

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS CHAPECÓ
GRADUAÇÃO EM MEDICINA

HELAMÃ MORAES DOS SANTOS
KEYLLOR NUNES DOMANN

EXPRESSÃO GÊNICA DE BIOMARCADORES DE IMUNOSSUPRESSÃO EM
GLIOMAS DE BAIXO GRAU E GLIOBLASTOMAS

CHAPECÓ-SC
2025

HELAMÃ MORAES DOS SANTOS
KEYLLOR NUNES DOMANN

**EXPRESSÃO GÊNICA DE BIOMARCADORES DE IMUNOSSUPRESSÃO EM
GLIOMAS DE BAIXO GRAU E GLIOBLASTOMAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Medicina da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para obtenção do título de médico.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Sarah Franco Vieira de Oliveira Maciel

Co-orientadora: Prof^ª Dr^ª Débora Tavares de Resende e Silva

CHAPECÓ-SC

2025

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Santos, Helamã Moraes dos
EXPRESSÃO GÊNICA DE BIOMARCADORES DE IMUNOSSUPRESSÃO
EM GLIOMAS DE BAIXO GRAU E GLIOBLASTOMAS / Helamã Moraes
dos Santos, Keyllor Nunes Domann. -- 2025.
60 f.:il.

Orientadora: Dra Sarah Franco Vieira de Oliveira
Maciel

Co-orientadora: Dra Débora Tavares de Resende e Silva
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Bacharelado em Medicina, Chapecó, SC, 2025.

1. Glioblastoma. 2. Imunoterapia. 3. Sinalização
Purinérgica. I. Domann, Keyllor Nunes II. Maciel, Sarah
Franco Vieira de Oliveira, orient. III. Silva, Débora
Tavares de Resende e, co-orient. IV. Universidade
Federal da Fronteira Sul. V. Título.

HELAMÃ MORAES DOS SANTOS

KEYLLOR NUNES DOMANN

**EXPRESSÃO GÊNICA DE BIOMARCADORES DE IMUNOSSUPRESSÃO EM
GLIOMAS DE BAIXO GRAU E GLIOBLASTOMAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Medicina da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para obtenção do título de médico.

Este trabalho foi defendido e aprovado pela banca em 25/06/2025

BANCA EXAMINADORA



Profª Drª Sarah Franco Vieira de Oliveira Maciel - UFFS
Orientadora



Profª Drª Andreia Machado Cardoso - UFFS
Avaliadora



Profª Drª Francini Francescon - UDESC
Avaliadora

AGRADECIMENTOS

Aos nossos pais por seu amor e dedicação incomparáveis;

Às nossas amadas companheiras pelo amor e companhia durante a realização deste trabalho;

Aos grandes amigos que compartilharam dessa jornada conosco;

Aos mestres que tivemos, em especial às nossas orientadoras;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas e ao Grupo de Estudos de Tumores do Sistema Nervoso Central, pelo apoio no desenvolvimento deste estudo;

Por fim, ao apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) - Termo de Outorga 2023TR000960

Dedicamos este trabalho à comunidade científica e acadêmica da Universidade Federal da Fronteira Sul, em especial ao curso de Medicina e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas, aos quais somos eternamente gratos.

RESUMO

Os gliomas, representados pelos Gliomas de baixo grau (GBG) e Glioblastomas (GBM), compreendem o grupo de tumores malignos primários mais prevalentes do tecido nervoso, e apresentam uma evolução clínica crítica e de difícil prognóstico. Seu comportamento biológico está associado à indução de um estado anti-inflamatório e imunossupressor através da modulação de componentes do microambiente tumoral. A imunossupressão permite com que esses tumores escapem da vigilância imunológica, além de tornarem-se resistentes às imunoterapias. A via da Morte Celular Programada, representada pelos ligantes PD-1 e PD-L1, bem como o eixo adenosinérgico regulado pela tríade ADO-CD73-A2A, desempenham um papel importante na natureza imunomoduladora desses tumores. Este estudo investigou a expressão gênica dos biomarcadores de imunossupressão PD-L1 (*CD274*) e CD73 (*NT5E*) em GBG e GBM, bem como a correlação entre esses marcadores e seu potencial prognóstico. Foram analisadas amostras tumorais de pacientes com GBG (n=17) e GBM (n=19) para quantificar os níveis de expressão gênica por RT-qPCR. Os resultados

revelaram que a expressão de PD-L1 não apresentou diferença estatisticamente significativa entre GBG e GBM (mediana de 0,539 e 1,856, respectivamente; $p=0,922$). Similarmente, a expressão de CD73 mostrou medianas de 0,956 para GBG e 0,252 para GBM, sem significância estatística ($p=0,070$). Contudo, uma correlação positiva forte e estatisticamente significativa foi observada entre PD-L1 e CD73 em GBM ($r=0,714$; $p=0,003$), enquanto em GBG a correlação foi não significativa ($p=0,255$). Esses achados sugerem que, no GBM, as vias imunossupressoras mediadas por PD-L1 e CD73 podem atuar de forma interdependente, indicando um microambiente tumoral mais imunossupressor. A co-expressão desses biomarcadores em GBM pode ter implicações para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas combinadas, visando múltiplos checkpoints imunológicos para otimizar a resposta ao tratamento.

Palavras-chave: Glioblastoma. Imunoterapia. PD-L1. Sinalização Purinérgica. CD73.

ABSTRACT

Gliomas, represented by low-grade gliomas (LGG) and glioblastomas (GBM), constitute the most prevalent group of primary malignant tumors of nervous tissue, exhibiting a critical clinical course and poor prognosis. Their biological behavior is associated with the induction of an anti-inflammatory and immunosuppressive state through the modulation of tumor microenvironment components. Immunosuppression allows these tumors to evade immune surveillance and become resistant to immunotherapies. The Programmed Cell Death pathway, represented by the PD-1 and PD-L1 ligands, as well as the adenosinergic axis regulated by the ADO-CD73-A2A triad, play a significant role in the immunomodulatory nature of these tumors. This study investigated the gene expression of the immunosuppressive biomarkers PD-L1 (CD274) and CD73 (NT5E) in LGG and GBM, as well as the correlation between these markers and their potential prognostic value. Tumor samples from patients with LGG ($n=17$) and GBM ($n=19$) were analyzed to quantify gene expression levels using RT-qPCR. The results revealed that PD-L1 expression showed no statistically significant difference

between LGG and GBM (median values of 0.539 and 1.856, respectively; $p=0.922$). Similarly, CD73 expression had medians of 0.956 for LGG and 0.252 for GBM, without statistical significance ($p=0.070$). However, a strong and statistically significant positive correlation was observed between PD-L1 and CD73 in GBM ($r=0.714$; $p=0.003$), while in LGG the correlation was not significant ($p=0.255$). These findings suggest that, in GBM, the immunosuppressive pathways mediated by PD-L1 and CD73 may act interdependently, indicating a more immunosuppressive tumor microenvironment. The co-expression of these biomarkers in GBM may have implications for the development of combined therapeutic strategies targeting multiple immune checkpoints to optimize treatment response.

Keywords: Glioblastoma. Immunotherapy. PD-L1. Purinergic signaling. CD73.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Via PD-1/PD-L1 e o papel do ICI	21
Figura 02 - Representação esquemática da Sinalização Purinérgica	24
Figura 03 - Representação do eixo adenosinérgico no contexto tumoral	25
Figura 04 - Análise comparativa da expressão gênica em amostras de GBG e GBM	34
Figura 05 - Correlação entre a expressão de CD73 e PD-L1 em amostras de GBG e GBM	35
Figura 06 - Expressão de CD274/NT5E e prognóstico de pacientes com GBM	36

LISTA DE QUADROS

Quadro 01 - Sequência dos primers *forward e reverse* para os genes alvos e de referência 31

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Características gerais da amostra de pacientes dos grupos de GBG e GBM 33

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES

A2A	Receptor de Adenosina Tipo 2A
ACTB	Actina Beta
ADO	Adenosina
ADP	Adenosina Difosfato
AMP	Adenosina Monofosfato
ATP	Adenosina Trifosfato
CD73	Ecto-5'-nucleotidase

CD39	Ectonucleosídeo difosfohidrolases trifosfato
CD274	Gene codificador de PD-L1
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor (Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico)
EMT	Epithelial-Mesenchymal Transition (Transição Epitelial-Mesenquimal)
FFPE	Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (Formol-Fixado e Embebido em Parafina)
GBG	Gliomas de Baixo Grau
GBM	Glioblastoma
GIC	Glioma Initiating Cells (Células iniciadas por glioma)
GLOBOCAN	Global Cancer Observatory (Observatório Global do Câncer)
GSC	Glioma Stem-like Cells (Células-tronco Semelhantes a Gliomas)
HIF-1	Hypoxia-Inducible Factor 1 (Fator Induzível por Hipóxia 1)
hFSRT	Hipofracionamento Estereotáxico da Radioterapia
ICI	Inibidores de Checkpoint Imunológico
IDH	Isocitrato Desidrogenase
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
LITT	Laser Interstitial Thermal Therapy (Terapia térmica intersticial a laser)
MAT	Microambiente Tumoral
MDSCs	Myeloid-Derived Suppressor Cells (Células Supressoras Mieloides Derivadas)
MEK/ERK	Mitogen-Activated Protein Kinase/Extracellular Signal-Regulated Kinase (Proteína quinase ativadora de mitógeno/Quinase reguladora de sinal extracelular)
MGMT	O6-Metilguanina-DNA-Metiltransferase
MMP	Metaloproteinases
MMR	Mismatch Repair (Reparo de Mismatch)
MSI	Microsatellite Instability (Instabilidade de Microssatélites)

NT5E	Gene que codifica CD73
NSCLC	Non-Small Cell Lung Cancer (Câncer de Pulmão de Não Pequenas Células)
PD-1	Programmed Cell Death Protein 1
PD-L1	Programmed Death-Ligand 1
PFI	Progression-Free Interval (Intervalo Livre de Progressão)
PFS	Progression-free survival (Sobrevida livre de progressão)
QT	Quimioterapia
RT	Radioterapia
RT-qPCR	Reações de PCR quantitativa em tempo real
SG	Sobrevida geral
SLP	Sobrevida livre de progressão
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TIL	Tumor-Infiltrating Lymphocytes (Linfócitos infiltrantes de tumor)
TMZ	Temozolomida
TERT	Telomerase Reverse Transcriptase (Telomerase transcriptase reversa)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	16
2.1	OBJETIVO GERAL	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3	REVISÃO DA LITERATURA	17
3.1	TUMORES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL	17
3.2	GLIOMAS DE BAIXO GRAU E GLIOBLASTOMAS	18

3.3 A VIA DA MORTE CELULAR PROGRAMADA E OS INIBIDORES DE CHECKPOINT IMUNOLÓGICO	20
3.4 O CENÁRIO DA IMUNOTERAPIA COM ICI PARA O GBM	22
3.5 O CD73 E A CASCATA PURINÉRGICA	24
3.6 A IMUNOSSUPRESSÃO E A RESISTÊNCIA TERAPÊUTICA	27
4 METODOLOGIA	29
4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO	29
4.2 COLETA E ARMAZENAMENTO DO TECIDO TUMORAL	29
4.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-qPCR	30
4.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO PD-L1 (CD274) E CD73 (NT5E) NA BASE DE BANCO DE BIÓPSIAS DO TCGA	31
4.6 ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS	32
5 RESULTADOS	33
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	33
5.3 EXPRESSÃO GÊNICA DE PD-L1 (CD274) E CD73 (NT5E) EM GBG E GBM	34
5.4 ANÁLISE DA CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO GÊNICA DE PD-L1 (CD274) E CD73 (NT5E)	35
5.5 EXPRESSÃO DO PD-L1 (CD274) E CD73 (NT5E) NA BASE DE BANCO DE BIÓPSIAS DO TCGA	35
6 DISCUSSÃO	37
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
REFERÊNCIAS	41
ANEXO I	50
ANEXO II	56

1 INTRODUÇÃO

Os gliomas são os tumores mais prevalentes do Sistema Nervoso Central (SNC). Trata-se de um conjunto heterogêneo de doenças, representando mais de um quarto dos tumores primários deste sítio, com cerca de 80% dos casos de malignidade (Ostrom et al., 2020). Acometem, em sua maioria, indivíduos adultos, a partir dos 40 anos, e a depender de sua apresentação histológica, pode evoluir com elevada agressividade e infiltrabilidade no parênquima cerebral, com alto risco de recidivas e baixas taxas de sobrevida, correspondentes a menos de 2 anos em determinados casos (Girardi et al., 2023).

A natureza destes tumores é variável devido às suas características intrínsecas, apresentando diferentes comportamentos biológicos e desfechos clínicos. Com destaque, seu potencial altamente invasivo com proliferação disseminada permite uma recorrência após a remoção cirúrgica do tumor (Seker-Polat *et al.*, 2022). Possui uma resistência às terapias convencionais associada à modulação do microambiente tumoral (MAT), que representa uma importante barreira no tratamento deste tipo de tumor (Dymova *et al.*, 2021).

A criação de um MAT com um estado imunossupressor é uma marca intrínseca do câncer (Hanahan, 2022). Atualmente, sabe-se que os Gliomas, sobretudo o Glioblastoma (GBM) induz à esta imunossupressão resultando na exaustão dos linfócitos infiltrantes de tumor (TIL, do inglês *Tumor-Infiltrating Lymphocytes*), hipóxia local e inativação das populações de células de resposta inata e adaptativa, favorecendo sua progressão e posterior disseminação (Kalluri, Shah, Lim; 2023).

A via da Morte Celular Programada (Lu, Du, Kong; 2020) e a via adenosinérgica (Kang *et al.*, 2023) são mecanismos utilizados na evasão imune em diversos tumores, inclusive no GBM. Nesse sentido, as moléculas que compõem estas sinalizações possuem o potencial de tornarem-se biomarcadores de prognóstico, podendo predizer, com elevado grau de confiabilidade, complicações e desfechos clínicos que podem orientar um manejo terapêutico mais individualizado e preciso para cada paciente (Vranic, Gatalica, 2023).

O GBM e suas respectivas características estão sendo amplamente discutidas dada a complexidade do tecido em que estão inseridos e seu impacto na qualidade de vida dos indivíduos afetados. Este trabalho atua na vertente de investigar seus mecanismos fisiopatológicos e seu cenário imunológico, contribuindo para o desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico e terapêutica cada vez mais específicas e assertivas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os níveis de expressão gênica do PD-L1 e de CD73, sua correlação e potencial preditor de prognóstico em amostras tumorais de pacientes com Gliomas de Baixo Grau (GBG) e GBM.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Caracterizar a amostra e suas propriedades clínico-epidemiológicas;
- b) Correlacionar a expressão gênica do PD-L1 e de CD73 no MAT com os parâmetros clínico-patológicos;
- c) Comparar os níveis de expressão gênica do CD73 e do PD-L1 no GBM e sua correlação com os respectivos desfechos clínicos - sobrevida livre de progressão e sobrevida geral -, bem como seu potencial preditor de prognóstico.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 TUMORES DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

As neoplasias do SNC são um grupo diversificado de tumores, capazes de se manifestar em diferentes faixas-etárias e atingir qualquer região do cérebro ou medula espinhal (Mendes; Ongaratti; Lima, 2014). Essas neoplasias podem se manifestar de maneiras clínico-biológicas muito distintas, abrangendo desde formas com desenvolvimento gradual até formas altamente agressivas (Deangelis; Wen, 2024).

Além disso, essas neoplasias são classificadas fundamentalmente conforme sua origem: as primárias, que surgem de células neurais ou gliais (como astrocitomas, incluindo o GBM) ou no tecido conjuntivo adjacente, como os meningiomas; e as secundárias, resultantes, principalmente, de metástases de carcinomas pulmonares, mamários ou melanomas (Deangelis; Wen, 2024).

