

Ricardo de Amoreira Gepp

**Análise prognóstica comparativa entre a perfusão cerebral por ressonância magnética e resultado da análise de metilação do promotor do gene MGMT nos gliomas malignos**

**Brasília, 2013**

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA  
SAÚDE

Ricardo de Amoreira Gepp

**Análise prognóstica comparativa entre a  
perfusão cerebral por ressonância magnética e  
resultado da análise de metilação do promotor  
do gene MGMT nos gliomas malignos**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

*Orientador: Prof. Dr. Luciano Farage*

*Brasília*

*2013*

Ricardo de Amoreira Gepp

**Análise prognóstica comparativa entre a perfusão cerebral por ressonância magnética e resultado da análise de metilação do promotor do gene MGMT nos gliomas malignos**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em 30 de julho de 2013

**BANCA EXAMINADORA**

Componente da banca - (presidente)

Prof. Dr. Luciano Farage  
Universidade de Brasília

Componente da banca

Prof. Dr. Riccardo Pratesi  
Universidade de Brasília

Componente da banca

Prof. Dr. Daniel Rocha de Carvalho  
Rede Sarah de Hospitais de Reabilitação

*Dedico este trabalho a*  
*Natércia, Roberto e Caterina, pelo apoio incondicional e ao amor durante todos os*  
*nossos dias juntos.*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Cláudia e Richard, a base e o princípio de tudo!

A minha Tia Clotilde, grande percussora pelo meu encanto pelo estudo.

Ao meu orientador Prof.Dr. Luciano Farage, pelo estímulo a realização deste trabalho.

A Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (UnB), especialmente aos seus funcionários e professores do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde.

A Rede SARAH de Hospitais de Reabilitação, por ser uma instituição única, que presta assistência ao paciente de forma humana, ética e associada à pesquisa científica.

Aos Professores Doutores Armando Alves (*in memoriam*), Roberto Colichio Gabarra e Marco Zanini, da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista (UNESP), meus iniciadores ao mundo da neurocirurgia.

Aos colegas da equipe de neurocirurgia da Rede SARAH de Hospitais de Reabilitação. Apoiadores na busca do melhor para os nossos pacientes.

Aos pacientes que anonimamente participaram deste estudo. Pessoas que demonstraram coragem e vontade de viver diante da luta contra a doença. Foram exemplos de vida, principalmente por terem demonstrado a mim o valor que devemos dar as coisas simples da vida.

## A ARTE DE CURAR

*“Ouvir... de verdade, ouvir... a melodia do ser...  
Perceber o tema, a essência do humano viver...  
Discernir a dissonância do doentio padecer...  
Sintonizar o poder do seu sadio querer...  
Entender, compreender, bem querer,  
Empatizar, identificar, bem afinar,  
Para então... e só então...”*

*Falar, dialogar, diagnosticar,  
Sugerir, intervir, agir,  
Tratar, medicar, operar,*

*Com clara firmeza e... suave delicadeza;  
Com profunda certeza e... harmônica beleza;  
Reavivando a verdade : científica, fria, dura,  
Com estética, artística... com bondade, com ternura”*

*Wilhelm Kenzler*

## **Resumo**

### **Introdução**

A RM é o padrão atual de imagem para o diagnóstico de tumores encefálicos, com imagens anatômicas e funcionais. Achados anatômicos por meio da ressonância magnética são insuficientes na avaliação prognóstica dos tumores, sendo necessária a utilização de outros métodos. A análise da metilação do gene promotor do MGMT é outro fator importante no prognóstico de gliomas anaplásicos. Este estudo teve o objetivo de estudar o prognóstico e as relações entre aspectos de perfusão na ressonância magnética e a análise da metilação do gene promotor de MGMT.

### **Métodos**

Foram analisados 39 pacientes com gliomas malignos encefálicos. Os pacientes foram submetidos a ressonância magnética com estudo da perfusão e após a cirurgia foi realizada a análise da presença de metilação do gene promotor de MGMT. Foi feita a análise estatística e o estudo das curvas de sobrevivências do grupo metilado e não metilado e da perfusão.

### **Resultados**

O estudo demonstrou que a sobrevida média dos pacientes negativos para metilação no gene promotor de *MGMT* foi de 17,9 meses, enquanto que no grupo positivo para metilação a sobrevida foi de 29,2 meses ( $p < 0,05$ ). A curva de Kaplan-Meier demonstrou uma sobrevida maior no grupo com metilação do gene promotor de MGMT ( $p < 0,01$  *log-rank* teste). A curva de sobrevivência da análise da metilação do gene promotor do MGMT com relação a perfusão demonstrou que nos pacientes com presença do gene a variação da perfusão entre alta e baixa não foi significativa ( $p = 0,944$ ). Na avaliação dos casos sem a presença do gene, os pacientes com perfusão alta tiveram pior sobrevida ( $p = 0,038$ ).

### **Conclusão**

A presença de metilação do gene promotor de MGMT associado a uma perfusão baixa na ressonância magnética, são fatores para melhor prognóstico nos gliomas malignos encefálicos.

**Descritores:** Glioma; ressonância magnetica, estudo comparativo, prognóstico

**ABSTRACT**

**BACKGROUND:** Magnetic resonance imaging is the current standard in the diagnostic imaging of brain tumors, yielding both anatomical and functional images. Anatomical findings on MRI are insufficient for the prognostic assessment of tumors; thus, other methods are needed. MGMT promoter methylation assessment is another important factor in the prognosis of malignant gliomas. The aim of the present study was to examine prognosis and the relationships between perfusion features on MRI and the presence of MGMT promoter methylation.

**METHOD:** A total of 39 patients with malignant brain gliomas were evaluated. The patients underwent brain MRI and perfusion, and the presence of MGMT promoter methylation was assessed postoperatively. Statistical analysis and a study of the survival curves of the methylated and unmethylated groups were performed, and perfusion was assessed for each group.

**RESULTS:** The mean survival of patients who were negative for MGMT promoter methylation was 17.9 months, while in the methylation-positive group survival was 29.2 months ( $p < 0.05$ ). The Kaplan-Meier curve showed longer survival for the group with MGMT promoter methylation ( $p < 0.01$  by the log-rank test). The survival curve of MGMT promoter methylation in relation to perfusion showed that variations between high and low perfusion values were not significant ( $p = 0.944$ ) for the methylation-positive patients. In the evaluation of the methylation-negative patients, those who showed high perfusion values had poorer survival ( $p = 0.038$ ).

**CONCLUSION:** Presence of MGMT promoter methylation in conjunction with low perfusion on MRI are factors of better prognosis in malignant brain gliomas.

**Keywords:** Glioma, Magnetic Resonance Imaging, Comparative study, Prognosis.

## Lista de Figuras

1 – Figura 1- Glioma maligno do lobo frontal.....	15
2 – Figura 2- Curva de Kaplan Meier comparando a sobrevida entre gliomas grau III e grau IV.....	29
3 – Figura 3 - Curva de sobrevivência geral.....	30
4 – Figura 4 - Análise de sobrevivência dos pacientes com resultado negativo para a presença de gene promotor de MGMT.....	31
5 – Figura 5 - Análise de sobrevivência dos pacientes com resultado positivo para a presença de gene promotor de MGMT.....	31
6 – Figura 6 – sobrevida dos pacientes que tiveram lesões corticais quando comparada as lesões subcorticais.....	32
7 – Figura 7 - Estudo da captação de contraste.....	33
8 – Figura 8 - Análise do índice mitótico.....	36
9 – Figura 9 - Glioma infiltrativo.....	37
10 – Figura 10 - Perfusão de glioma maligno.....	38
11 – Figura 11 - Glioblastoma multiforme.....	40

## **Lista de Tabelas**

1 – Tabela 1 - Aspectos clínicos.....	24
2 – Tabela 2 - Análise univariada e porcentagens.....	27
3 – Tabela 3 - Resultado final .....	28

**Lista de abreviaturas e siglas**

ADC = coeficiente de difusibilidade aparente

DSC = dynamic susceptibility-weighted contrast-enhanced

MGMT = O<sub>6</sub>-metilguanina-ADN-metiltransferase

MRI = magnetic resonance imaging

PCR = polymerase chain reaction

PWI = perfusion-weighted image

OMS = Organização Mundial de Saúde

rCBV= relative cerebral blood volume

RR= risco relativo

RM= ressonância magnética

SNC= Sistema nervoso central

VEGF = vascular endothelial growth factor

## Sumário

1 - INTRODUÇÃO .....	13
1.1 –Introdução geral .....	13
1.2 –Objetivo .....	17
2 – Método .....	18
2.1 –Pacientes .....	18
2.2 - Análise das imagens .....	20
2.3 - Análise da histologia e gene promotor de MGMT .....	21
2.4 - Análise estatística.....	23
3 – Resultados .....	24
3.1 – Características da amostra .....	24
3.2 – Aspectos radiológicos e histológicos .....	26
3.3 – Análise estatística .....	27
4- Discussão.....	34
5- Conclusão .....	43
6 - Referências bibliográficas .....	44

# 1 - INTRODUÇÃO

## 1.1 - Introdução geral

Os gliomas encefálicos são tumores raros quando comparados a outras neoplasias, cerca de 18.500 novos casos ocorrem nos Estados Unidos anualmente.(1;2) Aproximadamente 50% dos tumores encefálicos são considerados malignos e resultam em cerca de 13.000 óbitos ao ano.(3) A incidência dos tumores malignos do encéfalo vem gradativamente aumentando, principalmente com o progressivo aumento da população mais idosa.(3;4) Na faixa etária infantil, os tumores encefálicos são o segundo grupo de neoplasias mais comuns, sendo menos prevalentes apenas do que as doenças linfoproliferativas.(1-3)

Os gliomas são neoplasias derivadas de três tipos básicos de células gliais que incluem os astrócitos, oligodendrócitos e células endimárias (Figura 1).(5;6) A Organização Mundial de Saúde (OMS) estabeleceu uma classificação detalhada dos tumores do sistema nervoso central (SNC) composta de mais de 120 tipos de tumores primários.(7) A maioria dos tumores cerebrais e em especial os gliomas são classificados em uma escala de I a IV, sendo o grau IV o mais maligno.(4) Apesar desta diversidade, os tumores grau III e IV são denominados malignos, sendo por este motivo estudados de forma agrupada em muitos estudos, enquanto que os tumores grau I e II são considerados mais benignos.(3) Entre os principais tumores anaplásicos destacam-se: oligodendrogliomas, endimomas, astrocitomas anaplásicos (grau III) e o glioblastoma multiforme.(7)

Os tumores de alto grau de malignidade têm um prognóstico ruim, mesmo com todo o desenvolvimento tecnológico dos últimos anos que incluiu melhores técnicas operatórias, quimioterapia específica e radioterapia de alta dose e localizada.(8;9) Nas maiores séries de pacientes, a sobrevida média foi de 21,7 meses nos pacientes com gliomas malignos.(5) Esta maior sobrevida ocorreu em pacientes com bom resultado após a cirurgia e que apresentou resposta terapêutica a utilização da Temozolamida.(2) Nos casos em que não houve resposta ao uso da quimioterapia a sobrevida média foi de 12,7 meses.(2) Identificar antes do tratamento em qual grupo de resposta estará o paciente analisado é uma questão frequentemente abordada em estudos e na prática clínica. Atualmente novas formas

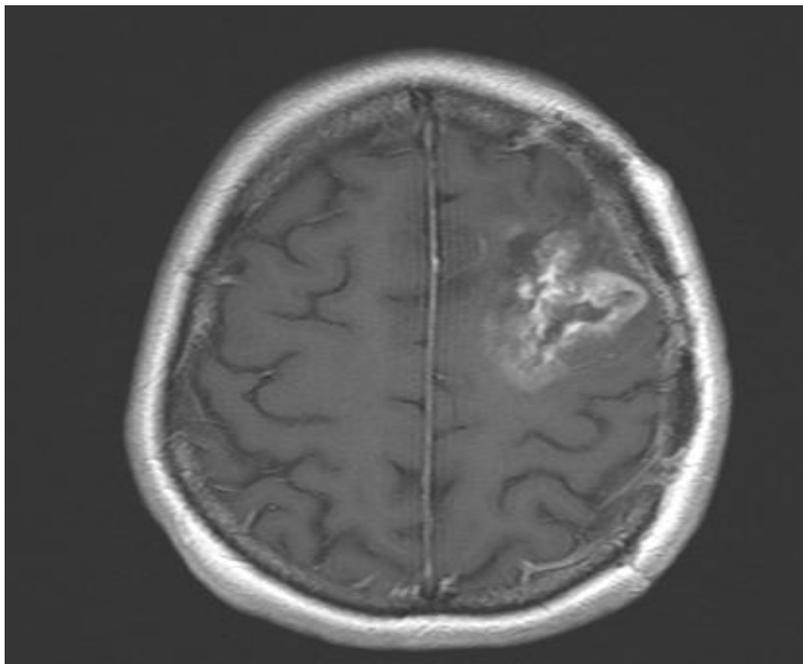
de avaliação da histologia tentam determinar quais são as formas de tumores de comportamento biológico mais agressivo e os fatores prognósticos de resposta ao tratamento quimioterápico.(2;10)

