

**Faculdade de Medicina da USP**  
**Projeto Doutorado**  
**Programa Neurologia**

**Avaliação da atividade do vírus da Zika sobre a progressão  
radiológica e clínica de pacientes portadores de Glioblastoma**

**Pesquisador Executante**

Antônio Santos de Araújo Junior

**Orientador**

Prof. Dr. Guilherme Alves Lepski

São Paulo,  
Setembro de 2017

## Introdução

O vírus da Zika foi primeiramente isolado em 1947 no sangue de macacos *Rhesus* advindos da Floresta Zika na Uganda em uma pesquisa sobre a febre amarela. Desde então ele ficou em estado latente por cerca de 70 anos, até que em 2015 apresentou um surto epidemiológico no Brasil, por uma cepa de vírus originários das Ilhas do Pacífico, tendo se espalhado rapidamente por todo o continente americano.

Em mais de meio século a Zika foi a única doença infecciosa descoberta que se correlaciona com malformações congênitas, e em 2016 foi motivo de alerta global pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e declarada como emergência médica internacional ("Public Health Emergency of International Concern").

## *Epidemiologia*

O vírus da Zika é um flavivírus da família *Flaviridae*. A família *Flaviviridae* envolve inúmeros vírus, tais como o vírus da Dengue, o vírus da Febre Amarela, o vírus da Encefalite Japonesa, e o vírus da febre do Rio Nilo.

O vírus da Zika foi inúmeras vezes isolado de mosquitos *Aedes africanus* depois de 1947, quando este foi descoberto, no entanto foi apenas em 1953 que se descobriu que ele podia infectar seres humanos. Neste estudo residentes de múltiplas áreas da Uganda foram investigados e a taxa de soroprevalência de anticorpos contra o vírus da Zika foi de impressionantes 6,1%, provando ser a infecção frequente naquela população.

Desde então a sua prevalência geográfica só aumentou, tendo sido descrito em pesquisa sorológica no Egito, Leste da África, Nigéria, Índia, Tailândia, Vietnam, Filipinas e Malásia.

A doença relacionada ao vírus da Zika foi primeiramente relatada na Nigéria em 1953, quando se reconheceu que esta poderia causar um quadro febril leve, e desde então apenas 13 outros casos foram relatados num período de 57 anos.

Em 2007 o vírus da Zika retornou, para surpresa da comunidade científica, com um surto epidemiológico nas ilhas do pacífico, e em 2013 e 2014 na Polinésia Francesa, onde admite-se ter infectado cerca de 32.000 pessoas. Nesta re-eremgência da Zika houve pela primeira vez relato de afecção do Sistema Nervoso Periférico (SNP) por Síndrome de Guillain-Barré causada pelo Zika vírus.

#### *Importância epidemiológica do tema*

O vírus da Zika foi primeiramente identificado nas Américas em Março de 2015, quando um surto de doença exantematosa ocorreu no Estado da Bahia, no Brasil. Com início em Fevereiro de 2015, na cidade de Salvador – Bahia, este surto se mostrou absolutamente preocupante, tendo em vista sua extensão geográfica – em Outubro de 2015 já haviam 14 estados federativos brasileiros com relato de Zika – e sua virulência – em Dezembro de 2015 a estimativa do Ministério da Saúde brasileiro era de que houvesse mais de 1.3 milhões de brasileiros infectados pelo Zika.

Em Setembro de 2015 investigadores brasileiros relataram um aumento significativo de crianças nascidas com microcefalia nestes territórios

onde circulava o vírus, atingindo em Fevereiro de 2016 o número preocupante de 4.300 casos de microcefalia no país.

Em Março de 2016 houve 51.473 casos suspeitos de Zika na Colômbia, e reportou-se a presença do vírus em impressionantes 33 países e territórios das Américas.

#### *Ciclo de Transmissão do vírus da Zika*

Na África, o vírus da Zika tem um ciclo silvestre envolvendo primatas e espécies de mosquito aedes. Em zonas urbanas o vírus é transmitido pelo ciclo homem-mosquito-homem, sendo vetores conhecidos duas espécies de mosquito aedes: *A. aegypti* e *A. albopictus*. Estas espécies são as únicas conhecidas nas américas. O *A. aegypti* vive em áreas tropicais e subtropicais, enquanto o *A. albopictus* vive em áreas temperadas. Na Ásia há outras duas espécies, reconhecidas como vetores dos surtos da Polinésia Francesa: *A. hensilli* e *A. polynesiensis*.

A despeito de quatro espécies de vetores, sem dúvida o *A. aegypti* é o que tem a maior capacidade vetorial (habilidade do vetor em transmitir um patógeno em uma determinada localização por um determinado tempo), por se alimentar prioritariamente de humanos, picar inúmeras pessoas por refeição, ter a picada imperceptível, e viver em habitações humanas.

Outra forma de transmissão do Zika é aquela que ocorre da mãe para feto durante a gestação, chamada de transmissão vertical. O RNA do Zika vírus já foi identificado no líquido amniótico de fetos cuja ultrassonografia revelava anormalidades cerebrais, assim como antígenos virais e RNA foram

identificados em tecido cerebral e placentas de bebês nascidos com microcefalia e que foram a óbito logo após o nascimento.

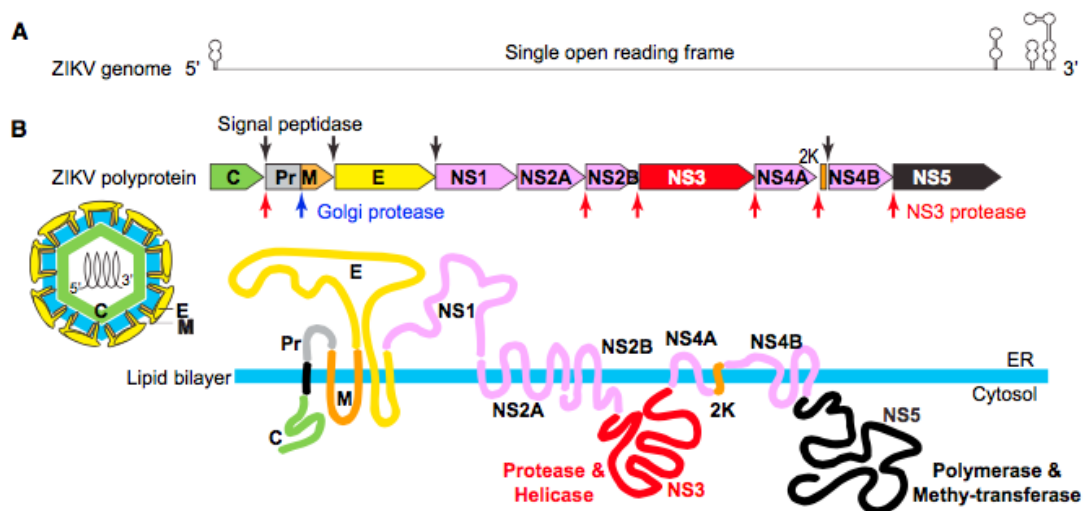
Transmissão peri-parto do Zika também foi relatada em duas ocasiões. O RNA do vírus foi identificado no sangue dos dois bebês, enquanto um apresentou afecção cutânea com trombocitopenia e o outro se manteve assintomático.