Esse grupo heterogêneo de tumores cerebrais apresenta incidências variadas conforme a idade e o sexo. De acordo com o Observatório Global do Câncer (em inglês, *Global Cancer Observatory* - GLOBOCAN), a taxa de incidência mundial dos tumores cerebrais é de 3,9% de todos os cânceres, ajustados por idade, conforme a população padrão mundial (Bray *et al.*, 2024). Além disso, há uma maior incidência global em homens (3,9 vs. 3,1/100.000), sendo que os GBM acometem mais o sexo masculino, enquanto os meningiomas acometem mais o sexo feminino (Price *et al.*, 2024).

Ademais, em crianças (0-14 anos), há um predomínio de tumores primários (97%), sendo os gliomas os principais tipos (45%), dentre estes, o astrocitoma é o subtipo histopatológico mais prevalente (15%). Já em adolescentes (15-19 anos), o principal subtipo são os tumores da hipófise, representando 34,6% dos casos, seguido pelos gliomas, que correspondem a 29,2% dos diagnósticos nessa faixa etária (Ostrom *et al.*, 2022).

Em jovens adultos, o sexo mais acometido é o feminino (60%), com tumores da hipófise sendo os mais prevalentes (36%), seguido pelos meningiomas (16%) e GBG (25%), como astrocitomas difusos e oligodendrogliomas (Price *et al.*, 2024).

Adultos mais velhos, acima dos 40 anos, apresentam uma taxa de incidência global de tumores primários malignos e não malignos de 46/100.000, sendo uma proporção maior de não malignos (36 vs 11/100.000). O subtipo mais comumente encontrado nessa faixa etária é o GBM, com uma incidência de 21/100.000 (Price *et al.*, 2024)

Por fim, a Classificação de Tumores do SNC da Organização Mundial da Saúde (OMS), publicada em 2021, organiza os tumores cerebrais com base em características histológicas e moleculares. Entre os grupos mais comuns estão os gliomas, meningiomas e ependimomas, além de tumores da região pineal e da hipófise, bem como metástases. Sendo que cada tipo é caracterizado pela localização típica, tipo celular predominante e mutações genéticas associadas, como alterações nos genes Isocitrato Desidrogenase 1 e 2 (IDH, do inglês, *Isocitrate Dehydrogenase*), codeleção 1p/19q e o status do promotor da telomerase transcriptase reversa (TERT, do inglês *telomerase reverse transcriptase*). A classificação também inclui um sistema de graduação (grau 1 a 4) para indicar a agressividade e o potencial de progressão clínica do tumor (Louis *et al.*, 2021).

3.2 GLIOMAS DE BAIXO GRAU E GLIOBLASTOMAS

Os gliomas são as neoplasias primárias malignas mais comuns do cérebro e, com base na sua linhagem neuronal, são divididos em astrocitomas, oligodendrogliomas, ependimomas, entre outros. Segundo a classificação da OMS, os tumores originários dos astrócitos, astrocitomas, podem ser divididos em quatro graus prognósticos (I a IV), de acordo com seu grau de malignidade e agressividade, sendo os dois primeiros (I e II) considerados de baixo grau (GBG), e os dois últimos (III e IV) de alto grau (Deangelis, Wen, 2024; Louis *et al.*, 2021; Togao *et al.*, 2016).

Nesse sentido, os astrocitomas de grau I (como o astrocitoma pilocítico) e II são tumores de crescimento lento e geralmente bem diferenciados, com baixo potencial de agressão. Já os astrocitomas de grau III (astrocitoma anaplásico) e IV (GBM) são neoplasias mais agressivas e com maior potencial de invasão. Os GBM, por sua vez, são os tumores malignos mais comuns entre as neoplasias cerebrais primárias, caracterizados por serem tumores altamente infiltrativos que se apresentam como massas em anel, com necrose central e edema circundante, além de apresentarem alterações moleculares específicas como mutações nos genes IDH e amplificação do gene EGFR (do inglês, *Epidermal Growth Factor Receptor*) (Deangelis, Wen, 2024; Louis *et al.*, 2021; Togao *et al.*, 2016).

Ademais, os gliomas são os tumores intra cerebrais primários mais comuns, conforme supramencionado, simbolizando 26,3% de todas as neoplasias do cérebro, sendo o subtipo mais comum o GBM, que representa 14,2% das neoplasias e 50,9% dos tumores malignos (Deangelis, Wen, 2024; Ostrom *et al.*, 2022). Além disso, de acordo com os dados do Central

Brain Tumor Registry of the United States (CBTRUS) de 2016 a 2020, os tumores primários do cérebro representam uma média anual de 17.206 mortes, com uma taxa de mortalidade ajustada por idade de 4,42/100.000 habitantes. No que se refere aos GBM, apresentam uma taxa de mortalidade específica de cerca de 3,2/100.000, o que representa aproximadamente 51% das mortes por tumores malignos do SNC. Também, a taxa de sobrevivência relativa em cinco anos para esse tipo de tumor foi de 6,9%, com uma sobrevida de cerca de 9 meses, o que evidencia a agressividade dos GBM (Price *et al.*, 2024).

O diagnóstico de gliomas de alto grau é feito com uma combinação de neuroimagem avançada, análise histopatológica e perfil molecular. O padrão ouro para imagem neurológica é com ressonância magnética com contraste de gadolínio, evidenciando o realce anelar, necrose central e edema perilesional em sequências T1, T2/FLAIR e perfusão, comumente localizados no lobo frontal ou temporal (Louis *et al.*, 2021; Mckinnon *et al.*, 2021).

A análise histopatológica, obtida por biópsia ou ressecção cirúrgica, revela características típicas, como necrose e proliferação microvascular, enquanto a análise molecular avalia mutações nos genes IDH1 e IDH2, metilação da enzima O6-metilguanina-DNA-metiltransferase (MGMT) e a amplificação do gene EGFR. Essa combinação de metodologias para o diagnóstico preciso são essenciais para a classificação correta do tumor e a melhor orientação terapêutica (Louis *et al.*, 2021; Mckinnon *et al.*, 2021).

A agressividade do GBM torna o seu tratamento desafiador e o seu prognóstico limitado. As diretrizes atuais recomendam a ressecção cirúrgica máxima, com o objetivo de controlar a carga tumoral e obter tecido para a análise histopatológica, seguida por radioterapia (RT) associada à administração concomitante de Temozolomida (TMZ) - fármaco que age nas células com metilação do promotor de MGMT, o que contribui para o controle da doença e a melhora das funções neurológicas. O tratamento adjuvante subsequente depende da idade e do desempenho funcional do paciente, sendo o protocolo padrão para indivíduos com menos de 70 anos a continuidade da TMZ por seis ciclos mensais. Para pacientes com mais de 70 anos é recomendado um regime de 3 semanas (Deangelis, Wen, 2024; Mckinnon *et al.*, 2021; Yalamarty *et al.*, 2023).

Os principais fatores prognósticos consistem em idade avançada, ausência de mutações no IDH, promotor de MGMT não metilado, baixo desempenho funcional e impossibilidade de ressecção tumoral completa. A presença da mutação no gene IDH (IDH-mutante) está associada a uma sobrevida significativamente maior em comparação ao subtipo IDH wild-type, com média de 3 a 5 anos versus 8 a 9 meses, respectivamente.

Entretanto, esse tipo de mutação só ocorre em cerca de 10% dos casos, sendo o segundo subtipo o mais comum entre os GBM (Brown, Ottaviani, Tazare, 2022; Deangelis, Wen, 2024; Della Monica *et al.*, 2022).

De forma complementar, a metilação do promotor da MGMT também está associada à melhor resposta à TMZ e aumento da sobrevida, ou seja, pacientes com tumores MGMT-metilados tendem a ter melhor resposta à quimioterapia, uma vez que a metilação reduz a expressão da enzima reparadora, tornando as células tumorais mais suscetíveis ao dano induzido pela TMZ. A sobrevida geral de pacientes MGMT-metilados é de aproximadamente 22 meses, em contraste com 15 meses entre aqueles com promotor não metilado (Brown, Ottaviani, Tazare, 2022; Deangelis, Wen, 2024; Della Monica *et al.*, 2022).

Entretanto, mesmo após o tratamento ideal, os GBM sempre sofrem recidiva, o que representa um grande desafio terapêutico. Essa resistência ao tratamento decorre tanto de fatores intrínsecos quanto extrínsecos ao tumor. Entre os fatores intrínsecos, destacam-se os tumores com promotores de MGMT não metilados, conforme supramencionado, e a heterogeneidade intratumoral, caracterizada por subpopulações de células geneticamente distintas (Goenka, Tiek, Song *et al.*, 2021; Yalamarty, Filipczak, Li *et al.*, 2023)

Quanto aos fatores extrínsecos, a hipóxia tumoral exerce papel central. Ou seja, a redução da oxigenação, decorrente do crescimento tumoral desorganizado e da insuficiente vascularização, prejudica a eficácia da RT, uma vez que oxigênio potencializa o efeito letal das radiações ionizantes. Outrossim, o microambiente imunossupressor favorece a evasão das células tumorais ao sistema imune, dificultando ainda mais a resposta ao tratamento e aumentando assim as taxas de recorrência (Goenka, Tiek, Song *et al.*, 2021; Yalamarty, Filipczak, Li *et al.*, 2023).

3.3 A VIA DA MORTE CELULAR PROGRAMADA E OS INIBIDORES DE CHECKPOINT IMUNOLÓGICO

A via da Morte Celular Programada, representada principalmente pelos receptores de membrana *Programmed-Cell Death 1* (PD-1) e *Programmed-Cell Death Ligand* (PD-L1), tem recebido atenção significativa no contexto do câncer (Tang *et al.*, 2022). Esses receptores são expressos em vários tecidos e, em condições homeostáticas, atuam na prevenção de distúrbios autoimunes e permitindo a autotolerância imunológica (He, Xu; 2020).

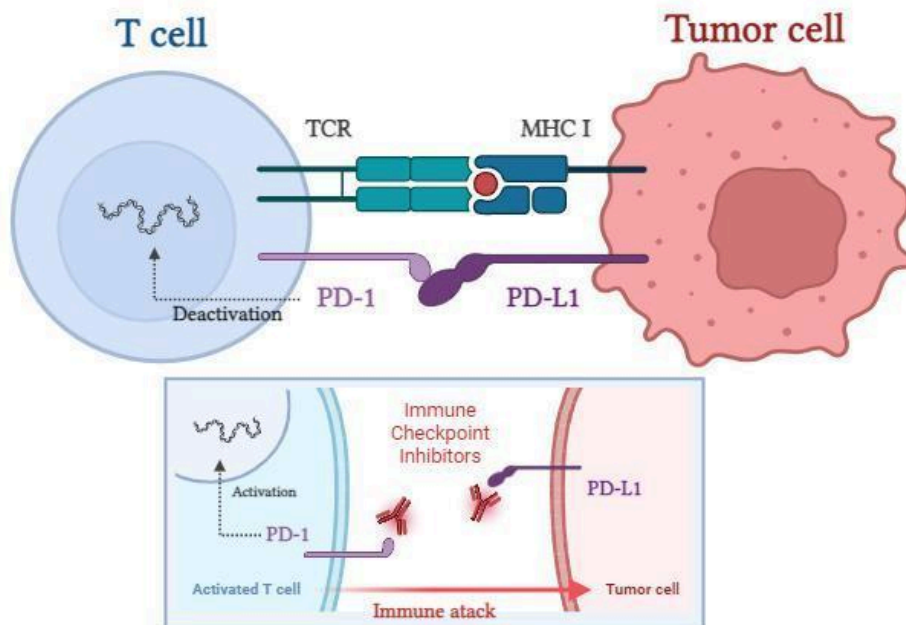
No GBM, células tumorais reguladas pelo interferon-gama (IFN- γ) expressam o receptor PD-L1 (B7-H1; *CD274*), que interage com o PD-1 (*CD279*), presente nas células do

sistema imune, principalmente células T e B ativadas, emitindo um sinal co-inibitório, reproduzindo múltiplos efeitos como a inibição da proliferação e ativação de clones de células TCD8+ (conforme demonstrado na Figura 01), diminuição da população de células *Natural-Killers* (NK) e estimulação de células T regulatórias (Treg) (Mahmoud *et al.*, 2022).

Os Inibidores de Checkpoint Imunológico (ICI) são anticorpos monoclonais que atuam bloqueando essa interação, impedindo a inativação dos linfócitos T e permitindo que eles realizem sua atividade antitumoral (Kumar *et al.*, 2023). Apesar dos avanços na aplicação clínica da imunoterapia em vários tipos de tumores, ainda não há taxas de resposta satisfatórias em todos eles, e em alguns pacientes foi observada resistência terapêutica após respostas iniciais (Goldberg, 2019).

A ampla heterogeneidade celular imune no MAT pode contribuir para o estado geral de imunossupressão. Os macrófagos associados a tumores (TAM) desempenham diversas funções, como a secreção de fatores anti-inflamatórios, como as interleucinas (IL) 1 e 10 (IL-1 e IL-10) e o fator de crescimento tumoral beta (TGF- β), promovendo o aumento da atividade do eixo PD-1/PD-L1 (Codrici *et al.*, 2022; Fanelli *et al.*, 2021).

Figura 01 - Via PD-1/PD-L1 e o papel do ICI



Legenda: Mecanismo de evasão tumoral via PD-1/PD-L1 e ação dos ICI, que restauram a resposta das células T contra o tumor. TCR = Receptor de Células T; MHC I = Complexo Principal de Histocompatibilidade tipo 1.

Fonte: Elaborado pelos autores (2025)

A presença discreta de células TCD8⁺ é uma característica do GBM, com aumento significativo após exposição à quimioterapia (QT) e RT. A concentração de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) está diretamente correlacionada com a expressão de PD-L1 pelas células tumorais, em que foi encontrada uma associação entre esses marcadores e um pior prognóstico em um grupo de pacientes (Shadbad *et al.*, 2021). Em tumores recorrentes após tratamento, foi encontrada uma expressão aumentada dos marcadores CD8⁺, CD68⁺, CD3⁺ e PD-L1 em uma comparação pareada com os tumores primários (Loussouarn *et al.*, 2023).

Ao contrário de outros tipos de tumores, o GBM tem uma baixa carga mutacional e, portanto, há menos produção de neoantígenos, induzindo uma menor migração de TILs, contribuindo para o “MAT frio”. Este é um dos principais fatores que influenciam a baixa resposta imunoterapêutica (Miller *et al.*, 2023). A QT e a RT tem o potencial de induzir um fenótipo hipermutante no GBM, gerando assim um espectro expandido de neoantígenos, o que justifica o enriquecimento de TILs em tumores refratários (Touat *et al.*, 2020). Em pacientes com GBM recorrente, apenas alguns pacientes demonstram um bom resultado clínico com o uso de ICI (Filley, Henriquez, Dey; 2017).

Um estudo anterior de Hutarew e outros (2022) investigou a regulação genética no GBM por meio de análises moleculares de 20 amostras de tumores fixadas em formalina e embebidas em parafina (FFPE), e descobriu que as amostras que apresentaram hipometilação e consequente maior ativação genética, estavam diretamente associados a altas taxas de expressão de PD-L1, o que indica a importância de uma maior elucidação dos mecanismos moleculares e epigenéticos subjacentes à via PD-1/PD-L1 nesses tumores.

3.4 O CENÁRIO DA IMUNOTERAPIA COM ICI PARA O GBM

Como mencionado anteriormente, devido a natureza “fria” e baixa infiltração linfocitária, os ensaios clínicos com pacientes com GBM, sejam eles recém-diagnosticados ou refratários, não alcançam bons resultados como visto em outros tipos de câncer, como melanoma e câncer de pulmão não pequenas células (NSCLC) (Ng *et al.*, 2024; Jain, Vashist, Panjiyar; 2023). Apesar dos cenários adversos, diferentes metodologias estão sendo investigadas para melhorar a eficácia dos ICI na terapia anti-GBM, para entender os fatores intrínsecos que promovem a falha terapêutica (Salvato, Marchini; 2024).

O Nivolumabe é um agente anti-PD-1 e tem sido o medicamento mais testado para o tratamento do GBM. O Checkmate-143 foi um estudo pioneiro que avaliou a eficácia do

Nivolumabe, e não se observou melhora significativa na sobrevida global (SG) em pacientes tratados com o ICI em monoterapia quando comparados com aqueles tratados com um medicamento anti-Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Reardon *et al.*, 2017).

