

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

RICARDO JORGE VASCONCELOS BARBOSA

**ATIVIDADE DAS METALOPROTEINASES 2 E 9 E PADRÕES DE COLORAÇÃO
TUMORAL PELA FLUORESCEÍNA SÓDICA EM CIRURGIAS PARA GLIOMAS
ENCEFÁLICOS**

**Recife
2017**

RICARDO JORGE DE VASCONCELOS BARBOSA

**ATIVIDADE DAS METALOPROTEINASES 2 E 9 E PADRÕES DE COLORAÇÃO
TUMORAL PELA FLUORESCÊINA SÓDICA EM CIRURGIAS PARA GLIOMAS
ENCEFÁLICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Orientador:

Prof. Dr. Jacinto da Costa da Silva Neto

Departamento de Histologia, CB/UFPE

Coorientadora:

Profa. Dra. Manuela Figueiroa Lyra de Freitas

Departamento de Histologia, CB/UFPE

**Recife
2017**

Catálogo na Fonte

Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

B238a Barbosa, Ricardo Jorge Vasconcelos.

Atividade das metaloproteinases 2 e 9 e padrões de coloração tumoral pela fluoresceína sódica em cirurgias para gliomas encefálicos / Ricardo Jorge Vasconcelos Barbosa. – 2017.

81 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientador: Jacinto da Costa Silva Neto.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Patologia. Recife, 2017.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Astrocitoma. 2. Metaloproteinase 2 da Matriz. 3. Metaloproteinase 9 da Matriz. 4. Fluoresceína. 5. Barreira hematoencefálica. I. Silva Neto, Jacinto da Costa (Orientador). II. Título.

616.07

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2018-207)

RICARDO JORGE DE VASCONCELOS BARBOSA

Atividade das metaloproteinases 2 e 9 e padrões de coloração tumoral pela fluoresceína sódica em cirurgias para gliomas encefálicos.

Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Patologia. Universidade Federal de Pernambuco.

Aprovada em: 15 de setembro de 2017

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Roberto José Vieira de Mello
Programa de Pós-Graduação em Patologia, CCS/UFPE
Departamento de Patologia, CCS-UFPE.

Prof. Dr. Marcelo Moraes Valença
Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciência do Comportamento, CCS/UFPE
Departamento de Patologia, CCS-UFPE.

Prof. Dr. Jacinto, da Costa Silva Neto
Programa de Pós-Graduação em Patologia, CCS/UFPE
Departamento de Histologia, CB-UFPE.

**Recife
2017**

RESUMO

Astrocitomas malignos (AM) têm evolução devastadora. Cirurgia para retirada supra total ou completa é central no tratamento. O uso transoperatório da fluoresceína serve para aumentar a ressecção, criando um tom amarelo na neoplasia diferente do cérebro normal. Quebra da barreira hematoencefálica pode ser a causa da permanência desse corante no tumor, e alguns marcadores de invasividade e neoangiogênese, como as Metaloproteinases 2 e 9 (MMP-2 e 9), podem influenciar na efetividade da fluoresceína, características radiológicas e grau tumoral. Neste ensaio clínico buscou-se entender características radiológicas, moleculares e de coramento da fluoresceína nas cirurgias de AM. O uso da fluoresceína foi randomizado e as amostras de tecidos foram retiradas em quatro momentos da cirurgia (acopladas a uma fotografia): após a durotomia, ao encontrar a pseudocápsula, na retirada do *core* e após ressecção. Análise radiológica e histológica duplo cega foi feita e avaliação visual da imunohistoquímica (IHQ) para MMP-2 e 9. O coramento por fluoresceína foi medido com ImageJ e escala visual. Grau de ressecção avaliado pela comparação das ressonâncias/tomografias. 73 pacientes foram incluídos, mas 31 ficaram para análise. O volume médio dos tumores foi 36,31 cm e a média de necrose foi de 36,25%. 16 tumores eram em área eloquente/próxima. Houve 22 casos de AM de alto e baixo graus, 2 casos de metástase, 2 malignos inconclusivos (MI) 6 de gliose/benigno ou tecido normal e 1 astrocitoma grau I. 17 das 21 amostras da substância branca edemaciada, retiradas após o tumor, eram de AM, incluindo 8 graus IV. IHQ para MMP-2 e 9 nas áreas A1 (n=11) apresentaram na maioria intensidade fraca ou nula, com forte ou moderada quando as histologias foram graus III e MI. Nas lâminas com tumor grau IV (n=16) predominou o coramento forte para MMP-2 e fraco ou nulo para MMP-9. O gadolínio foi mais forte na área de pseudocápsula e a fluoresceína na pseudocápsula e *core*. Houve correlação entre o contraste na RM e o coramento pela fluoresceína, que também correspondeu às áreas de maior atividade das MMPs-2 e 9 e ao maior grau de malignidade. Um aplicativo de imagem pode complementar a utilidade da Fluoresceína.

PALAVRAS-CHAVE: Astrocitoma. Metaloproteinase 2 da Matriz. Metaloproteinase 9 da Matriz. Fluoresceína. Barreira hematoencefálica.

ABSTRACT

Malignant astrocytomas (MA) have devastating evolution. Supra total or complete removal is key in the treatment. Transoperative fluorescein is used to increase degree of removal, creating in the tumour a different intensity of yellow from normal brain. Disruption of blood-brain barrier is believed to be the cause of the stain permanence in the tumour, and some markers of invasiveness and neoangiogenesis, such as MMP-2 and MMP-9, may be implicated in the effectiveness of fluorescein and in lesions aggressiveness radiologic features. In this trial, an effort was made to understand radiologic, molecular characteristics of MA and fluorescein behaviour during surgeries. Fluorescein use was randomized and tissue samples were collected in four surgery times (connected to a Picture): after durotomy, when dissected pseudocapsule, during core removal and after resection. Double blinded histologic and radiologic analysis was done, besides visual evaluation of immunohistochemistry (IHC) for MMP-2 and 9. Fluorescein intensity was measured with ImageJ and visual scale. Degree of resection was achieved by comparing MRI/CT scans. 73 patients were initially included, but only 31 remained for analysis. Mean volume was 36,31 cm³ and mean necrosis percentage was 36,25%. 16 tumours were in eloquent/near area. There was no difference in degree of resection between groups. There were 22 cases of MA of high and low grades, 2 metastasis, 2 inconclusive malignant (IM), 6 gliose/benign or normal tissue and 1 grade I astrocytoma. 17 of the 21 samples of swollen white matter after tumour removal were of MA, including 8 grade IV histology. IHC for MMP-2 and 9 in A1 area (n=11) showed a majority weak or null intensity, with strong or moderate when histology was grade III or IM. Among grade IV samples (n=16), strong dye was noticed for MMP-2, while weak or null predominated for MMP-9. Gadolinium was stronger in the pseudocapsule and fluorescein in the pseudocapsule and core areas. There was correlation between MRI and fluorescein intensities, and they also related to areas of greater intensities of MMP-2 and MMP-9 and a higher degree of malignance. An image software may be useful to fluorescein use.

KEY WORDS: Astrocytoma. Fluorescein. Matrix Metalloproteinase 2. Matrix Metalloproteinase 9. Blood-Brain Barrier.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Lâmina representativa de um tecido cerebral normal, corado com HE	-----	39
Figura 2 -	Fragmento corado com HE, de um paciente com astrocitoma grau IV	-----	40
Figura 3 -	Exemplo de uma lâmina contra corada com eosina e realizada imunohistoquímica para MMP-2	-----	45
Figura 4 -	Fotografia transoperatória mostrando o córtex de um paciente com tumor que superficializava-se na região posterior do encéfalo	-----	50
Figura 5 -	Foto da imagem do microscópio cirúrgico durante a dissecação da pseudocápsula	-----	51
Figura 6 -	Em relação a A3, houve uma média de incremento de 64% na intensidade de verde medido pelo ImageJ, em comparação com o córtex em volta da lesão	-----	52
Figura 7 -	após a retirada da massa tumoral, um pouco da região continuou corando timidamente	-----	53

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1 -	Estudos com gliomas e Metaloproteinases de Matriz 2 (MMP-2)	-----	18
Quadro 2 -	Estudos com gliomas e Metaloproteinases de Matriz 9 (MMP-9)	-----	19
Quadro 3 -	Estudos com gliomas e Metaloproteinases de Matriz 2 e 9	-----	20
Tabela 1 -	Diagnóstico histopatológico final por paciente	-----	36
Tabela 2 -	Todos os pacientes, agrupados pela histologia	-----	37
Tabela 3 -	Distribuição dos pacientes por tipo de tratamento recebido	-----	37
Tabela 4 -	Distribuição da histologia por áreas de retirada dos fragmentos durante a cirurgia	-----	41
Tabela 5 -	Positividade para MMP-2 na região de tecido normal	-----	43
Tabela 6 -	Intensidade da reação para MMP-2 na região de pseudocápsula	-----	44
Tabela 7 -	Positividade para MMP-2 nas amostras do centro do tumor (A3)	-----	44
Tabela 8 -	Positividade da MMP-9 na área da pseudocápsula dos tumores	-----	46
Tabela 9 -	Distribuição da positividade para MMP-9 nas áreas centrais dos tumores	-----	46
Tabela 10 -	Distribuição da positividade para MMP-9 nas áreas em volta do tumor	-----	47
Tabela 11 -	Comparação entre as intensidades de realce pelo gadolínio nas diferentes áreas de coletas de fragmentos dos tumores	-----	47
Tabela 12 -	Comparação entre as intensidades de coramento pela fluoresceína nas diferentes áreas de retirada do tumor, no grupo caso	-----	48
Tabela 13 -	Media das razões da intensidade do verde na área do tumor, nas diferentes profundidades de ressecção, comparadas ao córtex circunjacente	-----	49
Tabela 14 -	Comparação do realce na ressonância em comparação com o grau de coramento pela fluoresceína, nas diferentes camadas de ressecção	-----	54
Tabela 15 -	Comparação entre as intensidades de fluoresceína pelo ImageJ nas diferentes profundidades de retirada do tumor	-----	54
Tabela 16 -	Intensidades de coramento do gadolínio e da fluoresceína nas áreas A2	-----	55
Tabela 17 -	Intensidades de coramento do gadolínio e da fluoresceína nas áreas A3	-----	55
Tabela 18 -	Distribuição das intensidades de coramento do gadolínio e da fluoresceína nas áreas A4, por tipo histológico	-----	56

LISTA DE ABREVIACÕES

AA	Astrocitoma anaplásico
BHE	Barreira Hematoencefálica
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GBM	Glioblastoma ou astrocitoma grau IV
HE	Hematoxilina e Eosina
KPS	Escala de performance de Karnofsky
MMP-2	Metaloproteinase de matriz 2
MMP-9	Metaloproteinase de matriz 9
OMS	Organização Mundial de Saúde
PTEN	Homólogo da fosfatase e tensina
PNET	Tumor neuroepitelial primitivo
RANO	<i>Response assessment in neuroncology</i>
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	Fundamentação teórica	13
1.1.1	Gliomas encefálicos.....	13
1.1.2	As metaloproteinases de Matriz (MMPs)	15
1.1.3	MMP-2 e MMP-9 na progressão dos gliomas encefálicos	16
1.1.4	Ressecção Cirúrgica de Gliomas e Utilização de Fluoresceína.....	21
2	JUSTIFICATIVA	23
3	OBJETIVOS	24
3.1	Objetivo geral.....	24
3.2	Objetivos específicos.....	24
4	METODOLOGIA.....	26
4.1	Tipo de Estudo	26
4.2	Locais do estudo.....	26
4.3	População alvo e período de estudo.....	26
4.4	Crterios de inclusão e exclusão.....	27
4.5	Metódo de coleta e análise do material biológico.....	27
4.5.1	Instrumentos para coleta de dados.....	28
4.5.2	Cálculo do volume tumoral pré e pós-operatório e injeção de fluoresceína	29
4.5.3	Definição de tumores mensuráveis e não mensuráveis e localização dos tumores	29
4.5.4	Colheita de fragmentos no transoperatório.....	30
4.5.5	Captura e análise de imagens.....	31
4.5.6	Imunohistoquímica para MMP-2 e MMP-9	31
4.6	Análise dos dados.....	32
4.7	Aspectos éticos e legais	33
5	RESULTADOS.....	35
5.1	Distribuição dos casos e histologia das lesões operadas	35
5.1.1	Laudos histopatológicos externos.....	38
5.1.2	Laudos histopatológicos da pesquisa.....	38
5.2	Grupos caso e controle quanto aos graus de ressecção e morbimortalidade	42
5.3	Correlação grau de malignidade x imunohistoquímica para MMP-2 e MMP-9..	43
5.4	Realce pelo contraste da ressonância e Coramento pela fluoresceína	47
6	DISCUSSÃO	57
6.1	Distribuição dos casos e histologia das lesões operadas	57
6.2	Graus de ressecção e morbimortalidade	58

6.3	Correlações grau de malignidade x imunohistoquímica para MMP-2 e MMP-9	59
6.4	Realce pelo contraste da ressonância e Coramento pela fluoresceína	59
7	CONCLUSÃO.....	62
	REFERÊNCIAS	63
	APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO.....	72
	APÊNDICE B - FORMULÁRIO DE CADASTRAMENTO DO PACIENTE...	74
	APÊNDICE C - FORMULÁRIO PARA RANDOMIZAÇÃO DO PACIENTE.	77
	ANEXO A - CRITÉRIOS RANO DE PROGRESSÃO TUMORAL.....	78
	ANEXO B - ESCALA DE DESEMPENHO DE KARNOFSKY.....	79
	ANEXO C - REGISTRO DA FLUORESCÊNCIA NA ANVISA.....	80
	ANEXO D - TERMO DE COMPROMISSO E CONFIDENCIALIDADE.....	81

1 INTRODUÇÃO

Dos tumores cerebrais primários, o glioma (neoplasia astrocitária) é o diagnóstico mais comum (atingindo 6,45 a cada 100.000 pessoas por ano), sendo considerado benignos apenas os de grau I na classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS), enquanto os de graus II a IV são malignos e em sua grande maioria infiltrativos (LOUIS et al., 2007). O prognóstico dos pacientes com gliomas de alto grau encefálicos (astrocitomas grau III e IV da OMS) (STUPP et al., 2005) não melhora como esperado. O aumento médio na sobrevida em 2 anos de 10,4% para 26,5% em casos de glioblastoma (GBM, grau IV) resultou de técnicas que permitem uma ressecção cirúrgica ampla e segura, além da evolução na radioterapia e quimioterapia adjuvantes. Nos pacientes portadores de gliomas de baixo grau de malignidade (15% dos tumores primários recém-diagnosticados, em adultos jovens) o prognóstico é melhor (SANAI et al., 2008), mas apresenta sobrevida média em 5 anos de 50-70% dos pacientes sob as melhores condições de tratamento clínico e cirúrgico, e com taxas de progressão para gliomas de alto grau em torno de 50% (SANAI et al., 2008; BERGER, 2013).

Uma das formas de tentar aumentar a ressecção cirúrgica de gliomas encefálicos é o uso transoperatório da fluoresceína, corante proteico (xanteno) com características fluorescentes na forma de sal sódico (fluoresceína sódica), que auxilia na localização das margens nos tumores cerebrais infiltrativos, tornando visíveis áreas que sofreram alterações na barreira hematoencefálica provocadas pelo tumor (SILVA, 2010). Por sua propriedade de impregnar preferencialmente ou exclusivamente as lesões expansivas do sistema nervoso, é usada não apenas para melhorar a ressecção dos gliomas encefálicos, mas de meningioma, adenomas e outros tumores da base do crânio (SILVA; SILVA, 2010). Por sua capacidade de corar o líquido quando utilizada via endotecal ou endovenosa, a fluoresceína é usada para correção cirúrgica de fístulas líquóricas frontobasais (TABAE et al., 2006) ou para orientação em cirurgias endoscópicas endonasais de tumores cranianos (ANARI et al., 2007; SILVA; SILVA, 2010). Também é descrito seu uso durante endoscopias ventriculares (LONGATTI et al., 2013).

Avaliando a eficácia da fluoresceína e seu benefício no prognóstico dos pacientes com gliomas de baixo grau, Koc et al., (2008) compararam o volume da lesão captante de contraste (área considerada tumor) nos exames pré e pós-operatório e observaram que as taxas de ressecção completa foram maiores nos grupos que receberam fluoresceína, assim como constataram um aumento do tempo livre de recidiva da doença e da sobrevida nos grupos de pessoas que receberam a fluoresceína. A segurança do procedimento também tem sido bem

avaliada, com ocorrência de novos déficits mais comuns nos grupos controle (CHEN et al., 2012).

A hipótese tão amplamente aceita de que a ação transoperatória da fluoresceína guarda relação com a quebra da barreira hematoencefálica (BHE) carece de esclarecimentos quanto a seus mecanismos. Na gênese desse fenômeno, ocorre degradação da matriz extracelular pelas células tumorais, mudança de polaridade e migração dos astrócitos neoplásicos, e as metaloproteinases de matriz participam de vias metabólicas importantes nesse sentido (BRAT et al., 2004).

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são moléculas com importância no entendimento da agressividade de algumas neoplasias, incluindo tumores encefálicos, especialmente no que concerne a invasividade e neoangiogênese, pois entre as funções conhecidas das MMPs estão: a degradação de proteínas de matriz permitindo migração celular, lise e ativação de outras MMPs, receptores, citocinas, outras enzimas e fatores de crescimento (VANDOOREN et al., 2013). A atividade aumentada de MMP-2 e 9 é encontrada em tumores mais agressivos, e está associada ao mal prognóstico em gliomas (TABOURET et al., 2014). Várias vias moleculares estão alteradas nas diferentes apresentações de astrocitomas de baixa e alta malignidade, muitas delas tendo como resultado alteração do padrão de expressão de metaloproteinases de matriz (ZWIATKOWSKA et al., 2013).

Há poucos estudos sobre quais os mecanismos celulares e teciduais pelos quais há tantos padrões diferentes de coramento transoperatório pela fluoresceína, de acordo com o grau de malignidade e padrão de crescimento tumoral em gliomas (CHEN et al., 2012). Este estudo tem como finalidade verificar se há uma correlação entre a atividade das metaloproteinase de matriz 2 e 9, os diferentes tipos de gliomas e seu grau de malignidade e se o padrão de coramento pela fluoresceína está relacionado com atividade aumentada ou diminuída das MMPs, além de comparar padrões de coramento por sua distribuição no espectro de cor, avaliados computacionalmente. Elucidar os benefícios do uso transoperatório da fluoresceína e seus mecanismos biológicos é parte da estratégia para melhorar o tratamento e reduzir custos, permitindo melhor prognóstico e sobrevida dos pacientes.

1.1 Fundamentação teórica

Esta fundamentação teórica busca abordar os principais tópicos relacionados ao tema da dissertação.

1.1.1 Gliomas encefálicos

Os gliomas malignos são lesões cancerígenas derivadas de astrócitos ou de células precursoras de astrócitos ou oligodendrócitos. Juntos, são os tumores mais comuns do sistema nervoso central (STUPP et al., 2005; LOUIS et al., 2007; FULLER et al., 2011; HINOJOSA et al., 2011), e incluem os astrocitomas com baixo grau de malignidade, como o astrocitoma difuso, o oligodendroglioma e o oligoastrocitoma (graus II da OMS), e o astrocitoma anaplásico (AA), o oligoastrocitoma anaplásico e o oligodendroglioma anaplásico, que são considerados de grau III de malignidade pela OMS, e, por fim, inclui também o glioblastoma (GBM), que é a lesão mais comum e é representativa do grau IV. Mesmo com o melhor tratamento possível atualmente – ressecção cirúrgica de pelo menos 98% da lesão em casos de tumores ressecáveis, radioterapia e quimioterapia com o agente citotóxico temozolamida e o anticorpo monoclonal inibidor do VEGF bevacizumab - estas lesões permitem uma sobrevida média de menos de 2 anos, nos casos de alta malignidade (SHINODA et al., 2003; MCGIRT et al., 2009). Esse tipo de tumor se caracteriza por comportamento invasivo e infiltrativo – e não metastático – que faz com que uma ressecção curativa seja altamente improvável. Os AA acometem pessoas com 40 anos de idade média, enquanto o GBM acomete pessoas com 53 anos em média, mas com pico de incidência entre 65 e 74 anos. AA e GBM têm localização preferencial periventricular e nos hemisférios, enquanto os gliossarcomas, que perfazem cerca de 8% dos tumores de grau IV, têm localização preferencial temporal e tendência de invasão dural (SHINODA et al., 2003; MAGIET et al., 2009).