Transmissão sexual do vírus também já foi relatada, sendo que o RNA do vírus pôde ser identificado no esperma de homens que desenvolveram a doença em até 62 dias após a primeira manifestação. A transmissão sanguínea por doação de sangue ainda está sob análise, no entanto durante o surto na Polinésia Francesa 3% das bolsas de sangue testadas apresentavam o vírus. Outrossim a transmissão via leite materno ainda está em investigação, mas sabe-se que a concentração do vírus no leite materno alcança uma titularidade muito alta.

#### *Estrutura molecular do vírus da Zika*

O genoma do vírus da Zika consiste em uma cadeia única de RNA de aproximadamente 11.000 nanômetros de comprimento, que agregam uma cadeia única codificadora localizadas entre os códons topológicos 3' e 5' (Figura 1).

Esta cadeia única possibilita leitura direta do RNA com formação de mRNA que codifica uma poliproteína grande com mais de 3.000 aminoácidos, que é clivada tanto no vírus quanto na célula hospedeira em 10 outras proteínas através de enzimas proteases. Três dessas novas proteínas são proteínas estruturais que produzem partículas virais, e sete destas proteínas participam da replicação do RNA.



**Figure 1:** (A) Diagrama do genoma do Zika vírus. (B) Estratégia de processamento e transcrição de proteínas. A poliproteína codificada é clivada em vários pontos tanto no vírus quanto na célula hospedeira, por proteases e peptidases. O arranjo topológico permite que a bicamada lipídica – azul – envolva a estrutura de nucleocapsídeos – proteína capsídea, c, com RNA replicado dentro – e ainda permita a aderência da membrana externa – e.

A membrana externa viral, também chamada de envelope, é decorada com a proteína M e E, duas glicoproteínas transmembrana fundamentais no processo de invasão da célula hospedeira. E é a proteína de adesão celular receptor-mediada e a proteína M previne a adesão precoce. A clivagem da

proteína M pela protease no complexo de Golgi da célula hospedeira marca o estágio de maturação viral, e inicia a saída da célula pela via secretória.

## **Manifestação clínica**

### *Estado febril agudo*

O período de incubação do vírus da Zika é desconhecido, mas estima-se que seja similar aos outros flavivírus, menos de uma semana. Em voluntários um período febril após 82h de incubação subcutânea do vírus ocorreu, durando em média 4 dias. Durante o surto na Polinésia Francesa, dos receptores de sangue contaminado, 26% apresentou conjuntivite, rash cutâneo ou a combinação destes sintomas 3 a 10 dias após a transfusão.

Sintomas comuns da manifestação clínica do Zika são: rash cutâneo máculo-papular (90%), febre (65%), artrite ou artralgia (65%), conjuntivite não-purulenta (55%), mialgia (48%), cefaleia (45%), dor retro-orbitária (39%), edema (19%) e vômitos (10%). Geralmente o rash cutâneo é associado a prurido, e a febre quando presente é baixa e de curta duração. Outros sintomas também relatados são a hematospermia, inchaço das mãos, audição metálica, e o sangramento subcutâneo.

### *Complicações neurológicas*

Um surto temporal e geográfico de Guillain-Barré foi associado com o surto de Zika no Pacífico e nas Américas. Na Polinésia Francesa, 38 casos de Guillain-Barré foram relatados num universo de 28.000 pessoas atendidas com suspeita de Zika, demonstrando uma associação muito importante (odds ratio >34), todos comprovados por estudo eletrofisiológico mostrando uma

polineuroradiculite axonal motora aguda. Outrossim meningoencefalite e mielite aguda também foram associadas ao Zika.

### *Malformações congênitas*

As malformações do sistema nervoso central durante embriogênese causadas pelo Zika vírus ainda estão para ser elucidadas. Acredita-se que assim como outros patógenos, rubéola e citomegalovírus (CMV), o acometimento no primeiro trimestre, principalmente nas primeiras 10 semanas de vida gestacional, parecem acarretar em malformações mais graves e complexas.

As malformações congênitas associadas a infecção materna por rubéola envolvem perda auditiva neurosensorial, catarata e outras anormalidades oculares, anomalias cardíacas e neurológicas: retardo mental, isquemia cerebral, e microcefalia.

Por sua vez as malformações fetais causadas pela infecção materna pelo CMV envolvem perda auditiva neurosensorial, coriorretinite, microcefalia, retardo mental e paralisia cerebral.

Outras causas de microcefalia são: síndromes genéticas, isquemias placentárias, deficiência nutricional e exposição a certas toxinas, como o mercúrio.

Microcefalia é resultado do pequeno perímetro cefálico quando pareado com a idade gestacional e sexo do feto, e é definido por circunferência occipitofrontal menor que o terceiro percentil. A microcefalia indica sempre problemas com crescimento do tecido cerebral. Sua prevalência nos Estados Unidos é de 6 casos por 10.000 nascidos vivos.



Estudos preliminares brasileiros demonstraram a incidência de malformações fetais pela Ultrassonografia em 29% das mães infectadas durante a gravidez. Morte fetal prematura ocorreu por infecção desde a 6<sup>a</sup> à 32<sup>a</sup> semana de gestação. Malformação ocular foram encontradas em 35% das crianças com microcefalia (10 em 29 crianças), sendo as principais atrofia corioretiniana e hipoplasia de nervo óptico e papila.

## **Diagnóstico**

O diagnóstico de rotina do Zika vírus é através da detecção de ácido nucleico viral em exame de PCR ou através da detecção de anticorpos Ig-M anti-Zika por exame ELISA. A detecção do ácido nucleico viral no soro é o diagnóstico de certeza da doença, no entanto a viremia é transitória, e a detecção por PCR é mais sensível com 1 semana do início dos sintomas.