O manejo dos tumores malignos do SNC se modificou de forma significativa após a introdução dos métodos de imagem.(6-8) Inicialmente os tumores cerebrais eram estudados baseados apenas em avaliação clínica. Os primeiros exames radiológicos a ajudarem na identificação de processos neoplásicos foram a angiografia e a ventriculografia. Estes exames demonstravam desvios de estruturas vasculares ou ventriculares e assim era feito o diagnóstico de suposição, que existia uma massa tumoral causando este desvio da posição normal das estruturas. Com o surgimento da tomografia computadorizada do crânio e em seguida da ressonância magnética (RM), foi possível uma melhor caracterização anatômica e tecidual dos tumores, melhorando assim o diagnóstico pré-operatório e facilitando o planejamento cirúrgico. (8, 9) A RM apresenta diversas vantagens em relação à tomografia computadorizada, sendo hoje o exame de escolha. O método permite uma melhor diferenciação tecidual (melhor resolução de contraste), aquisição multiplanar e mais recentemente a introdução de técnicas funcionais que permitem análise bioquímica dos tecidos (espectroscopia) e estimativa da microvasculatura do encéfalo (difusão e perfusão).(8, 10) O princípio da RM consiste de um campo magnético estacionário, aplicar pulsos de radiofrequência que excitam os prótons de hidrogênio e geram sinal que serão transformados em imagem. As diferentes técnicas e ponderações são resultado de variações nos pulsos de radiofrequência aplicados.(7)

A utilização do meio de contraste permite a avaliação de sinal de quebra de barreira hemato-encefálica o que é interpretado como sinal de malignidade do tumor (Figura 1).(11) Classicamente a presença de efeito de massa e necrose são dois importantes preditores do grau de malignidade do tumor (Figura 1).(1) Entretanto, mesmo entre as neoplasias malignas pode ocorrer dificuldade de diagnóstico diferencial com tumores de baixo grau, quando houver pouco ou nenhum realce pelo meio de contraste, não ocorrer efeito de massa ou necrose.(1) Os gliomas de baixo grau também podem apresentar aspectos que na imagem convencional de RM demonstre aspectos sugestivos de tumor de alto grau.(1;12;15) Principalmente pelo fato de que imagens convencionais não gerarem informações sobre angiogênese,

metabolismo e celularidade, novas técnicas de RM foram desenvolvidas para que tenha um diagnóstico mais preciso e com valor prognóstico.(1)

Os estudos de perfusão podem ser realizados diretamente pela angiografia, tomografia com xenônio ou cintilografia cerebral. Na RM é realizado um estudo de perfusão relativo, pois a verdadeira concentração de meio de contraste que entra e que sai do tecido não é conhecida, mas estimado por curvas de sinal pelo tempo. O estudo envolve técnicas T2\* eco-planares (aquisição rápida e repetida), com a infusão venosa de meio de contraste a base de gadolínio, o que permite estimar o fluxo sanguíneo na região estudada.(11;13;16) A medição da hemodinâmica do tumor é útil na caracterização da neoplasia devido ao fato que a agressividade e o crescimento da lesão estão associados à hiperplasia endotelial e a nova vascularização do tumor.(16)



*Figura 1 - Imagem de RM demonstrando glioma maligno do lobo frontal. Observa-se a presença de captação de contraste e necrose na região central da lesão*

Devido à alta mortalidade entre pacientes diagnosticados com tumores cerebrais, principalmente o glioblastoma multiforme, há um crescente interesse no estudo dessa neoplasia, principalmente quanto à etiologia e fatores prognósticos.(11) O tratamento dos gliomas cerebrais baseia-se na realização de

cirurgia e tratamento coadjuvante com quimioterapia e radioterapia.(9;17) Atualmente novos esquemas terapêuticos com novas drogas específicas têm demonstrado resultados promissores. A utilização de medicações que agem especificamente em subtipos de tumores tem demonstrado um melhor resultado clínico e deve ser uma nova linha de pesquisa no futuro, principalmente a correlação com novas técnicas de RM.(18;19)

Além dos exames de imagem, houve um avanço grande na avaliação dos aspectos histológicos dos tumores malignos do cérebro. Neoplasias que anteriormente eram classificadas apenas com graus de diferenciação histológica passaram a ser analisadas com outros parâmetros.(12) As avaliações de biologia molecular dos tumores e de marcadores genéticos colaboram para diferenciar melhor os tumores do SNC e seus subtipos. Alterações no gene p53 são úteis para avaliar se o tumor de grau IV é primário ou evoluiu de um glioma grau III. Fatores como a perda de heterozigidade ou deleções parciais dos cromossomos 1p e 19q são exemplos de marcadores genéticos dos oligodendrogliomas e conferem um melhor prognóstico.(4, 13-15)

A OMS classifica os tumores cerebrais de acordo com a célula de origem e o grau de malignidade. O termo glioma é usado para tumores originados em células da glia: astrocitomas, glioblastomas, oligodendrogliomas e ependimomas. Os astrocitomas variam de aspecto e comportamento biológico conforme o local de origem no SNC. Os astrocitomas difusos situam-se na substância branca de um dos hemisférios cerebrais. São mal delimitados, mesclando-se imperceptivelmente com o tecido nervoso em volta. Geralmente é impossível definir onde acaba o tumor. Nunca são encapsulados. A cor é geralmente branca ou cinzenta, mas não raro há cistos com conteúdo líquido, áreas de necrose (amareladas), ou de hemorragia (vermelhas), em especial na parte interna do tumor. A consistência parece-se com a do tecido nervoso normal (mas pode ser mais firme ou mais mole). Os astrocitomas têm aspecto microscópico variável segundo o grau de diferenciação. Os tumores bem diferenciados são constituídos por células que lembram astrócitos normais ou patológicos. Os astrócitos neoplásicos podem ser: fibrilares, protoplasmáticos e gemistocíticos. Estes vários padrões podem ocorrer em diferentes áreas do mesmo tumor. É raro que um astrocitoma cerebral seja histologicamente homogêneo.

Os astrocitomas difusos bem diferenciados são considerados como grau II de malignidade pela OMS. Os astrocitomas menos diferenciados são denominados astrocitomas anaplásicos (grau III de malignidade), e os mais malignos, glioblastoma multiforme (grau IV). Aspecto macroscópico do glioblastoma apresenta-se como massa expansiva mal delimitada na substância branca de um hemisfério cerebral. Necrose é muito comum e pode envolver a maior parte do tumor. Pode haver formação de cistos e/ou hemorragia. Há comumente edema peritumoral e desvio da linha média, com hérnias. Em alguns casos o tumor infiltra o corpo caloso, passando ao hemisfério contralateral (tumor em asa de borboleta). O aspecto microscópico apresenta atipias celulares, mitoses, proliferação vascular e necrose coagulativa.

O MGMT é uma proteína de reparo do DNA, tem a função de reverter a alquilação da posição O6 da guanina. Esta ação promove a uma resistência das células tumorais aos agentes alquilantes como a temozolamida. A pesquisa de metilação do gene promotor do MGMT (O<sup>6</sup>-metilguanina-DNA metiltransferase) foi desenvolvida como um importante marcador para prognóstico em pacientes com tumores gliais malignos submetidos a tratamento com a temozolamida, um agente quimioterápico alquilante.(16, 17) Gliomas que sejam portadores de MGMT metilados são sensíveis ao tratamento quimioterápico.(17, 18) Esta análise genética tornou-se importante para a definição de tratamento quimioterápico e para o prognóstico dos pacientes.(19)

## **1.2 -Objetivo**

O presente estudo teve como objetivo analisar a relação prognóstica das imagens pré-operatórias de pacientes com gliomas malignos. Foram analisadas as características radiológicas das lesões tumorais e o valor relativo do volume sanguíneo cerebral por meio de análise de perfusão cerebral, sendo feita a relação com a sobrevida dos pacientes portadores de gliomas malignos. Além disso, foram estudados os aspectos de histologia, avaliação de marcadores genéticos e índice de proliferação mitótica. Os fatores radiológicos foram correlacionados também com os aspectos de biologia tumoral obtidos em cada caso para definir fatores prognósticos importantes.

## 2 – Método

### 2.1 – Pacientes

Inicialmente foram estudados 45 pacientes portadores de gliomas de grau III e IV na classificação da OMS (Organização Mundial de Saúde), sendo que todos os pacientes foram tratados no serviço de neurocirurgia e oncologia da Rede SARAH de Hospitais de Reabilitação (Rede Sarah), no período de janeiro de 2008 a dezembro de 2011. Todos os pacientes do estudo eram adultos, portadores de gliomas malignos que foram submetidos à cirurgia de ressecção da lesão tumoral e foram tratados com temozolamida como medicação quimioterápica inicial, além de terem sido submetidos a radioterapia.

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa (CEP) da Rede SARAH. Foi liberada a utilização de termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) por ser um estudo retrospectivo de revisão de prontuários, sem que nenhuma intervenção adicional tenha sido realizada nos pacientes. Todos os procedimentos realizados nos pacientes foram os necessários para o diagnóstico e tratamento habituais do manejo dos casos de tumores cerebrais.

O estudo foi delineado para avaliar pacientes adultos com imagem sugestiva de glioma maligno do cérebro. Definido os critérios de inclusão e exclusão. O grupo de pacientes foi admitido para avaliação com o grupo de neurocirurgia e com a equipe de oncologia, sendo que todos já apresentavam imagem com diagnóstico prévio sugestivo de tumor cerebral, realizado por meio de ressonância magnética. Todos os pacientes foram submetidos à cirurgia para o tumor cerebral na Rede SARAH com o objetivo de maior ressecção tumoral possível (maior que 90% era o objetivo, medido pelos critérios de MacDonald) e para a obtenção de material biológico para o diagnóstico histológico.

Os critérios de inclusão foram:

- Idade maior do que 18 anos;
- Ressonância magnética (RM) pré-operatória com perfusão (DSC);
- Avaliação histológica com índice mitótico (Ki 67);
- Análise do MGMT;
- Lesão tumoral do encéfalo localizada acima da tenda do cerebelo;

- Acompanhamento de ao menos doze meses ou até o óbito, após o diagnóstico.

Os critérios de exclusão foram:

- Pacientes com doenças graves associadas;
- Lesões medulares e tumores encefálicos infratentoriais;
- Tumores em crianças;
- Acompanhamento clínico por período de tempo inferior a doze meses, desde que não tenha ocorrido óbito do paciente.

Foram excluídos seis pacientes por não apresentarem tempo de seguimento e diagnóstico histológico diferente da proposta do delineamento do estudo. Nos casos onde foi possível apenas realização do MGMT também foi necessária a exclusão da pesquisa.

As variáveis analisadas quanto às características clínicas dos pacientes foram: idade, gênero, índice de Karnofsky no início do tratamento, localização da lesão primária quanto ao lobo cerebral predominante, localização quanto se a lesão era cortical ou subcortical, ocorrência de óbito e tempo de sobrevida medido em meses. A variável índice de Karnofsky foi escolhida devido ao fato de representar um fator prognóstico importante já detectado em outros estudos de sobrevivência sobre gliomas malignos.(20) O índice de Karnofsky esta descrito no anexo I.

O desfecho final do estudo foi à ocorrência do óbito ou o final da análise no tempo de seguimento mínimo delineado, sendo que o tempo de sobrevida foi calculado em meses. A ocorrência do óbito foi analisada e correlacionada estatisticamente com as principais variáveis de características clínicas dos pacientes.