A forma que a OMS utilizava até 2016 para classificar esses tumores denota o caráter agressivo e infiltrativo, com tendência a formação de necrose, neoangiogênese e índices proliferativos acentuados. Os de grau II (baixa malignidade, dentre os quais destacam-se os tipos protoplasmático, o gemistocítico e o fibrilar) se caracterizam por apresentar astrócitos bem diferenciados como células tumorais e apresentam, na avaliação histológica, hiper celularidade, infiltração exacerbada, porém atipia nuclear discreta e pouca ou nenhuma mitose, e sem apresentar necrose nem proliferação vascular. O AA é composto por astrócitos pouco diferenciados e altas taxas de mitose e atipias nucleares, podendo-se encontrar proliferação vascular, mas não necrose. Os gliomas de grau IV da OMS (GBM e

gliossarcoma) caracterizam-se por apresentar não só alto grau de mitose e atipia nuclear, mas proliferação vascular (essa relacionada ao insulto isquêmico da proliferação acelerada e associada à disfunção da barreira hematoencefálica) e áreas de necrose em pseudopalissada – que provavelmente representam células tumorais fugindo da área isquêmica (LACRIOX et al., 2001). A morfologia celular do GBM é variável, indo de células pequenas, alongadas ou redondas e densamente empacotadas até formas bizarras gigantes ou multinucleadas, que podem estar presentes no mesmo tumor. Figuras mitóticas são comuns e correspondem ao marcador de índice mitótico, o antígeno Ki-67 (SANAI et al., 2008). Houve uma importante mudança na classificação da OMS para os astrocitomas, sendo a nova classificação inovadora por levar em consideração parâmetros moleculares (LOUIS et al., 2016), mas neste estudo continuamos usando a classificação de 2007.

Os gliomas difusos ou grau II apresentam grande expressão de proteína ácida glial fibrilar (GFAP), enquanto no GBM há grande expressão de receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR), o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e alta taxa de mutação da p53 no tipo secundário (SENAI et al., 2008; BERGER, 2013). Há uma tendência em separar os GBM em 4 subclasses moleculares – com possíveis influências no prognóstico e tratamento: clones envolvendo: 1. A amplificação e ativação dos genes do receptor de tirosina quinase (RTK), incluindo mutações do receptor EGFR em 45%; 2. Ativação da via do PI3K, parte da via do AKT, que estimula a sobrevivência e proliferação celular e está mutado em cerca de 15% dos casos de GBM (juntas, as vias de sinalização RTK/RAS/PI3K estão alteradas em cerca de 88% dos GBM e causam ativação das metaloproteinases de matriz); 3. Inativação do p53 - com esse gene mutado em 35% e a ciclina dependente de quinase N2A (CDKN2A) em 49% e 4. Das vias do supressor tumoral retinoblastoma (RB) – com deleção deste em 11% e CDKN2A em 52% e da CDKN2B em 47%. Outro gene frequentemente alterado é o do supressor tumoral fosfatase lipídica PTEN (inibe o PI3K), em 36% dos casos. Esta via, quando liberada e promovendo proliferação celular, também ativa a expressão das MMP-2 e MMP-9. Outra mutação frequente e importante é a metilação do gene MGMT, com importância no tratamento dos GBM, pois representa passagem destes para um fenótipo hipermutante e com quimiorresistência ao principal agente citotóxico usado (temozolamida) (CHACKO et al., 2003; STUPP et al., 2003; SANAI et al., 2008; TODA, 2008).

Em relação ao incremento da proliferação vascular, característico no crescimento dos astrocitomas malignos e principalmente no GBM, representa a mais importante frente de tratamento clínico (VALLE et al., 2011; ALDAVE et al., 2013), após aprovação para gliomas

recorrentes do inibidor do VEGF-A bevacizumab. Acredita-se que durante a malignização desses tumores as células de glioma, em resposta a mutações e hipóxia: 1. Liberam fatores de crescimento, como o VEGF e o básico de fibroblasto (bFGF), que ativam células endoteliais locais a se diferenciarem em fenótipo angiogênico; 2. Fatores de crescimento se ligam a receptores endoteliais e ativam vias de transdução levando à proliferação endotelial; 3. Vasos neoformados liberam uroquinase e metaloproteinase e migram em direção ao tumor usando integrinas; 4. As células tumorais envolvem os vasos e migram através deles para longe do tumor principal para formar um nicho vascular; 5. Após atingir um tamanho crítico, o glioma recruta seus próprios vasos, perpetuando o processo. As MMP-2 e 9 são produzidas e nas células tumorais da margem infiltrativa ou da parte interna dos tumores, nos vasos neoformados, nos pericitos e neutrófilos, e estão envolvidas, em conjunto com o VEGF, no processo de neoangiogênese, e se este processo vai ser eficaz ou facilitar a necrose (ROSE et al., 2008).

1.1.2 As metaloproteinases de Matriz (MMPs)

A ação de MMPs foi mostrada pela primeira vez por Gross e Lapierre (1962), que observaram enzimas capazes de degradar géis de colágeno fibrilar da cauda involutiva de girinos, posteriormente denominadas de collagenases. As MMPs pertencem a uma família de endopeptidases zinco-dependentes com capacidade de degradar uma ampla variedade de substratos dentre os principais componentes da matriz extracelular e membrana plasmática além de moléculas da superfície celular e outras proteínas pericelulares (STERNLICHT; WERB, 2001). São, por essas funções, integrantes fundamentais no processo de progressão das lesões tumorais. Atualmente as MMP são agrupadas em oito classes, sendo que cinco das classes são secretadas (MMP) e três são metaloproteinases do “tipo membrana” (MT-MMP) (NAGASE et al., 2006). As MMP localizam-se na superfície celular em ligação com integrinas ou interação com proteoglicanas e colágeno tipo IV e dependem da ligação com o zinco para funcionamento (VANDOOREN et al., 2013).

Em geral, seus elementos estruturais incluem uma sequência sinalizadora N-terminal (pré-domínio) que direciona ao retículo endoplasmático, sendo então removida; um domínio pró-peptídico, que mantém a latência da enzima; um domínio catalítico contendo um sítio de ligação do íon zinco (Zn^{2+}); uma região de articulação ou ligação e um domínio de repetições semelhantes à hemopexina (STERNLICHT et al., 2001). Fatores de crescimento, hormônios, citocinas, oncogenes e microRNAs regulam a transcrição dessas enzimas, que são sintetizadas como zimogênios inativos (pró-MMPs) (WEY et al., 2011; ZWIATKOWSKA et al., 2011;

ASUTHKAR et al, 2012; VANOOREN et al., 2013). As pró-MMPs são mantidas inativas pela interação entre um grupo sulfidril ou tiol (SH) de cisteína não pareado, próximo à extremidade C-terminal do domínio pró-peptídeo, e o íon zinco no domínio catalítico. A ativação requer a abertura deste “interruptor” por remoção proteolítica do domínio pró-peptídeo ou por perturbação ectópica da ligação entre cisteína e zinco (STERNLICHT; WERB, 2001). A maioria das MMPs é ativada no exterior da célula por outras MMPs já ativadas ou serina proteases, como a plasmina (WOESSNER; NAGASE, 2000). O microRNA-211 é um regulador intranuclear das MMPs, e apresentou um efeito supressor sobre a invasividade e migração das células de glioma no estudo de Asuthkar e colaboradores, além de que seus níveis altos têm efeito aditivo, quando associados à radioterapia.

A ação das MMPs na degradação e remodelação da Matriz Extracelular (MEC) é essencial em processos fisiológicos como desenvolvimento embrionário, morfogênese, reprodução, reabsorção e remodelação tecidual. Expressão desregulada de MMPs devido ao desequilíbrio entre sua ativação e inibição é observada em doenças inflamatórias, na fibrose e no câncer (NAGASE et al., 2006).

1.1.3 MMP-2 e MMP-9 na progressão dos gliomas encefálicos

As atividades das MMP-2 e MMP-9 têm sido investigadas em associação com infiltração e agressividade de tumores de diversas origens. Além de incremento do fenótipo maligno, há elevação da atividade dessas MMPs nas células tumorais, endoteliais e nos perícitos, bem como, nas células inflamatórias na evolução dos gliomas, muitas vezes acompanhada de uma redução da ação dos inibidores de MMP, com variações que demonstram a importância das MMPs para o prognóstico desses tumores (WOESSNER et al., 2000; STERNLICHT et al., 2001; EGEBLAD, 2002; NAGASE et al., 2006; ROSE et al., 2008). A MMP-2 foi identificada como um marcador genético do GBM, aumentando seus níveis quanto maior o grau de malignidade do glioma. Em animais de laboratório alterados geneticamente para que os tumores não produzam MMP-2, a neoangiogênese foi ineficaz (ROSE et al, 2008). No caso da MMP-9, além de seu papel na biologia tumoral, apresenta envolvimento na formação embrionária esquelética, reprodutiva e neuronal, e na sinalização antiapoptótica e proinflamatória (VANDOOREN et al., 2013).

A expressão de MMPs tem sido alvo de diversos estudos relacionando o grau de malignidade e sobrevida em pacientes com tumores cerebrais. Desta forma, nos quadros 1, 2 e 3, há uma síntese dos resultados obtidos por diferentes metodologias empregadas para averiguar esta relação, assim como, país de estudo, número de amostras, tipo de tumor

encontrados em algumas pesquisas que se propuseram a avaliar a importância das MMP-2 e MMP-9 nos gliomas encefálicos.

Quadro 1 - Estudos realizados com tumores cerebrais e a expressão de Metaloproteinasas de Matriz 2 (MMP-2): autor, ano de publicação, número de amostras (N), tipos de tumores estudados, técnicas laboratoriais aplicadas e níveis de expressa da MMP-2.

Autor/Ano	Amostras (N)	Tipo de Tumor	Técnica Utilizada	Expressão das MMPs
Jaalinoja et al (2000)	N= 101 tumores cerebrais	tumores benignos astrocitomas astrocitomas analásicos oligodendrogliomas anaplásicos GBM	Imunohistoquímica	Identificado que a MMP-2 está expressa nas células tumorais e na vasculatura, assim como em células inflamatórias. A sobrevida media dos pacientes com tumores negativos para MMP-2 foi de 36 meses enquanto foi de 7 – 14 meses nos tumores positivos para MMP-2.
Hirohito Yano et al (2001)	N= 11 casos de astrocitoma, N= 10 casos de astrocitoma e 09 casos de GBM.	Gliomas	Imunohistoquímica	A expressão de MMP-2 se correlacionou com o grau de malignidade
Ping Guo et AL (2005)	N= 57 amostras de grau (I e IV) bordas do tumor; N= 35 (centro do tumor)	Glioma	Imunohistoquímica Western blot Zimografia	Expressão principais nas áreas invasivas mas não nas áreas centrais dos tumores. Aumento d a expressão de MMP-2.
Kai Zhang et al (2007)	N= 41 (16 de baixo grau e 25 de alto grau)	Astrocitoma	Espectroscopia imunohistoquímica	A expressão para MMP-2 foram bem maiores nos tumores de alto grau. A espectroscopia por ressonância é útil em avaliar a invasividade de astrocitomas e predizer o prognostico.
Jian Gu et al (2009)	N= 45 amostras de gliomas pediátricos N=20 amostras controle	Astrocitoma Anaplasico; GMB	Imunohistoquímica	Expressão aumentada de MMP-2 em AA e GBM, estando positivamente relacionado e associado com maior grau de malignidade

Quadro 2 - Estudos realizados com tumores cerebrais e a expressão de Metaloproteinases de Matriz 9 (MMP-9): autor, ano de publicação, número de amostras (N), tipos de tumores estudados, técnicas laboratoriais aplicadas e níveis de expressa da MMP-2.

Autor/Ano	Amostras (N)	Tipo de Tumor	Técnica Utilizada	Expressão das MMPs
Jipei Zhao et al (2012)	N= 272 pacientes	Gliomas	Imunohistoquímica	A expressão de MMP-9 estava aumentada em gliomas e foi associada com a progressão tumoral, pois aumentou do grau 2 para o 4. Pacientes com gliomas com níveis mais altos de MMP-9 tiveram uma sobrevida geral mais curta. Em análise multivariada, a expressão de MMP-9 se mostrou um fator prognostico independente em gliomas. O estudo foi a primeira evidência da expressão de MMP-9 como fator prognostico.
Wei Yan et al (2011)	N=168 pacientes	GBM	mRNA microarray	O aumento da expressão de MMP-9 se correlacionou com o pior prognóstico.
Hlobilkova et al (2009)	N= 66 pacientes (29 com grau 2 e 37 com graus 3 e 4)	Astrocitomas	Imunohistoquímica	A expressão de MMP-9 foi aumentada no grupo de maior malignidade.
Hormigo et al (2006)		Astrocitoma	ELISA Padrão radiográfico	Há um aumento dos marcadores no período posoperatório. EM casos de glioblastoma, pessoas com tumores residuais tiveram níveis de MMP-9 significativamente mais elevados que os sem sinais radiográficos de doença residual, mas o mesmo não aconteceu em relação aos astrocitomas grau III. MMP-9 não apresentou associação com a sobrevida dos pacientes. Conclui-se que a dosagem sérica da MMP-9 pode ser usada na monitorização de tumor residual em pacientes com GBM.

Quadro 3 - Estudos realizados com tumores cerebrais e a expressão de Metaloproteínas de Matriz 2 e 9 (MMP-2 e MMP 9): autor, ano de publicação, número de amostras (N), tipos de tumores estudados, técnicas laboratoriais aplicadas e níveis de expressa da MMP-2e 9.

Autor/Ano	Amostras (N)	Tipo de Tumor	Técnica Utilizada	Expressão das MMPs
Kachra et al (1999)	N= 60 tumores	schwannomas, meningiomas e astrocitomas pilocíticos grau 1, astrocitomas grau 2 e anaplasicos grau 3. GBM grau 4.	Western blotting	Os níveis de MMP-9 estavam aumentados nos astrocitomas e oligodendrogliomas grau 3 do que em schwannomas e meningiomas (grau 1).
Sheetal Raithatha et al (2000)		Glioma	hibridização in situ e imunohistoquímica	Expressão de MMP-2 e 9 se localizou nas células tumorais e estruturas vasculares. A expressão da proteína MMP-2 foi vista predominantemente nas células tumorais enquanto a expressão de MMP-9 foi mais proeminente nas estruturas vasculares, mas também foi expressa em células tumorais.
Manaut et al (2003)	N= : 20 GBM e 05 cérebros normais	GBM	RT-PCR Western blot Zimografia imunohistoquímica	Com excelente correlação entre mRNA e níveis proteicos, formas ativas de MMP-2 e MMP-9 estavam presentes em 8/18 e 7/18 dos GBMs e 17/20 expressavam altas quantidades de VEGF.
Komatsu et al (2004)	N=21	Gliomas	Imunohistoquímica RT-PCR	38% dos casos foram positivos para MMP-2 e seu mRNA detectado em 62%. Não houve relação significativa entre a expressão de MMP-2 ou do mRNA e a agressividade ou classificação histológica, mas o MMP-2 mRNA estava elevado em casos disseminados ou recorrentes. Houve positividade para MMP-9 em 81% das amostras, nas células neoplásicas e endoteliais. A expressão do Mrna da MMP-9 foi detectado em 91% dos casos (mais elevados em casos de GBM), sugerindo relação com grau de malignidade.
Thorns et al (2006)		Astrocitomas Oligodendrocitomas grau 4 anaplasias	Imunohistoquímica	MMP-2 e MMP-9 coram primariamente estruturam vasculares. têm papel importante na neoangiogênese e vascularização tumoral.

1.1.4 Ressecção Cirúrgica de Gliomas e Utilização de Fluoresceína

Se a ressecção de um glioma abranger mais de 75% do volume inicial já há benefícios demonstráveis na sobrevida sobre as pessoas que receberam biopsia (até 50% de retirada) ou ressecção parcial (MCGIRT et al., 2009). No entanto, ressecções de pelo menos 98% (LACRIOX et al., 2001), quando estas são possíveis sem acarretar acréscimo de morbidade neurológica, apresentam melhor resultado, com maior tempo livre de recidiva. Nos casos de reoperação, a ressecção total ou próxima do total também mostrou associação significativa com o aumento da sobrevida (SANAI et al., 2008; SMITH et al., 2008; STUMMER et al., 2008; BERGER, 2013).

Opções para aumentar a ressecabilidade dos gliomas, mantendo a segurança do procedimento, incluem a neuronavegação (TODA, 2008), uso de ultrassonografia transoperatória (CHACKO et al., 2003; HINOJOSA et al., 2011), o mapeamento transoperatório de áreas eloquentes (SANAI et al., 2008), a craniotomia com o paciente acordado (área de linguagem) e o uso do 5-ALA associado ao microscópio com filtro de luz azul (HEFTI et al., 2010; VALLE et al., 2011) ou a fluoresceína sódica endovenosa durante a cirurgia (MOORE et al., 1948; KOC et al., 2008; SILVA; SILVA, 2010; CHEN et al., 2012). A técnica da fluoresceína pode ser ainda mais eficaz quando a mesma é conjugada com a albumina (ICHIODA et al., 2004) ou utilizando-se de excitação e filtros de barreira (OKUDA et al., 2012) ou filtro de luz no microscópio cirúrgico, reduzindo-se a dose injetada, com bons resultados (REY-DIOS, 2012).

Os gliomas podem ser separados nos grupos difuso e circunscrito, sendo que as lesões difusas apresentam maior grau de dificuldade de ressecção, por serem tumores mais infiltrativos (FULLER et al., 2011). Eles correspondem à grande maioria dos gliomas de graus II a IV. Há evidências de que o sinal fluorescente vai além das áreas de tecido que realçam com o contraste nos exames de ressonância (UZUKA et al., 2007; VALLE et al., 2011; CHEN et al., 2012). Podem-se identificar, de forma didática, as zonas de coloração pela fluoresceína como: amarelo forte, amarelo fraco e não corada. O tecido estudado na zona amarela forte corresponderia a uma região de maior densidade celular neoplásica, mais propensa à ocorrência de necrose e proliferação vascular, enquanto a zona amarela fraca apresentaria menor densidade de células neoplásicas, sem necrose ou proliferação vascular, e a zona não corada apresentaria pouca ou nenhuma célula tumoral (SHINODE et al., 2003; TODA, 2008). Em análise volumétrica do grau de ressecção de GBM usando o 5-ALA – outro agente transoperatório fluorescente – foi observado um valor preditivo positivo de

100% para tumor na região de fluorescência forte. Todos os pacientes do estudo tiveram ressecção acima de 98% e com o volume médio ressecado de 99,8% (VALLE et al., 2011).

A fluoresceína não é metabolizada e tem excreção renal, motivo pelo qual deve ser evitado seu uso nos pacientes com doença renal (ANARI et al, 2007). Há poucos relatos de complicações com o uso endovenoso da fluoresceína sódica, com apenas um caso de anafilaxia grave (grau 3 ou 4). Em estudo com uso intratecal, efeitos adversos vagos e passageiros, como mal-estar, cefaleia e tonturas (TABAE et al., 2006). Classicamente a administração endovenosa é feita no início da cirurgia ou antes da abertura da dura-máter, mas estudos mostraram que em 10 minutos atinge-se a coloração adequada, permitindo sua aplicação após a abertura da dura-máter sem acréscimo de morbidade (CHEN et al., 2012).

O uso transoperatório da fluoresceína no GBM oferece bons resultados (SHINADA et al., 2003; UZUKA et al., 2007; KOC et al., 2008; COHEN-GADOL; REY-DIOS, 2012) com aumento significativo no grau de ressecção dos tumores das pessoas que recebem a fluoresceína, com aumento de sobrevida para o grupo com ressecção total. Existe evidência crescente de que a reoperação de gliomas, tanto de alto quanto de baixo grau de malignidade, prolonga a sobrevida (STUMMER et al., 2008; SANAI et al., 2008; HINOJOSA et al., 2011; BERGER, 2013), quando o paciente se apresenta em boas condições clínicas, especialmente se associada a outras características de boa evolução prognóstica, como o índice de desempenho de Karnofsky e a baixa idade.

2 JUSTIFICATIVA

Os astrocitomas de graus II a IV classificados pela OMS têm tratamento clínico e cirúrgico muito difícil e são as malignidades primárias mais comuns do sistema nervoso central. A capacidade de invadir o tecido normal circunjacente e a neovascularização que acompanha essas patologias são elementos chaves no difícil controle clínico e cirúrgico, e o metabolismo de metaloproteinases de matriz 2 e 9 (MMP-2 e MMP-9) tem sido investigado como essencial na infiltração e agressividade tumorais, e está também provavelmente implicado no fenômeno de quebra da barreira hematoencefálica. A BHE tem importância no comportamento tumoral e na eficácia do uso transoperatório da fluoresceína. O contraste usado na ressonância magnética também realça preferencialmente a área do tumor, em geral mais acentuado na cápsula e negativo na área de edema/gliose. Dessa forma, a elucidação dos mecanismos celulares envolvidos na patogênese dos gliomas encefálicos e na ação da fluoresceína transoperatória são importantes na otimização do tratamento dessas neoplasias, com maior segurança no procedimento cirúrgico.

3 OBJETIVOS

Os objetivos descritos abaixo visam alcançar as perguntas que conduziram a realização desta pesquisa.

3.1 Objetivo geral

Estudar, nos gliomas encefálicos malignos, nas diferentes áreas de interesse, dentro e fora do tumor (cérebro normal, pseudocápsula, região central do tumor e na área infiltrativa em volta) a intensidade da presença das MMPs e os diferentes padrões de coramento com a fluoresceína transoperatória e do contraste da ressonância, tentando identificar correlações com os tipos histológicos e graus de malignidade tentando avaliar também a eficácia de ressecção tumoral com o uso de fluoresceína.