Em contrapartida a detecção de RNA viral ou a detecção de anticorpos Ig-M é mais duradoura, ocorrendo desde o final da primeira semana da manifestação clínica até meses. Assim recomenda-se a triagem por teste PCR na primeira semana após sintomas, e de ELISA nas amostras negativas após a primeira semana, para se aumentar a acurácia terapêutica.

A imunidade cruzada entre os flavivírus dificulta a interpretação dos resultados sorológicos com pesquisa de anticorpos. Pessoas recém-infectadas pela Zika podem manifestar ELISA positivo para dengue e vice-versa. Testes laboratoriais específicos para se distinguir a imunidade cruzada existem mas são dispendiosos e trabalhosos, de pouca aplicação prática. No dia-a-dia um teste ELISA positivo para Zika e negativo para dengue são presuntivos de infecção pelo Zika vírus.

Testes antenatais ou pré-natais para Zika ainda são motivo de pesquisa, sabe-se apenas que o PCR no líquido amniótico, o PCR ou ELISA do sangue do cordão umbilical e mesmo o estudo imunohistoquímico das perdas fetais são potencialmente diagnósticos de infecção pelo Zika.

O diagnóstico da microcefalia geralmente é feito através do ultrassom gestacional, onde se encontram outras malformações associadas, tais como: agenesia de corpo caloso, hidranencefalia, calcificações cerebrais, dilatação ventricular, atrofia cerebral, hidropsia fetal, ausência de líquido amniótico e retardo de crescimento intrauterino.

### **Tumores cerebrais primários – Gliomas**

#### *Prevenção, diagnóstico e screening*

A incidência anual de gliomas, incluindo Glioblastomas, é de cerca de seis novos casos por 100.000 indivíduos no mundo. O diagnóstico é realizado por exames de imagem tais como Tomografia Computadorizada do Crânio (TCC) ou pelo exame de Ressonância Nuclear Magnética (RNM) do Crânio, no entanto a RNM apresenta maior sensibilidade na detecção de lesões pequenas. Não há até o momento marcadores sorológicos para detecção de gliomas.

Estas lesões podem evoluir rapidamente em semanas ou meses, sendo muitas vezes diagnosticadas quando já se encontram volumosas, dificultando sobremaneira a prevenção ou mesmo a intervenção precoce.

A prevenção e o screening deve ser reservado apenas para indivíduos com predisposição genética ou síndrome familiar – Neurofibromatose Tipo I, Síndrome de Turcot ou Síndrome de Li Fraumeni. Outrossim, fatores de risco

para o desenvolvimento de tumores cerebrais devem ser levados em conta, tais como exposição à radiação.

### *Apresentação clínica*

A evolução dos sinais e sintomas neurológicos permite geralmente a estimativa do crescimento dinâmico destes tumores. Tumores que apresentam sintomas em semanas provavelmente são de crescimento rápido exponencial, enquanto tumores que se manifestam em anos são de crescimento lento.

A apresentação clínica se dá por crise convulsiva inédita, ou déficit neurológico focal (fraqueza, desvio de rima labial, dificuldade de fala, apatia ou alteração de comportamento e demais distúrbios neurocognitivos), ou ainda por sintomas de aumento da pressão intracraniana – cefaleia, vômitos e rebaixamento do nível de consciência.

O exame físico é focado para detecção de câncer sistêmico e para contraindicações de procedimento neurocirúrgico, enquanto que o exame neurológico é focado em graduação de déficits e de performance neurológica, segundo escala de Karnofsky ou escala de performance da OMS. Avaliação neuropsicológica é fundamental, desde aplicação do Mini Exame do Estado Mental e Montreal Cognitive Assesment (MoCA), até uma avaliação mais detalhada especializada.

### *Exames complementares*

A RNM de crânio, incluindo as sequencias T2 e FLAIR, T1 pré e pós-Gadolínio, em pelo menos no plano axial, é o método de escolha para

detecção dos gliomas e mesmo para seguimento destas lesões no pós-operatório. Ademais, TCC mostrando calcificação intralesional, angiografia cerebral e PET com aminoácidos podem revelar hotspots para biópsia.

Coleta de líquido lombar muitas vezes se mostra inócua na detecção de gliomas, devendo ser realizada apenas em casos de dúvida diagnóstica, e após afastada possibilidades de hipertensão intracraniana por efeito de massa lesional.

Eletroencefalografia é útil para se estudar padrões epileptiformes das epilepsias secundárias ao tumor e investigação de outras causas de rebaixamento do nível de consciência, tais como Estado de Mal-epiléptico Não-convulsivo.

### *Manejo pré-operatório*

O manejo destes pacientes deve seguir uma rotina de discussão multidisciplinar, com equipe formada por neurocirurgiões, neurologistas, neuroradiologistas, neuropatologistas, neurooncologistas e radioterapeutas, para se preparar o melhor armamentário clínico e cirúrgico caso-a-caso.

O uso de corticoides no preparo pré-operatório deve ser instituído para se diminuir o edema perilesional, com exceção de suspeita de linfoma ou lesão de natureza inflamatória.

Pacientes com história prévia de crises convulsivas devem ser iniciados com profilaxia medicamentosa anticonvulsivante, de preferência com aqueles que não interferem com o tratamento adjuvante de quimioterapia, tais como Levotiracetam ou Lacosamida. Pacientes virgens de

crises convulsivas não se beneficiam com a profilaxia, e não devem ser iniciados com anticonvulsivantes.

### *Ressecção cirúrgica*

A decisão terapêutica nos gliomas depende da análise histopatológica e ainda de marcadores moleculares, de forma que a cirurgia é realizada com fins diagnósticos e terapêuticos.

A técnica cirúrgica destas lesões geralmente envolve a localização exata por Neuronavegação, com estudo de trajetória e acessibilidade, e a ressecção máxima segura por microscopia, com base em estudo eletrofisiológico intraoperatório.

Em lesões profundas e com risco acentuado de morbidade peroperatória biópsias estereotáticas podem ser realizadas com mínimo risco, algumas vezes sob anestesia local, e permitindo a coleta de múltiplos fragmentos. Seja pela peça em bloco ou por microfragmentos, a análise patológica se tornou imprescindível nas últimas décadas para a definição terapêutica.