## 2.2 - Análise das imagens

Os pacientes foram submetidos ao exame de RM antes do início do tratamento cirúrgico. Os estudos foram realizados em aparelhos GE (Milwaukee, WI, EUA) de 1,5 e 3T, que incluíram ao menos sagital T1, axiais T2 e FLAIR; sagital e axial T1 pós-gadolinéio e estudo de perfusão com infusão dinâmica de meio de contraste (Eco-planar GRE TR 1800, TE 35; com cortes de 5mm, sem intervalo (*gap*), total de 17 cortes). A dose de meio de contraste foi de 0,05mmol/Kg, a infusão foi realizada por injetora automática na velocidade de 4ml/s. A infusão dinâmica sempre foi precedida de  $\frac{1}{4}$  da dose de gadolinéio a fim de reduzir o efeito de extravazamento. Os mapas de perfusão foram gerados na GE AW Workstation 4,5 (Milwaukee, WI, EUA).

Os estudos foram avaliados por dois radiologistas com mais de cinco anos de experiência e com título de especialista do Colégio Brasileiro de Radiologia/ Associação Médica Brasileira. Os médicos radiologistas não sabiam dos resultados da presença de metilação do gene promotor de MGMT ou da avaliação histológica dos pacientes.

Foram analisadas as seguintes variáveis radiológicas: localização da lesão, tamanho do tumor, padrão de captação do meio de contraste, necrose tumoral, valor do rCBV no ponto mais significativo e disseminação da lesão para o outro hemisfério ou por trato. Os autores padronizaram para esta amostra um valor acima de 1,75 de rCBV para ser considerada como perfusão elevada.(21) Todas estas variáveis foram analisadas e relacionadas com o desfecho final de interesse do estudo, a ocorrência do óbito. As avaliações das variáveis quantitativas foram feitas de forma individual por cada radiologista do estudo e comparadas entre os mesmos. As discordâncias foram revistas pelo autor principal do estudo antes das análises estatísticas.

### 2.3 - Análise da histologia e gene promotor de MGMT

A histologia tumoral foi analisada por equipe de patologistas independentes ao estudo e qualificada, com experiência na análise de amostras de tumores do sistema nervoso central. Foram descritas as seguintes variáveis: grau de anaplasia segundo os critérios da OMS, índice mitótico Ki 67, presença, valor numérico e classificação da resposta do gene *MGMT*.

Na avaliação histológica foram utilizadas técnicas padrão de histologia e imunohistoquímica para que ocorresse a definição precisa do diagnóstico de gliomas maligno e a diferenciação em grau III e IV. Foram utilizados os critérios de neuropatologia da OMS. A avaliação do índice mitótico do KI67 foi realizada por contagem manual pelo patologista responsável pelo caso.

A avaliação da metilação do promotor do gene *MGMT* foi realizada utilizando DNA genômico isolado nas secções de parafina do tecido tumoral. Os detalhes destas técnicas estão publicados no artigo de Riemenschneider e colaboradores.(19)

A avaliação do MGMT foi realizada por biólogo participante do estudo. O DNA genômico foi isolado por secções selecionadas de parafina do tecido tumoral usando o material de isolamento de ácido nucléico total (Ambion P/N 1975M, Austin, TX, EUA) ou por método de fenol clorofórmio para amostras de tecido tumoral congelado. As amostras do DNA extraído foram quantificadas por espectrofotometria usando um *NanoDrop* (NanoDrop ND-1000, Thermofisher Scientific, Loughborough, UK).

O procedimento de amplificação para análise da metilação (MS\_MLPA) foi realizada utilizando o Salsa MS-MLPA ME011 MMR probemix (MRC-Holland, Amsterdã, Países Baixos) foi realizado utilizando 200ng de DNA, conforme orientação do fabricante. A reação ocorre em três etapas: recozimento e ligação das sondas, digestão com a enzima HhaI que somente corta o DNA de não não metilados sítios e finalmente, amplificação do PCR. Os fragmentos de reação do PCR foram separados por electroforese capilar (ABI 3130xl genetic analyzer, Applied Biosystems) e analisado pelo programa Genemapper (Applied Biosystems).

Para analisar a quantidade de metilação do MGMT de cada amostra, a análise dos dados foi feita no programa Microsoft Excel®, como descrito pelo

fabricante do sistema MLPA. As análises foram feitas três vezes e uma média do resultado foi calculada. Pelo menos cinco amostras de DNA normais, coletadas de sangue de voluntários sadios, foram usadas para controle em casa análise dos experimentos de MS-MLPA. (11) O grau de metilação do MGMT foi definido seguindo critérios estabelecidos, sendo que foi definida como ausência a presença de 0 a 25% de metilação, grau leve quando a metilação foi de 25% a 50%, grau moderado de 50% a 75% e grau extenso de 75% a 100%.

Os dados histológicos e de metilação do gene MGMT foram obtidos nos prontuários (laudos definitivos) e tabulados com os dados clínicos e de imagem para e realização da avaliação estatística.

## 2.4 - Análise estatística

Inicialmente foi feita a avaliação quantitativa das variáveis para descrição da amostra estudada. Os dados foram avaliados quanto a valores absolutos e percentual em relação à amostra total. O estudo estatístico foi feito em conjunto com a equipe de estatística do setor de controle de qualidade da Rede SARAH de Hospitais de Reabilitação. Foram construídas tabelas com a discriminação das variáveis e suas frequências.

A análise dos pacientes para determinação de correlação entre os dados foi realizada por análise univariada. Esta forma de estudo foi para a determinação de relevância inicial das variáveis quanto ao prognóstico de sobrevida baseados no desfecho da ocorrência do óbito. Foi utilizado o programa de estatística SPSS versão 11.0.

Após a obtenção de variáveis significantes no estudo estatístico por análise univariada, foram analisados os modelos com variáveis mais relevantes do ponto de vista biológico para a análise multivariada. Os dados foram então submetidos à análise multivariada por regressão de Cox para definição dos fatores prognósticos significantes. Foi determinado o risco relativo para ocorrência de óbito para cada variável significativa na análise multivariada.

Foi feita a análise de sobrevivência dos grupos com metilação do gene promotor do *MGMT* e do grupo não metilado, tendo sido feita análise estatística pelo teste de *log-rank*. Foi realizado também a análise de sobrevivência do *MGMT* com relação à perfusão, sendo relacionado a presença da metilação do gene com o nível alto ou baixo de perfusão cerebral. Foi feita a análise estatística pelo teste de *log-rank*. As curvas de sobrevivência do tipo Kaplan-Meier foram criadas para cada análise relevante realizada.

A segunda etapa da análise estatística do estudo foi a avaliação da correlação entre os aspectos por imagem determinados como importantes pelo delineamento do estudo, com a característica da metilação do gene promotor de *MGMT*. Foi utilizado o teste de Chi quadrado, com valor de significância (*p value*) de 0,05.

### 3 – Resultados

#### 3.1 – Características da amostra

A análise de metilação do gene promotor de *MGMT* foi realizada em 45 pacientes com gliomas malignos do SNC operados no período do estudo. No período do estudo, foram operados 86 pacientes portadores de tumores do SNC na Rede SARA, sendo que apenas 45 pacientes foram inicialmente estudados. Estes 41 pacientes foram excluídos devido a não ter sido possível a obtenção de amostras adequadas para análise de *MGMT* ou presença de RM sem todas as análises possíveis e pacientes com cirurgia prévia em outro serviço médico. Quatro pacientes foram excluídos do estudo por terem diagnóstico histológico final de oligodendroglioma o que modifica a resposta ao tratamento. Outros dois pacientes foram excluídos por não terem tempo suficiente de acompanhamento conforme o delineamento do estudo.

Variáveis	Resultados	
Idade	47 média	18 a 78 (variação)
Gênero	27	Masculino
	16	Feminino
Karnofsky	70	médio
Localização do tumor	23	Frontal
	5	Ocipital
	11	Parietal
	4	Temporal
GRAU (OMS)	16	III
	27	IV
MGMT	26	Metilado
	17	Não metilado

*Tabela 1 -Aspectos clínicos e dados gerais do grupo total de pacientes estudados. Esta análise foi feita com os 43 pacientes com resultados de pesquisa de metilação do gene promotor de MGMT.*

Na análise dos pacientes quanto às características clínicas obtivemos que a média de idade encontrada foi de 47 anos. Na avaliação por faixas de idade indentificou-se que o grupo de mais de 45 anos foi o mais prevalente. Observou-se que 56% dos pacientes tinham mais de 45 anos. O gênero masculino foi o mais frequente entre os pacientes, tendo sido 61,5% da amostra (Tabela 1). O índice de Karnofsky (anexo I) médio dos pacientes ficou situado no escore de 70.

### 3.2 – Aspectos radiológicos e histológicos

As lesões primárias foram mais comumente observadas na região do lobo frontal com 19 casos (Tabela 1). Foram observados 11 casos de tumores localizados na região parietal. As lesões tumorais foram analisadas quanto a profundidade em relação ao córtex cerebral e foram consideradas de predomínio cortical em 29 pacientes.

Na avaliação radiológica dos tumores foi observada a captação de contraste. Em 27 pacientes foi observada uma significativa captação de contraste. Nos pacientes em que houve a captação de contraste, foi feita análise quanto a qualidade de captação do contraste. No grupo de 27 pacientes com captação importante de contraste 22 apresentaram uma característica de forte impregnação observada nas imagens por ressonância magnética. A necrose foi outra variável analisada, tendo esta alteração sido observada em 23 pacientes (59% da amostra) (Tabela 2).

A análise histológica demonstrou 25 casos de glioblastoma (grau IV), e 14 astrocitomas anaplásicos (grau III). O índice mitótico do Ki 67 médio foi de 26,4%, tendo variado de 1 a 67,4% de células em mitose. A presença da metilação do gene promotor de *MGMT* foi quantificada em valores numéricos e classificada de acordo com a expressão. Os valores variaram de 0,07 a 0,98. Ao todo, 17 pacientes foram negativos para a pesquisa de metilação do gene promotor de *MGMT*, sendo que dois pacientes saíram do estudo (Tabela 2).

O tempo de sobrevida variou de quatro até 52 meses, com média de 24,9 meses. Ocorreram 17 óbitos na amostra, 12 óbitos no grupo negativos para metilação do *MGMT* e 5 no grupo positivo para metilação do *MGMT*. A sobrevida média dos pacientes negativos para o *MGMT* foi de 17,9 meses, enquanto que no grupo positivo a sobrevida foi de 29,2 meses ( $p < 0,05$ ). O risco relativo para os portadores do gene promotor de *MGMT* foi de 0,2604 (IC 95% de 0,1147 a 0,5912), demonstrando que a presença da metilação do gene promotor de *MGMT* foi fator importante para aumento de sobrevida dos pacientes nesta amostra.

### 3.3 – Análise estatística

Inicialmente foi realizada a avaliação estatística com método de análise univariada com o programa SPSS versão 11. Foram obtidos os valores absolutos e percentuais e feito a análise estatística de relevância de cada variável isoladamente. A análise univariada com as variáveis mais significantes foram analisadas pelo modelo de regressão de Cox (Tabela2).