3.2 Objetivos específicos

- Traçar um perfil dos pacientes incluídos no protocolo de pesquisa quanto: à histologia das lesões, à gravidade de apresentação dos sintomas e às características radiológicas das mesmas, com base nos critérios RANO;
- Estudar as lesões cerebrais operadas quanto ao histopatológico oficial dos hospitais, aos histopatológicos dos diversos fragmentos retirados para a pesquisa, compreendendo a heterogeneidade e os graus de malignidade contidos nas amostras de cada fragmento diferente do mesmo paciente;
- Avaliar a gravidade de apresentação dos sintomas iniciais dos pacientes, e se seus tumores eram em áreas nobres, para controlar variáveis de confusão, e efetuar as seguintes análises: comparar os graus de ressecção das lesões, entre os grupos de pacientes que receberam e os que não receberam a fluoresceína entre ressecção total, subtotal, parcial e biopsia; comparar a morbidade e mortalidade pós-operatória imediata nos grupos caso e controle;
- Documentar e classificar as áreas de coramento transoperatório pela fluoresceína com o uso de software de análise de imagens e avaliar a correlação dos diferentes tipos de coramento com os resultados dos estudos histopatológicos (grau de malignidade, necrose e angiogênese). Comparar estes dados com a distribuição espacial do coramento do contraste da ressonância;

- Realizar imunohistoquímica para MMP-2 e MMP-9 nos fragmentos para histopatológico e: relacionar o padrão de coramento pela fluoresceína nas áreas de interesse onde os fragmentos foram colhidos, assim como o tipo de realce pelo contraste da ressonância, com a atividade de MMP-2 e 9 e com o grau de malignidade e tipo tumoral dos fragmentos.

4 METODOLOGIA

Neste tópico haverá a descrição metodológica de todas as etapas necessárias para alcançar cada objetivo específico, assim como métodos estatísticos e questões éticas..

4.1 Tipo de estudo

Estudo transversal do tipo caso controle, cego e randomizado, com agrupamento dos pacientes entre os que receberam ou não a fluoresceína sódica endovenosa, com avaliação de déficits e graus de ressecção - com categorização por grupos de lesões, área eloquente do tumor e gravidade de apresentação e pontuação na escala de desempenho de Karnofsky (Anexo II) para redução dos fatores de conflito (HINOJOSA et al., 2011), com avaliação histológica e radiológica dupla e imunohistoquímica.

4.2 Locais do estudo

O estudo foi desenvolvido no Hospital da Restauração (HR), que constitui referência estadual para pacientes com tumores do encéfalo, e no Hospital da UNIMED III, no Recife. A análise histológica e imunohistoquímica foi realizada no HR e nos laboratórios do Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFPE.

4.3 População alvo e período de estudo

Para compor a amostra deste estudo foram envolvidos aproximadamente 80 pacientes, com suspeita clínica e radiológica de astrocitoma malignos encefálicos, consideradas passíveis de cirurgia, com baixo ou alto grau de malignidade, apesar de o n calculado para o estudo ter sido de 60. Os seguintes parâmetros foram usados no cálculo do número da amostra (n): utilizando-se a fórmula representada abaixo para comparar tratamentos com graus de eficácia diferentes - nesse caso, supondo que o grau de ressecção sem a fluoresceína seja de 80% ($P_a = 0,8$) e de 90% com o uso do corante ($P_b = 0,9$), e considerando o $\alpha = 0,05$ e o poder de 0,90, temos uma amostra ideal de 265 pacientes submetidos à cirurgia:

$$n = 265$$

Considerando a população de Pernambuco como dez milhões de habitantes e a incidência da doença glioma maligno como 4 por 100.000 habitantes por ano (levando-se em consideração a grande quantidade de pessoas sem diagnóstico em nossa população e a incidência de lesões benignas dentro do valor de incidência geral de gliomas nos EUA (LOUIS et al., 2007), foi considerado como 400 o número de casos novos da doença estudada

na população do estado de Pernambuco em um ano. Os hospitais envolvidos na pesquisa recebem cerca de 30% dos casos novos (todos na Região Metropolitana do Recife), o que resulta em 120 casos novos por ano como população para este estudo. Deste total, foi avaliado que em cerca de 50% dos casos pode-se ter sucesso na inclusão do paciente e família, chegando-se ao número proposto acima como amostra final (nf), que perfaz cerca de 20% do volume amostral ideal para o tipo de comparação.

$$nf = \frac{400 - 280}{2} = 60 \quad (nf = 22,64\% \text{ de } 265)$$

Serão formados os seguintes grupos (com seguimento pós-operatório imediato):

- Grupo de estudo: pacientes com lesões características e que foram randomizados para receber o corante (fluoresceína) no transoperatório;
- Grupo controle: pacientes com lesões características e que foram randomizados para não receberem o corante. O estudo foi realizado no período de agosto de 2016 até agosto de 2017.

4.4 Critérios de inclusão e exclusão

- Inclusão: pacientes maiores de 18 anos e menores de 76 anos com diagnóstico clínico e radiológico de glioma supratentorial, tratados nos hospitais incluídos, no período do estudo. Após avaliação histopatológica, serão considerados gliomas de grau II os do tipo protoplasmático, gemistocítico e fibrilar e também os oligodendrogliomas e oligoastrocitomas. Como grau III incluir-se-á os astrocitomas anaplásicos, os oligoastrocitomas anaplásicos e os oligodendrogliomas anaplásicos. Como tumores de grau IV serão considerados o glioblastoma e o gliossarcoma.
- Exclusão: pacientes com alergia a fluoresceína, insuficiência renal aguda ou crônica, tumores localizados na fossa cerebral posterior e pacientes com lesões recidivadas, além dos indivíduos com tumores de outras linhagens celulares. Cirurgias planejadas para ressecções parciais ou biopsias serão excluídas, apesar de permanecerem no estudo se essa decisão for tomada no transoperatório.

4.5 Método de coleta e análise do material biológico

O projeto de pesquisa foi enviado para a Plataforma Brasil e encaminhado ao Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital da Restauração. Após recebida aprovação e autorização para coleta de dados, e concomitante ao treinamento da equipe multidisciplinar, os pacientes com suspeita clínico-radiológica de glioma maligno foram abordados e informados sobre os

objetivos e características do estudo. Um termo de consentimento livre e esclarecido foi assinado pelo participante ou responsável legal (Apêndice B).

4.5.1 Instrumentos para coleta de dados

Os dados foram coletados através de um formulário, para cada paciente, preenchido pelo pesquisador no período pré-operatório e no pós-operatório imediato, onde os fatores de análise de interesse do estudo foram discriminados.

As ressonâncias, próprias e de serviços conveniados, foram realizadas com o seguinte padrão: 1,5 Tesla e cortes de 5 mm na área de interesse, em cortes ortogonais.

A randomização foi obtida através da criação de uma matriz gerada por computação (*List randomizer*, através do sítio <https://www.random.org/lists/>) (Apêndice C) e pelo uso de envelopes com o número do paciente na pesquisa e a participação no grupo de estudo ou controle, junto com algumas instruções, que estiveram disponíveis para o cirurgião e pesquisador na sala operatória (Foto x). O cegamento duplo ocorreu porque o paciente não soube em que grupo foi incluído, assim como não teve essa informação os radiologistas, os patologistas nem o neurocirurgião responsável pela classificação quanto ao grau de ressecção, o tipo histológico, a imunohistoquímica e a intensidade dos contrastes.

A técnica cirúrgica consistiu na realização de craniotomia, sob anestesia geral, dentro do acesso planejado e, com ou sem uso de neuronavegação ou monitorização eletrofisiológica, foi procedido o menor acesso possível e seguro pelo tecido nervoso e sob microscopia, no menor trajeto para a extração do tumor. Pelo fato de os gliomas malignos serem infiltrativos, usa-se a fluoresceína, nos pacientes randomizados para recebê-la, como uma forma de facilitar a diferenciação entre tumor, cérebro infiltrado por tumor e áreas de cérebro normal. Quando o tumor forma uma pseudocápsula, pode-se optar por, depois de retirada de fragmentos para análise histopatológica, fazer uma cavitação inicial no tumor e seguir com uma ressecção extracapsular. Mais comumente, em lesões sem pseudocápsula, a retirada do tumor faz-se com um aspirador ultrassônico que fragmenta e aspira a massa neoplásica, por vezes com aspecto necrótico ou hemorrágico.

As imagens fotográficas e fotomicrográficas dos casos serão realizadas após a abertura dural e durante o procedimento de colheita dos fragmentos no transoperatório (ver pontos 5.5.4 e 5.5.6) e durante as análises histológicas e imunohistoquímicas, e todos os dados serão armazenados em arquivo pessoal do pesquisador, sendo descartadas todas as fontes de dados 5 anos após a conclusão da pesquisa. Os nomes dos participantes não serão divulgados.

4.5.2 Cálculo do volume tumoral pré e pós-operatório e injeção de fluoresceína

Definição do volume tumoral pré-operatório

Cálculo pelos diâmetros ortogonais (volume elipsoide): os avaliadores irão identificar os três maiores diâmetros ortogonais da lesão tumoral, desde a transição tumor/cérebro no exame de imagem na tela, com a medição pelo *software* do próprio equipamento, ou manualmente sobre os filmes de ressonância, com setas. Quando o formato da lesão ficar mais bem caracterizado por 2 elipsoides, um segundo grupo de três diâmetros ortogonais serão traçados e somados. Cada área cística ou necrótica será medida utilizando os mesmos cálculos e depois subtraídas do volume da lesão. A fórmula usada para computar os volumes será a do volume elipsoide padrão:

$$V = 4/3 \pi (a \times b \times c)$$

Onde a, b e c corresponde à metade dos diâmetros ortogonais.

Volumetria computadorizada: softwares próprios dos equipamentos de ressonância ou de neuronavegação calculam o volume total aproximado da lesão a partir do delineamento tridimensional das margens, realizada pelo cirurgião ou radiologista.

Definição do volume tumoral pós-operatório

Semelhante ao volume pré-operatório, porém subtraindo-se, do volume total, a cavidade do leito de ressecção.

4.5.3. Definição de tumores mensuráveis e não mensuráveis e localização dos tumores

Definição de tumores mensuráveis

Lesões captantes de contraste bidimensionalmente, com margens claramente definidas na ressonância, com 02 diâmetros perpendiculares com pelo menos 10 mm, visíveis em dois ou mais cortes axiais de 5-mm com *skip* de 0-mm. Cistos serão subtraídos, exceto se tiver um componente nodular com mais de 10-mm de diâmetro.

Tumores não mensuráveis

Mensurável apenas em uma dimensão, diâmetro menor que 10 mm e bordas mal definidas. Tumores predominantemente necróticos ou císticos serão considerados não

mensuráveis. O grau de necrose tumoral também será classificado em 3 diferentes classes: menos de 25%, 25-50% e mais que 50%, para avaliar a importância desse aspecto.

Localização dos tumores

Eloquente, quando ocupa o tálamo e hipotálamo, ínsula, núcleos da base, cápsula interna, área motora, áreas envolvidas na linguagem e o córtex visual; próximo à área eloquente, quando afeta o corpo caloso, ou quando nas proximidades do córtex motor ou sensitivo, do sulco calcarino ou das áreas da linguagem; e não eloquente (SANAI; BERGER, 2008). No entanto, na análise final, agrupamos as lesões em áreas eloquentes e próximas à eloquente.

Aplicação da Fluoresceína

Para o uso da fluoresceína, seguiu-se as seguintes etapas (registro na ANVISA nº 10172470003) (Anexo III):

1. Teste para anafilaxia: aplicação endovenosa de 05 ml da solução em diluição de 1%. Aplicação realizar-se-á após intubação e monitorização de sinais vitais.
2. Dose final: 15-20 mg/kg, numa diluição de 10%. Aplicação será feita após realização da craniotomia e antes da durotomia (abertura da dura mater).

4.5.4 Colheita de fragmentos no transoperatório

O primeiro fragmento, chamado de fragmento A1, nos tumores que não se expõem diretamente abaixo da aracnoide, foi retirado durante a corticectomia de acesso ao tumor, enquanto esse fragmento não colhido em caso de tumores muito superficiais. O segundo fragmento, chamado de fragmento A2, consistiu de uma amostra da capsula ou da região do início do desbridamento interno (*debulking*), de acordo com a impressão do cirurgião, usando elementos anatômicos, de imagem e o coramento pela fluoresceína. O terceiro fragmento (A3) consistiu de parte da peça cirúrgica principal, envolvendo normalmente o centro da lesão e margens, e o quarto fragmento (A4) representou a área de infiltração difusa, colhida após a retirada da massa tumoral principal, quando esta foi indicada em casos com essa suspeição. O momento da retirada de quaisquer fragmentos para a pesquisa foi combinado temporalmente com uma foto transoperatória para avaliação concomitante do coramento pela fluoresceína.

Todas as peças foram colocadas para fixação em formol 10%, sendo os recipientes marcados com o número do indivíduo na pesquisa, entre os dados rotineiramente descritos nos frascos com os diferentes fragmentos do tumor. O emblocamento foi realizado apenas após 24 horas de fixação.

4.5.5 Captura e análise de imagens

As fotografias e fotomicrografias transoperatórias, utilizando o microscópio cirúrgico (Zeiss) foram capturadas na seguinte sequencia: 1. Após abertura dural, mostrando a corticalidade, com ou sem a presença da lesão tumoral; 2. Após a identificação inicial da pseudocápsula e de sua separação da gliose; 3. No momento considerado pelo cirurgião principal como metade da ressecção realizada na área central, também chamado usualmente de *core* da lesão; 4. Ao final da ressecção da massa tumoral principal também foi colhido um fragmento da área de infiltração difusa no leito cirúrgico, independente do coramento pela fluoresceína. As imagens das cirurgias foram analisadas com uso do software IMAGEJ, de uso gratuito.

4.5.6 Imunohistoquímica para MMP-2 e MMP-9

Os cortes de gliomas parafinizados com espessura de 4 µm foram desparafinizados e reidratados. Para recuperação antigênica, as amostras foram colocadas em tampão citrato e aquecidas a 90° C num forno de micro-ondas por 15 minutos. Depois as mostras foram tratadas com peróxido de hidrogênio a 3% por 15 minutos em temperatura ambiente. Após serem lavadas com tampão salina de fosfato (PBS), a biotina endógena foi bloqueada com clara de ovo a 30% por 20 minutos em temperatura ambiente. Após lavadas, as ligações não específicas foram bloqueadas com soro de cabra ou de coelho. Essas lâminas foram então incubadas durante a noite inteira com anticorpo policlonal de coelho para MMP-9 (1:200, Abcam) em PBS a 4 ° C. Após lavadas com PBS, o anticorpo secundário IgG anti-coelho (1:400, Sigma) foi adicionado, e as lâminas incubadas por uma hora em temperatura ambiente. Após nova lavagem com PBS, foi adicionado às lâminas com os cortes, complexo peroxidase - estreptavidina pronto para uso, sendo aquelas incubadas em temperatura de 37°C por 20 minutos. A reação de imunoperoxidase foi realizada pela 3,3'-diaminobenzidina tetraidroclorídrica a 0,05% (Sigma-Aldrich) com peróxido de hidrogênio a 0,01% por 5 minutos em temperatura ambiente. Os núcleos das células foram contracorados com hematoxilina por 2 min a temperatura ambiente. Controles negativos e positivos apropriados

foram obtidos para cada série de ensaios imunoistoquímicos. As lâminas foram montadas com lamínulas e analisadas em microscópio óptico (Olympus BH-2, Japão).

4.6 Análise dos dados

Para a análise dos dados relacionados aos aspectos radiológicos gerais e fotográficos da fluoresceína, as variáveis envolvidas foram comparadas nos dois grupos (Com e Sem fluoresceína). Para as variáveis numéricas (ex: número de lesões, volume do tumor, % necrose, etc.), esta comparação foi realizada a partir da aplicação dos testes de normalidade (para entender se os dados eram paramétricos ou não paramétricos) e a partir daí testou-se a significância de possíveis diferenças nestes dois grupos pelo teste *Teste U de Mann-Whitney*, que é um teste não paramétrico. A regra de decisão se baseia no p-valor, onde assumindo o nível de 5% de significância (pois deseja-se ter 95% de certeza), se $p\text{-valor} < 0,05$ existe diferenças significativas entre os valores dos dois grupos para variável em questão.

Por outro lado, para a comparação das variáveis categóricas (ex: circunscrito, mensurável, eloquente, etc.) nos dois grupos (ou seja, verificar a homogeneidade da amostra), realizou-se cruzamentos de dados (tabelas de contingência) para estudo das frequências absolutas e percentuais, bem como a aplicação dos testes *Qui-quadrado de Independência* e *Teste Exato de Fisher*. Ambos testes verificam se o comportamento de tais variáveis qualitativas está associado ao grupo (Com ou sem fluoresceína).

Para a comparação dos dados resultantes da análise de imagens pelo ImageJ, para intensidade de contraste em cada uma das áreas, aplicou-se os testes de normalidade de *Kolmogorov-Smirnov* e teste de normalidade de *Shapiro-Wilk*, que testam a hipótese nula de que os dados são normais contra a hipótese alternativa de que não são normais. Definindo o nível de 5% de significância, se p-valor do teste de normalidade for menor que 0,05 conclui-se que os dados não são normalmente distribuídos e neste caso deve-se usar uma técnica não paramétrica para estudo comparativo, sendo neste caso o *Teste Kruskal-Wallis*. Uma alternativa ao teste ANOVA (paramétrico), este teste estuda diferenças significativas em uma variável quantitativa não normal quando se comparam mais de dois grupos e neste caso ele foi usado para testar possíveis diferenças significativas na intensidade de coramento pela fluoresceína, para os diferentes níveis de contrastes em cada uma das regiões (A2, A3 e A4). O Teste *Kruskal-Wallis* avalia a hipótese nula deste teste é que não existem diferenças significativas do % Corado entre os níveis de Contrastes ($p\text{-valor} > 0,05$), contra a hipótese alternativa de que existe diferença significativa ($p\text{-valor} < 0,05$).

Para a comparação da intensidade de fluoresceína, do volume pós-operatório e do grau de ressecção entre os grupos (Com e Sem Fluoresceína) aplicou-se também o Teste U de Mann-Whitney para testar possíveis diferenças significativas entre estes dois grupos para estas variáveis. Para as demais análises aplicou-se os mesmos testes citados, considerando o mesmo nível de 5% de significância. Para mais detalhes teóricos sobre os testes utilizados o leitor poderá consultar Bussab e Morettin (1987).

4.7 Aspectos éticos e legais

O projeto foi encaminhado ao Comitê de Ética do Hospital de Restauração e à Plataforma Brasil, e levou em consideração os princípios bioéticos internacionais de autonomia dos indivíduos, não maleficência e beneficência das práticas envolvidas e da justiça e equidade (BRASIL, 2012). Além da Carta de Anuência da direção das instituições hospitalares envolvidas, foi apresentada uma carta de compromisso dos proponentes da pesquisa e de todos os participantes do estudo (Anexo IV).

Para a proteção dos participantes da pesquisa, além de serem abordados sobre a participação no momento, local e com a quantidade de informações apropriadas, os mesmos também receberam o termo de consentimento livre e esclarecido, com informações claras e detalhadas sobre o estudo e os riscos envolvidos. Os benefícios aos participantes são diretos (melhora da técnica operatória) e difusos (maior evidência científica sobre o tratamento de gliomas). Podemos considerar os grupos a serem analisados como vulneráveis, pois são pacientes hospitalizados com diagnóstico de neoplasia encefálica. Porém tal escolha é justificada pelos objetivos do estudo, que envolve técnicas operatórias e características da biologia tumoral em pacientes específicos.

Os instrumentos para coleta de dados preenchidos, assim como as fotografias transoperatórias e os termos de consentimentos serão arquivados pelo pesquisador durante um período de 5 anos. Os exames de imagem permanecerão com os pacientes. O material biológico ressecado e levado a estudo não difere por conta da participação na pesquisa.

O presente estudo envolveu elementos de intervenção no tratamento. Os pacientes ou familiares puderam recusar a participação no estudo desde o momento inicial, na entrevista, mas também em qualquer fase do acompanhamento. O estudo poderia ser encerrado e o fato será comunicado ao Comitê de Ética em Pesquisa caso uma das alternativas de tratamento apresentasse clara superioridade sobre a outra.

Os resultados do estudo, corroborando ou não para a hipótese original, serão publicadas e devidamente informados para as autoridades de saúde do estado de Pernambuco, assim com

ajudarão na melhoria do protocolo de tratamento de gliomas encefálicos nas instituições envolvidas na pesquisa.

5 RESULTADOS

Neste item, os resultados da pesquisa estão abordados em tópicos de acordo com cada um dos objetivos lançados.

5.1 Distribuição dos casos e histologia das lesões operadas

A quantidade total de pessoas inscritas foi de 78 pessoas, mas, ao final, o protocolo de pesquisa foi atingido, total ou parcialmente, em 31 pacientes, e os mesmos foram mantidos para análise dos dados, independente do resultado dos histopatológicos. Desta forma, lesões de natureza outra que não astrocíticas malignas, como, por exemplo, os 2 casos de metástases, 2 casos de maligno inconclusivo (MI), 1 caso de astrocitoma benigno (pilocítico), permaneceram nas análises aqui descritas, junto com os 22 casos de astrocitomas de baixo e alto grau (22 pessoas pelos laudos externos e 21 nas avaliações histológicas do nosso estudo). Em 2 casos não tivemos o histopatológico externo, mas houve avaliação da nossa patologista (astrocitoma de baixo grau e ausência de neoplasia). Tivemos 1 caso sem lâminas próprias da pesquisa. 28 pessoas foram excluídas por razões como: morte pré-operatória, alta para cuidados paliativos e decisão por biopsia e alta hospitalar. Nos casos restantes (19 casos), as cirurgias foram realizadas sem a aplicação do protocolo de pesquisa.