### *Classificação histológica e diagnóstico molecular dos Gliomas*

O exame de congelação intraoperatório através do esfregaço de fragmentos do tumor cerebral permite a análise histológica para definição diagnóstica e programação da extensão de ressecção cirúrgica. Os demais fragmentos assim como a peça operatória seguem para análise de rotina por parafina com coloração de hematoxilina-eosina e posteriormente exame imunohistoquímico e molecular.

O diagnóstico histopatológico segue a classificação da OMS, sendo a última revisão de 2016, e confere à equipe terapêutica a informação do comportamento biológico da lesão, opções de tratamento, prognóstico e sobrevida destes doentes.

Esta última classificação da OMS atribue à mutação do IDH 1 (isocitrato desidrogenase) – códon 132 e IDH 2 – códon 172 papel preponderante no diagnóstico dos gliomas difusos, gliomas anaplásicos e oligodendrogliomas, agora classificados como tumores IDH-mutados.

Tumores oligodendrogliais têm a codeleção 1p/ 19q. Astrocitomas difusos e astrocitomas anaplásicos com *IDH-wild-type* são descritos como entidades provisórias. Oligoastrocitomas e gliomatose cerebri não são classificados como entidades distintas dos gliomas, tendo em vista sua similaridade genética e epigenética. No entanto gliomas difusos de linha média (tálamo, tronco encefálico e medula espinhal) são classificados à parte, como tumores histona H3-K27M mutantes, pela presença de mutação no códon 27 e troca de lisina por metionina nas histonas H3.3 e H3.1.

Quatro marcadores moleculares são fundamentais segundo a classificação da OMS de 2016: mutação do IDH, codeleção 1p/ 19q, mutação histona H3-K27M, e O<sup>6</sup>-metilguanina DNA metiltransferase promotor da metilação (MGMT). Os três primeiros norteiam a classificação histológica, enquanto o MGMT serve para decisão a cerca da quimioterapia com agente alquilante Temozolamida. A definição do status da metilação do promotor MGMT deve ser realizada por testes genéticos moleculares tais como PCR metilação-específica, e não pelo exame imunohistoquímico, sob pena de perda de acurácia do método. Por sua vez a definição por imunohistoquímica

da perda da expressão nuclear do ATRX nos tumores IDH-mutados é característica dos gliomas astrocíticos. Por outro lado a manutenção da expressão nuclear do ATRX deve ser seguida pela análise da codeleção 1p/19q para distinção do glioma astrocítico com o oligodendroglioma.

Já os glioblastomas apresentam uma peculiaridade molecular, principalmente aqueles secundários, que decorrem de malignização de um glioma de baixo grau, apresentam uma mutação *wild-type* do IDH geralmente associada com a perda da expressão nuclear do ATRX.

Técnicas de última geração de sequenciamento ou *microarray* devem em pouco tempo suplantam a classificação molecular isolada.

## **Considerações gerais para tratamento dos Gliomas**

### *Fatores prognósticos*

Idade e boa performance neurológica são fatores isolados de bom prognóstico nos gliomas. A extensão da ressecção é um importante fator prognóstico dependente da terapia, com exceção dos tumores oligodendrogliais que respondem muito bem à quimioterapia. Marcadores moleculares de bom prognóstico são a mutação do IDH e a presença de codeleção 1p/19q.

### *Tratamento cirúrgico*

O tratamento cirúrgico padrão para os gliomas envolve a ressecção microscópica máxima segura de tumor com a intenção de melhora dos sintomas neurológicos. Vários armamentários tecnológicos permitem a segurança da técnica cirúrgica, incluindo o uso de sistema de navegação

para localização do tumor (neuronavegador), RNM intraoperatória, ultrassom intraoperatório, monitorização funcional eletrofisiológica, uso de pó liofilizado fluorescente do cloridrato do ácido 5-aminolevulínico para visualização de glioblastomas, aumentando assim a ressecção cirúrgica e minimizando a morbidade do procedimento.

O uso de potencial evocado motor ou sensitivo, eletromiografia ou mapeamento cerebral em cirurgias com paciente acordado para se monitorizar a linguagem ou a cognição, deve ser reservado para tumores em áreas eloquentes. A prevenção de déficit novo ou permanente deve ser o marco da cirurgia, tendo em vista que a cirurgia não é curativa, existindo doença infiltrativa muito além da lesão identificada pela RNM. Sendo assim a qualidade de vida deve sempre ser a prioridade no tratamento destas lesões.

O resultado da cirurgia deve sempre ser identificado por exame de RNM em 24-72 horas após o procedimento. Um resíduo tumoral muito grande tende a ser um fator de mau prognóstico, no entanto na literatura até então não há confirmação de que a extensão da ressecção impacte a sobrevida ou mesmo se os tumores submetidos à cirurgia têm um comportamento biológico distinto.

### *Radioterapia*

O objetivo da radioterapia no gliomas é se obter um controle local da doença adequado sob um risco-benefício aceitável. A radioterapia preserva função e aumenta a sobrevida dos doentes portadores de glioma. Indicações segundo timing, dose de entrega, e meio de fracionamento dependem do diagnóstico e do prognóstico dos doentes, considerando idade, performance



de Karnofsky, e extensão da ressecção. Radioterapia focal em glioblastomas, por exemplo, é realizada com dose total de 60 Gy fracionadas em aplicações diárias de 2 Gy, durante seis semanas. Radioterapia hipofracionada (15 x 2,67 Gy) é apropriada para pacientes idosos com fatores de mau prognóstico. A área de captação de contraste em RNM T1 e o leito cirúrgico são considerados para cálculo de volume tumoral. A margem de 1,5-2,5 cm além da área de hiperintensidade em imagem T2 ou FLAIR é adicionado ao volume tumoral para cálculo de volume alvo. Neste volume alvo áreas de alteração de sinal distantes podem ser incluídas ou mesmo estruturas nobres eloquentes podem ser retiradas para cálculo final (nervos ópticos, quiasma óptico, retina, tronco encefálico, hipófise, cóclea e hipocampos). Outra margem de 0,3-0,5 cm além do volume alvo deve ser adicionada para correção de possíveis erros de cálculo ou mesmo para corrigir o movimento do paciente durante a aplicação.

Novas técnicas de radioterapia, como IMRT – intensidade modulada – e radioterapia guiada por imagem ou estereotáctica para doença recidivada, prometem melhor entrega de dose com mínimo *fall-off* da radiação. Em crianças ou em tumores profundos em adultos a braquiterapia intersticial ou a radioterapia com prótons, disponível apenas em grandes centros médicos americanos, podem ser uma opção.

