IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES EM VESÍCULAS EXTRACELULARES PARA MONITORAMENTO DE GLIOMAS PEDIÁTRICOS

Autores: Liana Figueiredo Nobre (ME)[1], Marcio Christiani[5], Aline Helen da Silva Camacho[3], Antonio Aversa[5], Marina Lipkin Vasquez[6], Leila Chimelli[4,6], Isabel Porto Carreiro[6], Sima Ferman[2], Bárbara Monte-Mor[1], Ilana Zalcberg[1].

1-Laboratório de Biologia Molecular CEMO-INCa; 2-Serviço de Oncologia Pediátrica–INCa; 3-DIPAT INCa; 4-Coordenação de pesquisa(CPq)-INCa; 5-Serviço de Neurocirurgia-INCa; 6- Instituto Estadual do Cérebro

INTRODUÇÃO

- Os tumores de sistema nervoso central (SNC) são os tumores sólidos mais comuns na infância e principal causa de óbito por neoplasia em pacientes pediátricos.
- Os gliomas de baixo grau (I e II) são responsáveis por aproximadamente 40 % dos casos de tumores de SNC nesta faixa etária. Estudos de biologia molecular recentes conseguiram identificar alterações moleculares específicas na via MAPK, dados que podem auxiliar no diagnóstico diferencial e tratamento desta população (Fig.1)[1].
- As vesículas extracelulares (VE) são partículas expelidas por todas as células do organismo, inclusive células neoplásicas. Estas vesículas apresentam conteúdo variável, que inclui proteínas, lipídios e ácidos nucléicos (mRNA, micro RNA e DNA). Os exossomos são vesículas que apresentam entre 30-100nm e estudos sugerem que a avaliação de seu conteúdo pode ser utilizada para detecção de biomarcadores, tanto no diagnóstico quanto para avaliação de resposta e/ou progressão tumoral (Fig.2)[2].

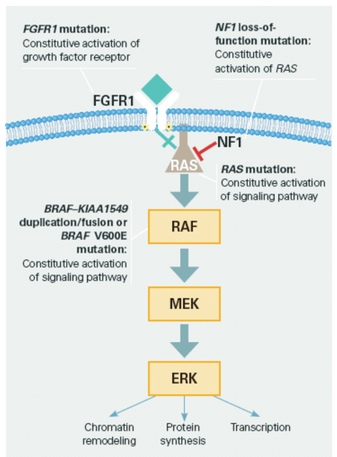

Figura 1 - Mutações presentes em gliomas be baixo grau na via MAPK[1]

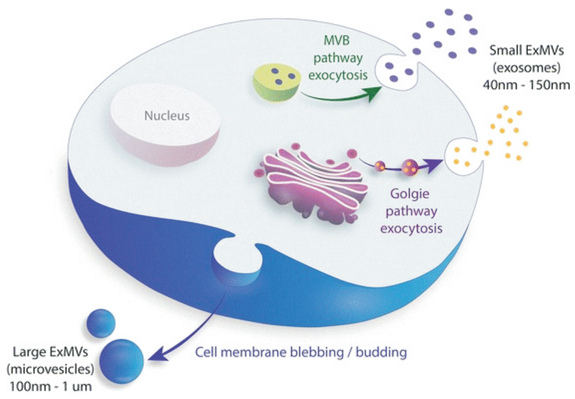

Figura 2 - Mecanismos de secreção de exossomos[2]

OBJETIVOS

- Avaliar o perfil molecular dos pacientes com gliomas de baixo grau diagnosticados entre 2010-2015.
- Avaliar a possibilidade de detecção de marcadores moleculares em exossomos de sangue periférico ao diagnóstico e durante o tratamento/seguimento em diferentes grupos de gliomas pediátricos.

MATERIAL E MÉTODOS

- Levantamento de casos dos pacientes entre 0-18 anos com glioma de baixo grau admitidos no INCA entre 2010-2015.
- Extração de DNA de material de parafina e determinação de alterações em *BRAF*, *FGFR1*, *IDH1e2*, *MYB*, *MYBL1* através de sequenciamento direto e/ou por MLPA (Fig.3).
- Coleta de sangue periférico dos pacientes em acompanhamento ou tratamento, para isolamento de exossomas e posterior caracterização dos mesmos. As mutações encontradas nos tumores primários serão pesquisadas nos exossomas através de extração de DNA e sequenciamento direto (Fig4.)

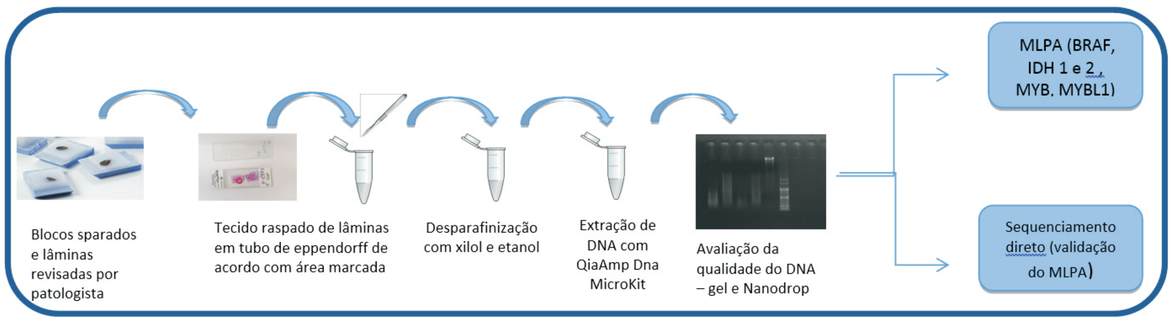

Figura 3 - Esquema ilustrativo da metodologia utilizada para extração de DNA de parafina e as análise moleculares subsequentes propostas