Em regimes combinados, o Nivolumabe foi testado em outros dois estudos de fase III: o CheckMate 498 e o CheckMate 548. No primeiro, pacientes recém-diagnosticados com MGMT não metilado com o uso de Nivolumabe associado à RT não demonstraram nenhuma melhora em comparação ao grupo que realizou o protocolo Stupp (TMZ e RT). No segundo estudo, por sua vez, foram selecionados pacientes com metilação de MGMT, combinando Nivolumabe com TMZ e RT, e não encontraram melhora significativa em comparação ao grupo controle (Omuro *et al.*, 2023; Lim *et al.*, 2022).

O Nivolumabe no contexto neoadjuvante não demonstrou nenhum benefício clínico imediato, no entanto, no acompanhamento de longo prazo, os pacientes apresentaram taxas de sobrevida livre de progressão (PFI, do inglês *Progression-Free interval*) superiores a 30 meses. As melhores taxas de SLP foram associadas à presença de metilação do MGMT (Schalper *et al.*, 2019).

Uma proposta de metodologia alternativa foi realizada no estudo Glitipni, que investigou os efeitos da administração de Nivolumabe por meio de injeções intracranianas intraoperatórias (TII). A aplicação de TII demonstrou maior segurança e tolerabilidade com menor incidência de efeitos adversos quando comparada à administração intravenosa, no entanto, não houve melhora na PFI. Este modelo requer mais evidências para reforçar seus resultados (Duerinck *et al.*, 2021).

O ensaio KEYNOTE-028 utilizou Pembrolizumabe sozinho em pacientes com GBM recorrente. As taxas de resposta total da população do estudo foram discretas (8%), mas apresentaram resultados otimistas com melhora da SG em mais da metade dos pacientes, demonstrando um potencial antitumoral sustentado em longo prazo (Reardon *et al.*, 2021).

Apesar de serem abordagens menos utilizadas, o bloqueio de PD-L1 também está sendo investigado, especialmente em propostas de terapias combinadas. Em um grupo de pacientes com GBM recorrente, um ensaio clínico testou Avelumab em combinação com Axitinib, um inibidor seletivo da tirosina quinase para receptores do VEGF. Ele foi interrompido porque não atingiu uma taxa de sobrevida livre de progressão (PFS, do inglês *Progression-free survival*) satisfatória nos primeiros 6 meses da investigação (Neyns *et al.*, 2019).

Outro ensaio clínico de fase I, em pacientes com GBM recorrente, comparou Avelumab sozinho com outro grupo tratado com Avelumab após sessões de terapia térmica

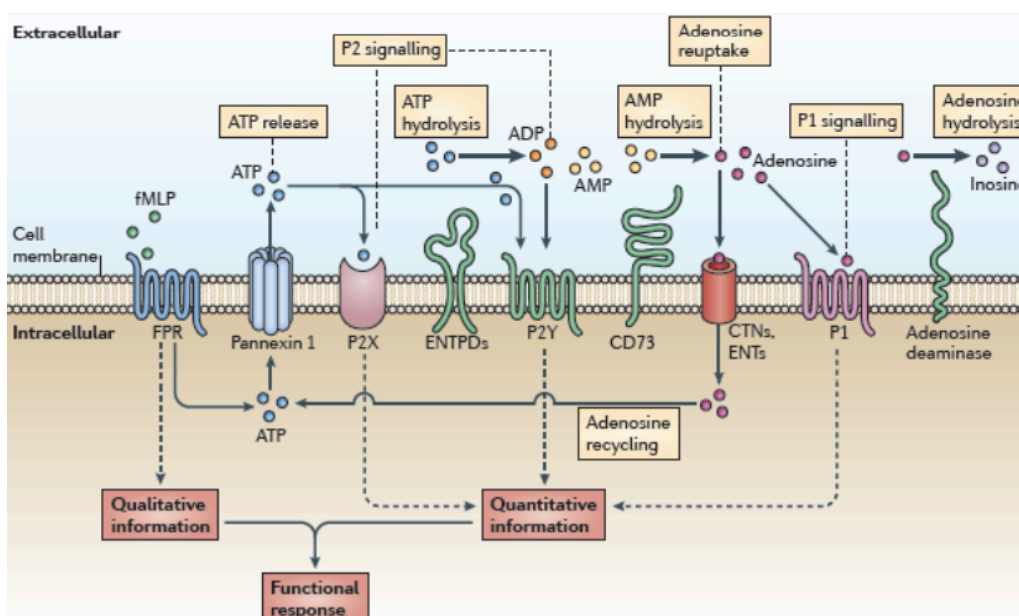
intersticial a laser guiada por ressonância magnética (LITT). Infelizmente, a combinação aumentou a toxicidade do tecido sem melhorar significativamente a PFS (Chiu *et al.*, 2023).

Durvalumab combinado com RT demonstrou um ligeiro aumento na sobrevida em indivíduos com GBM recém-diagnosticado com MGMT não metilado (Reardon *et al.*, 2019). Da mesma forma, a associação com a técnica de RT estereotáxica hipofracionada (hFSRT), em pacientes com GBM recorrente, mostrou boa tolerabilidade nos resultados iniciais (Pouessel *et al.*, 2023).

3.5 O CD73 E A CASCATA PURINÉRGICA

A sinalização purinérgica é um sistema de comunicação extracelular mediada por purinas, enzimas transmembranares e receptores. Em resumo, é impulsionada pela atividade das ectoenzimas ectonucleosídeo difosfohidrolases trifosfato (CD39), que atua para converter adenosina trifosfato (ATP) em adenosina difosfato (ADP) e adenosina monofosfato (AMP); e da ecto-5'-nucleotidase (CD73), que converte AMP extracelular em adenosina (ADO), conforme visualizado na Figura 02 (Zimmerman, 2021).

Figura 02 - Representação esquemática da Sinalização Purinérgica



Fonte: Junger (2011)

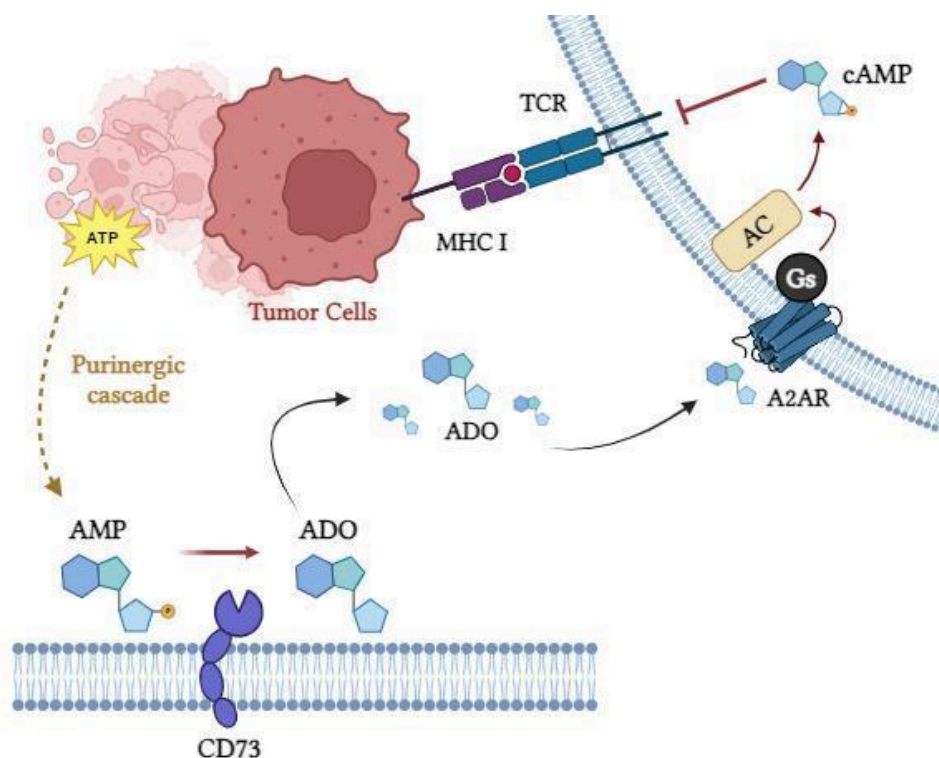
No contexto oncológico, as moléculas de ATP e ADO são secretadas ativamente pelas células no espaço extracelular, modulando a composição bioquímica do MAT como uma

alternativa para promover seu crescimento e progressão (Di Virgilio *et al.*, 2018). Exercem suas atividades ao ligarem-se aos seus respectivos receptores: a família P1 (A1, A2A, A2B, A3) e família P2 (P2X e P2Y) (Cardoso *et al.*, 2021).

Com destaque para o GBM, a CD73 é uma enzima transmembrana que participa da cascata de hidrólise do ATP em ADO. Esse nucleosídeo, no meio extracelular, desempenha um papel de inativação dos linfócitos e demais células imunes por meio de sua ligação com os receptores da família P1, principalmente o A2A. Nesse sentido, o aumento da expressão desses receptores pode representar uma pior evolução do quadro clínico devido à imunossupressão induzida pela ADO (Debom, Rubenich, Braganhol *et al.*, 2022).

O receptor A2A está presente nas principais células de citotoxicidade que estão dispersas no MAT e sua ligação com a ADO extracelular é uma parte importante do eixo adenosinérgico causando uma inibição do TCR e uma inativação imunológica, conforme mostrado na Figura 03 (Kang *et al.*, 2023). Estudos anteriores mostraram que os receptores A1, A2A e A3 estão superexpressos em gliomas (Huang *et al.*, 2016; Maziotta *et al.*, 2022).

Figura 03 - Representação do eixo adenosinérgico no contexto tumoral



Legenda: O CD73 hidrolisa o AMP em ADO. A alta afinidade do ADO pelo A2AR permite que sua ligação ocorra mesmo em baixas concentrações do ligante. O A2AR é um receptor acoplado à proteína Gs que ativa a adenilato ciclase (AC). Uma cascata de fosforilação é iniciada e o AMP cíclico (cAMP) exerce sua atividade inibindo o desencadeamento da resposta imune potencial do TCR.

A expressão gênica do A2A, quando elevada, tem associação com a agressividade do glioma, sobretudo em homens, e apresenta pior evolução clínica. De fato, tem-se encontrado uma relação intrínseca entre a superexpressão do A2A e o aumento da expressão de genes de exaustão de linfócitos, adesão focal, interações da matriz extracelular e promoção da angiogênese (Rafi *et al.*, 2023).

Uma coorte realizada por Ott e outros observou a regulação positiva do A2A e a presença de CD73 em populações TIL em todos os indivíduos com Gliomas, independentemente da apresentação clínica, inferindo que a via ADO é o mecanismo imunossupressor mais frequente em pacientes com diferentes subtipos de Gliomas, principalmente GBM (Ott *et al.*, 2020).

A ADO tem o potencial de promover a expansão e o recrutamento de células supressoras monocíticas derivadas de mieloides (MDSCs), que contribuem para a inativação de populações de células T e um ambiente imunossupressor (Liu *et al.*, 2022; Pang *et al.*, 2022). A concentração de MDSCs mostrou-se elevada em amostras de sangue periférico de pacientes com resposta leve à ICI (Chung *et al.*, 2020).

O crescimento e a diferenciação de células-tronco semelhantes a gliomas (GSC), bem como a expressão de genes de transição mesenquimal-epitelial (EMT, do inglês *Epithelial-Mesenchymal Transition*), estão diretamente associados à expressão de CD73, demonstrando seu potencial para modular a composição estrutural do MAT (Tsiampali *et al.*, 2020).

A CD73 e a ADO demonstraram o potencial de regular a migração, agressividade e invasividade *in vitro* e em camundongos, levando à deformação do parênquima cerebral e à ação de metaloproteinases (MMP) que degradam a matriz extracelular e permitem a disseminação das células tumorais (Azambuja *et al.*, 2019; Yan *et al.*, 2019).

A morte celular causada pela QT e RT pode causar um aumento no ATP extracelular e ADO, com maior atividade de ectoenzimas (Wang *et al.*, 2018). Alguns estudos indicaram que a RT impulsiona um MAT imunologicamente reativo e combinado com o bloqueio de CD73 pode aumentar a resposta inflamatória antitumoral e ajudar a combater cânceres, especialmente aqueles refratários ao tratamento (De Leve, Wirsdörfer, Jendrossek; 2019).

Além da imunossupressão, o CD73 desempenha um papel nos processos de neoangiogênese, metástase e resistência a medicamentos (Arab, Hasannejad; 2021). Metodologias de tratamento que visam componentes do eixo adenosinérgico demonstraram resultados clínicos e pré-clínicos promissores na restauração da resposta antitumoral, superando a quimiorresistência e aumentando as taxas de sobrevivência (Jin *et al.*, 2021).

Um ensaio com cultura de células de glioma C6 objetivou avaliar a atividade antitumoral do Resveratrol, um composto polifenólico, por meio da modulação da via adenosinérgica. De fato, o polifenol induziu uma redução significativa da atividade de CD73, entretanto, os mecanismos moleculares que levam à esta modulação ainda não foram bem elucidados (Sánchez-Melgar *et al.*, 2021).

Em relação às terapias que visam bloquear o eixo adenosinérgico, há uma carência de estudos clínicos que comprovem a segurança e eficácia desses anticorpos em GBM e tumores do SNC em geral. O bloqueio concomitante da produção e acúmulo de ADO (CD73) e sua sinalização (A2AR, A2BR, A3R) estão sendo investigados clinicamente, principalmente em tumores sólidos, metastáticos ou irrecorríveis (Willingham *et al.*, 2020).

Em camundongos, foi demonstrado que uma menor atividade induzida de CD73 pode impulsionar a resposta anti-PD-1 além de regular o crescimento tumoral, sugerindo o uso dessa abordagem em estudos clínicos robustos que reforcem a eficácia dessa associação (Azambuja *et al.*, 2019; Goswani *et al.*, 2020). Também pode intensificar a resposta à QT e RT, superando a resistência terapêutica atual (Franco *et al.*, 2021).

3.6 A IMUNOSSUPRESSÃO E A RESISTÊNCIA TERAPÊUTICA

A TMZ e a RT têm efeitos imunomoduladores no MAT, favorecendo a imunossupressão no GBM. A morte celular local causa uma explosão de ATP extracelular que inicia a cascata purinérgica e, subsequentemente, a via adenosinérgica na mesma intensidade (Scheffel *et al.*, 2021). ADO extracelular pode desempenhar diferentes funções no MAT que determinam a resistência terapêutica, representada por suas conexões com os receptores A2B e A3 (Schäkel *et al.*, 2022).

No GBM, a maior expressão de A2B e A3 é promovida pelo fator indutor de hipóxia 1 (HIF-1) (Torres *et al.*, 2019). A ativação desses receptores pela ADO pode induzir a via de sinalização da proteína quinase ativadora de mitógeno/quinase reguladora de sinal extracelular (MEK/ERK), que desencadeia a transcrição de genes EMT, refletindo a reconstituição da matriz extracelular, levando à sobrevivência do tumor e à resistência terapêutica (Jia *et al.*, 2023).

A hipóxia é um fator importante na resistência terapêutica. Há um estímulo para a ativação de células iniciadas por glioma (GIC) e HIF-1, que aumentam a expressão de MGMT, diminuindo o efeito potencial da TMZ em células GBM residuais (Shaw *et al.*,

2024). O bloqueio combinado do HIF-1 pode representar um novo panorama a ser considerado ao abordar o GBM (Alsafwai *et al.*, 2021).

Recentemente, houve uma melhor compreensão do papel da hipóxia como a chave entre as vias adenosinérgica e dos ligantes de morte celular programada, desempenhando papéis importantes na resposta biológica do tumor frente às alternativas terapêuticas (Domènech *et al.*, 2022). De fato, a hipóxia desempenha um papel importante na resistência terapêutica, indução da imunossupressão, angiogênese, ganho metabólico, entre outras funções que favorecem o desenvolvimento tumoral (Bou-Gharios, Noël, Burckel; 2024).