Tabela 1: Diagnóstico histopatológico final por paciente, comparando os resultados dos serviços oficiais dos hospitais com os achados da pesquisa.

Número na pesquisa	Histopatológico hospitalar	Histopatológico da pesquisa
N 01	Metástase	Metástase
N 04	Maligno inconclusivo	Grau IV
N 11	Grau II	Gliose
N 15	Ausência de neoplasia	Grau II
N 27	Grau IV	Grau IV
N 42	Grau IV	Grau IV
N 52		Grau II
N 53	Grau IV	Grau IV
N 54	Grau IV	Maligno inconclusivo
N 55		Hemorragia
N 58	Grau IV	Grau IV
N 62	Grau IV	Ausência de neoplasia
N 70	Grau IV	Grau IV
N 76	Grau I	Grau IV
N 77	Grau IV	Grau IV
N 78	Grau IV	Grau IV
N 06	Grau IV	Grau III
N 05	Grau IV	Grau III
N 10	Benigno inconclusivo	Ausência de neoplasia
N 22	Grau IV	Grau IV
N 26	Grau IV	Maligno inconclusivo
N 28	Grau IV	Grau IV
N 33	Ausência de neoplasia	Grau II
N 38	Grau IV	Grau IV
N 48	Grau II	Grau III
N 49	Grau IV	Grau IV
N 66	Grau III	Grau IV
N 72	Maligno inconclusivo	Metástase
N 74	Grau IV	Grau IV

N 75	Grau IV	Gliose
N 78	Grau IV	

Tabela 2: Todos os pacientes, agrupados pela histologia: no laudo da pesquisa considerou-se a amostra de grau maior de malignidade entre os fragmentos recolhidos.

	Laudo histopatológico externo	Laudo histopatológico da pesquisa
Astrocitoma grau IV	19	15
Astrocitoma grau III	1	3
Astrocitoma grau II	2	3
Astrocitoma grau I	1	0
Metástase	1	2
Ausência de neoplasia/gliose	2	5
Benigno inconclusivo	1	0
Maligno inconclusivo	2	2
Angioma cavernoso	1	0
Não acessível ao estudo	2	2

Ao final, 18 pacientes receberam tratamento com fluoresceína e 13 pacientes tiveram cirurgias sem fluoresceína, representando respectivamente 58,1% e 41,9% da amostra em questão.

Tabela 3 – Distribuição dos pacientes por tipo de tratamento recebido.

	N	%
Com Fluoresceína	18	58,1%
Sem Fluoresceína	13	41,9%
Total	31	100

A maioria dos pacientes (83,9%), nos dois grupos, tiveram uma lesão encefálica (12,9% tiveram duas lesões e apenas 3,2% apresentou três lesões), e os grupos caso e controle foram homogêneos quanto ao número de lesões (média de 1,17 lesões no grupo caso contra 1,23 lesões no grupo controle), quanto à média dos volumes das lesões (43,65 x 44,31 cm³, respectivamente), quanto ao percentual de necrose das lesões (média de 62,6% de necrose no grupo caso e 57,7% no grupo controle), quanto à localização em área eloquente/próximo de

eloquente em relação aos tumores em áreas não eloquentes (com 14 e 11 lesões em áreas eloquentes, respectivamente) e os pacientes dos grupos também foram homogêneos quanto a média de performance na escala de Karnofsky (média de 89,2 no grupo caso e 81,8 no grupo controle) e quanto à presença de tumores não mensuráveis (tendo aparecido apenas uma lesão não mensurável em cada grupo) e não circunscritos (3 casos no grupo com fluoresceína e 4 casos no grupo controle), sendo, em todos os casos, as diferenças consideradas não significativas entre os grupos de pessoas que receberam a fluoresceína transoperatória e o grupo que não recebeu, para todos os parâmetros citados acima.

5.1.1 Laudos histopatológicos externos

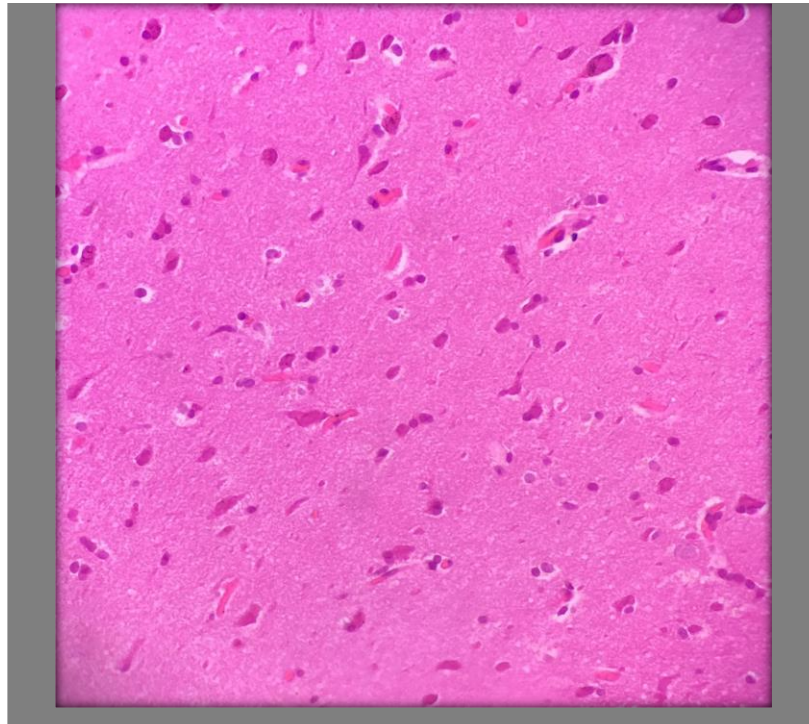
Correspondem a histologia das lesões pelos laudos histopatológicos dos serviços hospitalares ou privados, e têm distribuição exposta nas tabelas 1 e 2.

5.1.2 Laudos histopatológicos da pesquisa

Foram dados fragmento por fragmento de diferentes etapas da ressecção de cada tumor. Logo, pedaços de tumor e área fora do tumor do mesmo paciente receberam diagnósticos e gradações histológicas independentes. Apesar de o resultado do histopatológico da nossa profissional ser dividido por fragmentos de vários locais da ressecção, demos também um resultado final do nosso histopatológico para cada paciente, como a lesão de grau mais alto de malignidade entre os vários colhidos (tabela 1).

Fragmentos A1: Conseguimos fragmentos A1 (do córtex ou substância branca considerada normal ou de passagem pelo cirurgião) em 16 pacientes. A distribuição dos laudos histopatológicos nos fragmentos A1, realizados pela patologista do estudo, foi de 3 lesões astrocíticas de grau III e de gliose ou tecido normal nas lâminas restantes. A maioria das lâminas A1 alteradas eram de pessoas com astrocitomas grau IV, incluindo as 3 lâminas com lesões grau III, mostrando a distância das alterações citológicas causadas pelo glioblastoma.

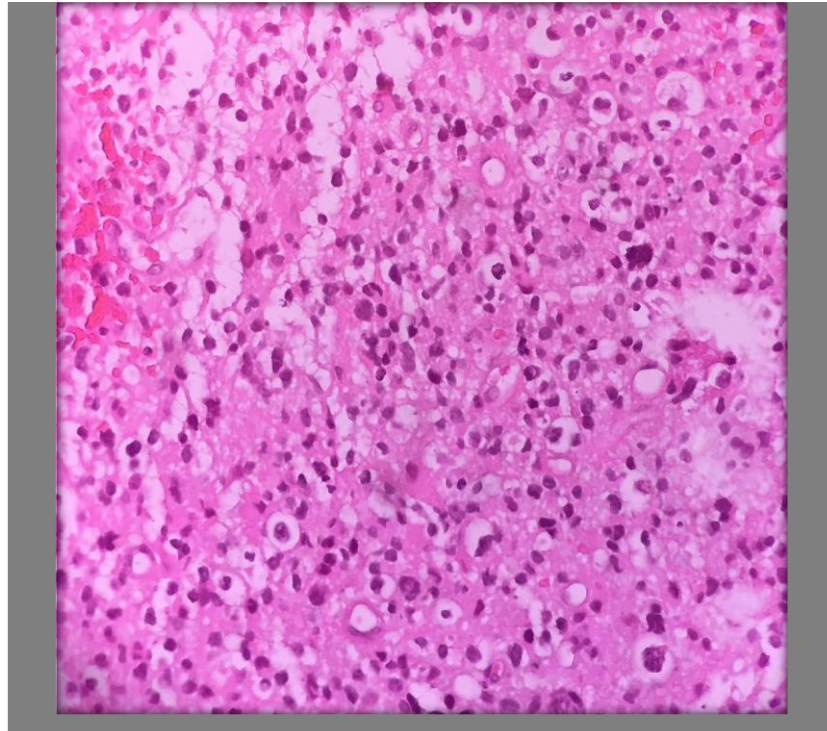
Figura 1: lâmina representativa de um tecido cerebral normal, corado com HE. Notamos poucos neurônios e astrócitos, sem figuras de mitose ou área de neoangiogênese ou necrose.



Fragmentos A2: Extraímos 28 fragmentos considerados pseudocápsula do tumor (A2). Os fragmentos A2 mostraram lesões de grau IV em 9 casos, tecido normal em 5 casos, 4 lâminas com lesões grau III, 3 com lesões de grau II e 3 casos de hemorragia, 2 metástases e 2 malignidades inconclusivas. Houve uma tendência de associação significativa entre os laudos hospitalares e os da pesquisa já na região da pseudocápsula (p -valor = 0,06), destacando-se que nos 18 casos de grau IV pelos histopatológicos das famílias, encontramos, nas lâminas da margem da lesão (A2), 6 tumores com características de graus IV, 3 graus 3, 2 malignos inconclusivos, uma lesão grau II e 5 lâminas vieram com tecido normal ou gliose.

Fragmentos A3: 27 fragmentos do centro do tumor (área A3) foram processados no nosso estudo. A histologia dos fragmentos A3 foi de 14 casos de tumor astrocítico de grau IV, 4 casos de tecido normal, 2 casos grau III e 1 de grau II, 2 MI, 2 metástases e 3 hemorragias (tabela 4). Quando procuramos a concordância entre os laudos hospitalares e a histologia do fragmento central do tumor na pesquisa (fragmento A3), notamos uma concordância importante, com p -valor igual a 0,004, onde ressaltamos 12 casos de concordância em glioma grau IV. Em dois casos de laudo oficial grau IV, nosso laudo foi de malignidade inconclusiva e 1 de hemorragia e outro de grau III, nesta região.

Figura 2: fragmento corado com hematoxilina e eosina de um paciente com astrocitoma grau IV. Notar o aumento da celularidade, as figuras de mitose, a proliferação vascular e as áreas de necrose em pseudopaliçada



Fragmentos A4: Os cirurgiões envolvidos consideraram apropriado retirar fragmentos da área infiltrativa difusa, após a retirada do tumor, em 21 pacientes. A histologia dos fragmentos A4 foi de 8 pessoas com grau IV, 5 pessoas com grau III, 1 lesão de grau II, uma maligna inconclusiva, 3 apresentavam hematoma e 3 fragmentos tinham cérebro normal. O mais importante é notar que, nas pessoas com laudo oficial grau IV, 6 fragmentos dessa área, considerada infiltrativa difusa e fora do tumor, apresentavam acometimento por tumor de grau IV, enquanto 5 laminas dos pacientes com glioblastoma deram tumor de grau III nessa região.

Tabela 4 – Distribuição da histologia por áreas de retirada dos fragmentos durante a cirurgia.

	Fragmentos A1	Fragmentos A2	Fragmentos A3	Fragmentos A4
Grau IV/Hemorragia	0	08/03 (11)	14/3 (17)	08/03 (11)
Grau III	03	04	2	05
Grau II	0	03	1	01
Grau I + gliose	04	01	02	0
Metástase	0	02	02	0
Maligno inconclusivo	0	02	02	01
Normal	09	05	01	03
Total	16	28	27	21

Outros aspectos importantes nos nossos resultados histopatológicos é que:

1. Fragmentos de áreas consideradas normais (n=16), como o córtex ou substância branca gliótica, podem estar francamente acometidas por tumor (13 pacientes tiveram tecido normal ou gliose enquanto 3 apresentaram lesões de grau III de malignidade);
2. Fragmentos de áreas diferentes de ressecção da lesão, em um mesmo paciente, podem mostrar lesões astrocíticas em diferentes graus de malignidade (pacientes 4, 28, 42, 49, 53, 66, 74 e 77), incluindo um caso onde encontramos tumor de grau II e grau IV (caso 49). Quando comparamos os laudos oficiais dos pacientes de glioma grau IV com os histopatológicos dos fragmentos A4 destes mesmos pacientes, notamos que 5 apresentaram glioma grau III e 6 apresentavam grau IV;
3. Os fragmentos retirados após o fim da ressecção cirúrgica (fragmentos A4) estavam frequentemente acometidas por tumor de alta ou baixa malignidade (ver acima);
4. Uma quantidade grande de fragmentos retirados como sendo de massa tumoral consistiam apenas em hemorragia (9 fragmentos).

5.2 Grupos caso e controle quanto aos graus de ressecção e morbimortalidade

Todos os pacientes tiveram os parâmetros radiológicos pré-operatórios medidos na ressonância magnética, enquanto que para a avaliação radiológica do pós-operatório tivemos acesso a apenas 5 RM de controle. Os outros 17 pacientes com radiologia pós-operatória foram avaliados pela tomografia do crânio com contraste.

Os graus de ressecção dos tumores não foram significativamente diferentes entre os grupos que receberam ou não a fluoresceína transoperatória (média de 70,71% no grupo caso e de 70,00% no grupo controle).

No grupo caso, considerando as pessoas com tumores em áreas eloquentes (n 14), encontramos no pré-operatório 46 sintomas e sinais neurológicos nos pacientes, incluindo 4 casos confirmados de hemiparesia (pelo exame físico, e outras 6 pessoas apresentaram este sintoma antes da corticoterapia apenas) e dois de redução visual. Porém, no período pós-operatório, os sinais e sintomas alterados reduziram para 8, com recuperação do déficit de força em um paciente. Ainda entre as pessoas que usaram a fluoresceína transoperatória, mas que tinham tumores em áreas não eloquentes (n=4), este corante manteve sua utilidade ao evitar déficits permanentes, sendo que este grupo passa de 8 sinais e sintomas para nenhum no período pós-operatório (com uma morte após uma semana).

Já no grupo controle, considerando as pessoas com tumores em áreas eloquentes (n=11), apareceram 47 sintomas, incluindo 05 casos de hemiparesia flagrados no exame físico dos pacientes. No período pós-operatório, esse subgrupo mostrava 13 alterações neurológicas, com nenhuma recuperação de hemiparesia, porém aconteceram 3 mortes precoces no pós-operatório. Houve recuperação da afasia notada em dois dos 3 pacientes com este sintoma. Ainda no grupo controle, as pessoas que não receberam a fluoresceína e que tinha tumores em áreas não eloquentes, a ocorrência pré-operatória de sinais e sintomas neurológicos foi de 5, com recuperação completa das queixas no pós-operatório imediato, nesse pequeno subgrupo de duas pessoas.

Os sintomas mais comuns nos dois grupos foram cefaleia (18 casos), hemiparesia (15 casos, incluindo sintomas e sinais), sintomas e sinais de HIC (12 casos), epilepsia (12 casos) e afasia (5 casos), e a distribuição dos mesmos nos grupos caso e controle foram significativamente aleatória. Outros sintomas e sinais considerados importantes foram disartria, déficit visual, tonturas, vômitos sem HIC, confusão, hipoestesia e Glasgow menor que 13, mas todos com menor ocorrência. Apenas uma pessoa no grupo caso estava assintomático e uma do grupo controle tinha tetraplegia (houve um caso de hemiplegia).

O sintomas e sinais de HIC foram distribuídos desigualmente: estavam mais presentes no pré-operatório no grupo que usou fluoresceína (10 contra 2 pessoas do grupo controle). Considerando apenas o exame físico, é importante notar que 4 indivíduos de cada grupo estavam com o exame neurológico normal, contribuindo para a distribuição equitativa da gravidade dos casos.

O grupo que recebeu fluoresceína teve um número (não significativo) mais elevado de pós-operatórios com exame físico “normal”: 9 casos, em relação aos 3 do grupo controle.

5.3 Correlação grau de malignidade x imunohistoquímica para MMP-2 e MMP-9

A imunohistoquímica para MMP-2 e MMP-9 foi realizada apenas em uma parte da amostra total incluída nos resultados.

MMP-2 - A1: na região creditada como não afetada pelo tumor, houve positividade na imunohistoquímica para metaloproteinase de matriz 2: nas amostras com tumores grau III houve reação forte em uma lâmina e fraca em outra (n=2). Nas áreas de gliose ou tecido normal houve positividade fraca em 4 e moderada em 1. Dois fragmentos de tecido normal não coraram para MMP-2.

Tabela 5: positividade para MMP-2 na região de tecido normal. Lembrar que o tecido normal ou gliótico que aí corou estava próximo a região tumoral.

		A1_MMP2				Total
		Forte	Fraco	Moderado	Não corou	
A1	Grau III	1	1	0	0	2
	Normal/Gliose	0	4	1	2	7
Total		1	5	1	2	9
	%	11,10%	55,60%	11,10%	22,20%	100,00%

Na região correspondente à pseudocápsula (A2), houve positividade para MMP-2 em muitos fragmentos: 6 tiveram positivities fortes, 4 moderadas, 5 fracas e apenas duas amostras não coraram para o anticorpo dessa proteína. O coramento forte concentrou-se nos astrocitomas malignos (3 no grau III, 2 no grau IV e 1 no grau I) em relação aos outros fragmentos. Houve positividade moderada para MMP-2 nos astrocitomas malignos, numa amostra maligna inconclusiva (grau IV no laudo da família) e numa amostra de metástase de adenocarcinoma. Diferenças não são significativas.

Tabela 6: intensidade da reação de imunohistoquímica para MMP-2 na região de pseudocápsula. Apenas áreas de tecido normal ou gliose não reagiram. Áreas de astrocitoma maligno de alto ou baixo grau tiveram reações muitas vezes forte ou moderada.

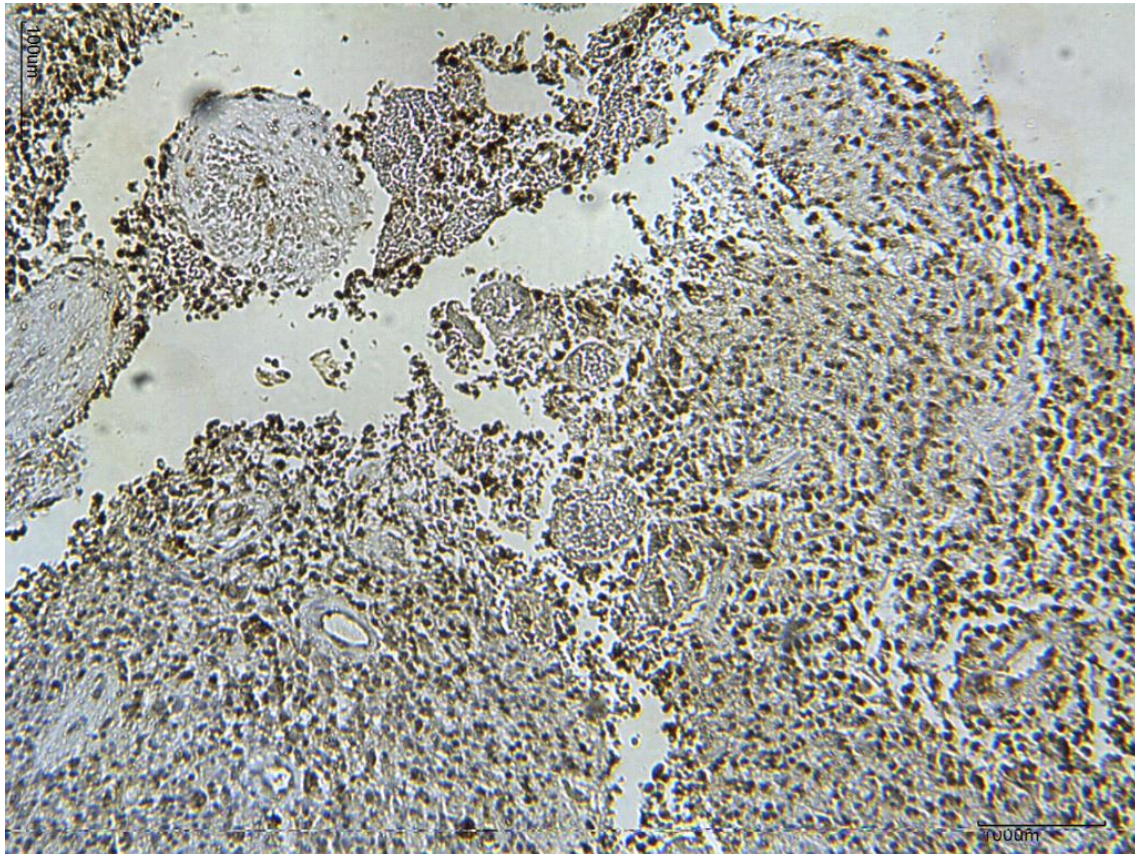
		A2_MMP2				Total	
		Forte	Fraco	Moderado	Não corou		
A2	Grau II	1	2	0	0	3	
	Grau III	3	0	1	0	4	
	Grau IV	2	1	1	0	4	
	Hemorragia	0	1	0	0	1	
	Maligno inconclusivo	0	0	1	0	1	
	Metástase	0	0	1	0	1	
	Normal/Gliose	0	1	0	2	3	
Total		6	5	4	2	17	
		%	35,30%	29,40%	23,50%	11,80%	100,00%

Na região correspondente ao centro da lesão (A3), houve um predomínio da positividade forte (8 lâminas). Também ocorreram 4 casos de positividade moderada e 2 de fraco. Duas amostras não reagiram para MMP-2.