### *Quimioterapia*

Quimioterapia citotóxica é parte do tratamento de grande parte dos gliomas, geralmente à base de agente alquilante imunossupressor – Temozolamida. Toxicidade hematológica, hepática e renal são descritos com

uso desta medicação. Critérios de exclusão para tratamento incluem doenças cardíacas ou pulmonares graves ou mesmo presença de quadro infeccioso.

A Temozolamida é um agente oral alquilante de DNA com boa penetração pela barreira hematoencefálica, muito usado na neurooncologia, em geral muito bem tolerado, com poucos riscos, sendo o principal a mielosupressão com trombocitopenia. Outros agentes como a nitrosuréias, procarbazina, lomustina, carmustina, nimustina, fotemustina, também usados na neurooncologia, têm efeitos mielossupressores mais prolongados e temíveis, a ponto de necessitar suspensão do tratamento.

As nitrosuréias se tornaram tratamento de segunda escolha (após Temozolamida) para os gliomas na Europa, sendo que alguns centros advogam o uso de PCV (procarbazina-carmustina-vincristina) como primeira escolha. Braquiterapia com carmustina no leito cirúrgico parece ter efeito modesto no tratamento de pacientes com astrocitoma anaplásico e glioblastomas, em cujo tratamento sistêmico não é uma opção.

Drogas anti-angiogênese como o bevacizumabe (anticorpo anti-VEGF – fator de crescimento vascular endotelial) são uma opção de resgate nos glioblastomas recidivados, apesar de até o momento não haver biomarcador, tumoral ou plasmático, preditor de resposta a este tratamento.

### ***Follow-up dos pacientes com Gliomas***

O retorno destes pacientes para seguimento deve ser realizado a cada 3 meses, seguidos de exames de RNM, no entanto este intervalo pode ser estendido nos casos de tumores indolentes ou doença sob controle. Em caso de suspeita de progressão de doença a RNM deve ser antecipada para

intervalos de 4-6 semanas. Pseudoprogessão e pseudoresposta ocorrem geralmente nos primeiros três meses após o tratamento. Por isso a RNM merece análise cuidadosa neste período, muitas vezes com o uso de RNM com sequencia de perfusão, para se distinguir áreas quentes correspondentes à progressão, de áreas frias – pseudoprogessão.

É preciso ter em mente situações especiais tais como a presença de glioma em gestantes. Gliomas de baixo grau podem crescer significativamente durante a gestação. Investigação radiológica deve ser realizada por RNM sem contraste Gadolínio, e indicação de radioterapia ou quimioterapia deve ser reservada apenas ao puerpério. Tratamento cirúrgico para tumores com hipertensão intracraniana pode ser uma opção nestes casos.

## **Tratamento dos Glioblastomas (GBM)**

A maioria dos glioblastomas são IDH-wild-type mutados, e expressam segundo a última classificação da OMS as seguintes variantes: glioblastoma de células gigantes, gliosarcoma e glioblastoma epitelióide. Até o momento não existe tratamento específico do GBM de acordo com suas variantes morfológicas. Cerca de 50% dos glioblastomas epitelióides expressam mutação *BRAF*<sup>V600E</sup>, e o uso de inibidores de BRAF ainda está em análise nesta pequena parcela de GBM.

O tratamento do GBM (OMS grau IV) é indistinguível do tratamento do astrocitoma anaplásico (OMS grau III). Estudos randomizados com pacientes acima de 65 anos portadores de glioma grau III ou IV mostraram

superioridade da ressecção cirúrgica sobre a biópsia, e ainda da ressecção completa sobre a ressecção parcial.

A radioterapia se mostrou válida no tratamento dos GBM desde a década de 80, a grosso modo dobrando a sobrevida. A dose de tratamento habitual é de 60 Gy fracionados em 2 Gy/dia. Pacientes idosos ou com baixa performance neurológica (Karnofsky abaixo de 70) são tratados com regime hipofracionado (50 Gy em 15 frações). Até o momento nenhuma outra forma de fracionamento ou mesmo adjuvância comprovou aumentar a sobrevida dos pacientes com GBM, tampouco apresentou vantagem sobre o regime padrão de quimio-radioterapia, dentre eles os regimes de hiper- ou hipofracionamento acelerado, braquiterapia, radiocirurgia, ou boosts de radioterapia estereotática.

A concomitância de quimio-radioterapia nos pacientes portadores de GBM é o tratamento padrão destas patologias, indicado para pacientes com boa performance clínica e neurológica e com idade inferior à 70 anos. O estudo EORTC 26062 do Instituto Nacional de Câncer do Canadá, no qual se comparou a sobrevida total dos pacientes idosos (> 65 anos) com glioblastoma *de novo* nos braços Temozolamida com Radioterapia hipofracionada (40Gy em 15 frações) vs radioterapia sozinha, concluiu que a quimio-radioterapia é superior à radioterapia sozinha. Portanto a temozolamida não perde a sua eficiência em decorrência da idade do paciente.

Outrossim a temozolamida apresenta maior eficácia em glioblastomas MGMT metilados. Nos pacientes idosos com tumores não-metilados, segundo o Estudo Nórdico e o NOA-08, o tratamento envolve a radioterapia

sozinha hipofracionada, enquanto nos metilados envolve a temozolamida sozinha (5 dias por 28 dias) até a progressão ou por 12 meses. Nos pacientes onde o perfil do MGMT não é conhecido deve-se pesar a prescrição da temozolamida caso-a-caso, contanto que não se perca a oportunidade de tratamento inicial concomitante com radioterapia, e manutenção de pelo menos 6 ciclos da quimioterapia. A quimioterapia costuma ser bem aceita, com mínimos efeitos adversos, principalmente de ordem hematológica, leucopenia e plaquetopenia.

A braquiterapia no leito cirúrgico com carmustina quando associada à radioterapia parece prolongar a sobrevida de doentes com GBM em tratamento de primeira linha, principalmente quando a ressecção cirúrgica da área captante é superior à 90%.