Os mecanismos de resistência ao tratamento-padrão (QT e RT após ressecção do tumor) focam no reparo efetivo do DNA promovido pelas células de GBM, especialmente através da ação da enzima MGMT, que repara o dano alquilante causado pela TMZ (Yalamarty *et al.*, 2023). Um ensaio clínico de fase III encontrou que pacientes com GBM com metilação na região promotora da MGMT tiveram melhores taxas de sobrevivência quando comparados a tumores não metilados, o que pode indicar um perfil de elegibilidade de pacientes que podem se beneficiar melhor da imunoterapia (Reardon *et al.*, 2020).

Tumores deficientes em genes de reparo de incompatibilidade (MMR) com instabilidade de microssatélites (MSI) demonstraram regulação imunológica positiva com maior infiltração de TIL, o que pode estar associado à maior presença de neoantígenos relacionados ao tumor (Leelatian, Hong, Bindra; 2021). Indivíduos com deficiência primária de MMR demonstraram melhor resposta à imunoterapia quando comparados a indivíduos com deficiência de MMR após exposição a agentes alquilantes, como TMZ; justificando a razão de porque os tumores refratários ao protocolo Stupp, geralmente, apresentam menor resposta ao ICI (Ülgen *et al.*, 2020).

4 METODOLOGIA

4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo quantitativo transversal comparativo não-intervencional e está aprovado junto ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), na Plataforma Brasil sob número CAAE - 65163722.0.0000.5564. Todos os pacientes foram consentidos e informados por escrito através de um Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE), sendo o estudo conduzido de acordo com as diretrizes da Resolução nº466/12 do Conselho Nacional de Saúde e protocolos vigentes das instituições envolvidas.

A população de estudo foi composta de indivíduos diagnosticados com GBG ou GBM, procedentes da microrregião oeste de Santa Catarina, que possuíam elegibilidade cirúrgica para a ressecção do tumor. O processamento do cálculo amostral foi realizado com o auxílio do Software de Cálculo Amostral Comento. Foi determinado segundo parâmetros definidos pelos pesquisadores que são: a) Média de cirurgias realizadas em Chapecó-SC, nos últimos 3 anos (42); b) Nível de confiança (95%); c) Erro amostral (5%); d) Distribuição mais homogênea da população (80/20). Portanto, a amostra foi composta por 36 participantes que foram divididos em 2 grupos: GBG (n=17) e GBM (n=19).

Foram incluídos no estudo pacientes adultos, maiores de 18 anos, de ambos os sexos, diagnosticados por um médico especialista com GBG ou GBM, que foram submetidos à procedimentos cirúrgicos para retirada do tumor, e que não tenham realizado algum tipo de terapia neoadjuvante (quimioterapia ou radioterapia). Foram excluídos pacientes com diagnóstico de câncer metastático e/ou portadores de distúrbios neurodegenerativos (doença de Alzheimer, doença de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica e esclerose múltipla).

Foram coletadas informações obtidas a partir dos prontuários médicos como idade, sexo e a Escala de Performance de Karnofsky (KPS, do inglês *Karnofsky Performance Status*) cuja função é determinar a funcionalidade pré-operatória dos pacientes, de acordo com os critérios definidos pelo pesquisador responsável.

4.2 COLETA E ARMAZENAMENTO DO TECIDO TUMORAL

A abordagem dos participantes ocorreu nas consultas de acompanhamento pré-operatório, onde os indivíduos foram esclarecidos sobre os objetivos do estudo e convidados a participar do mesmo, consentindo através de assinatura do TCLE. A coleta de

tecido tumoral foi realizada em um único momento, durante a ressecção cirúrgica por um médico neurocirurgião responsável.

Após a coleta, uma parte das amostras foram armazenadas em microtubos com 1 ml de solução de estabilizadora de RNA (RNA later®) e armazenadas em congelador a -80°C para posterior análise molecular, conforme protocolos previamente padronizados.

4.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-qPCR

Para a extração do RNA, foi utilizado protocolo com o reagente Trizol para isolamento de RNA em tecidos. Nisso, foi adicionado 1 ml de Trizol no microtubo contendo o tecido, seguindo o protocolo de extração de acordo com as especificações do fabricante (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA). Para melhor aproveitamento da amostra, realizou-se um novo procedimento de lavagem com isopropanol e etanol 75%. Após, foram ressuspendidas em 20 µl de água livre de RNase. As concentrações totais de RNA foram medidas pelo espectrofotômetro Nanodrop® (Thermo Scientific, Wilmington, DE). Os valores médios foram usados para calcular a entrada total de RNA para a síntese de cDNA. A pureza do RNA foi estimada pela razão de absorbância A260 /A280.

O RNA extraído (até 10 µg de RNA em 50 µL de reação) foi tratado com a enzima DNase I (Ambion, Thermo Fisher Scientific) para remoção de possíveis fragmentos de DNA genômico contaminante, conforme orientações do fabricante. Para a retrotranscrição do RNA em uma molécula de DNA complementar (cDNA), foi utilizado o kit High Capacity Reverse Transcription (Applied Biosystems - Thermo Fisher Scientific). Em seguida, as reações foram submetidas aos seguintes ciclos de temperatura: 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos e 85°C por 5 minutos.

As reações de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) foram realizadas no equipamento termociclador QuantStudio™ 7 Pro (Applied Biosystems, Thermo Fisher Sci), com o protocolo “SYBR Green”. Em cada poço da placa de PCR, foi adicionado uma mistura de reagentes (1 µL de água ultrapura; 0,5 µL/cada dos primers *Forward* e *Reverse* - vide Quadro 01 - e 5 µL do SYBR Green) somados à 3 µL de cDNA (30 ng). O controle negativo continha 3 µL de água ultrapura em vez de cDNA e o controle positivo, por sua vez, representava a amostra já expressando os respectivos genes e foi usado para validar o fluxo de trabalho geral da manipulação. As reações foram realizadas em triplicatas. A placa de PCR foi colocada no termociclador após 40 ciclos: 02 minutos a 50 °C, 02 minutos a 95 °C, 15 segundos a 95 °C e 1 minuto a 60 °C, seguido de avaliação da temperatura de melting

Quadro 01 - Sequência dos primers *forward* e *reverse* para os genes alvo e de referência

Gene	Direção	Sequência
PDL1 (<i>CD274</i>)	<i>Forward</i>	TGCCGACTACAAGCGAATTACTG
	<i>Reverse</i>	CTGCTTGTCCAGATGACTTCGG
CD73 (<i>NT5E</i>)	<i>Forward</i>	GCCTGGGAGCTTACGATTTTG
	<i>Reverse</i>	TAGTGCCCTGGTACTGGTTCG
<i>ACTB</i>	<i>Forward</i>	TCCCTGGAGAAGAGCTACG
	<i>Reverse</i>	GTAGTTTCGTGGATGCCACA

A análise da expressão gênica por Quantificação Relativa foi realizada pelo Método do $\Delta\Delta Ct$. Nesta metodologia, a concentração relativa é dada pelas fórmulas:

$$\Delta Ct = Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ gene de referência}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - \Delta Ct \text{ amostra calibradora}$$

A expressão dos genes alvo na amostra em relação à amostra calibradora é obtida pela fórmula:

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Curvas-padrão para cada um dos genes (*CD274* e *NT5E*) e do gene de referência (actina B; *ACTB*) foram elaboradas para a análise das eficiências de reação (E), necessárias ao Método do $\Delta\Delta Ct$.

4.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO PD-L1 (*CD274*) E CD73 (*NT5E*) NA BASE DE BANCO DE BIÓPSIAS DO TCGA

Os dados de expressão de mRNA do PD-L1 (*CD274*) e CD73 (*NT5E*) em pacientes com GBM foram obtidos dos conjuntos de dados públicos do portal *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), disponível no endereço <https://tcga-data.nci.nih.gov/via> (acessado em Dezembro de 2024) via navegador Xena Functional Genomics Explorer desenvolvido pela University of California, Santa Cruz (<https://xena.ucsc.edu>, acesso em Dezembro de 2024).

Foram selecionadas as amostras do estudo “TCGA Glioblastoma (GBM)” (n=631) e filtrados para tumores primários (n=602) e excluídas as que não tinham informações associadas ao *CD274* e *NT5E* resultando num total de 154 amostras. Os grupos foram estratificados de acordo com os níveis de expressão de *CD274/NT5E* em “-low” e “-high”, usando valores de expressão medianos como ponto de corte.

4.6 ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Os dados foram tabulados e analisados primariamente utilizando o aplicativo LibreOffice Calc, e após, as análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism 8 (Prism 10.3.1, GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Os *outliers* foram identificados aplicando o teste de Grubbs e foram removidos posteriormente. A distribuição de normalidade dos grupos foi testada pelo teste de Shapiro-Wilk, sendo todos classificados como não-paramétricos.

As diferenças de expressão gênica entre os grupos foram avaliadas pelo Teste de Mann-Whitney e aplicou-se o teste de Correlação de Spearman para avaliar a associação entre os marcadores analisados em cada um dos grupos (GBG e GBM) e a magnitude da força de correlação foi classificado segundo indicado por Schober *et al* (2018).

Os resultados foram apresentados como mediana e intervalo de confiança (IC 95%). As curvas de Kaplan-Meier foram empregadas para estimar o PFI e a SG e o teste de *log rank* (Mantel-Cox) foi utilizado para analisar as diferenças entre as curvas de sobrevida. Para todo o estudo, foram consideradas estatisticamente significantes as diferenças em que a probabilidade de rejeição da hipótese de nulidade foi menor que 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A amostra do estudo foi composta de 36 pacientes, sendo destes 17 pertencentes ao grupo de GBG e 19 ao grupo de GBM. A Tabela 1 apresenta os dados das características demográficas, bem como o status funcional dos indivíduos por meio da KPS.

Tabela 01 - Características gerais da amostra de pacientes dos grupos de GBG e GBM

	Grupos		Total (n=36)	p
	GBG (n=17)	GBM (n=19)		
Sexo				0,709
Masculino	10	10	20 (55,6%)	
Feminino	7	9	16 (44,4%)	
Idade, em anos (\pmDP)	40,9 (\pm 11,3)	63,9 (\pm 8,8)	52,9 (\pm 15,8)	<0,0001
KPS				0,0002
≤ 70	2 (11,8%)	14 (73,7%)	16 (44,4%)	
≥ 70	15 (88,2%)	5 (26,3%)	20 (55,6%)	

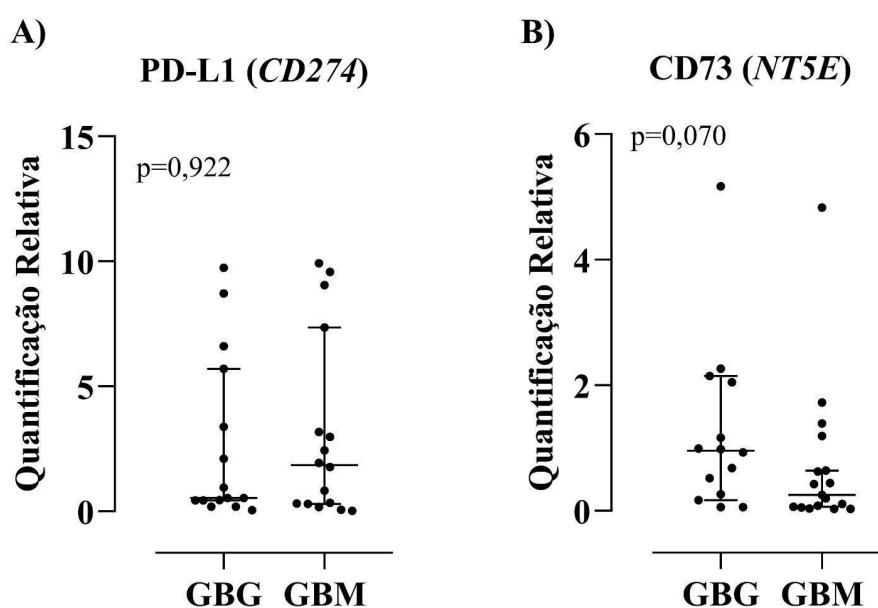
Legenda: As comparações entre os grupos foram realizadas por meio do teste Qui-quadrado para variáveis sexo e KPS (0,139 e 13,93, respectivamente) e pelo teste *t* de Student para as médias de idade. Considerou-se significância estatística para valores de $p < 0,05$.

Em nossa amostra, foi observado uma predominância masculino (55,6%) em comparação com o sexo feminino (44,4%), com equilíbrio na distribuição dos sexos entre cada um dos grupos. Quanto à idade dos indivíduos, a amostra total apresentou uma média de $52,9 \pm 15,8$ anos, o grupo GBM foi composto de indivíduos com a idade mais avançada ($63,9 \pm 8,8$ anos) quando contrastado com o grupo GBG ($40,9 \pm 11,3$ anos). A avaliação da KPS revelou comprometimento funcional mais acentuado (KPS ≤ 70) para o grupo GBM (73,7%) com sete vezes mais indivíduos quando comparado com o grupo GBG (11,8%).

5.3 EXPRESSÃO GÊNICA DE PD-L1 (*CD274*) E CD73 (*NT5E*) EM GBG E GBM

As análises de expressão gênica avaliaram a expressão relativa dos genes de interesse (*CD274* e *NT5E*), buscando as diferenças entre os grupos de GBG e GBM. As respectivas análises estão representadas na Figura 04.

Figura 04 - Análise comparativa da expressão gênica em amostras de GBG e GBM



Legenda: Expressão relativa de mRNA dos genes *CD274* (A) e *NT5E* (B) nos grupos GBG e GBM. A comparação das medianas de expressão de *CD274* [GBG: 0,539 (IC95% 0,431-5,695) vs GBM: 1,856 (IC95% 0,298-7,360)] não encontrou diferença estatística entre os grupos ($p=0,922$). A comparação das medianas de expressão de *NT5E* (GBG: 0,956; IC95% 0,170-2,145 vs GBM: 0,252; IC95% 0,066-0,641) não encontrou diferença estatística entre os grupos ($p=0,070$). Realizado Teste de Mann-Whitney.

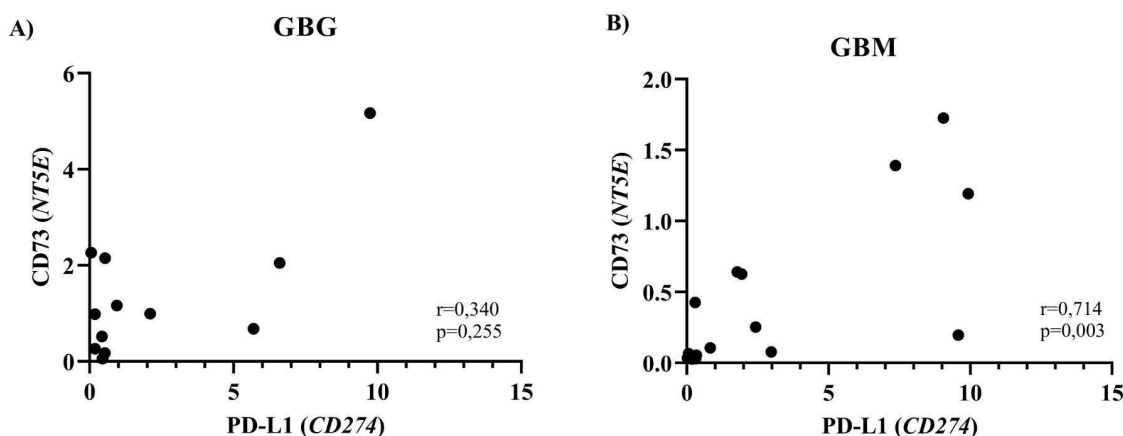
Na Figura 04A, estão apresentados os resultados, indicados pelos valores medianos, da expressão gênica relativa de *CD274* para cada grupo, onde observa-se no grupo de GBG ($n=17$) um valor de 0,539 (IC95% 0,431-5,695) e no grupo GBM ($n=19$) um valor de 1,856 (IC95% 0,298-7,360). A análise comparativa entre os grupos indicou não haver diferença estatisticamente significativa entre eles ($p=0,922$).