Tabela 7: positividade para MMP-2 nas amostras do centro do tumor/peça principal (A3). As diferenças não foram significativas.

		A3_MMP2				Total	
		Forte	Fraco	Moderado	Não corou		
A3	Grau II	0	0	0	1	1	
	Grau III	0	0	1	0	1	
	Grau IV	5	1	2	0	8	
	Hemorragia	0	1	1	0	2	
	Maligno inconclusivo	1	0	0	0	1	
	Metástase	2	0	0	0	2	
	Normal/Gliose	0	0	0	1	1	
Total		8	2	4	2	16	
		%	50,00%	12,50%	25,00%	12,50%	100,00%

Figura 3: Exemplo de uma lâmina contra corada com eosina e realizada imunohistoquímica para MMP-2: há uma positividade forte (marrom), especialmente nos núcleos das células neoplásicas (astrocitoma grau IV), para esta proteína, não especificando se em sua forma ativa ou inativa. Há também intensa positividade nos neutrófilos e regiões perivasculares. Quando obtivemos coramento apenas dos neutrófilos, chamamos, neste estudo, de intensidade “fraca”.



Nas amostras da região A4, todos os fragmentos foram positivos para MMP-2: 6 com positividade forte, coincidindo com áreas de lesões astrocíticas de alto grau, em relação às áreas de gliose e hematoma (uma amostra com tumor grau II também não corou). A positividade fraca distribuiu-se entre os vários tipos de diagnóstico histológico desta região, com destaque para as duas amostras de tecido gliótico coletadas após a retirada do tumor.

MMP-9: Em A1, houve positividade para MMP-9 moderada (1 amostra) e fraca (4 amostras). 4 lâminas foram negativas. Na região A2, a positividade para MMP-9 foi um pouco maior, em 14 casos: um caso forte, 6 moderados e 7 fracos. As lâminas com positividade mais intensa distribuíram-se entre os astrocitomas de alto grau. A positividade fraca aconteceu também para dois casos de baixo grau (II) e na metástase e na gliose.

Tabela 8: positividade da imunohistoquímica para MMP-9 na área da pseudocápsula dos tumores.

		A2_MMP9				Total	
		Forte	Fraco	Moderado	Não corou		
A2	Grau II	0	2	0	1	3	
	Grau III	1	1	2	0	4	
	Grau IV	0	0	3	1	4	
	Hemorragia	0	1	0	0	1	
	Maligno inconclusivo	0	1	0	0	1	
	Metástase	0	1	0	0	1	
	Normal/Gliose	0	1	1	1	3	
Total		1	7	6	3	17	
		%	5,90%	41,20%	35,30%	17,60%	100,00%

Na área A3 dos tumores, houve poucas lâminas com coramento para MMP-9: 5 coraram moderadamente, com concentração nos astrocitomas grau IV, 5 fracamente, enquanto a metástase corou fortemente para MMP-9 em sua região central. Tais diferenças não foram significativas.

Tabela 9: distribuição da positividade da imunohistoquímica para MMP-9 nas áreas centrais dos tumores.

		A3_MMP9				Total	
		Forte	Fraco	Moderado	Não corou		
A3	Grau II	0	0	0	1	1	
	Grau III	0	1	0	0	1	
	Grau IV	0	1	4	3	8	
	Hemorragia	0	2	0	0	2	
	Maligno inconclusivo	0	1	0	0	1	
	Metástase	1	0	1	0	2	
	Normal/Gliose	0	0	0	1	1	
Total		1	5	5	5	16	
		%	6,20%	31,20%	31,20%	31,20%	100,00%

Já a positividade para a MMP-9 na área biopsiada após a retirada do tumor (A4) mostrou-se forte em 3 casos, moderada em 2 e fraca em 5. Apenas duas lâminas não coraram (área com tumor de alta malignidade).

Tabela 10: distribuição da positividade da imunohistoquímica para MMP-9 nas áreas em volta do tumor operado.

		A4_MMP9				Total
		Forte	Fraco	Moderado	Não corou	
A4	Grau II	0	1	0	0	1
	Grau III	1	1	0	1	3
	Grau IV	2	0	2	1	5
	Hematoma	0	1	0	0	1
	Normal/Gliose	0	2	0	0	2
Total		3	5	2	2	12
		%	25,00%	41,70%	16,70%	100,00%

5.4 Realce pelo contraste da ressonância e Coramento pela fluoresceína

Gadolínio: houve diferença significativa entre as intensidades de captação do gadolínio nas áreas tumorais A2, A3 e A4, com a área da pseudocápsula (A2) realçando mais intensamente (22 casos com coramento forte, 8 fracos 1 caso não corou), enquanto que apenas uma parte das lesões coravam o interior (7 fortes e 11 fracos. 13 não realçaram o gadolínio nesta região) e em pouquíssimos casos houve realce do contraste na área fora do tumor, considerada infiltrativa (não realçou o gadolínio em 29 casos e realçou fraco em 2 casos, com nenhum forte). O p-valor foi de 0,000.

Tabela 11: Comparação entre as intensidades de realce pelo gadolínio nas diferentes áreas de coletas de fragmentos dos tumores para a pesquisa.

	Ressonância			p-valor
	A2	A3	A4	
Não	1	13	29	0,000
Fraco	8	11	2	
Forte	22	7	0	

Houve uma distribuição semelhante das intensidades de realce pelo contraste das ressonâncias nas diferentes áreas colhidas, nos grupos caso e controle, ressaltando a homogeneidade dos grupos.

Fluoresceína – avaliação visual: já a intensidade do coramento pela fluoresceína transoperatória variou bastante, desde as áreas A1 até as A4. Nos pacientes do grupo caso, em A1, o verde foi notado forte em 4 pacientes, fraco em 1 e não corado em 7. No grupo controle, na mesma região A1, 11 pessoas não coraram em verde (p-valor 0,158).

Em A2, a fluoresceína corou, no grupo que recebeu este corante, forte em 5 casos e fraco em 5, não tendo corado a capsula de apenas um tumor. A diferença foi significativa no grupo controle, na região A2, pois todas as áreas de pseudocápsula não coraram pela fluoresceína (p-valor 0,001). Esta diferença significativa se dá comparando tanto a quantidades de pessoas com coramento forte (5 x 0), quanto o fraco (5 x 0), quanto para as pessoas que não coraram (2 x 11 no grupo controle).

Em A3, também houve diferença significativa entre o grupo caso e o controle, quanto ao coramento visualmente aferido pela fluoresceína, já que esta foi notada forte em 9 casos, fraca em 1 e não notada em 2 casos do grupo caso, comparando com o grupo controle (p-valor 0,005). As diferenças permanecem significativas quando comparamos individualmente a quantidade de pessoas que coraram forte (9 no grupo caso x 1 no controle) e as que não coraram (2 x 8), na região A3.

Já na área infiltrativa difusa (A4), houve, no grupo dos que receberam a fluoresceína, apenas 2 casos de coramento forte, 1 coramento fraco pela fluoresceína e 7 que não ficaram verde, amarelo ou laranja. Tais resultados não geraram uma diferença significativa com o grupo controle, apesar de não ter havido coramento da área infiltrativa nesse subgrupo.

Tabela 12: Comparação entre as intensidades de coramento pela fluoresceína nas diferentes áreas de retirada do tumor, no grupo caso. A quantidade de pacientes que tiveram a parte externa do tumor corada pela fluoresceína fortemente foi de 5 pacientes e fracamente em 5. Já a área central do tumor corou forte em 9 pacientes. Já na área em volta do tumor, houve 2 coramentos fortes pela fluoresceína (A4). Estes pacientes tiveram também tumores residuais nos fragmentos A4.

	Fluoresceína visual			p-valor
	A2	A3	A4	
Não	2	2	7	0,01394
Fraco	5	1	1	
Forte	5	9	2	

Fluoresceína – avaliação pelo ImageJ: Quando analisamos a intensidade de verde medida pelo aplicativo ImageJ, notamos que:

1. Nas áreas A1, as fotografias transoperatórias de 4 pacientes mostravam um coramento forte pela fluoresceína, com média de 9% a mais de intensidade do verde nestes 4, porém quando contamos todas as fotografias de A1 nos pacientes do grupo de estudo, a média é de 5% a mais de verde, pois a maioria dos pacientes que receberam a fluoresceína não tiveram o córtex corado (ver tabela abaixo).

2. Em A2, temos uma média de intensidade 39% maior na área alvo corada em relação ao córtex normal circunjacente (razão de 1,39). Quando comparamos a intensidade do realce na ressonância com a intensidade da fluoresceína medida pelo ImageJ, notamos que, nos tumores que realçaram forte na ressonância, a média foi 47% mais alta de intensidade do verde, em relação ao córtex circunjacente.
3. Na região A3 (centro do tumor ou peça principal), tivemos a maior média de coramento: 64% a mais do que no tecido normal. A razão mediana foi de 1,47.
4. Já na região A4, a média de elevação do coramento foi insignificante, 1,02, considerando o grupo que recebeu a fluoresceína (apenas três pessoas coraram nessa região do tumor).

Tabela 13: Media das razões da intensidade do verde na área do tumor, nas diferentes profundidades de ressecção, comparadas ao córtex circunjacente.

	%corado A1	%corado A2	%corado A3	%corado A4
N	12,00	12,00	12,00	10,00
Média	1,05	1,39	1,64	1,02
SD	0,09	0,52	0,98	0,37
Mediana	1,05	1,30	1,47	1,08

Figura 4: Fotografia transoperatória mostrando o córtex de um paciente com tumor que superficializava-se no córtex da região posterior do encéfalo, e em que notamos o coramento pela fluoresceína em alguns pontos, após a abertura da dura mater. Neste caso, foi, visualmente, considerado que a fluoresceína estava forte na região A1, e a intensidade no ImageJ foi de 1,22, neste caso particular (22% mais elevada que nas áreas onde o córtex está branco)

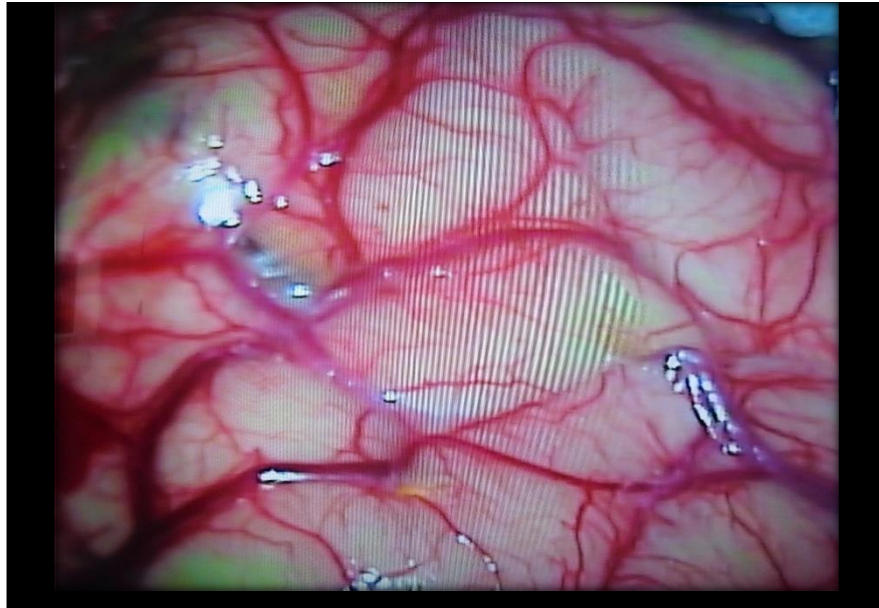


Figura 5: Foto da imagem do microscópio cirúrgico durante a dissecação da pseudocápsula. Podemos notar a capsula verde clara e um conteúdo líquido, logo abaixo, verde forte. Consideramos visualmente como forte, e a medição computacional do verde em A2, neste paciente, foi 175% maior do que no córtex em volta (razão 2,75). Observar a seta preta apontando para a linha azul que liga o ponto inicial, verde com mais alta luminosidade do tumor, com o segundo ponto de intensidade de luz semelhante, no córtex.



Figura 6: Em relação a A3, houve uma média de incremento de 64% na intensidade de verde medido pelo ImageJ, em comparação com o córtex em volta da lesão.

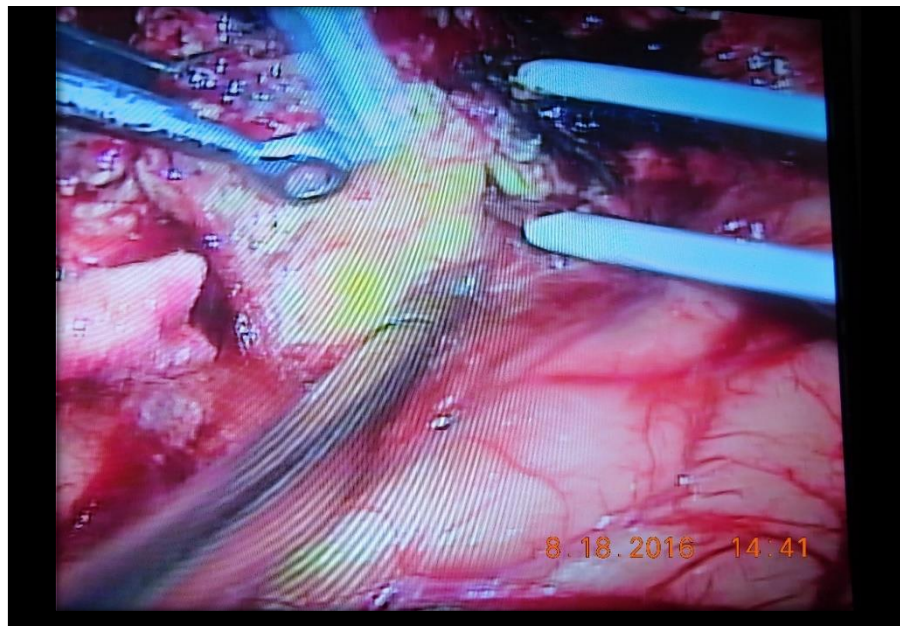
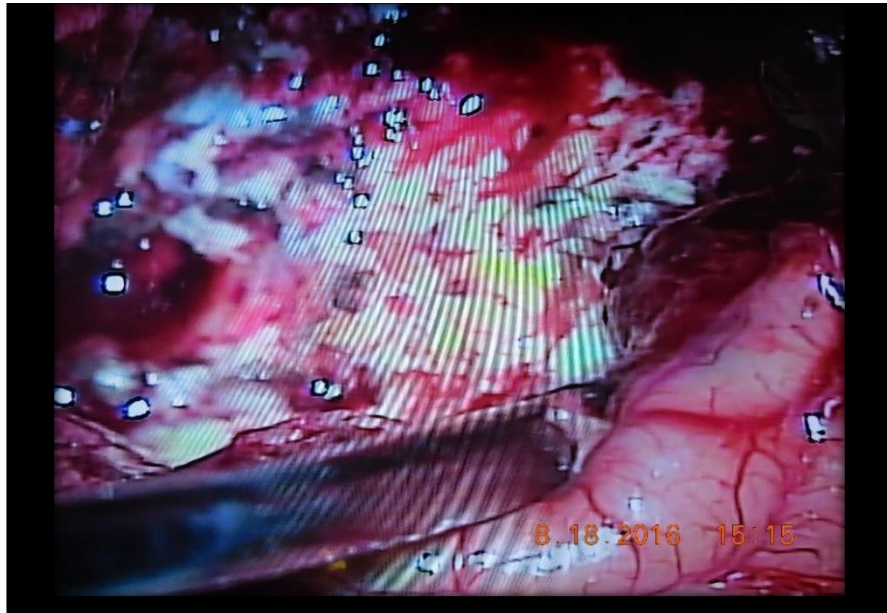


Figura 7: Após a retirada da massa tumoral, um pouco da região continuou corando timidamente. A fração de verde em relação ao córtex em volta, nesse ponto verde, foi de 40% a mais.



Gadolínio versus fluoresceína: Considerando a área da pseudocápsula (A2) houve diferença entre o gadolínio e a fluoresceína em A2, com o gadolínio tendendo a corar mais homoganeamente e fortemente a capsula. Nessa região houve 12 realces fortes pelo gadolínio

Já na área A3, aconteceu o inverso: a fluoresceína cora melhor a região central do tumor.

Já a região infiltrativa difusa (A4) quase nunca realça na ressonância (16 não realçaram e um fraco), enquanto que a fluoresceína transoperatória corou forte a área em volta do tumor em dois casos.

Tabela 14: comparação do realce das lesões na ressonância pré-operatórias em comparação com o grau de coramento pela fluoresceína, nas diferentes camadas de ressecção. Não houve diferença significativa, já que as intensidades, por região do tumor, são semelhantes.

	Gadolínio A2	Fluoresceína A2				p-valor
		n	Média	SD	Mediana	
Grupo Com Fluoresceína	Fraco	3	1,13	0,28	1,26	0,309
	Forte	9	1,47	0,57	1,37	
	Total	12	1,39	0,52	1,29	
	Gadolínio A3	Fluoresceína A3				p-valor
		n	Média	SD	Mediana	
Grupo Com Fluoresceína	Não	6	1,83	1,09	1,96	0,774
	Fraco	2	1,84	0,87	1,84	
	Forte	4	1,24	0,99	1,16	
	Total	12	1,64	0,98	1,47	
	Gadolínio A4	Fluoresceína A4				p-valor
		n	Média	SD	Mediana	
Grupo Com Fluoresceína	Não	9	1,00	0,38	1,05	0,699
	Fraco	1	1,21	.	1,21	
	Total	10	1,02	0,36	1,08	

As médias de intensidade do verde medidas pelo ImageJ foram significativamente diferentes nos grupos caso e controle nas áreas A2, e houve uma tendência a uma diferença nas áreas A3:

Tabela 15: Comparação entre as intensidades de fluoresceína pelo ImageJ nas diferentes profundidades de retirada do tumor.

	Grupo						p-valor
	Com fluoresceína			Sem fluoresceína			
	Média	SD	Mediana	Média	SD	Mediana	
ImageJ A1	1,05	0,09	1,04	1,01	0,11	1,01	0,478
ImageJ A2	1,39	0,55	1,29	0,87	0,17	0,82	0,001
ImageJ A3	1,64	0,99	1,47	0,94	0,34	0,86	0,082
ImageJ A4	1,02	0,39	1,08	1,08	0,15	1,04	0,887

Quando comparamos o realce pelo gadolínio com o coramento pela fluoresceína nos diferentes extratos de retirada do tumor (A2 até A4) e sua histologia (e considerando que haveria uma correspondência entre a área identificado como capsula, por exemplo, na ressonância, e o momento A2 da cirurgia), não notamos diferença significativa, mas há uma heterogeneidade importante de comportamento desses contrastes, de acordo com a histologia daquela região:

A2: nas áreas de cápsula, o gadolínio tende a corar forte os vários tipos de lesão e áreas de gliose, enquanto a fluoresceína parece ter uma predileção para astrocitomas grau IV.

Tabela 16: Distribuição das intensidades de coramento do gadolínio e da fluoresceína nas áreas A2, por tipo histológico.

		ContrasteA2			Total	A2 Fluoresceína			Total
		Não	Fraco	Forte		Forte	Fraco	Não	
A2	Grau II	0	1	2	3	0	1	1	2
	Grau III	1	1	2	4	0	0	3	3
	Grau IV	0	0	9	9	3	1	2	6
	Hemorragia	0	1	1	2	0	1	0	1
	Maligno inconclusivo	0	2	0	2	0	0	1	1
	Metástase	0	0	2	2	1	0	1	2
	Normal/Gliose	0	2	3	5	1	2	2	5
Total		1	7	19	27	5	5	10	20
p-valor		0,152				0,478			

Nas áreas A3 ou *core*, o gadolínio tende a não corar ou corar fraco. 4 casos de grau IV com 2 de maligno inconclusivo, que também eram tumores grau IV, assim como a metástase não estavam realçadas na ressonância. Por outro lado, houve 5 realces forte e 4 fracos na área central de GBM. Ainda na área A3, a fluoresceína corou verde forte o centro de 8 lesões, incluindo 5 GBM, uma metástase e um grau II.