Variáveis	Categorias	n	%	valor-p
Diagnóstico	astrocitoma	16	37,2%	
	glioblastoma	27	62,8%	
Gênero	feminino	16	37,2%	
	masculino	27	62,8%	0,732
Localização do tumor	frontal	23	53,5%	0,894
	ocipital	5	11,6%	0,991
	parietal	11	25,6%	0,464
	temporal	4	9,3%	0,744
Lesão	subcortical	10	23,3%	
	cortical	33	76,7%	0,022
Captação de contraste	não	13	30,2%	
	sim	30	69,8%	0,067
Forma da captação	fraca	6	20,0%	
	importante	24	80,0%	0,005
Captação de contraste	não	13	30,2%	0,021
	fraca	6	14,0%	0,759
	importante	24	55,8%	0,018
Necrose na RM	não	18	41,9%	
	sim	25	58,1%	0,009
Perfusão	não	1	2,3%	
	sim	42	97,7%	
Lesão bilateral	não	41	95,3%	
	sim	2	4,7%	
Grau tumoral	III	16	37,2%	
	IV	27	62,8%	0,014
Grau de metilação	ausência	17	39,5%	
	extensa	4	9,3%	
	leve	12	27,9%	
	moderada	10	23,3%	
MGMT metilado	0	17	39,5%	
	1	26	60,5%	0,006
Faixa etária	Menos de 35 anos	12	27,9%	0,093
	Entre 35 e 45 anos	9	20,9%	0,484
	Entre 46 e 55 anos	11	25,6%	0,335
	Acima de 55 anos	11	25,6%	0,056

*Tabela 1 - Esta tabela demonstra as variáveis estudadas com os valores absolutos e percentuais de frequência. A análise univariada foi realizada para identificação das variáveis significativas*

Na análise multivariada obtivemos variáveis significativas relacionadas com o desfecho óbito. Foi proposto o modelo estatístico mais relevante do ponto de vista biológico diante das variáveis que demonstraram valor de significância na análise univariada. O estudo multivariado demonstrou que a perfusão elevada, com risco relativo de 7,9 ( $p < 0,01$ ), e a forma de captação do meio de contraste, com risco relativo de 4,6 ( $p < 0,04$ ), foram às variáveis mais relevantes neste modelo. A mesma análise estatística demonstrou que a presença de metilação do gene promotor de MGMT foi um fator de proteção, com risco relativo de 0,27 ( $p < 0,04$ ). Outro fator protetor que ocasionou maior sobrevida foi o índice de Karnofsky ser maior de que 70. Os pacientes com melhor estado clínico prévio ao tratamento cirúrgico tiveram diminuição do risco relativo para 0,94 ( $p < 0,04$ ) (Tabela 3).

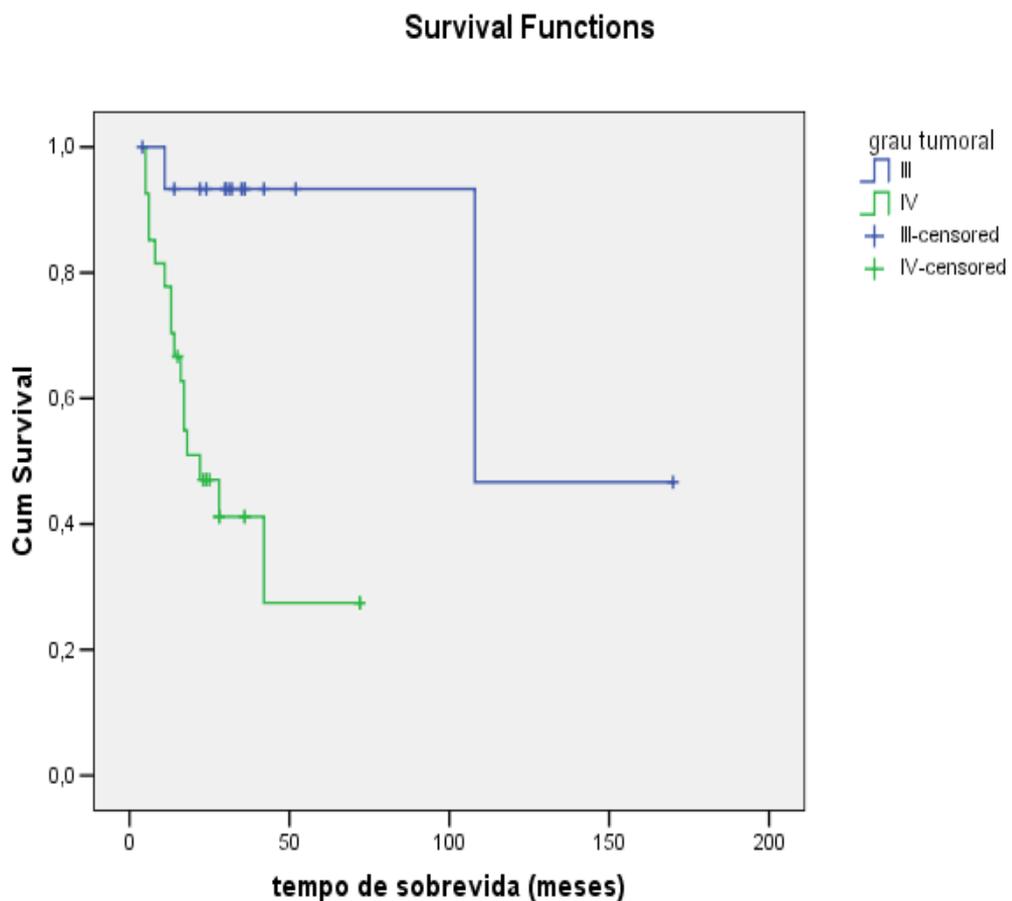
Variáveis	Risco relativo
Alta perfusão	7,9 ( $p < 0,01$ )
Alta captação de contraste	4,6 ( $p < 0,04$ )
MGMT metilado	0,27 ( $p < 0,04$ )
Karnofsky >70	0,94 ( $p < 0,04$ )

*Tabela 2 - Resultado final da análise multivariada para análise de fatores prognósticos em gliomas malignos tendo como desfecho a ocorrência de óbito.*

A análise de sobrevivência é parte importante de qualquer estudo relacionado à mortalidade em oncologia. A curva de sobrevivência foi utilizada para analisar diversos fatores neste estudo e comprovar o modelo de avaliação. Inicialmente foi feita a avaliação entre os astrocitomas anaplásicos (grau III) e o glioblastoma multiforme (grau IV). A curva e a avaliação estatística pelo método de *Log-Rank*

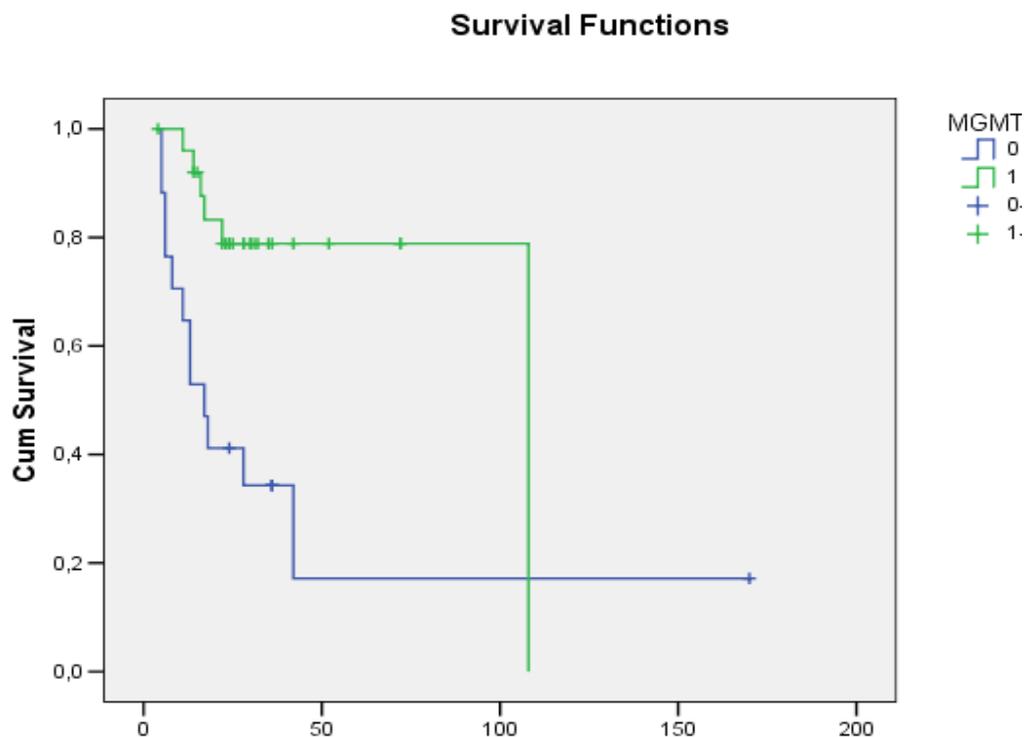
demonstrou uma maior mortalidade dos gliomas grau IV (Figura 2). A curva de Kaplan-Meier foi construída para os dois grupos de pacientes com relação ao aspecto de metilação e não metilação do gene promotor de MGMT. A análise das curvas de sobrevivência demonstraram uma sobrevida maior no grupo com metilação quando comparado ao grupo não metilado ( $p < 0,01$  no teste de *log-rank*) (Figura 3).

A curva de sobrevivência do gene promotor de metilação do MGMT com relação à perfusão foi realizada em cada uma das situações de positividade ou não. Na curva onde foi estudada a não metilação do gene promotor de MGMT, a avaliação da perfusão cerebral na região do tumor demonstrou dados importantes quanto ao tempo de sobrevida. Quando não foi observada a presença de metilação do gene promotor de MGMT, a perfusão elevada foi diretamente relacionada a uma maior mortalidade dos pacientes.



*Figura 2 - Curva de Kaplan Meier comparando a sobrevida entre gliomas grau III e grau IV. A análise demonstrou que tumores com maior grau de malignidade (grau IV) efetivamente ocasionaram maior mortalidade nos pacientes estudados*

Os pacientes com perfusão (rCBV) alto tiveram pior sobrevida do que o grupo com perfusão baixa. Estes dados tiveram significância estatística ( $p=0,038$ ) (Figura 4). Nos pacientes com presença de metilação do gene promotor de MGMT, a variação da perfusão entre alta e baixa não foi significativa ( $p=0,944$ ) (Figura 5). Estes dados demonstraram que quando o gene promotor de metilação do MGMT é positivo, o paciente terá uma sobrevida independente de a perfusão tumoral observado na RM ser alto ou não. Este dado foi um resultado importante da pesquisa e será discutido.



*Figura 3 - O estudo demonstra neste gráfico a curva de sobrevivência geral, demonstrando que os pacientes portadores do gene promotor de MGMT apresentaram melhor sobrevida em relação ao outro grupo sem metilação do gene*

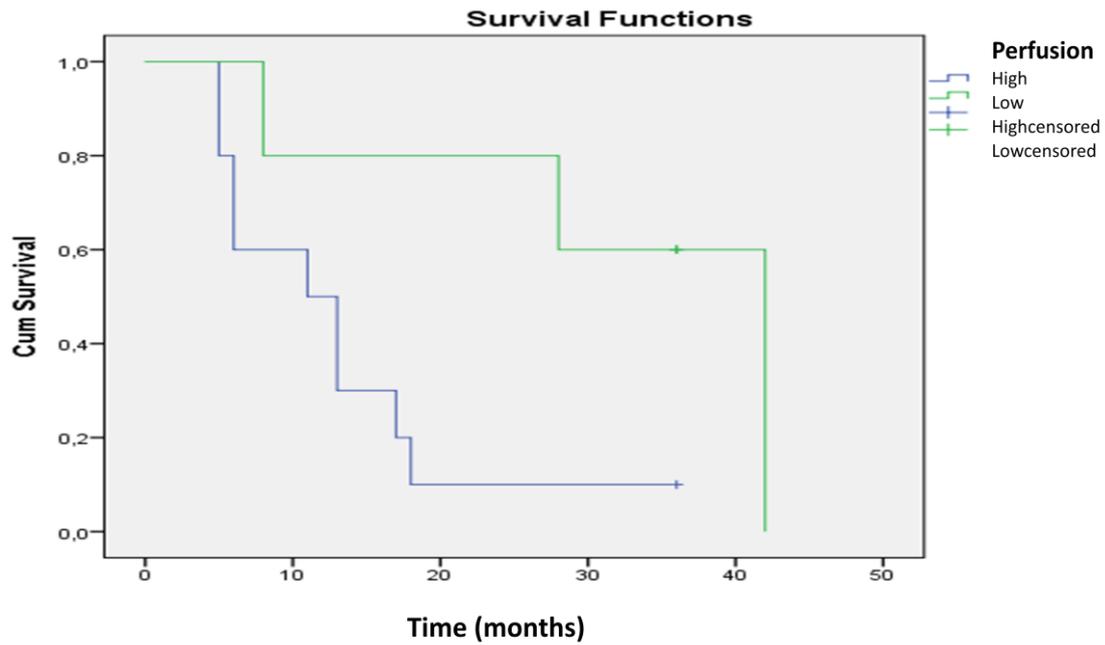


Figura 4 - Análise de sobrevivência dos pacientes com resultado negativo para a presença de gene promotor de MGMT. Comparando os grupos de alta e baixa perfusão observa-se que os pacientes com baixo valor de perfusão apresentaram melhor sobrevida