Ademais, a Figura 04B apresenta os dados de expressão gênica relativa de *NT5E* para os grupos GBG e GBM, sendo encontrado um valor de 0,956 (IC95% 0,170-2,145) vs 0,252 (IC95% 0,066-0,641), respectivamente. A diferença entre os grupos não atingiu significância estatística ($p=0,070$).

5.4 ANÁLISE DA CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO GÊNICA DE PD-L1 (*CD274*) E CD73 (*NT5E*)

A correlação entre a expressão de *CD274* e *NT5E* foi avaliada separadamente para cada grupo utilizando o teste de Spearman. No grupo de GBG, a análise de correlação entre PD-L1 e CD73 resultou em um coeficiente de Spearman (r) de 0,340 (IC95%: -0,275-0,758), indicando uma correlação positiva fraca e não estatisticamente significativa ($p=0,255$). Em contraste, no grupo de GBM, foi observada uma correlação positiva forte ($r=0,714$; IC95%: 0,303-0,901) e estatisticamente significativa entre a expressão de PD-L1 e CD73 ($p=0,003$).

Figura 05 - Correlação entre a expressão de CD73 e PD-L1 em amostras de GBG e GBM



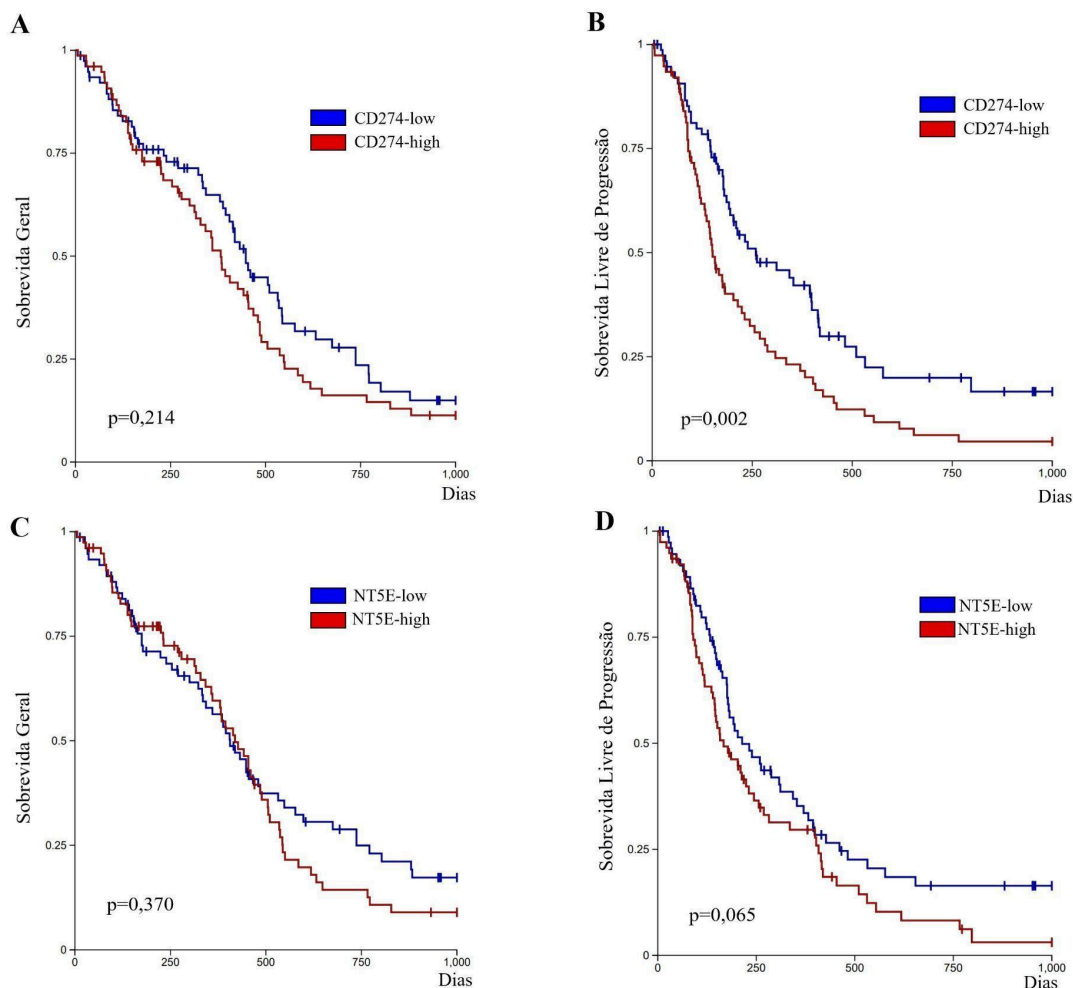
Legenda: Gráficos de dispersão representando a correlação entre a expressão relativa de PD-L1 e CD73 em amostras de GBG (A) e GBM (B). O coeficiente de correlação de Spearman para os grupos GBG e GBM foi de $r=0,340$ e $r=0,714$, respectivamente. Para o grupo de GBG, não encontrou-se significância estatística ($p=0,255$) e para o grupo GBM, por sua vez, encontrou-se correlação estatisticamente significativa ($p=0,003$). Realizado Teste de Correlação de Spearman.

5.5 EXPRESSÃO DO PD-L1 (*CD274*) E CD73 (*NT5E*) NA BASE DE BANCO DE BIÓPSIAS DO TCGA

Consideramos avaliar dados transcriptômicos com a expressão dos genes *CD274* e *NT5E* em biópsias de GBM disponíveis em bancos de dados internacionais. Assim, realizamos uma análise com as informações depositadas no TCGA com o objetivo de avaliar o potencial papel preditor de prognóstico desses marcadores no GBM, estratificando-os com os níveis de expressão dos respectivos genes, conforme retratado na Figura 06.

Encontramos que a maior expressão do *CD274* está associada a um menor PFI ($p=0,002$). A análise da SG no *CD274* não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p=0,214$) bem como os parâmetros de SG ($p=0,370$) e PFS ($p=0,065$) para o *NT5E*.

Figura 06 - Expressão de CD274/NT5E e prognóstico de pacientes com GBM



Legenda: A expressão de mRNA de CD274 (A, B) e do NT5E (C, D) foram correlacionadas com os desfechos clínicos de SG e SLP. As curvas de Kaplan–Meier foram criadas usando o banco de dados UCSC Xena, foram utilizadas as medianas ($\log^2[\text{norm_count}+1]$) de expressão do CD274 (4,916) e NT5E (10,070) como pontos de corte. A diferença entre os grupos deu-se pelo teste de *log rank* (Mantel–Cox).

6 DISCUSSÃO

Os Gliomas e seus respectivos subgrupos, representam um conjunto de doenças com um curso variável, apresentação atípica e ruim prognóstico, não apresentando melhorias concretas tanto no diagnóstico precoce quanto no manejo terapêutico nos últimos anos.

Primeiramente, a mediana de idade dos pacientes com GBM ($63,9 \pm 8,8$ anos) foi superior à do grupo com GBG ($40,9 \pm 11,3$ anos), o que está de acordo com estudos que apontam que os GBM são mais comuns em indivíduos com idade mais avançada, com o pico de incidência aos 80 anos, enquanto os GBG costumam afetar adultos jovens, normalmente cerca de 50 anos ou menos (Ostrom *et al.*, 2022; Schaff, Mellinghoff, 2023). Vale destacar que a amostra foi composta de indivíduos com elegibilidade para a ressecção cirúrgica e, neste caso, pode não contemplar idades mais avançadas ou pacientes com comorbidades restritivas que, desta forma, não receberam indicação ou optaram por não realizar o procedimento cirúrgico.

Outrossim, pôde-se verificar a predominância do sexo masculino (55,6%) em ambos os grupos, o que também é corroborado pela literatura, uma vez que estudos epidemiológicos mostram que os gliomas, sobretudo os de alto grau como o GBM, têm maior incidência em homens, possivelmente por influências hormonais, genéticas e ambientais (Kim *et al.*, 2021; Schaf, Mellinghoff, 2023; Ostrom *et al.*, 2022).

A avaliação do KPS revelou que a maioria dos pacientes com GBM (73,7%) apresentavam comprometimento funcional significativo (KPS ≤ 70), enquanto a maior parcela dos casos de GBG (88,2%) manteve boa capacidade funcional (KPS ≥ 70). Nesse sentido, é importante destacar que a avaliação do KPS se estabelece de forma fundamentada na literatura como fator prognóstico para pacientes com Gliomas, sendo que um KPS baixo corresponde a um risco de mortalidade em 2,3 vezes maior em comparação a um valor de KPS alto (Liang *et al.*, 2020; Weller *et al.*, 2021).

Assim, a maior frequência de déficit funcional, somada à idade avançada, observada nos pacientes com GBM está associada com a biologia agressiva desse subtipo tumoral, enquanto o comportamento do GBG pode ser bem visualizado uma vez que os pacientes demonstraram majoritariamente uma boa capacidade funcional, o que demonstra o seu caráter menos invasivo (Liang *et al.*, 2020; Weller *et al.*, 2021).

Ademais, os resultados deste estudo fornecem perspectivas importantes sobre a expressão gênica de PD-L1 e CD73 em GBG e GBM, bem como a correlação entre esses dois marcadores. Considerando a natureza mais agressiva do GBM, há uma expectativa maior de expressão dos receptores de checkpoint imunológicos em tumores de alto grau. Assim como, a literatura tem demonstrado variabilidade na expressão de PD-L1 em Gliomas, como foi demonstrado por Mushir e colaboradores (2025), que encontrou expressão de PD-L1 em 75% dos casos de GBM e 66,7% em Gliomas, sugerindo uma heterogeneidade no padrão de expressão do PD-L1 em tumores do SNC.

A CD73 desempenha um papel crucial na produção de ADO imunossupressora no MAT. A literatura sugere que a expressão de CD73 pode ser elevada em células de glioma, independentemente do grau (Bedeschi *et al.*, 2025), assim como já foi demonstrado que vesículas extracelulares positivas para CD73 promovem a progressão do GBM (Wang *et al.*, 2021), e seu bloqueio em camundongos retardam o crescimento e progressão tumoral (Azambuja *et al.*, 2020). Embora não estatisticamente significativa em nosso estudo, uma menor expressão de CD73 em GBM merece investigação adicional para entender os mecanismos compensatórios e as estratégias imunomodulatórias no contexto do GBM.

A análise de correlação entre PD-L1 e CD73 revelou correlação positiva forte e estatisticamente significativa em GBM ($r=0,714$; $p=0,003$), enquanto em GBG a correlação foi fraca e não significativa ($r=0,340$; $p=0,255$). Esta diferença sugere que, no contexto do GBM, a expressão de PD-L1 e CD73 pode estar co-regulada atuando de forma associada. A co-expressão desses marcadores pode indicar um MAT mais imunossupressor, onde a via da adenosinérgica - mediada pela CD73 - e a via PD-1/PD-L1 atuam sinergicamente para evadir a resposta imune antitumoral.

A compreensão dessa correlação é importante para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas combinadas que intervenham em múltiplas vias, visando uma melhor resposta ao tratamento e a redução de efeitos colaterais sistêmicos. A pesquisa sobre a interação entre diferentes vias imunossupressoras em Gliomas é uma área ativa, e nossos dados reforçam a necessidade de explorar a relevância clínica da co-expressão de PD-L1 e CD73 no GBM.

Os dados que correlacionam a expressão de mRNA do *CD274* e *NT5E* com a SG não revelaram diferença estatística. Na literatura, tem-se encontrado que uma maior expressão de PD-L1 está associada à uma menor sobrevivência, representando cerca de 150 dias a menos na estimativa (Sobhani *et al.*, 2023; Zhu *et al.*, 2020). Assim como, amostras *in silico* de GBM que apresentaram aumento da expressão de *NT5E* tiveram SG significativamente mais curta quando comparado com o controle (Braganhol *et al.*, 2024).

Já os dados de progressão, por sua vez, indicaram que a superexpressão gênica do *CD274* (PD-L1) está associada à um menor SLP em pacientes com GBM. Em uma meta-análise anterior, observou-se que pacientes com perfil de baixa expressão de PD-L1 e aumento da população de células TCD8+, não expostos a terapias, demonstraram melhores SLP quando comparados com pacientes com PD-L1 elevado (Shadbad *et al.*, 2021).

Entretanto, a análise dos grupos de expressão aumentada e diminuída do *NT5E* para a SLP não apresentou diferença estatística entre eles. Um estudo de Wang e Matosevic (2019) indicou que a expressão elevada de *NT5E/CD73* está associada a piores desfechos de SLP e pode desempenhar um papel importante na agressividade do tumor e em sua resistência ao tratamento.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos resultados de expressão gênica, embora com algumas limitações em termos de significância estatística para as diferenças entre os grupos, destacam a complexidade da imunobiologia dos GBG e GBM. A forte correlação entre PD-L1 e CD73 no GBM aponta para um potencial sinergismo entre essas vias imunossupressoras, sugerindo que abordagens terapêuticas combinadas que visem ambos os marcadores podem ser mais eficazes no tratamento do GBM, superando a resistência terapêutica.

Estudos futuros com um número maior de amostras e análises funcionais são necessários para validar esses achados e explorar suas implicações clínicas, especialmente no desenvolvimento de novas estratégias de imunoterapia para o GBM.

A análise dos desfechos clínicos (SG e SLP) através do banco de dados do TCGA auxiliam na compreensão dos fenômenos associados ao GBM. Nesse sentido, podem ser realizadas meta-análises que busquem aprofundar e diversificar o perfil dos pacientes, de forma a representar de maneira mais fidedigna a realidade.

No geral, nossos dados e as evidências experimentais atuais fornecem uma forte justificativa para ensaios clínicos que investiguem a eficácia do bloqueio combinado do PD-L1 e CD73 no GBM. Em tempo, experimentos adicionais sobre a expressão de receptores e análises no tecido tumoral são necessários para corroborar com os resultados encontrados no presente estudo, a fim de que a modulação do eixo adenosinérgico possa integrar a base de novos fármacos e protocolos terapêuticos eficientes no controle da progressão do GBM.

REFERÊNCIAS

- ALSAFWANI, N. et al. Tumor-Infiltrating Lymphocytes Are Enriched in Nonhypoxic Glioblastoma Niches. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 80, n. 2, p. 202–204, 20 jan. 2021.
- ARAB, S.; HASANNEJAD, F. An overview of current therapeutic strategies for glioblastoma and the role of CD73 as an alternative curative approach. **Clinical and Translational Oncology**, v. 24, n. 5, p. 742–756, 18 nov. 2021.
- AZAMBUJA, J. H. et al. Blockade of CD73 delays glioblastoma growth by modulating the immune environment. **Cancer Immunology and Immunotherapy**, v.69, n.9, p.1801-1812, 2020.
- AZAMBUJA, J. H. et al. CD73 Downregulation Decreases In Vitro and In Vivo Glioblastoma Growth. **Molecular Neurobiology**, v. 56, n. 5, p. 3260–3279, 2019.
- BEDESCHI, M. et al. Glioblastoma Tumor Microenvironment and Purinergic Signaling: Implications for Novel Therapies. **Pharmaceuticals (Basel)**, v.18, n.3, p.385, 2025.
- BRAGANHOL, E. et al. ENTPD1 (CD39) and NT5E (CD73) expression in human glioblastoma: an in silico analysis. **Purinergic Signalling**, v. 20, n. 3, p. 285–289, 2024.
- BRAGANHOL, E. et al. ENTPD1 (CD39) and NT5E (CD73) expression in human glioblastoma: an in silico analysis. **Purinergic Signalling**, v. 20, n. 3, p. 285–289, 2024.
- BRAY, F.; LAVERSANNE, M.; SUNG, H. *et al.* Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [S. l.], v. 74, n. 3, p. 229-263, 2024. DOI: 10.3322/caac.21834.
- BROWN, N. F.; OTTAVIANI, D.; TAZARE, J. *et al.* Survival outcomes and prognostic factors in glioblastoma. **Cancers**, [S.l.], v. 14, n. 13, p. 3161, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers14133161>.
- CARDOSO, A. M.; et al. **Sinalização Purinérgica e Suas Implicações Fisiopatológicas**. Sinalização Purinérgica: Implicações Fisiopatológicas. In: CARDOSO, Andréia Machado; MANFREDI, Leonardo Henrique; MACIEL; Sarah Franco Vieira de Oliveira (org). Chapecó: Editora UFFS, p.15-27, 2021.
- CHIU, D. et al. A Phase I Trial of VEGF-A Inhibition Combined with PD-L1 Blockade for Recurrent Glioblastoma. **Cancer Research Communications**, v. 3, n. 1, p. 130–139, 25 jan. 2023.
- CHUNG, J.-S. et al. DC-HIL/Gpnb Is a Negative Regulator of Tumor Response to Immune Checkpoint Inhibitors. **Clinical Cancer Research**, v. 26, n. 6, p. 1449–1459, 15 mar. 2020.
- DE BRUIN, M. E.; VAN DER MEER, P. B.; DIRVEN, L. *et al.* Efficacy of antiepileptic drugs in glioma patients with epilepsy: a systematic review. **Neuro-Oncology Practice**, [S.l.], v. 8, n. 5, p. 501–517, out. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1093/nop/npab030>.

