1
GO:0042974	retinoic acid receptor binding	0.0372	1
GO:0050704	regulation of interleukin-1 secretion	0.0372	1
GO:0050706	regulation of interleukin-1 beta secretion	0.0372	1
GO:0061333	renal tubule morphogenesis	0.0372	1
GO:0070423	nucleotide-binding oligomerization domain containing signaling pathway	0.0372	1
GO:0071347	cellular response to interleukin-1	0.0372	1
GO:0072028	nephron morphogenesis	0.0372	1
GO:0072078	nephron tubule morphogenesis	0.0372	1
GO:0072080	nephron tubule development	0.0372	1
GO:0072088	nephron epithelium morphogenesis	0.0372	1
GO:1902476	chloride transmembrane transport	0.0372	1
GO:0001570	vasculogenesis	0.0424	1
GO:0001825	blastocyst formation	0.0424	1
GO:0010824	regulation of centrosome duplication	0.0424	1
GO:0015103	inorganic anion transmembrane transporter activity	0.0424	1
GO:0015297 GO:0015300	antiporter activity	0.0424	1
GO:0016045 GO:0009598 GO:0009681	detection of bacterium	0.0424	1
GO:0016282	eukaryotic 43S preinitiation complex	0.0424	1
GO:0016578	histone deubiquitination	0.0424	1
GO:0031941	filamentous actin	0.0424	1
GO:0032570	response to progesterone	0.0424	1
GO:0032731	positive regulation of interleukin-1 beta production	0.0424	1
GO:0033290 GO:0016283	eukaryotic 48S preinitiation complex	0.0424	1
GO:0046605	regulation of centrosome cycle	0.0424	1
GO:0048806	genitalia development	0.0424	1
GO:0051220	cytoplasmic sequestering of protein	0.0424	1
GO:0060993	kidney morphogenesis	0.0424	1
GO:0061326	renal tubule development	0.0424	1
GO:0070993	translation preinitiation complex	0.0424	1
GO:0000920 GO:1902409 GO:2000695	cell separation after cytokinesis	0.0476	1
GO:0001731	formation of translation preinitiation complex	0.0476	1
GO:0005852	eukaryotic translation initiation factor 3 complex	0.0476	1

GO:0006821	chloride transport	0.0476	1
GO:0008656	cysteine-type endopeptidase activator activity involved in apoptotic process	0.0476	1
GO:0015085	calcium ion transmembrane transporter activity	0.0476	1
GO:0015238 GO:0015239 GO:0015559 GO:0015564 GO:0090484	drug transmembrane transporter activity	0.0476	1
GO:0016328	lateral plasma membrane	0.0476	1
GO:0021510	spinal cord development	0.0476	1
GO:0032732	positive regulation of interleukin-1 production	0.0476	1
GO:0045599	negative regulation of fat cell differentiation	0.0476	1
GO:0072009	nephron epithelium development	0.0476	1
GO:0098543	detection of other organism	0.0476	1
GO:0098661	inorganic anion transmembrane transport	0.0476	1