Tabela 17: Distribuição das intensidades de coramento do gadolínio e da fluoresceína nas áreas A3, por tipo histológico.

		ContrasteA3			Total	A3 Fluoresceína			Total
		Não	Fraco	Forte		Forte	Fraco	Não	
A3	Grau II	1	0	0	1	1	0	0	1
	Grau III	0	2	0	2	0	0	1	1
	Grau IV	4	5	4	13	5	1	4	10
	Hemorragia	2	0	1	3	1	0	0	1
	Maligno inconclusivo	2	0	0	2	0	0	1	1
	Metástase	1	0	1	2	1	0	0	1
	Normal/Gliose	0	2	1	3	0	0	1	1
Total		10	9	7	26	8	1	7	16
p-valor		0,310				0,850			

A4: Os dois coramentos das áreas periféricas ao tumor (A4) pelo gadolínio deram-se em lesão graus II e IV, enquanto que a fluoresceína, nos dois casos que corou fora do tumor, o fez em um tumor grau III e numa área biopsiada com gliose (sem diferença significativa).

Tabela 18: Distribuição das intensidades de coramento do gadolínio e da fluoresceína nas áreas A4, por tipo histológico.

		ContrasteA4		Total	A4 Fluoresceína			Total
		Não	Fraco		Forte	Fraco	Não	
A4	Grau II	1	0	1	0	0	1	1
	Grau III	4	1	5	0	1	3	4
	Grau IV	7	1	8	0	0	3	3
	Hematoma	1	0	1	0	0	1	1
	Hemorragia	1	0	1	0	0	0	0
	Maligno inconclusivo	1	0	1	0	0	0	0
	Normal/Gliose	4	0	4	1	0	3	4
Total		19	2	21	1	1	11	13
p-valor		0,955			0,786			

6 DISCUSSÃO

Com intuito de facilitar a compreensão do leitor, a discussão foi abordada em tópicos de acordo com os resultados.

6.1 Distribuição dos casos e histologia das lesões operadas

A execução do protocolo de pesquisa em suas várias pontas, desde a enfermaria, sala operatória e laboratórios de histologia e imunohistoquímica, deve atingir uma regularidade e metodismo, envolvendo os diversos pesquisadores, para melhorar os resultados. Estes são os desafios de um ensaio clínico com randomização, cegamento e intervenção sobre o tratamento cirúrgico. O número de participantes foi superior a grande parte dos estudos semelhantes (10 pacientes no estudo de Miwa, 14 no estudo de Zhou), porém a quantidade de perdas, tanto pelas dificuldades da equipe, quanto pela grande taxa de conversão de pessoas inicialmente candidatas a cirurgia e que deixam de sê-lo para tratamento paliativo, foi grande e teve impacto na qualidade dos resultados. Uma parte dos pacientes entrou para cirurgia em caráter de urgência, sofrendo herniação cerebral devido ao volume tumoral e edema cerebral, comprometendo tanto os parâmetros de ressecabilidade, quanto a avaliação da morbidade e mortalidade.

No principal hospital público do estado, um protocolo para atendimento, tratamento neurocirúrgico e multidisciplinar envolvendo outros hospitais, como de oncologia, foi pensado, mas ainda sem uma implementação prática. Logo, não apenas o tratamento multidisciplinar, como a quimioterapia e imunoterapia, que pequena minoria consegue realizar, mas também o próprio tratamento cirúrgico pode ser considerado de difícil acesso no estado para estas patologias. Caso haja a deterioração clínica do paciente após a corticoterapia inicial e o mesmo passa para um índice de desempenho de Karnofsky de 60, dentro do hospital, provavelmente deixa de ser candidato à cirurgia e aos benefícios parciais, mas importantes, de uma ressecção completa ou subtotal.

Haja visto o tempo de vida médio e a agressividade destes tumores, podemos pensar em um sistema estadual público de Pernambuco que acolha tais famílias e que envolva não apenas o Recife/HR, mas outros centros como Petrolina, Caruaru e Garanhuns. Os hospitais públicos cedidos às Organizações Sociais também precisam responsabilizar-se por parte desses pacientes.

Os estudos clássicos com uso de corante transoperatório na cirurgia de glioma excluem casos de histologia diferente, pois têm o foco na influência do grau de ressecção com o uso do

corante sobre o prognóstico pós-operatório. Nossa decisão em manter no estudo lesões de outra natureza derivou do fato de centrarmos o interesse no comportamento da aquisição do contraste da ressonância, da fluoresceína transoperatória e das metaloproteinases de matriz nas várias lesões encontradas e consideradas, clínico e radiologicamente, como astrocitomas malignos. Foi interessante comparar estes parâmetros em lesões metastáticas de adenocarcinomas, e lesões astrocíticas de menor grau de malignidade.

Também foi notado que há uma heterogeneidade de tipos histológicos dentro de alguns dos tumores, com áreas mais características de grau IV de malignidade enquanto outras têm características menos malignas. Tal característica em “mosaico” destes tumores já é conhecida, representando provavelmente clones de linhagens com adaptações diferentes ao parênquima cerebral e ao ambiente hipóxico. Em outros casos, a área de passagem no córtex “normal” já estava acometida por tumor maligno. Nestas situações, em nosso estudo, a fluoresceína, sem uso de filtros ou lâmpadas para aumentar a sensibilidade do método, foi incapaz de demonstrar a existência de tumor. Tais fatos nos levam a recomendar: 1. O cuidado no envolvimento, no planejamento cirúrgico, de áreas não mensuráveis e de tumor não captante, em ressonância realizada dias apenas antes da ressecção; 2. Uso mais frequente e racional da fluoresceína ou outros corantes transoperatórios, com uso de aplicativo de análise de imagem na sala, e em conjunto com outros métodos como a neuronavegação e a cirurgia com o paciente acordado; 3. Utilização de patologista em sala operatória, como já é consagrado para outros tipos de tumor cerebral; 4. Padronização da avaliação radiológica por ressonância pré e pós-operatórias, com volumétrica automática, período determinado de realização das imagens, etc., com armazenamento imediato dos dados nas fichas de pesquisa.

6.2 Graus de ressecção e morbimortalidade

Neste ponto, os resultados não foram significativos, e houve uma homogeneidade entre as taxas de ressecção nos grupos caso e controle e também na morbimortalidade. Uma quantidade maior de pessoas com o protocolo de pesquisa finalizado poderia demonstrar diferenças entre os grupos, como nos estudos de (CHEN, 2012). Incluir apenas lesões astrocíticas malignas ou apenas astrocitomas grau IV no estudo foi um método utilizado por alguns autores para garantir clareza dos resultados (GUANG, 2012).

6.3 Correlações grau de malignidade x imunohistoquímica para MMP-2 e MMP-9

Houve uma tendência de correlação entre o grau de malignidade das lesões e a presença das metaloproteinases de matriz 2 e 9 nos tecidos colhidos, especialmente a MMP-2. No entanto, o número de lâminas preparadas para imunohistoquímica ficou muito aquém da quantidade de reações realizadas, e muitos pacientes não foram avaliados quanto a presença desses marcadores tumorais (14 dos 32 pacientes). Tal deveu-se à crise de financiamento das pesquisa e laboratórios após a crise política e ao golpe parlamentar e judicial de 2016, com subfinanciamento drástico de pesquisas.

A MMP-2 corou mais intensamente a maioria das lesões, incluindo uma presença maior nas áreas de pseudocápsula e de área infiltrativa difusa, porém sem diferença significativa. Neste sentido, nosso estudo corrobora a visão de que a MMP-2 é mais fortemente associada ao comportamento maligno e invasivo dos astrocitomas malignos, desde o início de sua malignização e nas frentes de avanço angiogênico dos tumores. Tal importância também está sendo notada na MMP-2 para marcador plasmático e de resposta ao tratamento quimioterápico (GONG, 2014).

Níveis elevados da presença da MMP-9 na área gliótica de tecido cerebral biopsiado estava presente anos após irradiação e radiocirurgia no relato de caso de Adair e colaboradores (ADAIR, 1999).

Com um número maior de caso, poderá ter-se essa correlação melhor demonstrada e pode-se avaliar localização da presença das metaloproteinases dentro das células, nos tipos celulares e nas regiões diferentes do tumor. Marcação com Ki-67 e CD-31 (para perócito) podem ser necessários para complementar esse tipo de avaliação.

6.4 Realce pelo contraste da ressonância e Coramento pela fluoresceína

Mehta cita que o realce pelo gadolínio é heterogêneo por natureza e há ainda o problema técnico que é o realce intrínseco da mucosa nasal, dos vasos do encéfalo, etc. e reconhece que o critério RANO tenta reduzir as dificuldades na avaliação da progressão pós-tratamento e assim, pré e pós-operatórias, com inclusão da área não contrastada e o uso do FLAIR (60). Em seu estudo, os pacientes receberam ressonâncias seriadas no período pós-operatório, a primeira em até 48 h após o ato. Incluir as características das ressonâncias, assim que produzidas, num formulário envolvendo os parâmetros dos critérios RANO pode ser uma alternativa para melhorar o acompanhamento dos pacientes. Neste mesmo estudo, Mehta

propõe o uso de um software volumétrico chamado *Velocity*, que funde automaticamente a imagem T1 sem contraste à com contraste e mede a diferença após o gadolínio, usando um parâmetro interno de *cutoff* para o realce do contraste (a mucosa nasal). A área de contraste cora em amarelo sobre uma área de interesse azul do tumor, ficando verde a área contrastada final. Problemas com esse aplicativo envolvem a área de tumor não contrastada, como nos casos de lesão de baixo grau de malignidade. Uma alternativa proposta por Miwa e colaboradores é o uso do PET (tomografia por emissão de pósitrons) com uso de MET, para ter realçada, no exame pré-operatório uma área mais ampla e mais fidedigna com a extensão da invasão tumoral, do que aquela conseguida pelo gadolínio. A aplicação do nosso protocolo de pesquisa, com momentos padronizados de retirada de fragmentos para histopatológico, pode ser uma alternativa para confirmar área de realce do gadolínio/MET em relação à presença real do tumor naquela região, assim como o perfil do coramento da fluoresceína em cada etapa da ressecção (MIWA 2017). 98,1% das áreas coradas pelo MET estavam dentro de um raio de 20 mm em volta da área corada pelo gadolínio, em conformidade com os estudos que apontam que 2 centímetros é uma distância comumente percorrida pelas células astrocíticas malignas, além da área considerada radiologicamente e macroscopicamente como tumor. Outra proposta, feita por Zhou e colaboradores (2013), é a de ressonância com transferência de prótons tridimensionais (*APT-weighted images*), já que houve realce nas áreas do gadolínio e em outras em que este contraste não realçou, mas que tinham tumor na patologia, como em nosso estudo (também realçou lesões de baixo grau).

Houve uma tendência a uma correspondência entre as áreas em que o gadolínio realça os tumores malignos e as áreas em que a fluoresceína é retida no encéfalo. No entanto, provavelmente pela presença da vasculatura hipertrofiada em volta do tumor e pelo forte realce do gadolínio nos vasos, as áreas A2 do nosso estudo (pseudocápsula) foram mais fortemente coradas pelo gadolínio do que pela fluoresceína. No entanto, o contraste transoperatório teve uma capacidade maior de identificar presença de tumor na área infiltrativa difusa em volta do tumor. As áreas centrais dos tumores, necróticas ou sólidas, apresentam pouca afinidade pelo gadolínio. Já a fluoresceína transoperatória consegue corar em verde ou laranja, já considerando a presença do sangue no perimeio, as áreas centrais dos tumores. No entanto, apesar de haver também uma tendência de associação entre a intensidade de fluoresceína nas áreas de tumor maligno medida pela razão entre área corada e córtex normal, com o uso do ImageJ, e as áreas com presença de tumor maligno, a escolha de realização do gráfico de verde, azul e vermelho para esta análise nos fez perder parte do

espectro de cor da fluoresceína (o laranja e o amarelo, por exemplo) na avaliação das áreas coradas. Uma outra dificuldade foi a quantidade de sangue no leito operatório no momento das fotografias transoperatórias, gerando uma coloração laranja escura não reconhecida pelo ImageJ com espectro da fluoresceína, já que não era verde, além da pouca quantidade de luz nas áreas profundas do leito de ressecção tumoral.

Como não encontramos na literatura o uso de aplicativo de análise de imagem transoperatória da fluoresceína e para o avanço dos estudos neste sentido, propomos: 1. Utilização de microscópio cirúrgico com tela própria com foto transoperatória adquirida pelo próprio equipamento (já disponíveis nos hospitais estudados); 2. Pesquisa associada de outros métodos para avaliação da intensidade de coramento, que possa envolver também o coramento amarelo e laranja; 3. Reforçar a necessidade de hemostasia antes das fotos e garantir ângulo de visão microscópica e distância padronizada para garantir luminosidade suficiente no fundo das lesões, e luz em quantidade não excessiva na região cortical. Ideias que podem ser levadas a cabo são a utilização das luzes da sala acesas, com a luz do microscópio focada no fundo do leito, e o uso de lanterna de luz ultravioleta (BELYKH, 2016).

7 CONCLUSÃO

O presente estudo aponta para confirmação da importância de entender o metabolismo das metaloproteinases de matriz 2 e 9 como envolvido na malignização de astrocitomas cerebrais, e na invasividade, dada a presença elevada na capsula dos tumores e nas regiões de gliose e edema, assim como nas lesões de mais baixo grau de malignidade e nas metástases, sendo desta forma um alvo para pesquisas em tratamento. O estudo também incita ampliarmos o entendimento da quebra da barreira hemato-encefálica relacionada com o metabolismo destas enzimas catalíticas da matriz extra celular, produzidas pelas células tumorais, perícitos e neutrófilos, especialmente se compararmos o comportamento MMP-2 e 9 nas áreas de necrose em tumores de graus IV, caso a caso, com áreas infiltrativas e diversas histologias do mosaico de malignização e adaptabilidade tumoral, o que é garantido pela metodologia de pesquisa que criamos.

Outro ponto que merece ser aprofundado por novos estudos, com maior número de amostra, é como o exame de imagem e o planejamento cirúrgico podem envolver de forma programada as áreas infiltrativas ou claramente tumorais, além das que realçam pelo gadolínio, e o uso da fluoresceína transoperatória continua sendo uma forma barata e segura de melhorar a ressecção e a segurança e, junto com o patologista em sala, ajudar a dar conta da complexidade de histologias que podem advir em uma cirurgia de astrocitoma maligno. Nosso estudo refletiu também esta realidade com a positividade frequente das áreas edemaciadas do cérebro para as MMP-2 e 9. A utilidade da fotografia transoperatória com uso de aplicativo de imagem em sala para sensibilizar a utilização da fluoresceína carece de mais estudos.

REFERÊNCIAS

- [1] ADAIR, J. C.; BALDWIN, N.; KORNFELD, M.; ROSEMBERG, G. A. Radiation-induced blood-brain barrier damage in astrocytoma: relation to elevated gelatinase B and urokinase. **J Neurooncol**, v. 44, n. 3, pp. 283-289, 1999.
- [2] ANARI, S.; WALDRON, M.; CARRIE, S. Delayed absence seizure: a complication of intrathecal fluorescein injection. A case report and literature review. **Auris Nasus Larynx**. v. 34, n. 4, pp. 515-8, Dec. 2007.
- [3] ASUTHKAR, S.; VELPULA, K. K.; CHETTY, C.; GORANTLA, B.; RAO, J. S. Epigenetic regulation of miRNA-211 by MMP-9 governs glioma cell apoptosis, Chemoresitivity and radiosensitivity. **Oncotarget**, v. 3, pp. 1439-1454, 2012.
- [4] AWASTHI, R.; PANDEY, C. M.; SAHOO, P.; BEHANI, S.; KUMAR, V.; KUMAR, S.; MISRA, S.; HUSAIN, N.; SONI, P.; RATHORE, R.; GUPTA, R. K. Dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging-derived Kep as a potential biomarker of matrix metalloproteinase 9 expression in patients with glioblastoma multiforme: a pilot study. **J Comput Assist Tomogr**, v. 36, n. 1, pp.125 – 130, 2012.
- [5] BELYKH, E.; MARTIROSYAN, N. L.; PREN, M. C. Intraoperative fluorescence imaging for personalized brain surgery: current state and future directions. **Front Surg**. v. 3, n. 55, pp. 2 - 27, 2016.
- [6] BERGER MS. Editorial. Low-grade gliomas. **Journal of Neurosurgery**, v. 118, n. 6, pp. 1155 – 1156, march 15, 2013.
- [7] BLAZQUEZ, C.; SALAZAR, M.; CARRACEDO, A.; LORENTE, M.; EGIA, A.; GONZALEZ-FERIA, L.; HARO, A.; VELASCO, G.; GUZMAN, M. Cannabinoids inhibit glioma cell invasion by down-regulating matrix metalloproteinase-2 expression. **Cancer Res**, v. 68, n. 6, pp. 1945-1952, Mar. 2008.
- [8] BODEY, B.; BODEY, B.; SIEGEL, S. E.; KAISER, H. E. Matrix metalloproteinase expression in childhood astrocytomas. **Anticancer Res**, v. 20, n. 5A, pp. 3287-92, Sep-Oct, 2000.
- [9] BRASIL. Resolução Nº196/96 versão 2012. Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde.
- [10] BRAT, D. J.; CASTELLANO-SANCHEZ, A. A.; HUNTER, S. B.; PECOT, M.; COHEN, C.; HAMMOND, E. H.; DEVI, S. N.; KAUR, B.; VAN MEIR, E. G. Pseudopalisades in glioblastoma are hypoxic, express extracellular matrix proteases, and are formed by an actively migrating cell population. **Cancer Res**, v. 64, n. 3, pp. 920-7, Feb. 2004.
- [11] BRELL, M.; IBANEZ, J.; FELPETE, A.; BURGUERA, B.; FRONTERA, M.; COUCE, M. E. Quantitative analysis of matrix metalloproteinase-2mRNA expression in central and peripheral regions of gliomas. **Brain Tumor Pathol**, n. 28, pp. 137-44, 2011.
- [12] BREM S, WONG ET. Angiogenesis and brain tumor: molecular targets and molecular scalpels. Capítulo 104. **Youmans Neurological Surgery**, Sixth Edition, 2011.
- [13] CAPELLE, L.; FONTAINE, D. Spontaneous and therapeutic prognostic factors in adult hemispheric World Health Organization grade II gliomas: a series of 1097 cases. **Journal of Neurosurgery**, v. 118, pp. 1157 – 1168, 2013.
- [14] CHACKO, A. G.; KUMAR, N. K. S.; CHACKO, G.; ATHYAL R; RAJSHERKHAR, V. Intraoperative ultrasound in determining the extent of resection of parenchymal brain tumors – a comparative study with computed tomography and histopathology. **Acta Neurocirurgica**, v. 145, pp. 743-748, 2003.

- [15] CHANG E. F. Multiinstitutional validation of University of California at San Francisco Low-grade gliomas prognostic system. **Journal of Neurosurgery**, v. 111, n. 2, pp. 203 – 210, August 2009.
- [16] CHEN, B.; WANG, H.; WANG, H. Gross Total Ressection of Glioma with the Intraoperative Fluorescence-guidance of Fluorescein Sodium. **International Journal of Medical Sciences**, v. 9, n. 8, pp. 708-714, 2012.
- [17] CHOE, G.; PARK, J. K.; JOUBEN-STEELE, L.; KREMEN, T. J.; LIAU, L. M.; VINTERS, H. V.; CLOUGHESY, T. F.; MISCHER, P. S. Active matrix metalloproteinase 9 expression is associated with primary glioblastoma subtype. **Clin Cancer Res**, v. 8, n. 9, pp. 2894-901, Sep. 2002.
- [18] COHEN-GADOL, A. A.; REY-DIOS. A novel new method for intraoperative fluorescence-guided resection of gliomas. **Apresentado na Annual Meeting do Congress of Neurological Surgeons**, 2012.
- [19] COMINCINI, S.; PAOLILLO, M.; BARBIERI, G.; PALUMBO, S.; SBALCHIERO, E.; AZZALIN, A.; RUSSO, M. A.; SCHINELLI, S. Gene expression analysis of na EGFR indirectly related pathway identified PTEN and MMP9 as reliable diagnostic markers for human glial tumor specimens. **Journal of biomedicine and biotechnology**, v. 2009, pp. 12 pages, February, 2009.
- [20] DUBOIS, L. G. Gliomas and the fragility of blood brain barrier. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 8, Article 418, December 2014.
- [21] EGEBLAD, M.; WERB, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nature Reviews. Cancer**, v. 2, n. 3, p. 161–174, 2002.
- [22] ESCHBACHER, J.; MARTIROSYAN, N.; NAKAR, P.; SANAI, N.; PREUL, M.; SMITH, K.; COONS, S.; SPETZLER, R. In vivo intraoperative confocal microscopy for real-time histopathological image of brain tumors. **J Neurosurg** v. 116, pp. 854-860, 2012.
- [23] FENG, X.; MIAO, G.; HAN, Y.; XU, Y. CARMA3 is overexpressed in human glioma and promotes cell invasion through MMP-9 regulation in A172 cell line. **Tumor Biol**, v. 35, n. 1, pp. 149 – 154, 2014.
- [24] FORSYTH, P. A.; WONG, H.; LAING, T. D.; REWCASTLE, N. B.; MORRIS, D. G.; MUZIK, H.; LECO, K. J.; JOHNSTON, R. N.; BRASHER, P. M. A.; SUTHERLAND, G.; EDWARDS, D. R. Gelatinase-A (MMP-2), gelatinase-B (MMP-9) and the membrane type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) are involved in different aspects of pathophysiology of malignant gliomas. **British Journal of Cancer**, v. 79, pp. 11-12, 1999.
- [25] FULLER, G. N.; RIBALTA, T. Brain Tumors: An Overview of Current Histopathologic Classifications. Capítulo 96 em **Yomans Neurological Surgery**, Sixth Edition, 2011.
- [26] GONG, J.; ZHU, S.; ZHANG, Y.; WANG, J. Interplay of VEGFa and MMP2 regulates invasion of glioblastoma. **Tumor Biology**, v. 35, n. 12, pp. 11879-11885, Dec 2014.
- [27] GROSS, J.; LAPIERE, C. M. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 48, n. 6, p. 1014–1022, 1962.
- [28] GU, J.; ZHANG, C.; CHEN, R.; PAN, J.; WANG, Y.; MING, M.; GUI, W.; WANG, D. Clinical implication and prognostic value of EMMPRIN/CD147 and metalloproteinase expression in pediatric glioma. **European Journal of Pediatrics**, v. 168, n. 6, pp. 705-710, June 2009.