A associação de Bevacizumabe (Avastin ®) ao tratamento padrão de quimio-radioterapia aumentou a sobrevida-livre-de-progressão em 3-4 meses, no entanto não impactou a sobrevida total de pacientes com GBM *de novo*. No entanto a avaliação de progressão baseada em exame de RNM fica dificultada com o uso de Bevacizumabe, tendo em vista o tratamento diminuir significativamente a área captante de contraste por efeito anti-angiogênico. Outrossim o estudo RTOG 0825 alarmou a comunidade científica quanto aos efeitos precoce de declínio cognitivo nos pacientes tratados com Bevacizumabe. Portanto esta medicação não está liberada para uso em pacientes com GBM *de novo*, mas sim como resgate por progressão após tratamento convencional. Pacientes sintomáticos com tumores extensos com muito efeito de massa perilesional e resistentes à corticoterapia também são passíveis de tratamento com Bevacizumabe.

Pelo risco de declínio cognitivo precoce somado ao fato de que apenas 30% dos pacientes respondem ao tratamento, além de que não impacta na sobrevida total dos pacientes, a União Européia não liberou o Bevacizumabe para uso nos GBM recorrentes, a despeito do que ocorre nos Estados Unidos da América.

Outras alternativas para resgate após progressão são as nitrosuréis e o re-tratamento com temozolamida. Lomustina é uma opção de resgate, tendo apresentado taxas de sobrevida-livre-de-progressão em torno de 15-25% em 6 meses. Outras taxas similares vê-se em re-tratamento com temozolamida, no entanto este deve ser reservado apenas para tumores metilados. O estudo BELOB demonstrou sobrevida até 9 meses superior no grupo de pacientes com GBM tratados com concomitância de bevacizumabe e lomustina, no entanto este achado não se confirmou pelo EORTC 26101 fase III.

Tratamentos alternativos como o uso de capacete para emissão de pulsos elétricos inibitórios sobre a atividade mitótica tumoral (Novocure®) se mostrou promissor em estudos clínicos randomizados de fase III. Nestes estudos se observou uma maior sobrevida-livre-de-progressão e ainda sobrevida total no braço de doentes tratados com Novocure® + tratamento convencional vs tratamento convencional sozinho (razão de risco 0,74, 95% CI 0,56-0,98, p0,03). No entanto outros trabalhos de fase III não confirmaram este achado, ou qualquer superioridade do método sobre a melhor prática atual. Ademais os custos para a implantação deste método e as limitações da qualidade de vida destes doentes, pela necessidade de sessões prolongadas com o capacete, devem ser levadas em consideração.

O papel do re-tratamento cirúrgico na recorrência dos GBM ainda é controverso. O tratamento prévio, a idade do paciente, o escore de performance de Karnofsky e o padrão de progressão devem ser considerados para tomada de decisão. Cerca de 20-30% dos pacientes sintomáticos com tumores circunscritos – onde a chance de ressecção completa da lesão captante é alta, com intervalo de 6 meses da primeira cirurgia – vão se beneficiar da reoperação.

## **Virologia**

As cepas infectantes atuais do vírus da Zika são originárias do Leste Africano (Cepa nigeriana), enquanto que as cepas do surto americano são originárias do genótipo Asiático, muito similares àquelas que causaram o surto no Camboja, Tailândia e Polinésia Francesa. Todos os vírus circulantes no continente americano são geneticamente muito semelhantes (99% de homologia de nucleotídeos). Essa semelhança genética favorece o desenvolvimento de uma vacina única para todas as cepas.

## **Histórico e desenvolvimento da Imunoterapia**

No início do século 19 surge o conceito de que patógenos poderiam auxiliar no tratamento do câncer. O primeiro a difundir esta idéia foi o proeminente cirurgião nova-iorquino William B. Coley, que em 1891 notou o desaparecimento de um sarcoma recidivado cervical de uma criança após uma infecção estreptocócica de pele (erisipela). Em investigação naquela data ele recebeu inúmeras notificações de outros cirurgiões totalizando 38

casos de sarcomas e carcinomas que melhoraram após infecções superficiais, principalmente erisipelas.

Pouco tempo depois Dr Coley começou a inocular *Streptococcus* no subcutâneo de pacientes com sarcomas, com vários graus de sucesso, o que pode ser reconhecido como o primeiro tratamento por Imunoterapia. Alguns relatos falavam até em acréscimo de 8 anos de sobrevida destes doentes com o tratamento com as "toxinas".

Foi apenas no século 20 com a descoberta de citocinas (interleucinas, fator de necrose tumoral) que estes adventos da imunoterapia puderam render frutos com terapias mais diretas e mais seguras. Dr Coley agora passa à história como o "Pai da Imunoterapia", tendo descoberto e exposto para a comunidade científica os efeitos oncolíticos dos patógenos externos.

#### *Os primórdios da virologia como tratamento para o Câncer*

Em 1904, uma associação entre uma infecção viral levando à melhora do câncer foi feita por Dr Dock, em uma mulher de 42 anos portadora de leucemia que entrou em remissão após um quadro gripal. Em 1912 Dr De Pace testemunhou a regressão de um carcinoma cervical após a vacinação antirábica proposta por Pasteur. No decorrer do século inúmeras publicações relacionavam a remissão de câncer hematológico com viroses, no entanto sem remissão a longo prazo. Uma infinidade de vírus foi tentada como tratamento de tumores hematológicos (sarampo, catapora, caxumba, etc), com resultados temporários, sem sinais de cura ou remissão duradoura.



Até que com o advento das técnicas de biologia molecular os vírus puderam ser modificados para aumentar sua infectividade e seletividade para células cancerígenas.

#### *O uso de patógenos em Glioblastomas*

Em meados do século 20, médicos austríacos descobriram que esporos de uma bactéria não-patogênica *Clostridium butyricum* poderia induzir uma necrose liquefativa do tecido tumoral. O microambiente hipóxico com bastante substrato proliferativo poderia ser ideal para o desenvolvimento destas bactérias. Passou-se então às pesquisas clínicas, cujos resultados foram decepcionantes, dos 49 pacientes com glioblastoma que receberam infusão intracarotídea de esporos da bactéria, 19 morreram em decorrência de encefalite ou formação de abscesso cerebral, e o restante após recidiva tumoral, sem nenhum acréscimo na sobrevida total.

Nas últimas décadas, houve várias publicações que associavam um aumento de sobrevida dos glioblastomas com infecções bacterianas. Em 1999, Bowles e Perkins reportaram efeitos oncolíticos nos glioblastomas com concomitância de infecção por *Enterobacter aerogenes* após a cirurgia. Em 2009 Bohman et al. e em 2011 De Bonis et al. relataram drástico aumento de sobrevida em pacientes com glioblastoma após infecções pós-operatórias.