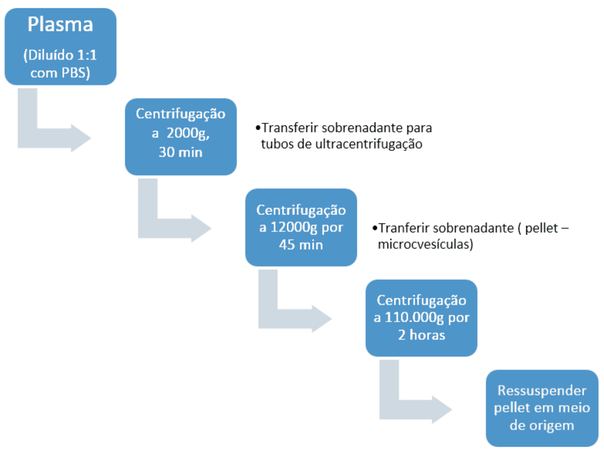

Figura 4 - Método de ultracentrifugação para isolamento de exossomas. Adaptado de *Current Protocols in Cell Biology (2006) 3.22.1-3.22.29*

RESULTADOS

- Foram levantados 86 casos com laudo histopatólogico (LHP) de glioma de baixo grau (I e II) matriculados entre 2010-2015. Até o momento, 44 casos tinham material disponível no DIPAT e foram encaminhados para extração de DNA e análise subsequente. A extração já foi realizada em 22 casos com média de rendimento de 61,2 ng/l. Estão em andamento as reações de PCR e sequenciamento direto para os genes IDH 1/2 e BRAF V600E. Foi realizado isolamento de exossomas de plasma por ultracentrífugação de dois doadores para padronização da técnica. Estas amostras serão utilizadas como controle.

Glioma grau I e II (2010- 2015)	Vivos	Óbitos	Total
Com LHP	80	6	86
Sem LHP	25	1	26
Total	105	7	112

Figura 5 - Pacientes com glioma de baixo grau entre 2010-2015

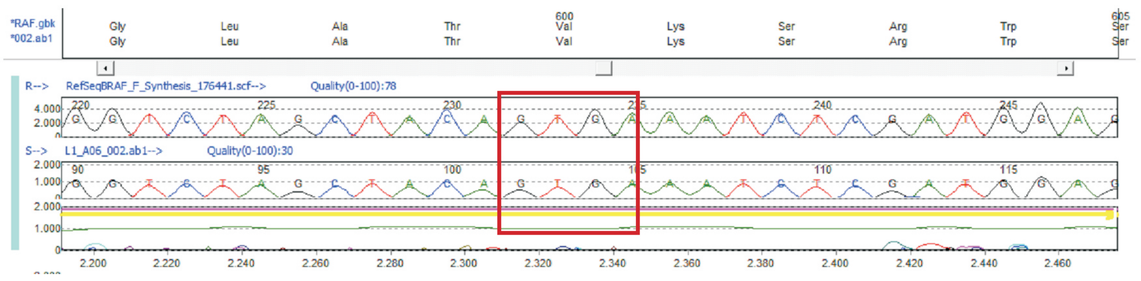

Figura 6 - Sequenciamento para BRAF V600E (p.V600E (c.1799 T>A))

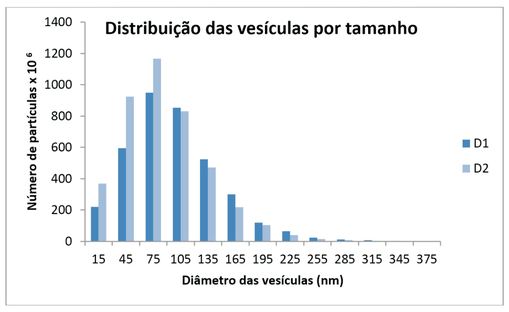

Figura 7 - Quantificação e avaliação por tamanho de exossomas isolados de amostras de doadores saudáveis(D1 e D2).

PERSPECTIVAS

- Concluir as análises por PCR nas amostras de parafina.
- Realizar análise por MLPA das amostras após avaliação da qualidade do DNA.
- Padronizar uma metodologia de extração de DNA a partir de exossomas.
- A validação de uma metodologia para detecção de mutações e alterações moleculares através de sangue periférico terá grande importância como ferramenta para melhoria do diagnóstico, tratamento e acompanhamento destes pacientes.

Referências:

1- Parson, DW Oncology, 2016 Maio, 30(5) 411-23
2- Ratajczak and Ratajczak Clin Trans Med (2016) 5:7
3- Current Protocols in Cell Biology (2006) 3.22.1-3.22.29

Projeto Gráfico: Serviço de Edição e Informação Técnico-Científica / INCA

INCA SUS MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASIL GOVERNO FEDERAL