- [29] GUAN, H.; CAI, J.; ZHANG, N.; WU, J.; YUAN, J.; LI, J.; LI, M. Sp1 is upregulated in human glioma, promotes MMP-2-mediated cell invasion and predicts poor clinical outcome. **Int. J. Cancer**, v. 130, pp. 593–601, 2012.
- [30] GUHA, A.; OMAHEN, D. Growth factors in glial tumors. Capítulo 101. **Youmans Neurological Surgery**, Sixth Edition, 2011.
- [31] HAN, Y.; WU, Z.; WU, T.; HUANG, Y.; LI, X.; SUN, T.; XIE, X.; ZHOU, Y.; DU, Z. Tumor-suppressive function of long noncoding RNA MALAT1 in glioma cells by downregulation of MMP2 and inactivation of ERK/MAPK signaling. **Cell death and disease**, v. 7, pp. 21-23, 2016.
- [32] HEFTI, M.; MEHDORN, H. M.; ALBERT, I.; DORNER, L. Fluorescence-guided Surgery for Malignant Glioma: A review on Aminolevulinic Acid Induced Protoporphirin IX Photodynamic Diagnostic in Brain Tumor. **Current Medical Imaging Review**, v. 6, pp. 000 – 000, 2010.
- [33] HINOJOSA, Q. A.; KOZTOWSKI, T.; HENRY, B. Malignant Gliomas: Anaplastic Astrocytomas, Glioblastoma Multiforme, Glioblastoma. Capítulo 122. **Youmans Neurological Surgery**, Sixth Edition, 2011.
- [34] HLOBICOVA, A.; EHRLMANN, J.; KNIZETOVA, P.; KREJCI, V.; KALITA, O.; KOLAR, Z. Analysis of VEGF, Flt-1, Flk-1, nestin and MMP-9 in relation to astrocytoma pathogenesis and progresion. **Neoplasma**, v. 56, n. 4 pp. 284-90, 2009.
- [35] HORMINGO, A.; GU, B.; KARIMI, S.; RIEDEL, E.; PANAGEAS, K. S.; EDGAR, M. A.; TANWAR, M. K.; RAO, J. S.; FLEISHER, M.; DEANGELIS, L. M.; HOLLAND, E. C. YKL-40 and matrix metalloproteinase-9 as potential serum biomarkers for patient with high-grade gliomas. **Clin Cancer Res**, v. 12, n. 19, pp. 5698-704, Oct. 2006.
- [36] HU, B.; GUO, P.; FANG, Q.; TAO, H. Q.; WANG, D.; NAGANE, M.; HUANG, H. J. S.; GUNJI, Y.; NISHIKAWA, R.; ALITALO, K.; CAVENEE, W. K.; CHENG, S. Y. Angiopoietin-2 induces human glioma invasion through the activation of matrix metalloproteinase-2. **PNAS**, v. 100, n. 15, pp. 8904 – 8909, july 22, 2003.
- [37] HU, F.; KU, M. C.; MARKOVIC, D.; DZAVE, O. D.; LEHNARDT, S.; SYNOWITZ, M.; WOFF, A. W.; KETTENMANN, H. Glioma associated microglial MMP9 expression is up regulated by TLR2 signaling and sensitive to monocycline. **Int J cancer**, v. 135, n. 11, pp. 2569 – 2578, 2012.
- [38] HUR, J. H.; PARK, M. J.; PARK, I. C.; YI, D. H.; RHEE; HONG, S. I.; LEE, S. H. Matrix metalloproteinase in human gliomas: activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) may be correlated with membrane metalloproteinase-type-1matrix metalloproteinase (MT-MMP) expression. **J Corean Med Sci**, v. 15, pp. 15:309-14, 2000.
- [39] IWAMOTO, F. M.; HOTTINGER, A. F.; KARIMI, S.; RIEDEL, E.; DANTIS, J.; JAHDI, M.; PANAGEAS, K. S.; LASSMAN, A. B.; ABREY, L. E.; FLEISHER, M.; DEANGELIS, L. M.; HOLLAND, E. C.; HORMIGO, A. Longitudinal prospective study of matrix metalloproteinase-9 as a serum marker in glioma. **J neurooncol**, v. 105, pp. 607-612, 2011.
- [40] JAALINOJA, J.; HERVA, R.; KORPELA, M.; HOYHTVA, M.; TURPEENNIEMI-HUJANEN, T. Matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) immunoreactive protein is associated with poor grade and survival in brain neoplasm. **J Neurooncol**, v. 46, n. 1, pp. 81-90, 2000.
- [41] KACHRA, Z.; BEAULIEU, E.; DELBECCHI, L.; MOUSSEAU, N.; BERTHELET, F.; MOUMDJIAN, R.; DEL MAESTRO, R.; BELIVEAU, R. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human brain tumors. **Clin Exp Metastasis**, v. 17, n. 7 pp. 555-66, 1999.

- [42] KAMINO, M.; KISHIDA, M.; KIBE, T.; IKOMA, K.; LIJIMA, M.; HIRANO, H.; TOKUDOME, M.; CHEN, L.; KORIYAMA, C.; YAMADA, K.; ARITA, K.; KISHIDA, S. Wnt-5a signaling is correlated with infiltrative activity in human glioma by inducing cellular migration and MMP-2. **Cancer Sci**, v. 102, n. 3, pp. 540 – 548, March, 2011.
- [43] KLEKNER, A.; VARGA, L.; BOGNÁR, L.; HUTÓCZKI, G.; KENVERES, A.; TÓTH, J.; HANZÉLY, Z.; SCHOLTZ, B. Extracellular matrix of cerebral tumors with different invasiveness. **Ideggyogy Sz**, v. 63, n. 1-2, pp. 38-43, 2010.
- [44] KOC, K.; ANIK, I.; CABUBUK, B. Fluorescein sodium-guided surgery in glioblastoma multiforme: a prospective evaluation. **British Journal of Neurosurgery**, v. 22, n. 1, pp. 99 – 103, 2008.
- [45] KOMATSU, K.; NAKANISHI, Y.; NEMOTO, N.; HORI, T.; SAWADA, T. Expression and quantitative analysis of matrix metalloproteinase-2 and -9 in human gliomas. **Brain Tumor Pathol**, v. 21, n. 3, pp. 105-112, 2004.
- [46] KUMAR, R.; MALIK, N.; TUNGARIA, A.; KAWAL, P. Matrix metalloproteinase-2 gene polymorphism is not associated with increased glioblastoma multiforme susceptibility: An Indian institutional experience. **Neurol India**, v. 59, pp. 236-40, 2011.
- [47] KUNISHIO, K.; OKADA, M.; MATSUMOTO, Y.; NAGAO, S. Matrix metalloproteinase-2 and -9 expressions in astrocytic tumors. **Brain Tumor Pathol**, v. 20, n. 2, pp. 39-45, 2003.
- [48] LACRIOX, M.; ABI-SAID, D.; FOURNEY, D. R.; SAWAYA, R. at al. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection and survival. **J Neurosurg**, v. 95, pp. 190-198, 2001.
- [49] LI Q, CHEN B, CAI J, WANG G, LI Y, LI R, FENG Y, HAN B, LI J, TIAN Y, YI L, JIANG C. Comparative analysis of matrix metalloproteinase Family members reveals that MMP9 predicts survival and response to temozolamide in patients with primary glioblastoma. **PloS One**, v. 11, n. 3, 2016.
- [50] LIMA FILHO, L. G. Ansiedade e depressão em pacientes em pré-operatório de neurocirurgia. Projeto de pesquisa na Residência de Enfermagem em Neurologia e Neurocirurgia do HR, 2007.
- [51] LIU, M. F.; HU, Y. Y.; JIN, T.; XU, K.; WANG, S. H.; DU, G. Z.; WU, B. L.; LI, L. Y.; XU, L. Y.; LI, E. M.; XU, H. X. Matrix Metalloproteinase-9/neutrophil gelatinase-activated complex activity in human glioma samples predicts tumor presence and clinical prognosis. **Disease Markers**, v. 2015, article ID 138974, 7 pages, 2016.
- [52] LONGATTI, P.; BASALDELLA, L.; SAMMARTINO, F. A. Fluorescein-Enhanced Characterization of Additional Anatomical Landmark in Cerebral Ventricular Endoscopy. **Neurosurgery**, v. 72, n. 5, pp. 855 – 860, 2013.
- [53] LOUIS, D. N.; OHGAKI, H.; WIESTLER, O. D. et al. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol*, v. 114, pp. 97–109, 2007.
- [54] LOUIS, D. N.; OHGAKI, H.; WIESTLER, O. D.; CAVENEE, W. K.; BURGER, P. C.; JOUVET, A.; SCHEITHAUER, B. W.; KLEIHUES, P. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. **Acta Neuropathol**, v. 114, pp. 97–109, 2007.
- [55] LUCIO-ETEROVIC, A.; PIAO, Y.; de GROOT, J. F. Mediators of glioblastoma resistance and invasion during antivascular endothelial growth factor therapy. **Clin Cancer Res**, v. 15, n. 14, pp. 4589 – 4599, July, 2009.
- [56] LU, Z.; CAO, Y.; WANG, Y.; ZHANG, Q.; ZHANG, X.; WANG, S.; LI, Y.; XIE, H.; JIAO, B.; ZHANG, J. Polymorphisms in the matrix metalloproteinase-1, 3, and 9

- promoters and susceptibility to adult astrocytoma in northern China. **J Neurooncol**, v. 85, n. 1, pp. 65-73, Oct. 2007.
- [57] MA, C.; LI, Y.; ZHANG, X.; ZHAO, G.; XU, H. Levels of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-9 proteins in patients with glioma. **Journal of International Medical Research**, v. 42, n. 1, pp. 198-204, 2014.
- [58] MACGIRT, M. J.; CHAICHANA, K.L.; GATINJI, M. et al. Independent association of extent of resection with survival in patients with malignant brain astrocytomas. **J Neurosurg**, v. 110, pp. 156-162, 2010.
- [59] MAYES, D. A.; HU, Y.; TENG, Y.; SIEGEL, E.; WU, X.; PANDA, K.; TAN, F.; YOUNG, W. K.; ZHOU, Y. H. PAX6 suppresses the invasiveness of glioblastoma cells and the expression of the matrix metalloproteinase-2 gene. **Cancer Res**, v. 66, n. 20, pp. 9809-17, Oct. 2006.
- [60] MEHTA, A. I.; KANALY, C. W.; FRIEDAN, A. H.; BIGNER, D. D.; SAMPSON, J. H. Monitoring radiographic brain tumour progression. **Toxins**, v. 3, pp. 191-200, 2011.
- [61] MIWA, K.; SHINODA, J.; YANO, H.; OKUMURA, A.; IWAMA, T.; NAKASHIMA, T.; SAKAI, N. Discrepancy between lesion distribution on methionine PET and MR images in patients with glioblastoma multiforme: insight from a PET and MR fusion image study. **J Neuro Neurosurg Psychiatry**, v. 75, pp. 1457-1462, 2004.
- [62] MOORE, G. E.; PEYTON, W. T.; FRENCH, L. A. et al. The clinical use of fluorescein in neurosurgery. The localization of brain tumors. **J Neurosurg**, v. 5, pp. 392-398, 1948.
- [63] MUNAUT, C.; NOEL, A.; HOUGRAND, O.; FOIDART, J. M.; BONIVER, J.; DEPREZ, M. Vascular endothelial growth factor receptor correlates with matrix metalloproteinases MT1-MMP, MMP-2 and MMP-9 in human glioblastomas. **Int J Cancer**, v. 106, n. 6, pp. 848-55, Oct. 2003.
- [64] MUSUMECI, G.; MAGRO, G.; CARDILE, V.; COCO, M.; MARZAGALLI, R.; CASTROGIOVANNI, P.; IMBESI, R.; GRAZIANO, A. C. E.; BARONE, F.; DI ROSA, M.; CASTORINA, S.; CASTORINA, A. Characterization of matrix metalloproteinase-2 and -9, ADAM-10 and N-cadherin expression in human glioblastoma multiforme. **Cell Tissue Res**, 07 may 2015.
- [65] NAGASE, H.; VISSE, R.; MURPHY, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. **Cardiovascular Research**, v. 69, n. 3, p. 562–573, 2006.
- [66] NOELL, S.; WOLBURG-BUCHOLZ, K.; MACK, A. F.; RITZ, R.; TATAGIBA, M.; BESCHORNER, R.; WOLBURG, H. Dynamics of expression patterns of AQP4, dystroglycan, agrin and matrix metalloproteinases in human glioblastoma. **Cell and Tissue Research**, v. 347, n. 2, pp. 429-441, Feb. 2012.
- [67] OKUDA, T.; YOSHIOKA, H.; AMAMI, K. Fluorescence-guided surgery for glioblastoma multiforme using high-dose fluorescein sodium with excitation and Barrier filter. **Journal of Clinical Neuro-Oncology**, v. 19, n. 12, pp 1719-1722, Dez. 2012.
- [68] ORZAIZ, G. A.; SOLIS, S. T.; VALVERDE, A. P.; SANCHEZ M. M. Prognostic Value of Residual Fluorescent Tissue in Glioblastoma Patient After Gross Total Resection in 5-ALA Guided Surgery. **Neurosurgery**, v. 72, n. 6, pp. 915 – 920, 2013. DOI: 10.1227/NEU.0b013e31828c3974.
- [69] PANGESTER, A.; WUSSLER, E. M.; OPDENAKKER, G.; VOLK, B.; CAMPBELL, I. L. Distinct expression patterns and enzymatic activity of matrix metalloproteinases and

- their inhibitors in primary brain tumors. **Journal of Neuropathology and experimental neurology**, v. 60, n 6, pp. 589 – 612, June 2001.
- [70] PARK, M. H.; AHN, B. H.; HONG, Y. K.; MIN, D. S. Overexpression of phospholipase D enhances matrix metalloproteinase-2 expression and glioma cell invasion via protein kinase C and protein kinase A/NF-kB/Sp1-mediated signaling pathways. **Carcinogenesis**, v.30, n. 2, pp.356–365, 2009.
- [71] PEIXE, F. C. Q.; NETO, J. C. S. Expressão de metaloproteinase de matriz pela imunohistoquímica em tecidos de câncer de mama: uma revisão sistemática. Biblioteca do mestrado em Patologia – UFPE, 2014.
- [72] PING, G.; IMANISHI, Y.; CACKOWSKI, F.; JARZYNSKA, M. J.; TAO, H. Q.; NISHIKAWA, R.; HIROSE, T.; HU, B.; CHENG, S. Y. Up-regulation of angiopoietin-2, matrix metalloproteinase-2, membrane type 1 metalloproteinase and laminin 5 gamma 2 correlates with the invasiveness of human glioma. **American Journal of Pathology**, v. 166, n. 3, pp. 877 – 890, Mar 2005.
- [73] QUINONES-HINOJOSA, A.; KOZTOWSKI, T.; HENRY, B. Malignant Gliomas: Anaplastic Astrocytomas, Glioblastoma Multiforme, Glioblastoma. Capítulo 122. **Youmans Neurological Surgery**, Sixth Edition, 2011.
- [74] RAITHATHA, S. A.; MUZIC, H.; REWCASTLE, B.; JOHNSTON, R. N.; EDWARDS, D. R.; FHORSYT, P. A. Localizaion of gelatinase-A and gelatinase-B mRNA and protein in human gliomas. **Neuro-oncology**, v. 2, n. 3, pp. 145-150, July 2000.
- [75] ROSE, D. U.; PETRICH, C.; KAN, L.; LIU, P.; HALLEN, A.; GANSS, R.; SONG, H.; VANDEMBERG, S.; BERGES, G. Matrix metalloproteinase-2 regulates vascular patterning and growth affecting tumor cell survival and invasion in GBM. **Neuro Oncology**, v. 10, n. 3, pp. 254 – 264, Junho 2008.
- [76] SANAI, N.; MIRZADETH, Z.; BERGER, M. S. Funtional outcome after language mapping for glioma resection. **N Engl J Med**, v. 358, pp. 18-27, 2008.
- [77] SANAI, N.; BERGER, M. S. Glioma extent of resection and its impact on patient outcome. **Neurosurgery**, v. 62, pp.753–766, 2008.
- [78] SANAI, N.; BERGER, M. Low-Grade Gliomas: Astrocytomas, Oligodendroglioma and Mixed Glioma. Capítulo 121 em **Youmans Neurological Surgery**, Sixth Edition, 2013.
- [79] SCHEBESCH, K. M.; BRAWANSKI, A.; HONENBERGER, C.; HOHNE, J. Fluorescein sodium-guided surgery of malignant brain tumros: history, current concepts, and future projects. **Turkish Neurosurgery**, v. 26, n. 2, pp. 185-194, 2016.
- [80] SHINODA, J. Y. H.; YOCHIMURA, S. I.; OKUMURA, A.; KAKU, Y.; IWAMA, Y.; SAKAI, N. Fluorescence-guided resection of glioblastoma multiforme by using high-dose fluorescein sodium. Technical note. **J Neurosurg**, v. 99, pp. 597–603, 2003.
- [81] SILVA, C. E.; SILVA, J. L. B. Use of Sodium Fluorescein in Skull Base Tumors. **Surg Neurol Int**, v. 1, pp. 70-4, 2010.
- [82] SILVA, C. E. Uso de fluoresceína sódica em tumores da base do crânio: um estudo experimental introdutório com análise quantitativa digital de contraste tumoral. Dissertação de mestrado no programa de pós-graduação em medicina e ciências da saúde da PUC-RS, 2010.
- [83] SMITH, J. S.; CHANG, E. F.; LAMBBORN, K. R.; CHANG, S. M.; PRADOS, M. D.; SHA, S.; TIHAN, T.; VALDENBERG, S.; MACDERMOTT, M. W.; BERGER, M. S. Role of extent of resection in long term outcome of low-grade hemispheric gliomas. **J Clin Oncol**, v. 26, pp. 1338-1345, 2008.

- [84] STERNLICHT, M. D.; BISSELL, M. J.; WERB, Z. The matrix metalloproteinase stromelysin-1 acts as a natural mammary tumor promoter. **Oncogene, Basingstoke**, v. 19, n. 8, p. 1102-1113, Feb. 2000.
- [85] STUPP, R.; MANSON, W. P.; VAN DEN BENT, M. J.; WELLER, M.; FISHER, B. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolamide for glioblastoma. **N Engl J Med**, v. 352, pp. 987-996, 2005.
- [86] STUMMER, W.; REULEN, H. J.; MEINEL, T. Extent of resection and survival in glioblastoma multiforme: identification of and adjustment for bias. *Neurosurgery*, v. 62, pp. 564-576, 2008.
- [87] TABAEE, A.; HILTZIK, D.; PLAKANTONAKIS, D. G. The safety and predictive value of intratecal fluorescein in endoscopic skull base surgery. *Skull Base* 2006; 16 – A088.
- [88] TABOURET, E. Letter to the editor. *Neuro-oncology*, v. 17, n. 8, pp. 1174-1176, 2015.
- [89] TABOURET, E.; BOUDOURESQUE, F.; BARRIE, M.; MATTA, M.; BOUCARD, C.; LOUNDOU, A.; CARPENTIER, A.; SANSON, M.; MATELLUS, P.; FIGARELLA-BRANGER, D.; OUAFIK, L. H.; CHINOT, O. Association of matrix metalloproteinase 2 plasma level with response and survival in patients treated with bevacizumab for recurrent high-grade glioma. **Neuro-Oncology**, v. 16, n. 3, pp. 392-399, 2014.
- [90] TABOURET, E.; BOUDOURESQUE, F.; FARINA, P.; BARRIE, M.; BEQUET, C.; SANSON, M.; CHINOT, O. MMP-2 and MMP-9 as candidate biomarkers to monitor bevacizumab therapy in high-grade gliomas. Letter to the editor. **Neuro-oncology**, v. 17, n. 8, pp. 1174-1176, 2015.
- [91] TAKANO, S.; MACHICO, R.; OSUKA, S.; ISHIKAWA, E.; OHNEDA, O.; MATSUMURA, A. Detection of failure of bevacizumab treatment for malignant glioma based on urinary matrix metalloproteinase activity. **Brain Tumor Pathol**, v. 27, pp. 89-94, 2010.
- [92] TAKANO, S.; TSUBOI, K.; MATSUMURA, A.; SATO, H.; NOSE, T. Localization of gelatinase activities in glioma tissues by film in situ zymography. **Brain tumor pathol**, v. 18, n. 2, pp. 145-50, 2001.
- [93] TAO, T.; YAN, S.; DONGFEN, H.; WENKANG, L.; JIN, Q.; JUNXIA, Z.; WINGYI, W.; YONGPING, Y. Chinese Glioma Cooperative Group. TPM3, a strong prognosis predictor is involved in malignant progression through MMP family members and EMT-like activators in gliomas. **Tumor Biol**, v. 35, n. 9, pp. 9053 – 9059, 2014. DOI 101007/s13277-014-1974-1
- [94] The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. **Nature**, v. 455, n. 7216, pp. 1061 – 1068, Oct 2008.
- [95] THORNS, V.; WALTER, G. F.; THORNS, C. Expression of MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-10 and MMP-11 in human astrocytic and oligodendroglial gliomas. **Anticancer Res**, v. 23, n. 5A, pp. 3937-44, 2003.
- [96] TIHAN, T. Proliferation markers in the evaluation of gliomas. Capítulo 99. **Youmans Neurological Surgery**, Sixth Edition, 2011.
- [97] TODA, M. Intraoperative neuronavigation and fluorescent imaging in malignant gliomas surgery. **Keio J Med**, v. 57, n. 3, pp. 155 – 161, September 2008.
- [98] TREMBLAY, P.; BEAUDET, M. J.; TREMBLAY, E.; RUEDA, N.; THOMAS, T.; VALLIERES, L. Matrix metalloproteinase 2 attenuates brain tumor growth, while promoting macrophage recruitment and vascular repair. **J Pathol**, v. 224, pp. 222–233 April 2011.