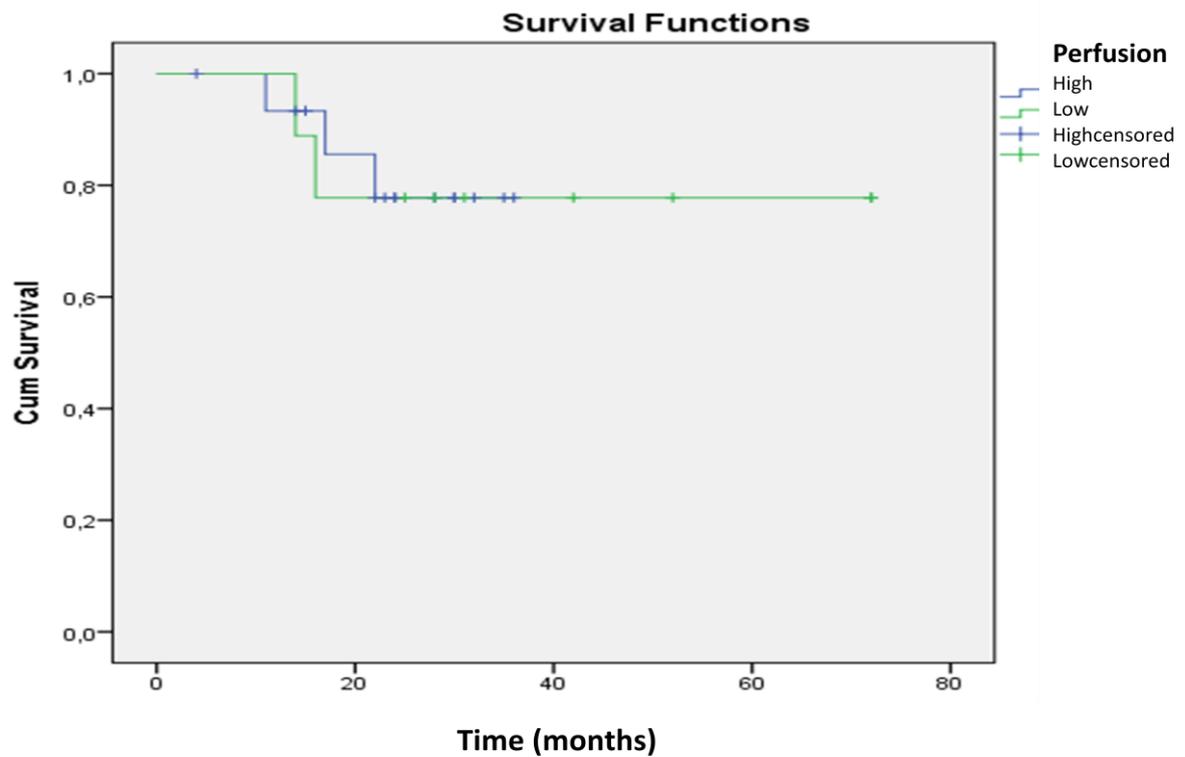


Figura 5 - Análise de sobrevivência dos pacientes com resultado positivo para a presença de gene promotor de MGMT. Neste gráfico observa-se que quando a presença de metilação do gene promotor de MGMT foi positiva, a avaliação da perfusão não se demonstrou como um fator importante no prognóstico

A possibilidade de relação entre as outras características das imagens por RM e a presença do gene promotor de metilação do *MGMT* também foi avaliada estatisticamente. Foram estudadas as relações entre o *MGMT* e as seguintes variáveis: rCBV, captação do meio de contraste, forma de captação do meio de contraste e presença de necrose na RM.

A avaliação de algumas características anatômicas das imagens por RM demonstraram resultados importantes (Figura 6). A localização do tumor demonstrou que lesões consideradas corticais apresentaram melhor sobrevida do que as lesões subcorticais ou mais profundas, sendo que a análise estatística demonstrou uma diferença com significância estatística ( $p < 0,015$ ).

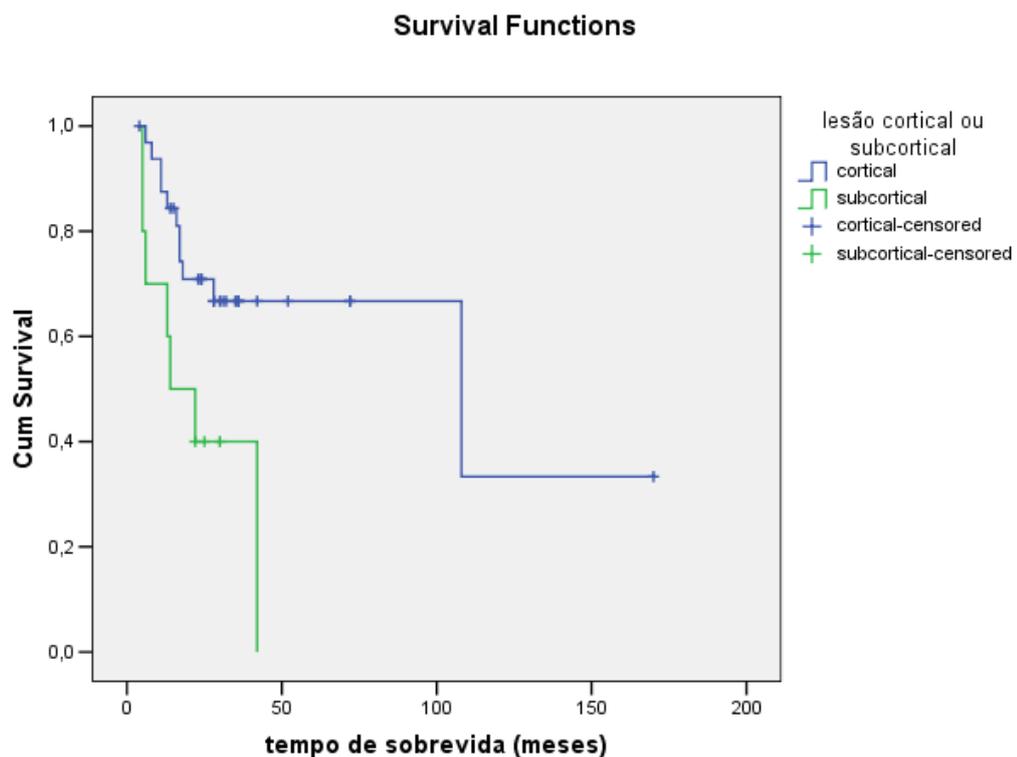
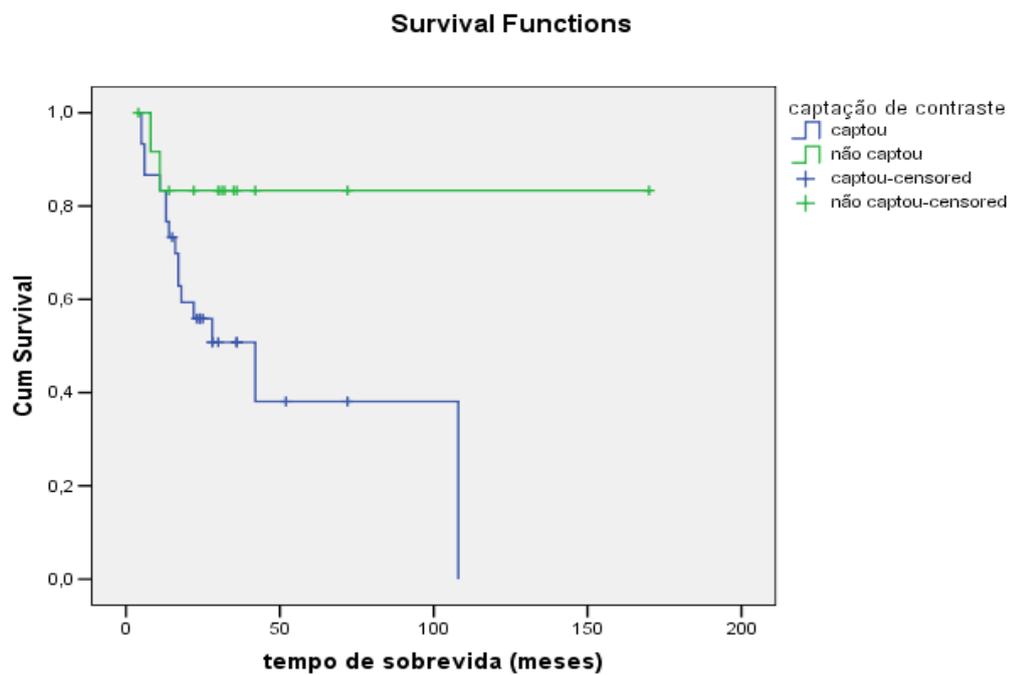


Figura 6 - O gráfico acima demonstra a melhor sobrevida dos pacientes que tiveram lesões corticais quando comparada as lesões subcorticais. As lesões profundas do SNC têm um maior comprometimento neurológico e a sua retirada cirúrgica é mais complexa

A análise da captação do meio de contraste na RM demonstrou uma relação entre a presença de captação difusa, forte e heterogênea de contraste, com uma não-metilação do *MGMT* ( $p < 0,05$ ). A perfusão cerebral demonstrou-se diferente nos

dois grupos de metilação do *MGMT*, mas apesar de terem sido obtidos valores maiores de rCBV no grupo de não-metilação, não houve uma diferença estatística. O estudo da curva de sobrevivência analisando o aspecto de captação de contraste demonstrou que nos pacientes onde se obteve captação de contraste houve maior mortalidade do que no grupo onde não houve (Figura 7). A análise estatística comparando as duas curvas demonstrou uma diferença estatística ( $p < 0,046$ ).



*Figura 7 - Estudo da captação de contraste demonstrou que o grupo com maior captação de contraste apresentou maior mortalidade. A captação de contraste está relacionada com a vascularização e passagem do contraste pela barreira hematoencefálica*

## 4- Discussão

Os gliomas malignos são tumores importantes devido a mortalidade e a morbidade que apresentam para o paciente acometido por esta grave doença. Não há um consenso a respeito, mas vários estudos epidemiológicos demonstram um aumento progressivo na incidência de tumores cerebrais malignos, principalmente na população idosa.(22-24) Uma possível explicação para este progressivo aumento dos gliomas malignos do SNC se deve ao aumento gradativo da expectativa de vida das populações pelo mundo.(25) No grupo de pacientes com idade superior a 75 anos a incidência de gliomas aumentou consideravelmente nas últimas três décadas.(3, 25) Aproximadamente 43.000 pessoas são diagnosticadas anualmente com tumor primário de cérebro nos Estados Unidos, sendo que cerca de 13.000 indivíduos irão falecer por consequência do tumor cerebral. Estes dados demonstram a gravidade e o impacto dos gliomas malignos para a sociedade.(24, 26)

As neoplasias do SNC mais frequentemente observadas são o glioblastoma multiforme e o astrocitoma maligno. São lesões que predominam no gênero masculino e com média de idade em 57 anos.(25) Na nossa série de casos estudada, a média de idade foi de 47 anos e houve também o predomínio do gênero masculino (Tabela 1). A idade mais baixa em relação ao observado na média mundial se deve ao fato da população brasileira ainda apresentar uma expectativa de vida menor do que os países do hemisfério norte.