Pesquisadores da Califórnia implantaram *E. Aerogenes* na cavidade cirúrgica de glioblastomas, no entanto após cobertura extensiva midiática e questionamentos bioéticos aos métodos empregados, três pacientes testados morreram e dois neurocirurgiões tiveram suas licenças cassadas.

### *Viroterapia em Glioblastomas (GBM)*

A viroterapia no tratamento oncológico teve um avanço significativo nas últimas décadas na medida em que os pesquisadores conseguiram modificar o genoma viral e neutralizar sua toxicidade.

Em 1991, Martuza et al. desenvolveu por engenharia genética o primeiro herpes vírus com características oncolíticas. Em 2000, estes vírus foram testados no tratamento dos glioblastomas em estudos de fase I, com resultados encorajadores. Os gliomas são candidatos ideais para viroterapia tendo em vista sua natureza altamente replicativa, sem metástases à distância e com isolamento de microambiente pós-mitótico, sem possibilidade de contágio peritumoral. O método oncolítico empregado por estes vírus envolve a replicação viral nas células tumorais, com consequente lise celular e disseminação viral, e sua predisposição pelas células tumorais se dá pela sinalização oncogénica e pela alta taxa de turnover das células cancerígenas.

Outras linhas de pesquisa envolvem o desenvolvimento de terapia gênica nos GBM com uso de vetores virais tais como adenovírus. Inicialmente estas terapias focavam em restabelecer mecanismos perdidos de supressão tumoral com a reintrodução de genes do *p53* ou *quinase-dependente-de-ciclina*, no entanto em ensaios clínicos esta técnica infelizmente não pareceu impactar a sobrevida destes doentes. Técnicas mais atuais de terapia gênica com vetores virais no tratamento de GBM envolvem a introdução de "genes suicidas" (timidina quinase ou citocina deaminase) no material genético das células tumorais.

### *Efeitos do Zika vírus sobre a neurogênese*

Em nível celular, o vírus da Zika infecta prontamente as células progenitoras neurais corticais, afetando a progressão do ciclo-celular e induzindo a apoptose celular. Em experimentos in-vitro, em culturas de células-tronco pluripotentes induzidas e derivadas de células somáticas, 2D, o vírus da Zika infecta rapidamente aquelas células progenitoras neurais recém-formadas.

Em nível molecular, o Zika causa uma desregulação do sistema de sinalização celular proteico, levando a down-regulation dos genes do ciclo-celular e ao up-regulation dos genes de apoptose. Mais tarde outras pesquisas comprovaram este tropismo do vírus por células progenitoras neurais (CPN), e conseguiram topografar o receptor de membrana da via tirosina quinase AXL (responsáveis pela invasão celular nas CPN) como o alvo da ação do Zika e sua consequente interrupção da neurogênese.

Inúmeros estudos comprovaram esta interrupção da neurogênese causada pelo Zika em cultura de células-tronco pluripotentes induzidas humanas e ainda células progenitoras neurais embrionárias humanas, tanto em culturas 2D quanto em culturas 3D com neuroesfera. O tamanho das neuroesferas infectadas pelo Zika era significativamente menor do que aquelas controle, 96 horas após o contágio.

Outrossim em estudos com organóides cerebrais (micro-cérebros) com cultura 3D de células-tronco pluripotentes induzidas humanas, que simulam fielmente o desenvolvimento embrionário do cérebro humano, tanto pela organização estrutural quanto pelas propriedades e assinaturas moleculares, a infecção pelo Zika pôde ser minuciosamente avaliada. Nestes modelos com

organoides humanos a infecção pelo Zika comprovou sua predileção pelas células radiais da glia e pelas células progenitoras de neurônios imaturos, levando a redução da proliferação neuronal e com indução da apoptose celular. No cérebro humano em desenvolvimento existe uma imensa população de células radiais da glia na periferia da zona subventricular, que são responsáveis evolutivamente pelo aumento no número de células e pela complexidade do córtex cerebral humano.

A infecção pelo Zika provou reduzir a espessura do córtex cerebral em modelos organoides tanto humanos como em primatas, sugerindo não haver impacto ou diferença do Zika sobre diferentes espécies, levando em último estágio à microcefalia. Ou seja em inúmeros estudos com diferentes modelos experimentais, incluindo cultura de células 2D, 3D neuroesferas, organoides cerebrais humanos, tecido cerebral embrionário, modelos animais (camundongos e primatas), pode-se concluir: as células progenitoras neurais de cérebro de mamíferos são particularmente vulneráveis para infecção pelo Zika com impacto patológico significativo.

#### *Efeitos do Zika vírus sobre células de Glioblastoma*

O primeiro relato da possível atividade do vírus da Zika sobre células de gliomas, em especial de Glioblastomas (GBM), foi publicado na revista Nature Medicine em Outubro de 2016 pelo grupo de pesquisadores Xu et al. realizado no Centro de Pesquisa Translacional Avançada do Instituto Nacional norte-americano de Saúde (NIH) na cidade de Betesda – Maryland – EUA. Neste estudo pesquisadores avaliaram a atividade enzimática da *caspase-3* (enzima responsável pela apoptose celular) e a viabilidade celular

em uma cultura de células de glioblastoma SNB-19 monocamada após infecção pelo Zika vírus. Após 6 horas de contágio pelo Zika, a atividade da *caspase-3* aumenta em 7 vezes o nível basal, e a viabilidade celular após 3 dias foi reduzida em 82% nesta cultura de células de GBM.

No entanto este trabalho não tinha o enfoque de tratamento do GBM por viroterapia ou como imunoterapia, e tão somente ele usava estas culturas de células de GBM como meio de teste medicamentoso para tratamento contra a infecção do vírus da Zika. Tendo em vista a capacidade proliferativa das células de GBM, este método se mostrou ideal para testes rápidos das medicações (após 3 dias de infecção). Testes que antes poderiam levar meses, agora poderiam ser realizados em dias, e assim responder a comunidade científica, ansiosa por respostas rápidas, tendo em mente a emergência médica mundial do Zika declarada pela OMS em 2016.

O presente trabalho procura estudar mais detalhadamente os efeitos do vírus da Zika sobre a capacidade proliferativa das células de GBM, o que nunca foi avaliado antes, e sobre o qual recai uma imensa responsabilidade por parte dos pesquisadores, tendo em vista o GBM ser uma doença atualmente incurável e de progressão rápida.