- [99] USHIO, Y.; KOCHI, M.; HAMADA, J.; KAI, Y.; NAKAMURA, H. Effect of surgical removal on survival and quality of life in patients with supratentorial glioblastoma. **Neurol Med Chir**, v. 45, pp. 454-461, 2005.
- [100] UZUKA, T.; TAKAHASHI, H.; FUJY, Y. Surgery strategy for malignant glioma resection with intraoperative use of fluorescein Na. **Neurological Surgery**, v. 35, n. 6, pp. 557-562, 2007.
- [101] VALLE, R. D.; SOLIS, S. T.; GASTEARA, M. A. Surgery guided by 5-aminolevulinic fluorescence in glioblastoma: volumetric analysis of extent of resection in single-center experience. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 102, n.1, pp 105-113, 2011.
- [102] VANOOREN, J.; VAN DE STEEN, P.; OPDENAKKER, G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase 9 (MMP-9): the next decade. **Crit Rev Biochem Mol Biol**, v. 48, n. 3, pp. 222-272, 2013.
- [103] VERHAAK, R.; HOADLEY, K. A.; PURDOM, E. An integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. **Cancer cell**, v. 17, n. 1: pp. 98?, 2010.
- [104] WANG, F.; XIAO, W.; SUN, J.; HAN, D.; ZHU, Y. MiRNA-181c inhibits EGFR-signaling-dependent MMP9 activation via suppressing Akt phosphorylation in glioblastoma. **Tumour Biol**, v. 35, n. 9, pp. 8653 – 8658, 2014. DOI 10.1007/s13277-014-2131-6.
- [105] WANG, H.; WANG, Y.; BAO, Z.; ZHANG, C.; LIU, Y.; CAI, J.; JIANG, C. Hypomethylated Rab27b is a progression-associated biomarker of glioma regulating MMP-9 to promote invasion. **Oncology Reports**, v. 34, pp.1503-1509, 2015.
- [106] WEN, P. Y.; MACDONALD, D. R.; REARDON, D. A.; CLOUGHESY, T. F.; SORESEN, A. G.; GALANIS, E.; DEGROOT, J. Update response assessment criteria for high grade gliomas: response assessment in neuro-oncology working group. **J Clin Oncol**, v. 28, pp. 1963-1972, 2010.
- [107] WOESSNER, J. F.; NAGASE, H. Matrix Metalloproteinases and TIMPs. New Edition. [s.l.]: **Oxford University Press**, 2000.
- [108] YAN, W.; ZHANG, W.; SUN, L.; LIU, Y.; YOU, G.; WANG, Y.; KANG, C.; YOU, Y.; JIANG, T. Identification of MMP-9 specific microRNA expression profile as potential targets for anti-invasion therapy in glioblastoma multiforme. **Brain research**, v. 1411, pp. 108-115, 2011.
- [109] YANG, T. Q.; LU, X. J.; WU, T. F.; DING, D. D.; ZAO, Z. H.; CHEN, C. L.; XIE, X. S.; LI, B.; WEI, Y. X.; GUO, L. C.; ZHANG, Y.; HUANG, Y. L.; ZHOU, Y. X.; DU, Z. W. MicroRNA-16 inhibits glioma cell growth and invasion through suppression of BCL2 and the nuclear factor-kB1/MMP9 signaling pathway. **Cancer Sci**, v. 105, n. 3, pp. 265-271, 2014.
- [110] YANG, X.; LV, S.; LIU, Y.; LI, D.; SHI, R.; TANG, Z.; FAN, J.; XU, Z. The clinical utility of matrix metalloproteinase 9 in evaluating pathological grade and prognosis of glioma patients: a meta-analysis. **Molecular Neurobiologist**, v. 52, n. 1, pp 38-44, 2015.
- [111] YANO, H.; HARA, A.; MURASE, S.; HAYASHI, K.; ANDO, H.; SHINODA, J.; SHIMOKAWA, K.; SAKAI, N. Expression of hepatocyte growth factor and matrix metalloproteinase-2 in human glioma. **Brain Tumor Pathol**, v. 18, pp. 7 – 12, 2001.
- [112] ZHANG, K.; LI, C.; LIU, Y.; LI, L.; MA, X.; MENG, X.; FENG, D. Evaluation of invasiveness of astrocitoma using H-magnetic resonance spectroscopy: correlation with expression of matrix metalloproteinase-2. **Neuroradiology**, v. 49, n. 11, pp. 913-919, 2007.

- [113] ZHAO, J.; LI, G.; ZHAO, Z.; WANG, J.; GAO, G.; HE, S. Matrix metalloproteinase-9 expression is increased in astrocytic glioma and associated with prognosis of patients. **Jpn J clin Oncol**, v. 42, n. 11, pp. 1060-1065, 2012.
- [114] ZHAO, Y.; XIAO, A.; DIPIERRO, C. G.; CARPENTER, J. E.; ABDEL-FATTAH, R.; REDPATH, G. T.; LOPES, M. B.; HUSSAINI, I. M. An extensive invasive intracranial human glioblastoma xenograph model: role of high level of matrix metalloproteinase 9. **Am J Pathol**, v. 176, n. 6, pp. 3032-49, June 2010.
- [115] ZHAO, W. J.; ZHANG, W.; LI, G. L.; CUI, Y.; SHI, Z. F.; YUAN, F. Differential expression of MMP-9 and AQP-4 in human glioma samples. **Folia Neuropathol**, v. 50, n. 2, pp. 176-186, 2012.
- [116] ZWITKOWSKA, A.; KIJEWSKA, M.; LIPKO, M. Downregulation of Akt and FAK phosphorylation reduces invasion of glioblastoma cells by impairment of MT1-MMP shuttling to lamellipodia and downregulates MMPs expression. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1813, pp. 655-667, 2011.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estamos convidando o senhor (a) a participar do estudo experimental “Atividade das metaloproteinases 2 e 9 e padrões de coloração tumoral pela fluoresceína sódica em cirurgias para gliomas encefálicos”, que está sob a responsabilidade do pesquisador e neurocirurgião Ricardo Jorge Vasconcelos Barbosa, telefone (81) 999242200, que pode ser encontrado pela secretaria de neurocirurgia no quinto andar do HR (endereço Av. Governador Agamenon Magalhães s/n – Derby, Recife – PE, CEP 52010-040 e telefone (81) 31815529) ou pelo email ceudeconcreto@yahoo.com. Também participam dessa pesquisa os pesquisadores Manuela Figueiroa Lyra de Freitas (81-999451030) e está sob a orientação de Jacinto Costa (81-997269509), com email: jacintocosta@hotmail.com.

Caso este Termo de Consentimento contenha informações que não lhe sejam compreensíveis, as dúvidas podem ser tiradas com a pessoa que está lhe entrevistando e apenas ao final, quando todos os esclarecimentos forem dados, caso concorde com a realização do estudo pedimos que rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias, uma via lhe será entregue e a outra ficará com o pesquisador responsável. Caso não concorde, não haverá penalização, bem como será possível retirar o consentimento a qualquer momento, também sem nenhuma penalidade.

A pesquisa tem como objetivo comparar a melhora da cirurgia dos tumores cerebrais, do tipo dos gliomas, com o uso de uma substância corante (fluoresceína sódica) que é aplicada na veia durante a cirurgia. O uso da fluoresceína durante as cirurgias já teve, em várias partes do mundo e também no Brasil, sua segurança testada, em estudos maiores, e tem sido usada por décadas para cirurgias do olho e neurológicas ou para exames da retina, com bastante segurança. Portanto, não se trata aqui de um estudo que pretende testar a segurança da fluoresceína, mas sim comparar os resultados operatórios e de melhora do problema quando nós usamos essa substância durante a cirurgia. O parecer da ANVISA permite o uso da fluoresceína como forma de diagnóstico e tratamento no Brasil.

Existe o risco de reações adversas ao uso do contraste, como anafilaxia, cefaleia ou vômitos, incluindo reações graves com choque e morte. No entanto um teste de anafilaxia com dose ínfima do contraste é aplicado nas pessoas randomizadas para recebe-lo, e, em casos de outras complicações, os hospitais em que o trabalho será desenvolvido dispõem de complexidade quaternária, incluindo múltiplas equipes clínicas e cirúrgicas e UTIs gerais e neurológicas.

Porém, caso o senhor (a) deseje participar da pesquisa, não significa que receberá a fluoresceína durante a cirurgia, pois faz parte do planejamento da pesquisa que metade das pessoas receba e a outra não, pois isso aumenta a precisão científica do trabalho. No entanto, ninguém sai prejudicado. As condições de tratamento, como encaminhamento para realização

de quimioterapia ou/e radioterapia, quando estas estiverem indicadas, ou em relação a data de cirurgia e outras, são idênticas para todos os pacientes, seguindo as normas atuais de funcionamento do departamento de neurocirurgia.

A fluoresceína possui uma cor amarelada que fica na pele da pessoa por cerca de 24 horas. Durante esse período a urina também modifica sua cor, já que o corante é eliminado pela urina.

Não existe nenhum patrocínio e nenhuma empresa privada está envolvida na pesquisa. O nosso objetivo é contribuir com o conhecimento científico na área de tratamento de tumores cerebrais e tentar encontrar maneiras melhores de fazer esse tratamento no Hospital da Restauração.

É garantida a liberdade de retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer tipo de prejuízo. Não há despesas pessoais como também não há remuneração pela participação no estudo. Os dados serão sempre usados de forma impessoal e sem citar nomes, apenas em publicação no âmbito científico.

Agradeço sua colaboração e colocamo-nos a disposição para esclarecimentos sobre os aspectos práticos ou éticos do estudo.

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo “Atividade das metaloproteinases 2 e 9 e padrões de coloração tumoral pela fluoresceína sódica em cirurgias para gliomas encefálicos”, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo(a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento).

Recife, _____ de _____ de 20__.

Assinatura do participante: _____

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participa:

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

APÊNDICE B – FORMULÁRIO DE CADASTRAMENTO DO PACIENTE

FICHA DE PARTICIPAÇÃO NA PESQUISA:

“Atividade das metaloproteínas 2 e 9 e padrões de coloração tumoral pela fluoresceína sódica em cirurgias para gliomas encefálicos. ”

Número na pesquisa: Prontuário HR: Número SERPAT:
 Data de admissão: Data de alta:

1) Dados do participante (admissão):

Nome:
 Data de Nascimento: Idade:
 Endereço:
 Telefone próprio: 2ª opção (nome e número):
 Email:
 HAS: DM: Doença renal (qual):
 Parecer cardiológico:
 Ureia: Creatinina: Glicemia de jejum:

2) História de doença:

Sintoma inicial e mês: Cefaléia:
 Síndrome HIC: Epilepsia controlada:
 Alteração urinária: Hemiparesia: Afasia:
 Disartria: BAV: Confusão:
 Agressividade: Lentificação: Sonolência:
 Coma: Quimioterapia: Radioterapia:

PERÍODO PREOPERATÓRIO

3) Exame físico do internamento:

ECG da entrada: ECG após corticoterapia:

Pupilas: Fundo de olho: Afasia (tipo):

Disartria: Atento: Nível de consciência:

Conteúdo da consciência: MOE: Acuidade a direita:

Acuidade a esquerda: Campo a direita: Campo a esquerda:

KPS: Dose decadron na alta:

4) Radiologia pré-operatória:

TAC Número de lesões: Mensurável: Volume %:

Volume calculado: Área contrastada: Superficial:

Profundo: Eloquente: Próximo a eloquente: Não eloquente:

RNM Número de lesões: Mensurável: Volume %:

Volume calculado: Área contrastada: Superficial:

Profundo: Eloquente: Próximo eloquente: Não eloquente:

APÊNDICE C – FORMULÁRIO PARARANDOMIZAÇÃO DO PACIENTE

(modelo)

List Randomizer

There were 80 items in your list. Here they
are in random order:

1. Fluoresceína
2. Fluoresceína
3. Controle
4. Controle
5. Fluoresceína
6. Fluoresceína
7. Fluoresceína
8. Controle
9. Fluoresceína
10. Fluoresceína
11. Fluoresceína
12. Controle
13. Controle
14. Controle
15. Controle
16. Controle
17. Fluoresceína
18. Controle
19. Fluoresceína
20. Controle
21. Controle
22. Fluoresceína
23. Controle
24. Fluoresceína
25. Fluoresceína
26. Fluoresceína
27. Controle
28. Controle
29. Fluoresceína
30. Fluoresceína
31. Controle
32. Fluoresceína
33. Fluoresceína
34. Controle
35. Controle
36. Fluoresceína
37. Controle
38. Fluoresceína
39. Controle

40. Fluoresceína
41. Fluoresceína
42. Controle
43. Fluoresceína
44. Fluoresceína
45. Controle
46. Fluoresceína
47. Fluoresceína
48. Fluoresceína
49. Controle
50. Controle
51. Controle
52. Fluoresceína
53. Controle
54. Fluoresceína
55. Fluoresceína
56. Controle
57. Controle
58. Controle
59. Controle
60. Controle
61. Fluoresceína
62. Fluoresceína
63. Fluoresceína
64. Fluoresceína
65. Controle
66. Controle
67. Controle
68. Controle
69. Controle
70. Fluoresceína
71. Fluoresceína
72. Controle
73. Controle
74. Controle
75. Controle
76. Fluoresceína
77. Fluoresceína
78. Fluoresceína
79. Controle
80. Fluoresceína

IP: 181.221.122.241

Timestamp: 2017-04-08 22:08:41 UTC

ANEXO A – CRITÉRIOS RANO DE PROGRESSÃO TUMORAL

CRITÉRIOS RANO

Resposta	Critério
Resposta completa	Todos: desaparecimento completo de todas as áreas captantes mensuráveis e não-captantes por 4 semanas; sem novas lesões e lesões não-captantes(T2/FLAIR) estáveis ou melhores; melhora clínica ou estável; sem corticoide ou em dose fisiológica. Nota que pessoas com lesões não-mensuráveis não podem ter resposta completa, mas apenas doença estável.
Resposta parcial	Todos: mais de 50% de redução na soma do produto dos diâmetros perpendiculares da área captante por 4 semanas; estável ou melhor clinicamente; lesões não-captantes (T2/FLAIR) estáveis ou menores, com corticoide em dose mais baixa ou igual do que quando realizada a imagem inicial.
Doença estável	Não é candidato a resposta completa, nem parcial nem progressão; lesões não-captantes (T2/FLAIR) estáveis ou menores com doses iguais ou menores de corticoides em relação ao exame inicial. Quando a necessidade de aumento da dose de corticoide não puder ser confirmada por imagem como progressão, a última neuroimagem mostrando doença estável será aquela antes da elevação da dose do corticoide.
Progressão	Aumento de mais de 25% na soma dos produtos dos diâmetros perpendiculares da área captante comparada com a imagem inicial ou com o período de melhor resposta; aumento significativo da região não-captante, com doses estáveis ou maiores de corticoide em relação à imagem inicial ou com o período de melhor resposta, exceto se o uso for por comorbidades, como alterações pós-operatórias, radioterapia, infarto, isquemia cerebral, desmielinização, convulsões, etc.; aumento considerável na área não-mensurável; aumento na dose do corticoide por piora clínica; deterioração clínica e morte.

Exames iniciais e de acompanhamento devem ser realizados segundo as mesmas técnicas.

Doses estáveis de corticoide incluem pessoas sem uso de corticoide.

ANEXO B – ESCALA DE DESEMPENHO DE KARNOFSKY

Valor	Descrição
100	Normal, sem sinais ou sintomas.
90	Capaz de realizar normalmente as atividades. Pouco sintoma ou sinal.
80	Atividade normal com alguma dificuldade, alguns sintomas ou sinais.
70	Incapaz de trabalhar ou de realizar atividades normais, capaz de cuidados pessoais.
60	Consegue realizar a maior parte dos cuidados pessoais, necessitando de alguma ajuda.
50	Precisa de ajuda frequente e cuidados médicos frequentes
40	Incapaz, requer ajuda e cuidados especiais.
30	Muito incapaz, precisando estar internado.
20	Muito doente, com admissão ou condutas de urgência e suporte vital
10	Moribundo, doença rapidamente progressiva para óbito.
0	Morte.

ANEXO C – REGISTRO DA FLUORESCEÍNA NA ANVISA

Número (10172470003)


Ministério da Saúde


Agência Nacional
de Vigilância Sanitária
www.anvisa.gov.br


UM PAÍS DE TODOS

Institucional
Anvisa Divulga
Serviços
Áreas de Atuação
Legislação
Espaço Cidadão
Profissional de Saúde
Setor Regulado

Detalhe do Produto: FLUORESCEÍNA SODICA OPTHALMOS

Nome da Empresa:	OPHTHALMOS S/A		
CNPJ:	61.129.409/0001-05	Autorização:	8014831
Produto:	FLUORESCEÍNA SODICA OPTHALMOS		
Modelo Produto Médico:	Apresentações: Solução Oftálmica a 1% e 2% embalada em frasco conta-gotas contendo 5mL; Para uso injetável a 10% e 20% embalada em ampola âmbar de 5mL; Para uso injetável a 25% embalada em ampola âmbar de 2mL; Para uso injetável a 10% e 20% embalada em frasco-ampola de 5mL; Para uso injetável a 25% embalada em frasco-ampola de 2mL.		
Registro:	10172470003		
Processo:	25000.011402/94-14		
Origem do Produto	FABRICANTE : OPTHALMOS S/A - BRASIL		
Vencimento do Registro:	18/5/2015		
			<< VOLTAR

Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Setor de Indústria e Abastecimento (SIA) – Trecho 5 – Área Especial 57 - Brasília (DF) - CEP 71205-050 - Tel: (61) 3462-6000 - Disque Saúde: 0 800 61 1997

Copyright © 2003 Anvisa

ANEXO D – TERMO DE COMPROMISSO E CONFIDENCIALIDADE

Título do projeto: “Atividade das metaloproteínas 2 e 9 e padrões de coloração tumoral pela fluoresceína sódica em cirurgias para gliomas encefálicos”

Pesquisador responsável: Ricardo Jorge Vasconcelos Barbosa

Instituição do pesquisador: Universidade Federal de Pernambuco

Telefone para contato: 81-999242200

E-mail: ceudeconcreto@yahoo.com

Os pesquisadores do projeto acima identificado assumem o compromisso de:

- Preservar o sigilo e a privacidade dos voluntários cujos dados e materiais biológicos serão estudados;
- Assegurar que as informações e/ou materiais biológicos serão utilizados, única e exclusivamente, para a execução do projeto em questão;
- Assegurar que os resultados da pesquisa somente serão divulgados de forma anônima, não sendo usadas iniciais ou quaisquer outras indicações que possam identificar o voluntário da pesquisa.

Os pesquisadores declaram que os dados coletados nesta pesquisa e os materiais biológicos ficarão armazenados em pastas de arquivos comuns e virtuais e em caixas de lâminas de histologia, sob a responsabilidade do pesquisador, no endereço Avenida Senador Sérgio Guerra 500, apartamento 303, Piedade, Jaboatão dos Guararapes, CEP 54400-003, pelo período de 5 anos.

Os Pesquisadores declaram, ainda, que a pesquisa só será iniciada após a avaliação e aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco – CEP/CCS/UFPE.

Recife, de de 20..... .

Assinatura Pesquisador Responsável