- DE LEVE, S.; WIRSDÖRFER, F.; JENDROSSEK, V. Targeting the Immunomodulatory CD73/Adenosine System to Improve the Therapeutic Gain of Radiotherapy. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 698, 5 abr. 2019.
- DEANGELIS, L. M.; WEN, P. Y. Tumores primários e metastáticos do sistema nervoso. In: HARRISON, T. R *et al.* (org.). **Medicina interna de Harrison**. 21. ed. Porto Alegre: AMGH, 2024. E-book. p.701-712.
- DEBOM, G. N.; RUBENICH, D. S.; BRAGANHOL, E. Adenosinergic Signaling as a Key Modulator of the Glioma Microenvironment and Reactive Astrocytes. **Frontiers in Neuroscience**, v. 15, p. 648476, 5 jan. 2022.
- DELLA MONICA, R.; CUOMO, M.; BUONAIUTO, M. *et al.* MGMT and whole-genome DNA methylation impacts on diagnosis, prognosis and therapy of glioblastoma multiforme. **International Journal of Molecular Sciences**, [S.l.], v. 23, n. 13, p. 7148, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms23137148>.
- DI VIRGILIO, F. *et al.* Extracellular ATP and P2 purinergic signalling in the tumour microenvironment. **Nature Reviews Cancer**, v. 18, n. 10, p. 601–618, 2018.
- DOMÈNECH, M. *et al.* Hypoxia: The Cornerstone of Glioblastoma. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 22, p. 12608, 22 nov. 2021.
- DUERINCK, J. *et al.* Intracerebral administration of CTLA-4 and PD-1 immune checkpoint blocking monoclonal antibodies in patients with recurrent glioblastoma: a phase I clinical trial. **Journal for ImmunoTherapy of Cancer**, v. 9, n. 6, p. e002296, 2021.
- DYMOVA, M. A.; KULIGINA, E. V.; RICHTER, V. A. Molecular Mechanisms of Drug Resistance in Glioblastoma. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 12, p. 6385, 15 jun. 2021.
- FALIH SOLIMAN, N.; JASIM MOHAMAD, B. The impact of CD37 ectoenzyme expression in benign and malignant colorectal tumors. **Archives of Razi Institute**, n. Online First, jun. 2022.
- FILLEY, A. C.; HENRIQUEZ, M.; DEY, M. Recurrent glioma clinical trial, CheckMate-143: the game is not over yet. **Oncotarget**, v. 8, n. 53, p. 91779–91794, 31 out. 2017.
- FRANCO, R. *et al.* Adenosine Receptor Antagonists to Combat Cancer and to Boost Anti-Cancer Chemotherapy and Immunotherapy. **Cells**, v. 10, n. 11, p. 2831, 21 out. 2021.
- FYLLINGEN, E. H. *et al.* Survival of glioblastoma in relation to tumor location: a statistical tumor atlas of a population-based cohort. **Acta Neurochirurgica**, v. 163, n. 7, p. 1895–1905, 2021.
- GIRARDI, F. *et al.* Global survival trends for brain tumors, by histology: analysis of individual records for 556,237 adults diagnosed in 59 countries during 2000–2014 (CONCORD-3). **Neuro-Oncology**, v. 25, n. 3, p. 580–592, 14 mar. 2023.
- GOENKA, A.; TIEK, D.; SONG, X. *et al.* The many facets of therapy resistance and tumor recurrence in glioblastoma. **Cells**, Basel, v. 10, n. 3, p. 484, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells10030484>.

GOLDBERG, M. et al. Do clinical outcomes in individuals with malignant gliomas differ between sexes? **Brain and Spine**, v. 5, p. 104172, 2025.

GOLDBERG, M. S. Improving cancer immunotherapy through nanotechnology. **Nature Reviews Cancer**, v. 19, n. 10, p. 587–602, 2019.

GOSWAMI, S. et al. Immune profiling of human tumors identifies CD73 as a combinatorial target in glioblastoma. **Nature Medicine**, v. 26, n. 1, p. 39–46, 2020.

HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12, n. 1, p. 31–46, 1 jan. 2022.

HANSEN, A.; PEDERSEN, C. B.; MINET, L. R. *et al.* Hemispheric tumor location and the impact on health-related quality of life, symptomatology, and functional performance outcomes in patients with glioma: an exploratory cross-sectional study. **Disability and Rehabilitation**, v. 43, n. 10, p. 1443-1449, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1080/09638288.2019.1668486>.

HE, X.; XU, C. Immune checkpoint signaling and cancer immunotherapy. **Cell Research**, v. 30, n. 8, p. 660–669, 2020.

HUANG, J. et al. Differential Expression of Adenosine P1 Receptor ADORA1 and ADORA2A Associated with Glioma Development and Tumor-Associated Epilepsy. **Neurochemical Research**, v. 41, n. 7, p. 1774–1783, 2016.

HUTAREW, G. et al. Methylome Profiling of PD-L1-Expressing Glioblastomas Shows Enrichment of Post-Transcriptional and RNA-Associated Gene Regulation. **Cancers**, v. 14, n. 21, p. 5375, 31 out. 2022.

JAIN, P.; VASHIST, S.; PANJIYAR, B. K. Navigating the Immune Challenge in Glioblastoma: Exploring Immunotherapeutic Avenues for Overcoming Immune Suppression. **Cureus**, 27 set. 2023.

JIA, W. et al. Purinergic signalling in cancer therapeutic resistance: From mechanisms to targeting strategies. **Drug Resistance Updates**, v. 70, p. 100988, 2023.

JIN, K. et al. Adenosinergic Pathway: A Hope in the Immunotherapy of Glioblastoma. **Cancers**, v. 13, n. 2, p. 229, 10 jan. 2021.

JUNGER, W. G. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 3, p. 201–212, 2011.

KALLURI, A. L.; SHAH, P. P.; LIM, M. The Tumor Immune Microenvironment in Primary CNS Neoplasms: A Review of Current Knowledge and Therapeutic Approaches. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 3, p. 2020, 19 jan. 2023.

KANG, C. et al. The adenosinergic machinery in cancer: In-tandem insights from basic mechanisms to therapy. **Frontiers in Immunology**, v. 14, p. 1111369, 23 fev. 2023.

KIM, M.; LADOMERSKY, E.; MOZNY, A. *et al.* Glioblastoma as an age-related neurological disorder in adults. **Neuro-Oncology Advances**, v. 3, n. 1, p. vdab125, jan.-dez. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1093/oaajnl/vdab125>.

KUMAR, S. et al. Targeting PD-1/PD-L1 in cancer immunotherapy: An effective strategy for treatment of triple-negative breast cancer (TNBC) patients. **Genes & Diseases**, v. 10, n. 4, p. 1318–1350, 2023.

LEELATIAN, N.; HONG, C. S.; BINDRA, R. S. The Role of Mismatch Repair in Glioblastoma Multiforme Treatment Response and Resistance. **Neurosurgery Clinics of North America**, v. 32, n. 2, p. 171–180, 2021.

LIANG, J.; LV, X.; LU, C. *et al.* Prognostic factors of patients with Gliomas – an analysis on 335 patients with Glioblastoma and other forms of Gliomas. **BMC Cancer**, v. 20, n. 35, p. 1-12, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12885-019-6511-6>.

LIM, M. et al. Phase III trial of chemoradiotherapy with temozolomide plus nivolumab or placebo for newly diagnosed glioblastoma with methylated *MGMT* promoter. **Neuro-Oncology**, v. 24, n. 11, p. 1935–1949, 2 nov. 2022.

LIMA, C. F. et al. Exploring the Expression of Adenosine Pathway-Related Markers CD73 and CD39 in Colorectal and Pancreatic Carcinomas Characterized by Multiplex Immunofluorescence: A Pilot Study. **Pathobiology**, v. 91, n. 3, p. 205–218, 2024.

LIU, Y. et al. Targeting the Negative Feedback of Adenosine- A2AR Metabolic Pathway by a Tailored Nanoinhibitor for Photothermal Immunotherapy. **Advanced Science**, v. 9, n. 14, p. 2104182, 2022.

LOUIS, D. N.; PERRY, A.; WESSELING, P. *et al.* The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Neuro-Oncology**, v. 23, n. 8, p. 1231–1251, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab106>.

LOUSSOUARN, D. et al. Spatial Distribution of Immune Cells in Primary and Recurrent Glioblastoma: A Small Case Study. **Cancers**, v. 15, n. 12, p. 3256, 20 jun. 2023.

LU, B.; DU, S.; KONG, X.-T. Immune checkpoint inhibitors for the treatment of glioblastoma: Where we are. **Journal of Solid Tumors**, v. 10, n. 1, p. 7, 4 fev. 2020.

MAHMOUD, A. B. et al. Advances in immunotherapy for glioblastoma multiforme. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 944452, 12 out. 2022.

MAIR, M. J. et al. Soluble PD-L1 is associated with local and systemic inflammation markers in primary and secondary brain tumours. **ESMO Open**, v. 5, n. 6, p. e000863, 2020.

MAZZIOTTA, C. et al. Cancer biology and molecular genetics of A3 adenosine receptor. **Oncogene**, v. 41, n. 3, p. 301–308, 12 jan. 2022.

McKINNON, C.; NANDHABALAN, M.; MURRAY, S. A. *et al.* Glioblastoma: clinical presentation, diagnosis, and management. **BMJ**, London, v. 374, n. 1560, 2021. DOI <https://doi.org/10.1136/bmj.n1560>.

MENDES, G. A.; ONGARATTI, B. R.; SEMMELMANN PEREIRA-LIMA, J. F. S. P. Epidemiologia de uma série de tumores primários do sistema nervoso central. **Arquivos Brasileiros de Neurocirurgia: Brazilian Neurosurgery**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 4, p. 279-283, 2014. DOI: [10.1055/s-0038-1626227](https://doi.org/10.1055/s-0038-1626227).

- MILLER, D. M. et al. Untangling the web of glioblastoma treatment resistance using a multi-omic and multidisciplinary approach. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 366, n. 3, p. 185–198, 2023.
- MUSHIR, S. I. et al. Unlocking the Glioblastoma Enigma: Exploring PD-L1 (Programmed Death-Ligand 1) and IDH1 (Isocitrate Dehydrogenase-1) Expression and Their Immunotherapeutic Implications. **Cureus**, v.17, n.1, p.e76920, 2025.
- NEYNS, B. et al. GLIAX: A stratified phase II clinical trial of avelumab and axitinib in patients with recurrent glioblastoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 37, n. 15_suppl, p. 2034–2034, 20 maio 2019.
- NG, A. T. et al. The challenges and clinical landscape of glioblastoma immunotherapy. **CNS Oncology**, v. 13, n. 1, p. 2415878, 31 dez. 2024.
- OMURO, A. et al. Radiotherapy combined with nivolumab or temozolomide for newly diagnosed glioblastoma with unmethylated *MGMT* promoter: An international randomized phase III trial. **Neuro-Oncology**, v. 25, n. 1, p. 123–134, 5 jan. 2023.
- OSTROM, Q. T.; PRICE, M.; RYAN, K. *et al.* CBTRUS Statistical Report: Pediatric Brain Tumor Foundation Childhood and Adolescent Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2014–2018. **Neuro-Oncology**, v. 24, suppl. 3, p. iii1–iii38, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1093/neuonc/noac161>.
- OTT, M. et al. Profiling of patients with glioma reveals the dominant immunosuppressive axis is refractory to immune function restoration. **JCI Insight**, v. 5, n. 17, p. e134386, 3 set. 2020.
- PANG, L. et al. Pharmacological targeting of the tumor–immune symbiosis in glioblastoma. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 43, n. 8, p. 686–700, 2022.
- POUESSEL, D. et al. Hypofractionated Stereotactic Re-irradiation and Anti-PDL1 Durvalumab Combination in Recurrent Glioblastoma: STERIMGLI Phase I Results. **The Oncologist**, v. 28, n. 9, p. 825–e817, 7 set. 2023.
- PRICE, M. et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2017–2021. **Neuro-Oncology**, v. 26, n. Supplement_6, p. vi1–vi85, 6 out. 2024.
- PRICE, M.; BALLARD, C.; BENEDETTI, J. *et al.* CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2017–2021. **Neuro-Oncology**, v. 26, suplemento 6, p. vi1–vi85, out. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1093/neuonc/noae145>.
- PRICE, M.; NEFF, C.; NAGARAJAN, N. *et al.* CBTRUS Statistical Report: American Brain Tumor Association & NCI Neuro-Oncology Branch Adolescent and Young Adult Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2016–2020. **Neuro-Oncology**, v. 26, suppl. 3, p. iii1–iii53, maio 2024. DOI: <https://doi.org/10.1093/neuonc/noae047>.
- RAFII, S. et al. A2AR as a Prognostic Marker and a Potential Immunotherapy Target in Human Glioma. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 7, p. 6688, jan. 2023.

REARDON, D. A. et al. Effect of Nivolumab vs Bevacizumab in Patients With Recurrent Glioblastoma: The CheckMate 143 Phase 3 Randomized Clinical Trial. **JAMA Oncology**, v. 6, n. 7, p. 1003, 1 jul. 2020.

REARDON, D. A. et al. OS10.3 Randomized Phase 3 Study Evaluating the Efficacy and Safety of Nivolumab vs Bevacizumab in Patients With Recurrent Glioblastoma: CheckMate 143. **Neuro-Oncology**, v. 19, n. suppl_3, p. iii21–iii21, 2017.

REARDON, D. A. et al. Phase II study to evaluate safety and efficacy of MEDI4736 (durvalumab) + radiotherapy in patients with newly diagnosed unmethylated MGMT glioblastoma (new unmeth GBM). **Journal of Clinical Oncology**, v. 37, n. 15_suppl, p. 2032–2032, 20 maio 2019.

REARDON, D. A. et al. Treatment with pembrolizumab in programmed death ligand 1–positive recurrent glioblastoma: Results from the multicohort phase 1 KEYNOTE-028 trial. **Cancer**, v. 127, n. 10, p. 1620–1629, 15 maio 2021.

REIHANIAN, Z. et al. Impact of Age and Gender on Survival of Glioblastoma Multiforme Patients: A Multicenter Retrospective Study. **Cancer Reports**, v. 7, n. 11, p. e70050, 2024.

REVILLA-PACHECO, F.; RODRÍGUEZ-SALGADO, P.; BARRERA-RAMÍREZ, M. *et al.* Extent of resection and survival in patients with glioblastoma multiforme: Systematic review and meta-analysis. **Medicine**, [S.l.], v. 100, n. 25, p. e26432, 2021. DOI: 10.1097/MD.00000000000026432.

SALVATO, I.; MARCHINI, A. Immunotherapeutic Strategies for the Treatment of Glioblastoma: Current Challenges and Future Perspectives. **Cancers**, v. 16, n. 7, p. 1276, 25 mar. 2024.

SÁNCHEZ-MELGAR, A. et al. Antitumoral Action of Resveratrol Through Adenosinergic Signaling in C6 Glioma Cells. **Frontiers in Neuroscience**, v. 15, p. 702817, 1 set. 2021.