## Objetivos

### Objetivo primário

Avaliar a atividade proliferativa das células de glioblastomas em cultura com a exposição ao vírus da Zika.

### Objetivos secundários

- Avaliar a atividade mitótica das células de glioblastomas segundo estudo imunohistoquímico com reagente MIB-1/ Ki-67, após 3, 7, 14 e 21 dias após exposição ao vírus da Zika
- Avaliar o índice apoptótico das células de glioblastomas em culturas, através da atividade enzimática da Caspase-3, após 3, 7, 14 e 21 dias de exposição ao vírus da Zika
- Avaliar a viabilidade das células de glioblastoma através do teste de ELISA para atividade metabólica (ATP-content assay)
- Comparar a taxa populacional das células de glioblastoma de mesma linhagem, em meios de cultura, expostas e não-expostas ao vírus da Zika após 1 mês e após 3 meses

## Métodos

*Cultura de células de glioblastoma (Estabelecimento de linhagens celulares e culturas primárias)*

Serão cultivadas linhagens comerciais estabelecidas de glioblastomas humanos - U-87 MG (ATCC® HTB-14™), na forma de monocamada, mantendo em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM),

suplementando com 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos (penicilina, estreptomicina e anfotericina B 1:1.000). As células serão mantidas em incubadora a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub>. As passagens serão feitas a 70-90% de confluência, com tripsina/EDTA, centrifugadas e ressuspensas em meio de expansão.

## **Delineamento do estudo**

Trata-se de um estudo analítico na forma de estudo experimental. O trabalho será realizado na Divisão de Neurocirurgia do Departamento de Neurologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), no período compreendido entre setembro de 2017 até dezembro de 2018. O projeto será submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa CAPESQ do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC- FMUSP).

## **Desenho do estudo**

Estudo analítico experimental.

## **Análise Estatística**

Para uma amostra normal, será utilizado o programa estatístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 20.0 for Windows (Prentice Hall, Chicago, EUA). O teste utilizado para verificar normalidade dos resultados dos inventários, escalas e testes cognitivos será Shapiro-Wilk ou Kolmogorov-Smirnov. Poderá também ser utilizado o teste t de Student não pareado para a comparação entre as médias e o teste Qui-Quadrado

para comparação entre proporções. Para uma amostra não normal, serão utilizados testes não paramétricos de Wilcoxon e Mann-Whitney. As variáveis quantitativas serão representadas através de médias e desvios-padrão, e as qualitativas, através de frequências absolutas e relativas. Será adotado o nível de significância de 5% ( $\alpha = 0,05$ ), conforme preconizado para ensaios biológicos.

### **Aspectos Éticos**

O projeto será submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPESQ-HCFMUSP) e à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa do Ministério da Saúde (CONEP).

### **Referências**

1. Petersen LR, Jamieson DJ, Powers AM, Honein MA. Zika Virus. **N Engl J Med.** 2016 Apr 21;374(16):1552-63.
2. Cugola FR, Fernandes IR, Russo FB, Freitas BC, Dias JL, Guimarães KP, Benazzato C, Almeida N, Pignatari GC, Romero S, Polonio CM, Cunha I, Freitas CL, Brandão WN, Rossato C, Andrade DG, Faria Dde P, Garcez AT, Buchpiguel CA, Braconi CT, Mendes E, Sall AA, Zanotto PM, Peron JP, Muotri AR, Beltrão-Braga PC. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. **Nature.** 2016 Jun 9;534(7606):267-71.
3. Metsky HC, Matranga CB, Wohl S, Schaffner SF, Freije CA, Winnicki SM, West K, Qu J, Baniecki ML, Gladden-Young A, Lin AE, Tomkins-Tinch CH, Ye SH, Park DJ, Luo CY, Barnes KG, Shah RR, Chak B, Barbosa-Lima G,



Delatorre E, Vieira YR, Paul LM, Tan AL, Barcellona CM, Porcelli MC, Vasquez C, Cannons AC, Cone MR, Hogan KN, Kopp EW, Anzinger JJ, Garcia KF, Parham LA, Ramírez RMG, Montoya MCM, Rojas DP, Brown CM, Hennigan S, Sabina B, Scotland S, Gangavarapu K, Grubaugh ND, Oliveira G, Robles-Sikisaka R, Rambaut A, Gehrke L, Smole S, Halloran ME, Villar L, Mattar S, Lorenzana I, Cerbino-Neto J, Valim C, Degraeve W, Bozza PT, Gnirke A, Andersen KG, Isern S, Michael SF, Bozza FA, Souza TML, Bosch I, Yozwiak NL, Maclnnis BL, Sabeti PC. Zika virus evolution and spread in the Americas. **Nature**. 2017 Jun 15;546(7658):411-415.

4. Xu M, Lee EM, Wen Z, Cheng Y, Huang WK, Qian X, Tcw J, Kouznetsova J, Ogden SC, Hammack C, Jacob F, Nguyen HN, Itkin M, Hanna C, Shinn P, Allen C, Michael SG, Simeonov A, Huang W, Christian KM, Goate A, Brennand KJ, Huang R, Xia M, Ming GL, Zheng W, Song H, Tang H. Identification of small-molecule inhibitors of Zika virus infection and induced neural cell death via a drug repurposing screen. **Nat Med**. 2016 Oct;22(10):1101-1107.

5. Solomon IH, Milner DA, Folkerth RD. Neuropathology of Zika Virus Infection. *J Neuroinfect Dis*. 2016 Jun;7(2). pii: 220. Epub 2016 Jun 23.

6. Ming GL, Tang H, Song H. Advances in Zika Virus Research: Stem Cell Models, Challenges, and Opportunities. **Cell Stem Cell**. 2016 Dec 1;19(6):690-702. doi: 10.1016/j.stem.2016.11.014.

7. Weller M, van den Bent M, Tonn JC, Stupp R, Preusser M, Cohen-Jonathan-Moyal E, Henriksson R, Le Rhun E, Balana C, Chinot O, Bendszus M, Reijneveld JC, Dhermain F, French P, Marosi C, Watts C, Oberg I, Pilkington G, Baumert BG, Taphoorn MJB, Hegi M, Westphal M, Reifenberger

G, Soffiatti R, Wick W; European Association for Neuro-Oncology (EANO) Task Force on Gliomas. European Association for Neuro-Oncology (EANO) guideline on the diagnosis and treatment of adult astrocytic and oligodendroglial gliomas. **Lancet Oncol.** 2017 Jun;18(6):e315-e329.