No período do estudo foram operados 86 pacientes portadores de tumores malignos do SNC, sendo que apenas 45 foram analisados inicialmente. Isto ocorreu devido à dificuldade de obtenção dos resultados do MGMT em todos os pacientes. A análise do marcador genético não é possível em todos os pacientes e esta é uma crítica importante a utilização deste dado como um importante fator prognóstico e delineador de tratamento em gliomas malignos. Por esta razão, a busca por outras formas de definir o prognóstico e o melhor tratamento tem sido pesquisados, principalmente por métodos radiológicos.(7, 10, 27)

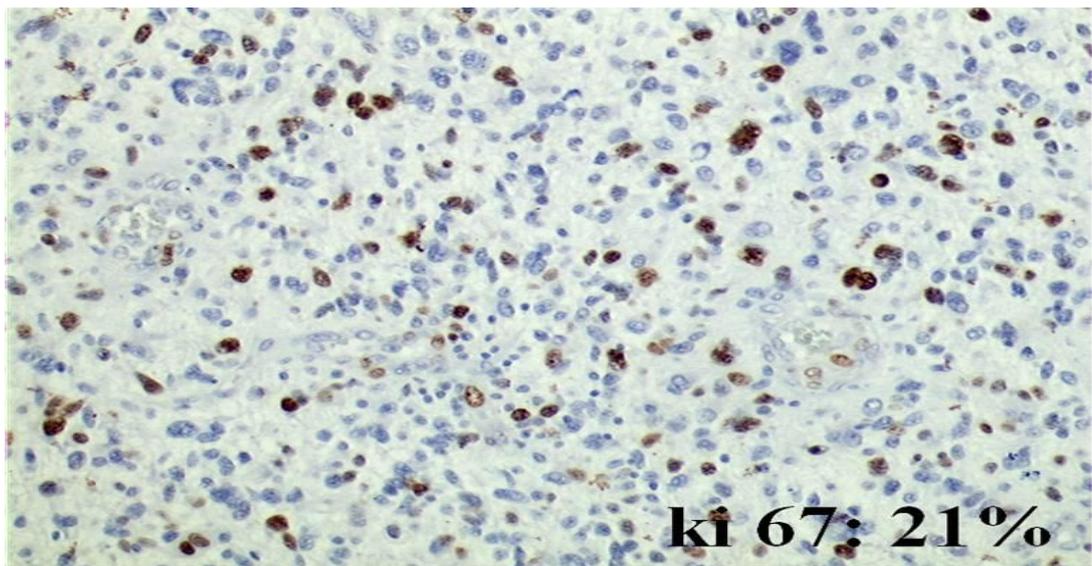
Os gliomas malignos são um grupo de tumores com grande heterogeneidade histológica e de localização anatômica.(14) Estudos mais recentes de citogenética e biologia molecular demonstraram uma diversidade maior ainda de subtipos tumorais dentro dos gliomas de grau III e IV.(4) Os astrocitomas infiltrativos são bem

diferentes dos astrocitomas circunscritos e apresentam prognóstico pior. O grupo de lesões infiltrativas é constituído de tumores de grau II, grau III e grau IV. Este estudo analisou os tumores de grau III e grau IV por serem lesões malignas.

A avaliação prognóstica é um importante fator na determinação de estratégias de tratamento. O prognóstico dos pacientes com gliomas malignos é em geral ruim. A idade ao diagnóstico e o índice de Karnofsky são dois fatores prognósticos bem estabelecidos na literatura sobre gliomas.(10, 23) Pacientes que apresentam lesões volumosas e profundas, ou com extensão para o outro hemisfério também apresentam prognóstico reservado. A avaliação por imagem tem sido cada vez mais utilizada como método para definição de prognóstico e principalmente como um meio de análise para diferenciar pacientes que podem responder a algumas formas de tratamento.(7, 10) A utilização de técnicas de RM para avaliação prognóstica vem aumentando na literatura médica e sendo assim mais incorporado a prática clínica. Atualmente, as técnicas como espectroscopia e a perfusão por RM vêm demonstrado melhor capacidade de avaliação do grau de malignidade e conseqüentemente do prognóstico dos pacientes. Law e colaboradores analisaram a sensibilidade e a especificidade do rCBR para determinação do grau de malignidade do tumor cerebral em relação as imagens convencionais.(8)

Foram estudados inicialmente 45 pacientes portadores de tumores malignos do SNC, dentro de um universo de 86 pacientes operados no mesmo período do estudo. A exclusão inicial de 41 pacientes se deve a dificuldade de obtenção de tecido para análise histológica completa, principalmente o estado de metilação do gene promotor de *MGMT*. Um grupo grande de pacientes também tinha sido submetido à cirurgia prévia em outro serviço o que dificultava o controle de algumas variáveis. No grupo de 45 pacientes A presença do gene promotor de metilação do *MGMT* esta relacionado com um melhor prognóstico nos gliomas malignos cerebrais.(17, 19, 28) A utilização da Temozolamida, agente de características alquilantes, como droga de escolha no tratamento quimioterápico aumentou a importância da análise da presença de metilação de *MGMT*.(17, 19) Acredita-se que pelo menos 40% dos gliomas malignos possuam o gene promotor de *MGMT* metilado, o que leva a este grupo de pacientes ter uma melhor sobrevida. No estudo realizado por Hegi e colaboradores, a análise independente do grupo submetido a tratamento demonstrou que a análise do PCR de *MGMT* demonstrou ser um importante fator prognóstico.(17) No mesmo estudo observou-se que de um total de

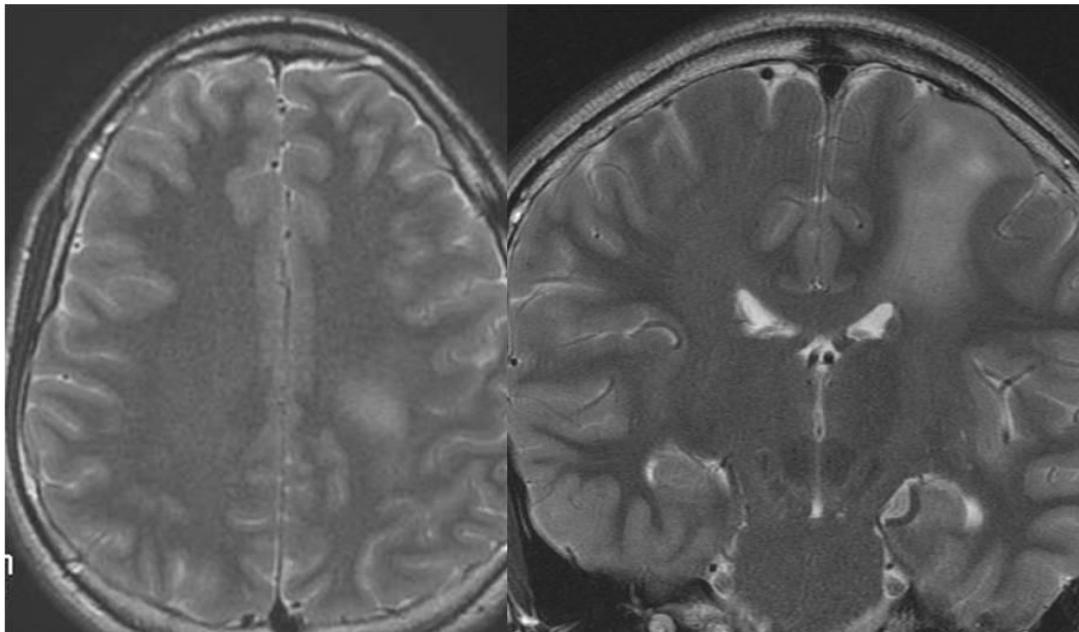
573 pacientes com glioblastoma só foi possível avaliar em 307 casos e destes 206 tiveram resultados com a possibilidade de análise.(17) Este fato demonstra a dificuldade técnica de se obter uma adequada caracterização do promotor de metilação do *MGMT* em algumas amostras teciduais.(17) No estudo realizado na Rede Sarah observamos a mesma dificuldade em obter a análise de tecidos com amostra para pesquisa do *MGMT*. Outro índice importante na análise da agressividade do comportamento biológico dos gliomas é o índice mitótico. O Ki 67 é um valor que representa a quantidade de células em mitose no determinado momento da análise histológica. Quanto maior o valor do Ki 67 maior a agressividade do tumor. Os gliomas de alto grau tendem a ter um índice mitótico elevado, mas apesar deste fato ainda não se considera este dado como um critério de malignidade absoluto e apenas como um fator prognóstico relativo.



*Figura 8 - Análise do índice mitótico de uma neoplasia de alto grau (glioma grau IV). O estudo demonstra um tumor de alto grau que apresenta índice mitótico elevado de 21%*

O desenvolvimento da RM ocasionou uma melhora importante na avaliação dos tumores do SNC. Comparada a tomografia do encéfalo a RM demonstra uma melhor capacidade de determinação anatômica do cérebro e das doenças que o afetam.(8)A avaliação da imagem convencional de RM demonstra que sinais de necrose e o realce da lesão pelo meio de contraste estão relacionados com a malignidade de tumores do SNC (Figura 1).(8, 29) Imagens que demonstram grande captação de meio de contraste, presença de edema vasogênico e associado a um

centro necrótico são relacionados a tumores de maior malignidade no SNC, mas parte das lesões expansivas malignas do SNC podem não apresentar tais características nas imagens.(30, 31) A utilização de técnicas como a perfusão cerebral e análise de metabólitos por espectroscopia na ressonância magnética pode aumentar a sensibilidade e o valor preditivo positivo para determinação do grau da neoplasia, quando comparado ao exame convencional.(8) No estudo de prognóstico, a análise multivariada demonstrou que a presença de uma alta captação de contraste esta associada a um aumento significativo do risco relativo ( $p < 0,04$ ). A ausência de captação de gadolínio esta relacionado classicamente a tumores de baixo grau. Esta relação nem sempre é correta, sendo que lesões que na RM apresentam baixa ou nenhuma captação de meio de contraste podem estar relacionadas a tumores malignos em até 30% dos casos (Figura 9).(32, 33) Devido a isto novas técnicas de RM foram desenvolvidas e atualmente são utilizadas com o objetivo de melhor graduar as características tumorais, o grau de malignidade e assim determinar o prognóstico de forma mais efetiva.(34)



*Figura 9 - Imagem de RM de um paciente com glioma infiltrativo. A imagem não apresenta captação de contraste e não há centro necrótico, que são sinais clássicos de maior malignidade. O estudo de histologia demonstrou glioblastoma multiforme agressivo com alto índice mitótico*

A perfusão cerebral por RM é um bom método para graduar o grau de agressividade dos tumores e é um fator prognóstico importante.(29) A presença de uma perfusão maior demonstra o grau de neovascularização do tumor, o que esta diretamente relacionada com os critérios de malignidade da OMS para gliomas.(27) O estudo realizado por Geer e colaboradores demonstrou que as imagens com análise da perfusão foram importantes na avaliação de pacientes com tumores cerebrais e auxiliaram na tomada de decisão sobre o caso.(35) A medida pelo volume sanguíneo cerebral relativo (rCBV) é um fator com grande correlação com a gradação histológica, conforme demonstrado por Law.(8) Este autor analisou 73 pacientes com gliomas e demonstrou que o rCBV foi diferente de acordo com o grau de malignidade dos tumores.(36)

A análise multivarida realizada em nosso estudo, demonstrou que a perfusão cerebral se relacionou com um maior risco relativo (RR de 7,9), sendo assim um fator prognóstico importante na sobrevida dos gliomas malignos ( $P < 0,04$ ).

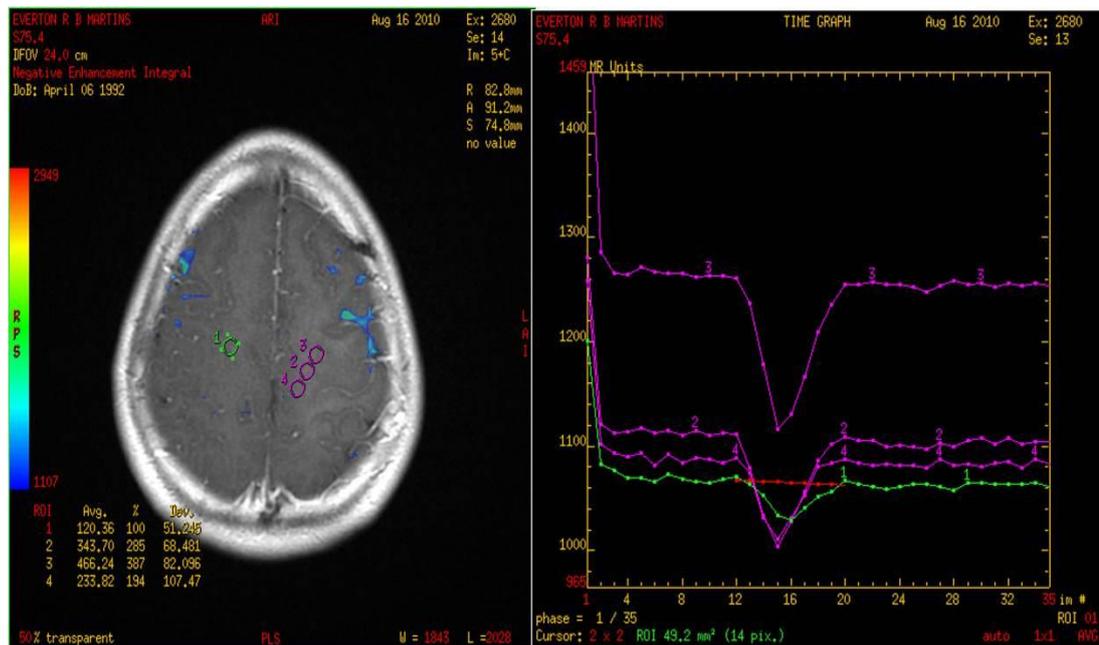


Figura 10 - Imagem de RM com perfusão de paciente com glioma maligno. Ao lado estão as curvas de perfusão demonstrando o alto fluxo sanguíneo no tumor. A imagem simples deste paciente não demonstrava sinais típicos de lesão de alto grau, mas a perfusão elevada foi coerente com os achados de histologia pós-operatória