SCHAF, L. R.; MELLINGHOFF, I. K. Glioblastoma and Other Primary Brain Malignancies in Adults: A Review. **JAMA**, v. 329, n. 7, p. 574–587, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1001/jama.2023.0023>.

SCHÄKEL, L. et al. Protein kinase inhibitor ceritinib blocks ectonucleotidase CD39 – a promising target for cancer immunotherapy. **Journal for Immunotherapy of Cancer**, v. 10, n. 8, p. e004660, 2022.

SCHALPER, K. A. et al. Neoadjuvant nivolumab modifies the tumor immune microenvironment in resectable glioblastoma. **Nature Medicine**, v. 25, n. 3, p. 470–476, 2019.

SCHIEFFEL, T. B. et al. Immunosuppression in Gliomas via PD-1/PD-L1 Axis and Adenosine Pathway. **Frontiers in Oncology**, v. 10, p. 617385, 15 fev. 2021.

SCHEI, S.; SAGBERG, L. M.; BØ, L. E. *et al.* Association between patient-reported cognitive function and location of glioblastoma. **Neurosurgical Review**, v. 46, p. 282, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10143-023-02177-z>.

SCHOBER, P.; BOER, C.; SCHWARTE, L. A. et al. Correlation Coefficients: Appropriate Use and Interpretation. **Anesthesia & Analgesia**, v.126, n.5, p.1763–1768, 2018.

- SEKER-POLAT, F. et al. Tumor Cell Infiltration into the Brain in Glioblastoma: From Mechanisms to Clinical Perspectives. **Cancers**, v. 14, n. 2, p. 443, 17 jan. 2022.
- SHADBAD, M. A. et al. A Systematic Review of the Tumor-Infiltrating CD8+ T-Cells/PD-L1 Axis in High-Grade Glial Tumors: Toward Personalized Immuno-Oncology. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 734956, 17 set. 2021.
- SHADBAD, M. A. et al. A Systematic Review of the Tumor-Infiltrating CD8+ T-Cells/PD-L1 Axis in High-Grade Glial Tumors: Toward Personalized Immuno-Oncology. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 734956, 17 set. 2021.
- SHAW, R. et al. MGMT in TMZ-based glioma therapy: Multifaceted insights and clinical trial perspectives. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1871, n. 3, p. 119673, 2024.
- SHU, J.; QIU, G.; ILYAS, M. A Semi-automatic Image Analysis Tool for Biomarker Detection in Immunohistochemistry Analysis. **2013 Seventh International Conference on Image and Graphics**, 2013.
- SIMON, M.; HAGEMANN, A.; GAJADIN, S. *et al.* Surgical treatment for insular gliomas: A systematic review and meta-analysis on behalf of the EANS neuro-oncology section. **Brain & Spine**, v. 4, p. 102828, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bas.2024.102828>.
- SOBHANI, N. et al. Analysis of PD-L1 and CD3 Expression in Glioblastoma Patients and Correlation with Outcome: A Single Center Report. **Biomedicines**, v. 11, n. 2, p. 311, 22 jan. 2023.
- SOBHANI, N. et al. Analysis of PD-L1 and CD3 Expression in Glioblastoma Patients and Correlation with Outcome: A Single Center Report. **Biomedicines**, v. 11, n. 2, p. 311, 22 jan. 2023.
- SOLOMONS, M. R.; JAUNMUKTANE, Z.; WEIL, R. S. *et al.* Seizure outcomes and survival in adult low-grade glioma over 11 years: living longer and better. **Neuro-Oncology Practice**, v. 7, n. 2, p. 196–201, abr. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1093/nop/npz056>.
- TANG, Q. et al. The role of PD-1/PD-L1 and application of immune-checkpoint inhibitors in human cancers. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 964442, 13 set. 2022.
- TOGAO, O.; HIWATASHI, A.; YAMASHITA, K. *et al.* Differentiation of high-grade and low-grade diffuse gliomas by intravoxel incoherent motion MR imaging. **Neuro-Oncology**, v. 18, n. 1, p. 132-141, jan. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1093/neuonc/nov147>.
- TORRES, Á. et al. Extracellular adenosine promotes cell migration/invasion of Glioblastoma Stem-like Cells through A3 Adenosine Receptor activation under hypoxia. **Cancer Letters**, v. 446, p. 112–122, 2019.
- TOUAT, M. et al. Mechanisms and therapeutic implications of hypermutation in gliomas. **Nature**, v. 580, n. 7804, p. 517–523, 23 abr. 2020.
- TSIAMPALI, J. et al. Enzymatic Activity of CD73 Modulates Invasion of Gliomas via Epithelial–Mesenchymal Transition-Like Reprogramming. **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 11, p. 378, 11 nov. 2020.

- ÜLGEN, E. et al. Whole exome sequencing–based analysis to identify DNA damage repair deficiency as a major contributor to gliomagenesis in adult diffuse gliomas. **Journal of Neurosurgery**, v. 132, n. 5, p. 1435–1446, 2020.
- VALENZUELA-FUENZALIDA, J. J.; MOYANO-VALAREZO, L.; SILVA-BRAVO, V. *et al.* Association between the Anatomical Location of Glioblastoma and Its Evaluation with Clinical Considerations: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Journal of Clinical Medicine**, v. 13, n. 12, p. 3460, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/jcm13123460>.
- VIMALATHAS, G.; KRISTENSEN, B. W. Expression, prognostic significance and therapeutic implications of PD-L1 in gliomas. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 48, n. 1, p. e12767, 2022.
- VRANIC, S.; GATALICA, Z. PD-L1 testing by immunohistochemistry in Immuno-Oncology. **Bosnian Journal of Basic Medical Sciences**, 7 ago. 2022.
- WANG, J.; MATOSEVIC, S. NT5E/CD73 as Correlative Factor of Patient Survival and Natural Killer Cell Infiltration in Glioblastoma. **Journal of Clinical Medicine**, v. 8, n. 10, p. 1526, 2019.
- WANG, J.; MATOSEVIC, S. NT5E/CD73 as Correlative Factor of Patient Survival and Natural Killer Cell Infiltration in Glioblastoma. **Journal of Clinical Medicine**, v. 8, n. 10, p. 1526, 23 set. 2019.
- WANG, M.; JIA, J.; CUI, Y. et al. CD73-positive extracellular vesicles promote glioblastoma immunosuppression by inhibiting T-cell clonal expansion. **Cell Death Dis**, v.12, n.11, p.1065, 2021.
- WELLER, M.; VAN DEN BENT, M.; PREUSSER, M. *et al.* EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 18, p. 170-186, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41571-020-00447-z>.
- WILLINGHAM, S. B.; HOTSON, A. N.; MILLER, R. A. Targeting the A2AR in cancer; early lessons from the clinic. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 53, p. 126–133, ago. 2020.
- YALAMARTY, S. S. K. et al. Mechanisms of Resistance and Current Treatment Options for Glioblastoma Multiforme (GBM). **Cancers**, v. 15, n. 7, p. 2116, 1 abr. 2023.
- YALAMARTY, S. S. K.; FILIPCZAK, N.; LI, X. *et al.* Mechanisms of resistance and current treatment options for glioblastoma multiforme (GBM). **Cancers**, Basel, v. 15, n. 7, p. 2116, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers15072116>.
- YAN, A. et al. CD73 Promotes Glioblastoma Pathogenesis and Enhances Its Chemoresistance via A_{2B} Adenosine Receptor Signaling. **The Journal of Neuroscience**, v. 39, n. 22, p. 4387–4402, 29 maio 2019.
- YAO, Y. et al. B7-H1 is correlated with malignancy-grade gliomas but is not expressed exclusively on tumor stem-like cells. **Neuro-Oncology**, v. 11, n. 6, p. 757–766, 1 dez. 2009.
- ZHU, Z. et al. PD-L1-Mediated Immunosuppression in Glioblastoma Is Associated With the Infiltration and M2-Polarization of Tumor-Associated Macrophages. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 588552, 30 nov. 2020.

ZHU, Z. et al. PD-L1-Mediated Immunosuppression in Glioblastoma Is Associated With the Infiltration and M2-Polarization of Tumor-Associated Macrophages. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 588552, 30 nov. 2020.

ZIMMERMANN, H. History of ectonucleotidases and their role in purinergic signaling. **Biochemical Pharmacology**, v. 187, p. 114322, 2021.

ANEXO I



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
Rodovia SC 484 - Km 02, Fronteira Sul, 89815-899 (49) 2049-6428
sec.ppgcb@uffs.edu.br

Comitê de Ética em Pesquisa - CEP/UFFS
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)
“NEOPLASIAS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL:
ANÁLISE DO SISTEMA PURINÉRGICO E ESTRESSE OXIDATIVO”

Prezado participante,

Você está sendo convidado(a) a participar da pesquisa intitulada “Neoplasias do Sistema Nervoso Central: análise do sistema purinérgico e estresse oxidativo”. Desenvolvida pela Prof^a Dr^a Débora Tavares de Resende e Silva, pesquisadora responsável e docente do curso de Medicina, Enfermagem e do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas (PPGCB) da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), campus Chapecó-SC.

O objetivo central da pesquisa é avaliar a atividade e expressão dos componentes do sistema purinérgico, que representam uma importante forma de comunicação de partes do organismo com outras e, além disso, buscamos examinar o estresse no metabolismo resultante dos distúrbios que a doença causa por meio de parâmetros do perfil oxidante e antioxidante e marcadores tumorais, presentes no sangue, em pacientes com diagnóstico de Neoplasia no Sistema Nervoso Central.

Portanto, estudos como este servem de base científica para mais pesquisas clínicas de diagnóstico e tratamento sobre o sistema purinérgico e o estresse oxidativo nas Neoplasias do Sistema Nervoso Central, o que acarreta possíveis diminuições de custos no sistema público de saúde, melhorias na qualidade de vida dos pacientes e uma redução dos efeitos adversos decorrente dessa doença.

O convite à sua participação se deve porque identificamos o seu diagnóstico de uma classe de Neoplasia do Sistema Nervoso Central e por submeter-se a um procedimento cirúrgico de retirada desse tumor. E, também, por possuir mais de 18 anos de idade e sem

histórico de doença crônica associada e, por esta razão, adequa-se aos critérios de inclusão estabelecidos para este estudo.

Vale reforçar que a sua participação não é obrigatória e você tem plena autonomia para decidir se quer ou não participar, bem como desistir da colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação e sem nenhuma forma de penalização. Você não será penalizado de nenhuma maneira caso decida não consentir sua participação, ou desista da mesma. Contudo, ela é muito importante para a execução da pesquisa.

Você não receberá remuneração e nenhum tipo de recompensa nesta pesquisa, sendo sua participação voluntária. Serão garantidas a confidencialidade e a privacidade das informações por você prestadas. Qualquer dado que possa identificá-lo será omitido na divulgação dos resultados da pesquisa e o material armazenado em local seguro. Os resultados serão divulgados em eventos e/ou publicações científicas mantendo sigilo dos dados pessoais.

A qualquer momento, durante a pesquisa, ou posteriormente, você poderá solicitar do pesquisador informações sobre sua participação e/ou sobre a pesquisa, o que poderá ser feito através dos meios de contato explicitados neste Termo. Essas amostras biológicas e os dados coletados nos prontuários ficarão sob a guarda do pesquisador responsável na Universidade Federal da Fronteira Sul e serão utilizados exclusivamente para o desenvolvimento dessa pesquisa e em conformidade com o projeto de estudo. Desse modo, elas somente poderão ser utilizadas em pesquisas futuras mediante ao incremento de nova autorização do participante.

Sua participação consistirá em consentir com o acesso ao prontuário eletrônico do paciente para caracterização da amostra, e com o aproveitamento e armazenamento do material tumoral removido durante a cirurgia. Sobre a neurocirurgia, é importante salientar que essa pesquisa não impactará no ato de ressecção cirúrgica, pois será aproveitado e armazenado unicamente o material biológico tumoral que foi removido no procedimento cirúrgico. Esse material é composto por tecido retirado, pelo neurocirurgião, da lesão ou tumor do tecido nervoso do cérebro ou da medula espinhal e não compromete a amostragem específica de análise do material para conduta médica e terapêutica pós-cirúrgica pelo fim de coleta para a pesquisa. Além disso, permitir a coleta de sangue por meio de uma punção venosa realizada por uma equipe de enfermagem devidamente qualificada e seguindo o rigor metodológico, coletará 30 ml de amostra sanguínea que será acondicionada em tubos de coletas de materiais biológicos (tubo com citrato, tubo sem anticoagulante e tubo com EDTA).

Todo o material biológico coletado, será devidamente acondicionado e encaminhado imediatamente para as dependências da Universidade, utilizado exclusivamente dentro dos laboratórios da UFFS para fins de pesquisa.

Estas as amostras coletadas, Instituição hospitalar parceira de referência na cidade de Chapecó, serão condicionadas imediatamente, pelos pesquisadores, em refrigeração nas caixas térmicas de isopor, até o término das coletas do dia. Assim, as baixas temperaturas, do ambiente interno da caixa, serão controladas por intermédio de um termômetro e placas de gelo e serão mantidas adequadamente para preservar as propriedades biológicas da amostra, as quais serão encaminhadas, de forma que o transporte seja rápido e ágil, até os laboratórios da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS. Nesse local, as amostras serão separadas em soro, por meios automatizados, para que então ocorram as análises. Igualmente, no laboratório dessa instituição de ensino, as amostras biológicas serão armazenadas em refrigeradores por tempo necessário para a realização do estudo descrito no cronograma de desenvolvimento do projeto. Após esse período, será realizado o descarte das amostras conforme protocolos estabelecidos para tal procedimento. Além disso, o descarte dos tubo de coleta e dos demais materiais infectantes e perfurocortantes será realizado pelos pesquisadores na UFFS de acordo com orientações descritas nos protocolos institucionais.

A presente pesquisa tem o propósito de promover a ampliação do conhecimento biológico e do desenvolvimento das ciências médicas. Dessa forma, os pesquisadores estimam que, no decorrer da análise dos resultados laboratoriais caracterizados, existem possibilidades de obterem dados os quais podem fornecer uma base científica para a estruturação de procedimentos médicos inovadores e a ampliação e especificação de novas intervenções médicas no combate às neoplasias. De tal forma, evidencia-se que, esses conhecimentos podem resultar em novas informações ou na confirmação de estudos já registrados na literatura, que são primordiais para o desenvolvimento tecnológico científico e para a facilitação do diagnóstico e do tratamento médico das neoplasias do sistema nervoso central. Tais eventos resultam no aumento da capacidade científica promover a prevenção em saúde, o combate ao câncer e o alívio do sofrimento dos pacientes, de modo que isso pode trazer benefícios posteriores à sociedade. Ademais, pode elencar que os principais benefícios imediatos aos contribuintes da pesquisa estão na colaboração deles com os avanços médicos que podem proporcionar resultados úteis no combate à doença e trazer maior qualidade de vida para as pessoas e comunidade.

Assim, os benefícios relacionados com a sua colaboração nesta pesquisa são, contribuir diretamente para o avanço científico nas áreas da progressão de tumores e no

controle, prevenção e tratamento para as Neoplasias do Sistema Nervoso Central, colaborando com os avanços da medicina e trazendo bem-estar, conforto e comodidade a diversas pessoas. A participação na pesquisa poderá causar riscos, principalmente na extração do material biológico, quanto à coleta sanguínea pode ocorrer dor, extravasamento de fluidos intravenosos, edema e hematoma no local da punção, já na coleta do material tumoral, por sua vez, os riscos estão associados ao procedimento cirúrgico conforme sinalizado pelo médico cirurgião anteriormente. Vale destacar que esses potenciais riscos serão amenizados, pois serão realizados por um profissional qualificado e com experiência para desempenhar a atividade.