Drabycz e colaboradores realizaram estudo onde analisaram as características da textura da imagem e da localização tumoral com a presença de

metilação do gene promotor de *MGMT* em glioblastoma multiforme.(37) Na análise da textura os autores estudaram as características das margens tumorais, captação do contraste, presença de cistos e se o sinal em T2 era homogêneo ou heterogêneo.(37) O estudo demonstrou que apenas a captação de meio de contraste foi uma variável significativa ( $p=0,0006$ ). As características em T2 também foram significativas ( $p<0,05$ ), mas a acurácia entre os observadores foi de 71%.(37) Moon também analisou características de textura nas imagens por RM e evidenciou que tumores com margens bem definidas estão associados a presença de metilação do gene *MGMT* ( $p=0,048$ ). (38)

Em nossa série de casos, observamos que houve uma sobrevida média de 24,9 meses analisando o grupo. Estudo realizado pelo grupo do Instituto Nacional do Câncer nos Estados Unidos demonstrou sobrevida média de 23 meses em pacientes submetidos a tratamento com cirurgia, radioterapia e quimioterapia com temozolamida.(39) Pacientes com astrocitoma anaplásico podem ter sobrevida de até 5 anos em algumas séries.(40, 41) A diferenciação entre astrocitomas grau III e glioblastomas grau IV nem sempre é possível pelos métodos anatômicos da RM.(10)

Em grandes séries de casos, os principais fatores prognósticos encontrados são: a histologia do tumor e a idade do paciente no momento do diagnóstico.(17, 19, 41) Observamos em nosso estudo que os pacientes com grau IV tiveram pior prognóstico do que os com lesões grau III (Figura 2). Além desses dados procurou-se analisar outros fatores prognósticos relacionados aos aspectos radiológicos e de histologia.

O nosso estudo demonstrou que apesar de valores elevados de perfusão e a ausência do gene promotor de *MGMT* estar relacionados com o pior prognóstico dos pacientes, não foi possível estabelecer uma relação direta entre variações da perfusão encontradas nas imagens por RM com a presença do gene promotor de *MGMT* das amostras teciduais. A análise de sobrevida, entretanto, demonstrou que quando a pesquisa do gene promotor de *MGMT* é negativa, a presença de uma perfusão alta está relacionada com um pior prognóstico ( $p=0,038$ ). Este dado demonstra que nos pacientes em que o gene promotor de metilação de *MGMT* for negativo a análise da perfusão assume uma importância significativa no estudo de prognóstico. O estudo realizado por Moon e colaboradores analisou a possibilidade de estudos por tomografia e ressonância magnética pudessem ser parâmetros que avaliariam o estado de metilação do gene promotor de *MGMT*.(38) O artigo

demonstrou que a presença do gene promotor de *MGMT* está relacionado com o aumento de *ADC* e maior atenuação nas imagens contrastadas de tomografia, mas não demonstrou relação com a perfusão.(38) A análise das imagens por tomografia computadorizada demonstrou que a atenuação foi menor nos pacientes positivos para metilação ( $p=0,009$ ). (38) Em contraste, o *rCBV* não se diferenciou nos dois grupos ( $p=0,380$ ). (38) Em outro estudo clínico, Carrilo e colaboradores analisaram a relação entre a mutação do *IDH-1* e a metilação do *MGMT* com aspectos radiológicos para obtenção de um marcador não invasivo de prognóstico.(16) Neste estudo com 202 pacientes não foi possível estabelecer uma correlação direta entre o estado de metilação do *MGMT* e os aspectos de imagem, mas a mutação do gene *IDH1* esteve relacionada com o aspecto do edema perilesional.(16) A análise do *MGMT* também pode auxiliar na análise da possibilidade de pseudoprogressão tumoral após o tratamento com radioterapia e quimioterapia.(18, 42, 43) Estudo realizado por Kong e colaboradores demonstrou que pacientes com gene promotor do *MGMT* e tratados com temozolamida, apresentam maior risco de desenvolver sinais radiológicos de pseudoprogressão tumoral.(43)

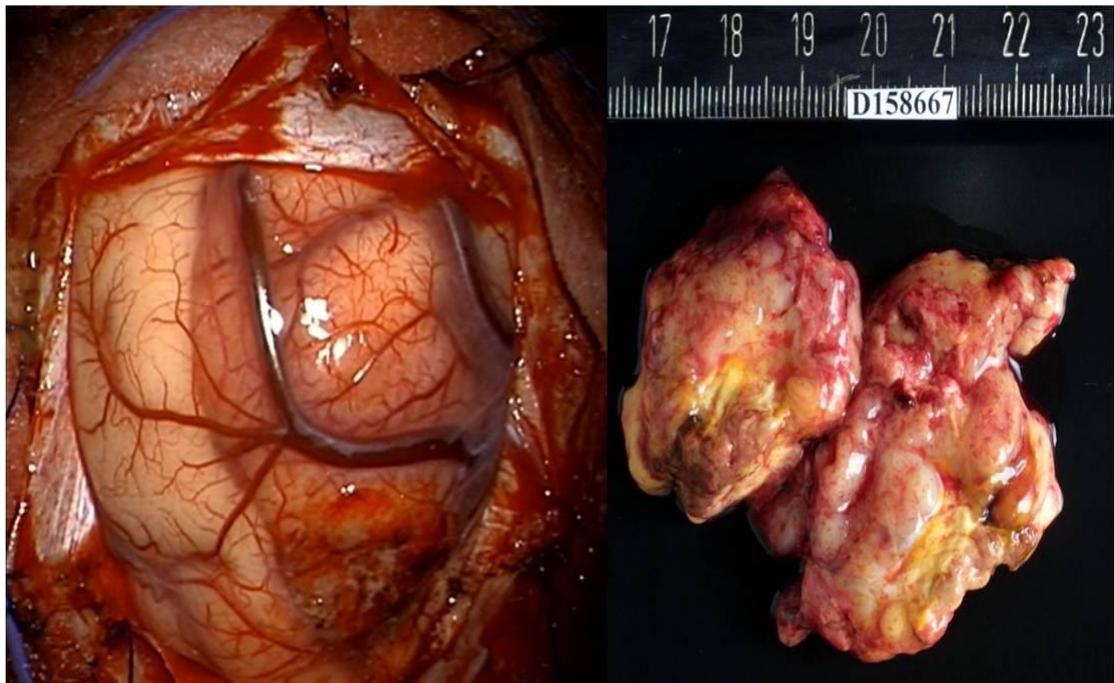
A análise das curvas de sobrevivência realizada demonstrou que os pacientes portadores de glioblastoma multiforme (grau IV) tiveram uma sobrevida pior em relação aos gliomas anaplásicos. Dados semelhantes são descritos na literatura onde grandes estudos de sobrevivência demonstraram a pior sobrevida dos glioblastomas devido a sua maior malignidade que ocasiona uma recorrência mesmo com o tratamento oncológico.(17, 23, 41)

Na análise das curvas de sobrevivência, observamos outros fatores que em uma análise dicotômica demonstraram serem importantes. Quando comparamos lesões corticais com subcorticais (Figura 6), observou-se que os tumores localizados mais profundamente apresentaram pior prognóstico. Isto se deve pelo fato de lesões profundas terem maior alteração neurológica associada e maior dificuldade de ressecção. Outra análise realizada foi a comparação entre lesões com captação de contraste e tumores com baixa captação. Observou-se também que pacientes com as lesões com maior captação de contraste tiveram pior prognóstico. Classicamente lesões com captação intensa apresentam maior malignidade e pior prognóstico, tendo o mesmo sido observado nesse estudo.

Algumas restrições existem neste estudo e devem ser discutidas. Os pacientes receberam inicialmente o mesmo tratamento e foram avaliados como

tendo recebido esquemas terapêuticos homogêneos, sendo que após a recaída tumoral houve variação do tratamento dos pacientes. Houve também variação do tratamento cirúrgico já que nem todos os casos obtiveram ressecção total da lesão. Estes mesmos problemas ocorreram em estudos semelhantes para análise de marcadores de prognóstico onde não há um controle completo dos tratamentos realizados durante o estudo.(10, 44)

Um outro fator limitador para aumento significativo do número de pacientes para o estudo é a necessidade de amostras de tecido adequadas para a análise do gene promotor de MGMT, fazendo com que esta série de pacientes, assim como outras na literatura tenham uma amostra de pacientes limitada.(19, 33, 45) A questão do número de pacientes que foram analisados no estudo pode ser avaliada como não tão relevante, já que foi encontrado uma diferença entre os grupos (hipótese nula) eliminando o fato que a amostra tenha sido pequena a ponto de não se encontrar uma diferença (erro do tipo II).



*Figura 11 - Visão cirúrgica de uma paciente com glioblastoma multiforme e o tumor ressecado e enviado para análise histológica*

Pacientes portadores de gliomas malignos apresentam como fatores prognósticos mais importantes: a idade do paciente, o índice de Karnofsky pré-operatório e o grau de ressecção tumoral.(40) Estes fatores são efetivamente os

principais aspectos quando se analisa um paciente com glioma maligno, mas apesar disto nenhum destes fatores implica em mudança na estratégia de tratamento do tumor cerebral.(17) Os aspectos radiológicos e de histologia são fatores que vem sendo cada vez mais estudados para complementação da análise prognóstica.(15, 21) O tratamento dos tumores cerebrais malignos é baseado na ressecção cirúrgica total seguida de quimioterapia e radioterapia (Figura 11). A cirurgia tem sempre como objetivo a retirada completa da lesão tumoral.(40) A possibilidade da avaliação radiológica e da análise genética ser utilizada para melhor determinação do tratamento complementar a cirurgia é um dos avanços possíveis no futuro do tratamento dos gliomas malignos do SNC.(13, 15)

O estudo analisou pacientes com gliomas anaplásicos, astocitomas grau III e glioblastomas, de forma unificada. Este delineamento teve como objetivo analisar o aspecto radiológico inicial, sendo assim se assemelhando a avaliação inicial feita na prática clínica diária.(10) Não foram incluídos os gliomas de baixo grau e oligodendrogliomas anaplásicos, devido a presença de características biológicas diferentes, apesar de também ser possível obter a dosagem do gene promotor de *MGMT* em outros tipos de tumores.(46, 47)

A procura por marcadores da presença de *MGMT*, principalmente por imagem, é um assunto novo e que tem originado uma série de pesquisas. A presença da metilação do *MGMT* é um fator prognóstico importante e novas técnicas de imagem buscam relacionar o estado genético do paciente com as características radiológicas dos tumores cerebrais malignos

## 5- Conclusão

Este estudo teve como objetivo analisar os métodos diagnósticos radiológicos e por avaliação genética, como fatores de prognóstico em gliomas malignos do SNC. Demonstramos neste estudo que a perfusão cerebral é um fator prognóstico importante com a associação da pesquisa da metilação do gene promotor de MGMT. Pacientes que tiveram a pesquisa da metilação negativa tiveram pior prognósticos e nestes casos a avaliação da perfusão foi importante.

Este estudo abre perspectiva para futuros pesquisas com o objetivo de correlacionar fatores prognósticos radiológicos e histológicos com terapêutica individualizada de tumores cerebrais. Isto permitiria que pacientes com determinadas alterações na RM tivessem o tratamento definido pela característica radiológica. A busca por técnicas que correlacione os exames de imagens com as características histológicas e genéticas dos tumores deve ser aprimorada.

Futuros estudos avaliando melhor as características radiológicas dos gliomas malignos e principalmente, que consigam correlacionar a imagem com fatores genéticos e histológicos, devem ser realizados e ampliados para que se possa definir não somente a característica e o prognóstico individual de cada caso, como também determinar formas de tratamento diferenciadas.