Igualmente, dentre as medidas reparatórias, caso os riscos físicos venham a se concretizar, estão a aplicação de técnicas cabíveis e adequadas para a reparação do dano, por profissional qualificado, e orientações, com bases científicas, aos participantes para mitigar e reparar a lesão ocasionada a esses contribuintes na coleta de material biológico. Além disso, essa atenção profissional e atendimento será gratuito. Os pesquisadores também informarão a instituição envolvida e o serviço/local de coleta dos dados e material biológico sobre a intercorrência e contribuirão impreterivelmente com medidas necessárias cabíveis à essa instituição hospitalar.

É importante ressaltar que existe a possibilidade de vazamento e quebra de sigilo dos dados coletados, pelos pesquisadores, nos prontuários dos participantes da pesquisa. Tais intercorrências podem ocorrer na coleta, processamento e armazenamento desses dados sigilosos. Os pesquisadores tomarão medidas cabíveis para minimizar a possibilidade desses riscos. Farão isso com o princípio de respeitar os preceitos éticos sigilosos das informações coletadas nos prontuários e com a prerrogativa de resguardar esse sigilo. Para isso, os pesquisadores respeitarão o anonimato dos participantes no decorrer da coleta dos dados, de modo que os participantes não serão identificados pelo nome no instrumento de coleta. Igualmente, o processamento e o armazenamento das informações serão realizados de forma cautelosa. Para isso, os dados serão manipulados e arquivados nas dependências dos laboratórios da Universidade Federal da Fronteira Sul de forma mais segura possível. Essa proteção será feita com a imposição de senhas para acessos a esses dados em computadores e garantir que somente pesquisadores desse projeto terão acesso a essas informações restritas.

Ademais, os dados coletados de forma física, em papel, serão armazenados em ambientes protegidos por chaves que permanecerão sobre os cuidados restritos dos pesquisadores. Os dados dos prontuários serão arquivados pela equipe de pesquisa e eliminados posteriormente ao tempo de guarda (5 anos). Os dados de arquivos digitais serão

padronizados no formato de planilhas e estarão dispostos em um sistema de “nuvem” o qual possuirá os dados de acesso “e-mail” e “senha” somente os responsáveis pela pesquisa, também serão acondicionados em um HD externo sob responsabilidade da pesquisadora principal, sendo que após o período de 5 anos o grupo de pesquisadores irão realizar a exclusão desses arquivos digitais como forma de descarte deste, com relação aos documentos físicos, os mesmos serão acondicionados em pastas de arquivos especificando a pesquisa e o tipo de material disposto nesta, os mesmos serão armazenados em armário com chave na Universidade Federal da Fronteira Sul sob responsabilidade da pesquisadora principal, os mesmos após o período de 5 anos serão fragmentados através de máquina específica e após realizado o descarte em lixo descartável.

Se o vazamento dos dados ocorrer, os pesquisadores tomarão todas as medidas legais cabíveis para resguardar o direito ao anonimato dos participantes e garantir a apuração legal de tal intercorrência, com a finalidade de evitar danos e resguardar os direitos dos envolvidos e participantes.

Ressalta-se que, caso algum dos riscos mencionados neste termo se concretize, a instituição envolvida será informada sobre o ocorrido.

No final da pesquisa o grupo de estudo desenvolverá um relatório científico com todos os principais dados, resultados e conclusões deste trabalho. Tal descrição científica será entregue de forma presencial e eletrônica à Instituição hospitalar parceira de referência na cidade de Chapecó. Igualmente, será enviado um e-mail com a devolutiva dos resultados do estudo aos participantes da pesquisa. Ademais, é importante ressaltar que os resultados serão divulgados em eventos e/ou publicações científicas mantendo sigilo dos dados pessoais. Caso concorde em participar, uma via deste termo ficará em seu poder e a outra será entregue ao pesquisador. Em caso de dúvida quanto à condução ética do estudo, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFFS nos endereços:

Número do CAAE: 65163722.0.0000.5564

Telefone: (049) 2049-3745 e/ou E-Mail: cep.uffs@uffs.edu.br

Universidade Federal da Fronteira Sul/UFFS - Comitê de Ética em Pesquisa da UFFS

Rodovia SC 484 Km 02, Fronteira Sul, Chapecó-SC – Brasil, CEP 89815-899

Desde já agradecemos sua participação!

Declaro que entendi os objetivos e condições de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

Eu, _____ (Nome completo do(a) participante) autorizo a coleta do material biológico, o depósito, o armazenamento, a utilização e o descarte conforme especificado no presente do documento.

Data:_____.

E-mail para a devolutiva do relatório final da pesquisa ao participante:_____.

Assinatura do(a) participante

Assinatura do(a) pesquisador

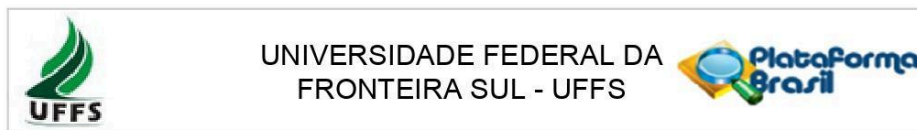
Em caso de dúvidas:

Telefone: (49) 998969097 e/ou E-Mail: debora.silva@uffs.edu.br.

Universidade Federal da Fronteira Sul/UFFS - Prof^a Dr^a Débora Tavares de Resende e Silva (pesquisadora responsável).

Rodovia SC 484 Km 02, Fronteira Sul, Chapecó-SC – Brasil, CEP 89815-899.

ANEXO II



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Neoplasias do sistema nervoso central: análise do sistema purinérgico e estresse oxidativo

Pesquisador: Débora Tavares de Resende e Silva

Área Temática:

Versão: 9

CAAE: 65163722.0.0000.5564

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL - UFFS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 6.746.802

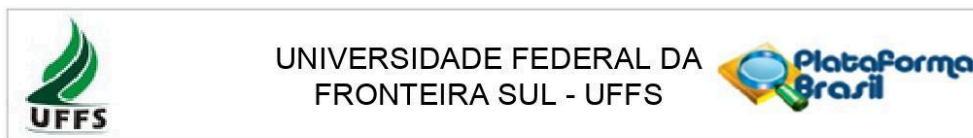
Apresentação do Projeto:

Trata-se de apresentação de emenda ao protocolo de pesquisa intitulado "Neoplasias do sistema nervoso central: análise do sistema purinérgico e estresse oxidativo", para o qual a pesquisadora responsável encaminhou a seguinte justificativa:

Justificativa da Emenda:

Justificativa para ampliação do cronograma: Diante do "Relatório Parcial de Pesquisa para o Comitê de Ética", descrito na parte 1 desse documento, o qual detalha o desenvolvimento do projeto, resalto que os tumores do Sistema Nervoso Central são classificados em vários tipos histológicos, os quais devem ser agrupados de acordo com a linhagem a que eles pertencem (tipos de tumores) para realização do estudo proposto no projeto. Igualmente, cada tipo de tumor agrupado exige análises separadas e específicas, ou seja, as análises devem ser pertinentes às especificidades de cada linhagem tumoral do grupo. Por

Endereço: Rodovia SC 484 Km 02, Fronteira Sul - Bloco da Biblioteca - sala 310, 3º andar
Bairro: Área Rural **CEP:** 89.815-899
UF: SC **Município:** CHAPECÓ
Telefone: (49)2049-3745 **E-mail:** cep.uffs@uffs.edu.br



Continuação do Parecer: 6.746.802

suporte Plataforma Brasil das 08h às 20h, de segunda a sexta;

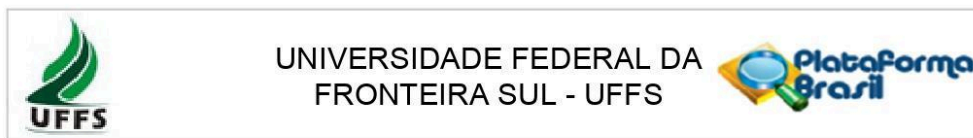
Contate a central de suporte da Plataforma Brasil, clicando no ícone no canto superior direito da página eletrônica da Plataforma Brasil. O atendimento é online.

Boa pesquisa!

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_2302863_E4.pdf	14/03/2024 08:03:16		Aceito
Cronograma	CRONOGRAMAAMPLIADO.pdf	14/03/2024 07:52:50	ADINEI ABADIO SOARES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto de Pesquisa_NSNC_marco dois mil vinte e quatro.pdf	14/03/2024 07:49:16	ADINEI ABADIO SOARES	Aceito
Outros	Pedido de Emenda ao Protocolo de Pesquisa reenviado.pdf	14/03/2024 07:43:57	ADINEI ABADIO SOARES	Aceito
Outros	Carta de Emenda marco dois mil vinte e quatro.pdf	14/03/2024 07:39:45	ADINEI ABADIO SOARES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Emenda3_TCLE_relato_de_caso.pdf	03/02/2024 15:49:32	ADINEI ABADIO SOARES	Aceito
Outros	Emenda3_PEDIDO_DE_EMENDA_AO_PROTOCOLO_DE_PESQUISA.pdf	03/02/2024 15:48:52	ADINEI ABADIO SOARES	Aceito
Outros	Carta de resposta ao parecer número 6537200.pdf	12/12/2023 08:43:27	ADINEI ABADIO SOARES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETONSNCCPEP6537200.docx	12/12/2023 08:37:53	ADINEI ABADIO SOARES	Aceito
Outros	carta de aceite.pdf	12/12/2023 08:35:23	ADINEI ABADIO SOARES	Aceito
Outros	EMENDACEPFLUORESCENCIA.pdf	31/10/2023 22:30:14	ADINEI ABADIO SOARES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE acesso prontuario.pdf	03/07/2023 11:12:15	ANGELA MAKELI KOSOSKI DALAGNOL	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE ajuste emenda.pdf	03/07/2023 11:10:44	ANGELA MAKELI KOSOSKI DALAGNOL	Aceito

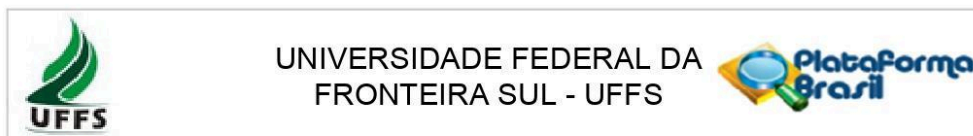
Endereço: Rodovia SC 484 Km 02, Fronteira Sul - Bloco da Biblioteca - sala 310, 3º andar
Bairro: Área Rural **CEP:** 89.815-899
UF: SC **Município:** CHAPECO
Telefone: (49)2049-3745 **E-mail:** cep.uffs@uffs.edu.br



Continuação do Parecer: 6.746.802

Outros	Cartaderespostaemenda.pdf	03/07/2023 11:10:13	ANGELA MAKELI KOSOSKI DALAGNOL	Aceito
Outros	Deferimento.pdf	12/06/2023 10:46:45	ANGELA MAKELI KOSOSKI DALAGNOL	Aceito
Outros	ProntuarioPacientesEmenda.pdf	12/06/2023 10:46:36	ANGELA MAKELI KOSOSKI DALAGNOL	Aceito
Outros	TCLEUNIMEDemenda.pdf	12/06/2023 10:46:23	ANGELA MAKELI KOSOSKI DALAGNOL	Aceito
Folha de Rosto	Folharostoatuizada.pdf	16/03/2023 19:57:06	ANGELA MAKELI KOSOSKI DALAGNOL	Aceito
Outros	SEGUNDACARTEPENDENCIAS.pdf	16/03/2023 16:32:00	ANGELA MAKELI KOSOSKI DALAGNOL	Aceito
Brochura Pesquisa	PROJETOPESQUISACORRIGIDO.pdf	16/03/2023 16:31:02	ANGELA MAKELI KOSOSKI DALAGNOL	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tclepessoassaudaveiscorrigido.pdf	16/03/2023 16:19:58	ANGELA MAKELI KOSOSKI DALAGNOL	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tclepacientescorrigido.pdf	16/03/2023 15:40:59	ANGELA MAKELI KOSOSKI DALAGNOL	Aceito
Outros	Carta_pendencias.docx	02/01/2023 12:38:49	ANGELA MAKELI KOSOSKI DALAGNOL	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA_CORRIGIDO.docx	02/01/2023 12:37:24	ANGELA MAKELI KOSOSKI DALAGNOL	Aceito
Outros	declaracaodr_marcelo.pdf	02/01/2023 12:36:46	ANGELA MAKELI KOSOSKI DALAGNOL	Aceito
Outros	INSTRUMENTO_DE_COLETA_DE_DADOS.docx	02/01/2023 12:31:58	ANGELA MAKELI KOSOSKI DALAGNOL	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_Pesquisa_NSNC_corrigido.docx	02/01/2023 12:30:54	ANGELA MAKELI KOSOSKI DALAGNOL	Aceito
Outros	TCLE_Pessoas_Saudaveis_Corrigido.docx	02/01/2023 12:28:59	ANGELA MAKELI KOSOSKI DALAGNOL	Aceito

Endereço: Rodovia SC 484 Km 02, Fronteira Sul - Bloco da Biblioteca - sala 310, 3º andar
Bairro: Área Rural **CEP:** 89.815-899
UF: SC **Município:** CHAPECO
Telefone: (49)2049-3745 **E-mail:** cep.uffs@uffs.edu.br



Continuação do Parecer: 6.746.802

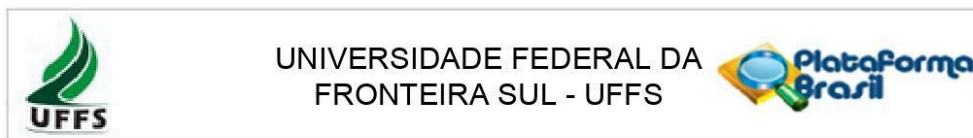
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Pacientes_corrigido.docx	02/01/2023 12:27:05	ANGELA MAKELI KOSOSKI DALAGNOL	Aceito
Outros	Termo_de_Compromisso.pdf	02/01/2023 12:26:39	ANGELA MAKELI KOSOSKI DALAGNOL	Aceito
Outros	Termo_de_Confidencialidade.pdf	02/01/2023 12:25:44	ANGELA MAKELI KOSOSKI DALAGNOL	Aceito
Outros	declaracao_uffs.pdf	03/11/2022 10:30:55	ANGELA MAKELI KOSOSKI DALAGNOL	Aceito
Outros	Declaracaodrmarcelo.pdf	01/11/2022 16:42:53	ANGELA MAKELI KOSOSKI DALAGNOL	Aceito
Outros	declaracaoluanlucena.pdf	01/11/2022 16:42:00	ANGELA MAKELI KOSOSKI DALAGNOL	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	aceite.pdf	01/11/2022 16:35:12	ANGELA MAKELI KOSOSKI DALAGNOL	Aceito
Declaração de Pesquisadores	202209230802.pdf	01/11/2022 16:21:45	ANGELA MAKELI KOSOSKI DALAGNOL	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	01/11/2022 16:20:08	ANGELA MAKELI KOSOSKI DALAGNOL	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjPesquisa_NSNC2.pdf	01/11/2022 16:19:13	ANGELA MAKELI KOSOSKI DALAGNOL	Aceito
Outros	TCLE_Pacientes.docx	01/11/2022 15:58:28	ANGELA MAKELI KOSOSKI DALAGNOL	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	01/11/2022 15:56:54	ANGELA MAKELI KOSOSKI DALAGNOL	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Controlo.docx	01/11/2022 15:28:11	ANGELA MAKELI KOSOSKI DALAGNOL	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Endereço: Rodovia SC 484 Km 02, Fronteira Sul - Bloco da Biblioteca - sala 310, 3º andar
Bairro: Área Rural **CEP:** 89.815-899
UF: SC **Município:** CHAPECO
Telefone: (49)2049-3745 **E-mail:** cep.uffs@uffs.edu.br



Continuação do Parecer: 6.746.802

Não

CHAPECO, 05 de Abril de 2024

Assinado por:
Renata dos Santos Rabello
(Coordenador(a))

Endereço: Rodovia SC 484 Km 02, Fronteira Sul - Bloco da Biblioteca - sala 310, 3º andar
Bairro: Área Rural **CEP:** 89.815-899
UF: SC **Município:** CHAPECO
Telefone: (49)2049-3745 **E-mail:** cep.uffs@uffs.edu.br