## 6 - Referências bibliográficas

1. Baldwin RT, Preston-Martin S. Epidemiology of brain tumors in childhood--a review. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2004;199(2):118-31.
2. Eby NL, Grufferman S, Flannelly CM, Schold SC, Vogel FS, Burger PC. Increasing incidence of primary brain lymphoma in the US. *Cancer.* 1988;62(11):2461-5.
3. Ohgaki H, Kleihues P. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol.* 2005;109(1):93-108.
4. Ohgaki H, Kleihues P. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res.* 2013;19(4):764-72.
5. Okamoto Y, Di Patre PL, Burkhard C, Horstmann S, Jourde B, Fahey M, et al. Population-based study on incidence, survival rates, and genetic alterations of low-grade diffuse astrocytomas and oligodendrogliomas. *Acta Neuropathol.* 2004;108(1):49-56.
6. Yamada K, Sorensen AG, Gonzalez G, Rosen BR. Echo-planar MR enters routine clinical practice. *Diagn Imaging (San Franc).* 1997;19(11):195-201.
7. Wang MY, Cheng JL, Han YH, Li YL, Dou SW, Yan FS, et al. Comparison of volumetric methods for tumor measurements on two and three dimensional MRI in adult glioblastoma. *Neuroradiology.* 2011;53(8):565-9.
8. Law M, Yang S, Wang H, Babb JS, Johnson G, Cha S, et al. Glioma grading: sensitivity, specificity, and predictive values of perfusion MR imaging and proton MR spectroscopic imaging compared with conventional MR imaging. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2003;24(10):1989-98.
9. Earnest F, Kelly PJ, Scheithauer BW, Kall BA, Cascino TL, Ehman RL, et al. Cerebral astrocytomas: histopathologic correlation of MR and CT contrast enhancement with stereotactic biopsy. *Radiology.* 1988;166(3):823-7.
10. Pope WB, Lai A, Nghiemphu P, Mischel P, Cloughesy TF. MRI in patients with high-grade gliomas treated with bevacizumab and chemotherapy. *Neurology.* 2006;66(8):1258-60.
11. Macdonald DR, Cascino TL, Schold SC, Jr., Cairncross JG. Response criteria for phase II studies of supratentorial malignant glioma. *J Clin Oncol.* 1990;8(7):1277-80.

12. Burger PC, Vogel FS, Green SB, Strike TA. Glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma. Pathologic criteria and prognostic implications. *Cancer*. 1985;56(5):1106-11.
13. Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, et al. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res*. 2004;64(19):6892-9.
14. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic profile of astrocytic and oligodendroglial gliomas. *Brain Tumor Pathol*. 2011;28(3):177-83.
15. Nobusawa S, Watanabe T, Kleihues P, Ohgaki H. IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas. *Clin Cancer Res*. 2009;15(19):6002-7.
16. Carrillo JA, Lai A, Nghiemphu PL, Kim HJ, Phillips HS, Kharbanda S, et al. Relationship between Tumor Enhancement, Edema, IDH1 Mutational Status, MGMT Promoter Methylation, and Survival in Glioblastoma. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2012.
17. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005;352(10):997-1003.
18. Fabi A, Russillo M, Metro G, Vidiri A, Di Giovanni S, Cognetti F. Pseudoprogression and MGMT status in glioblastoma patients: implications in clinical practice. *Anticancer Res*. 2009;29(7):2607-10.
19. Riemenschneider MJ, Hegi ME, Reifenberger G. MGMT promoter methylation in malignant gliomas. *Target Oncol*. 2010;5(3):161-5.
20. Pope WB, Sayre J, Perlina A, Villablanca JP, Mischel PS, Cloughesy TF. MR imaging correlates of survival in patients with high-grade gliomas. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2005;26(10):2466-74.
21. Law M, Young RJ, Babb JS, Peccerelli N, Chheang S, Gruber ML, et al. Gliomas: predicting time to progression or survival with cerebral blood volume measurements at dynamic susceptibility-weighted contrast-enhanced perfusion MR imaging. *Radiology*. 2008;247(2):490-8.
22. Arvinda HR, Kesavadas C, Sarma PS, Thomas B, Radhakrishnan VV, Gupta AK, et al. Glioma grading: sensitivity, specificity, positive and negative predictive values of diffusion and perfusion imaging. *J Neurooncol*. 2009;94(1):87-96.

23. Reardon DA, Galanis E, DeGroot JF, Cloughesy TF, Wefel JS, Lamborn KR, et al. Clinical trial end points for high-grade glioma: the evolving landscape. *Neuro Oncol.* 2011;13(3):353-61.
24. Davis FG, Malinski N, Haenszel W, Chang J, Flannery J, Gershman S, et al. Primary brain tumor incidence rates in four United States regions, 1985-1989: a pilot study. *Neuroepidemiology.* 1996;15(2):103-12.
25. Kita D, Ciernik IF, Vaccarella S, Franceschi S, Kleihues P, Lütolf UM, et al. Age as a predictive factor in glioblastomas: population-based study. *Neuroepidemiology.* 2009;33(1):17-22.
26. Wrensch M, Minn Y, Chew T, Bondy M, Berger MS. Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. *Neuro Oncol.* 2002;4(4):278-99.
27. Caseiras GB, Chheang S, Babb J, Rees JH, Peccerelli N, Tozer DJ, et al. Relative cerebral blood volume measurements of low-grade gliomas predict patient outcome in a multi-institution setting. *Eur J Radiol.* 2010;73(2):215-20.
28. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005;352(10):987-96.
29. Law M, Oh S, Johnson G, Babb JS, Zagzag D, Golfinos J, et al. Perfusion magnetic resonance imaging predicts patient outcome as an adjunct to histopathology: a second reference standard in the surgical and nonsurgical treatment of low-grade gliomas. *Neurosurgery.* 2006;58(6):1099-107; discussion - 107.
30. Lacerda S, Law M. Magnetic resonance perfusion and permeability imaging in brain tumors. *Neuroimaging Clin N Am.* 2009;19(4):527-57.
31. Lu H, Pollack E, Young R, Babb JS, Johnson G, Zagzag D, et al. Predicting grade of cerebral glioma using vascular-space occupancy MR imaging. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2008;29(2):373-8.
32. Hu LS, Baxter LC, Smith KA, Feuerstein BG, Karis JP, Eschbacher JM, et al. Relative cerebral blood volume values to differentiate high-grade glioma recurrence from posttreatment radiation effect: direct correlation between image-guided tissue histopathology and localized dynamic susceptibility-weighted contrast-enhanced perfusion MR imaging measurements. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2009;30(3):552-8.

33. Pope WB, Chen JH, Dong J, Carlson MR, Perlina A, Cloughesy TF, et al. Relationship between gene expression and enhancement in glioblastoma multiforme: exploratory DNA microarray analysis. *Radiology*. 2008;249(1):268-77.
34. Hirai T, Murakami R, Nakamura H, Kitajima M, Fukuoka H, Sasao A, et al. Prognostic value of perfusion MR imaging of high-grade astrocytomas: long-term follow-up study. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2008;29(8):1505-10.
35. Geer CP, Simonds J, Anvery A, Chen MY, Burdette JH, Zapadka ME, et al. Does MR perfusion imaging impact management decisions for patients with brain tumors? A prospective study. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2012;33(3):556-62.
36. Law M, Yang S, Babb JS, Knopp EA, Golfinos JG, Zagzag D, et al. Comparison of cerebral blood volume and vascular permeability from dynamic susceptibility contrast-enhanced perfusion MR imaging with glioma grade. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2004;25(5):746-55.
37. Drabycz S, Roldan G, de Robles P, Adler D, McIntyre JB, Magliocco AM, et al. An analysis of image texture, tumor location, and MGMT promoter methylation in glioblastoma using magnetic resonance imaging. *Neuroimage*. 2010;49(2):1398-405.
38. Moon WJ, Choi JW, Roh HG, Lim SD, Koh YC. Imaging parameters of high grade gliomas in relation to the MGMT promoter methylation status: the CT, diffusion tensor imaging, and perfusion MR imaging. *Neuroradiology*. 2012;54(6):555-63.
39. Narayana A, Gruber D, Kunnakkat S, Golfinos JG, Parker E, Raza S, et al. A clinical trial of bevacizumab, temozolomide, and radiation for newly diagnosed glioblastoma. *J Neurosurg*. 2012;116(2):341-5.
40. Nuño M, Birch K, Mukherjee D, Sarmiento JM, Black KL, Patil CG. Survival and Prognostic Factors of Anaplastic Gliomas. *Neurosurgery*. 2013.
41. Hart MG, Garside R, Rogers G, Stein K, Grant R. Temozolomide for high grade glioma. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013;4:CD007415.
42. Brandsma D, van den Bent MJ. Pseudoprogression and pseudoresponse in the treatment of gliomas. *Curr Opin Neurol*. 2009;22(6):633-8.
43. Kong DS, Kim ST, Kim EH, Lim DH, Kim WS, Suh YL, et al. Diagnostic dilemma of pseudoprogression in the treatment of newly diagnosed glioblastomas: the role of assessing relative cerebral blood flow volume and oxygen-6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation status. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2011;32(2):382-7.

44. Strik HM, Marosi C, Kaina B, Neyns B. Temozolomide dosing regimens for glioma patients. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2012;12(3):286-93.
45. Jeuken JW, Cornelissen SJ, Vriezen M, Dekkers MM, Errami A, Sijben A, et al. MS-MLPA: an attractive alternative laboratory assay for robust, reliable, and semiquantitative detection of MGMT promoter hypermethylation in gliomas. *Lab Invest.* 2007;87(10):1055-65.
46. Caseiras GB, Chheang S, Babb J, Rees JH, Peccerelli N, Tozer DJ, et al. Relative cerebral blood volume measurements of low-grade gliomas predict patient outcome in a multi-institution setting. *Eur J Radiol.* 2010;73(2):215-20.
47. Kapoor GS, Gocke TA, Chawla S, Whitmore RG, Nabavizadeh A, Krejza J, et al. Magnetic resonance perfusion-weighted imaging defines angiogenic subtypes of oligodendroglioma according to 1p19q and EGFR status. *J Neurooncol.* 2009;92(3):373-86.

## Anexo I - Escala de Karnofsky

Apto para atividades normais e trabalho; nenhum cuidado especial é necessário.	100	Normal; nenhuma queixa; nenhuma evidência de doença.
	90	Capacitado para atividades normais. Pequenos sinais e sintomas.
	80	Atividade normal com esforço. Alguns sinais e sintomas de doença.
Inapto para o trabalho; apto para viver em casa e cuidar de muitas de suas necessidades. As quantidades de assistência e suporte necessários são bastante variáveis.	70	Cuidados para si, incapaz para seguir com atividades normais ou trabalho ativo.
	60	Requer ajuda ocasional, porém apto a cuidar de muitas de suas necessidades pessoais.
	50	Requer ajuda considerável e freqüente assistência médica ou especializada.
Inapto para cuidar de si mesmo; requer cuidados hospitalares ou equivalentes especializado; doença pode estar progredindo rapidamente.	40	Incapacitado; requer cuidado especial e assistência.
	30	Severamente incapacitado; admissão hospitalar é indicada, mas a morte não é iminente.
	20	Muito doente; admissão hospitalar é necessária, necessitando de terapia e cuidados intensivos.
	10	Moribundo; processo de fatalidade progredindo rapidamente.
	0	Morte

Anexo II – Aspectos histológicos dos astrocitomas difusos e critérios patológicos

### ***Classificação dos astrocitomas difusos.***

<b>Critérios (feições) histológicas</b>	<b>Nome</b>	<b>Graduação</b>	<b>Sobrevida</b>
<b>1 critério, geralmente atipias nucleares.</b>	<b>Astrocitoma difuso de baixo grau</b>	<b>Grau II</b>	<b>&gt; 5 anos</b>
<b>2 critérios, geralmente atipias nucleares e mitoses</b>	<b>Astrocitoma anaplásico</b>	<b>Grau III</b>	<b>2 a 5 anos</b>
<b>3 ou 4 critérios: atipias, mitoses, proliferação vascular e/ou necrose.</b>	<b>Glioblastoma multiforme</b>	<b>Grau IV</b>	<b>&lt; 1 ano.</b>