



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

GUNTER GERSON

**MENINGIOMAS E O MICROAMBIENTE TUMORAL:
A EXPRESSÃO DA MOLÉCULA MODULADORA IMUNE PD-L1
E DO INTERFERON-GAMA NO PROGNÓSTICO**

FORTALEZA
2019

GUNTER GERSON

MENINGIOMAS E O MICROAMBIENTE TUMORAL: A EXPRESSÃO DA MOLÉCULA
MODULADORA IMUNE PD-L1 E DO INTERFERON-GAMA NO PROGNÓSTICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Patologia da Universidade Federal do Ceará como
requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em
Patologia. Área de concentração: Neuropatologia.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Rocha Fernandes Távora.

FORTALEZA
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

G1m GERSON, GUNTER.
MENINGIOMAS E O MICROAMBIENTE TUMORAL: A EXPRESSÃO DA MOLÉCULA
MODULADORA IMUNE PD-L1 E DO INTERFERON-GAMA NO PROGNÓSTICO /
GUNTER GERSON. – 2019.
47 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de
Pós- Graduação em Patologia, Fortaleza, 2019.

Orientação: Prof. Dr. Fábio Rocha Fernandes Távora.

1. Meningiomas. 2. Microambiente tumoral. 3. PD-L1. 4. Interferon-Gama. 5. Prognóstico. I.
Título.

CDD 571.9

GUNTER GERSON

**MENINGIOMAS E O MICROAMBIENTE TUMORAL:
A EXPRESSÃO DA MOLÉCULA MODULADORA IMUNE PD-L1
E DO INTERFERON-GAMA NO PROGNÓSTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Patologia. Área de concentração: Neuropatologia.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Rocha Fernandes Távora.

Aprovado em: 24/07/2019

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fábio Rocha Fernandes Távora (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Marcus Davis Machado Braga
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Duílio Reis da Rocha Filho
Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus a oportunidade de estar realizando essa pesquisa e poder estar concluindo mais essa etapa da minha vida profissional.

Agradeço a minha mãe Vilna Maria Araújo Matos (em memória) por todos os valores e virtudes que tenho; e em especial, pelo estímulo constante para que eu fosse um profissional melhor, qualificado, humano e honesto. Agradeço ao meu pai Carlos Alberto Gerson por seu apoio neste longo período de vida acadêmica e profissional, pela amizade e empenho constante em auxiliar-me em todas as horas.

Agradeço o apoio constante de minha esposa Érica de Castro Vieira Gerson, que esteve comigo em cada etapa desta jornada, auxiliando-me e sendo presente nos momentos de dificuldades. Agradeço a minha filha Maria Clara Vieira Gerson por seus sorrisos e alegria que me contagiavam em todos os momentos e me fazem ser alguém melhor.

Agradeço a minha irmã Giselle Cerise Gerson por seu apoio e exemplo de vida dedicada a pesquisa e ensino, muitas vezes estimulando-me a perseverar nas dificuldades desta jornada e a valorizar cada momento como possibilidade de crescimento profissional e pessoal.

Agradeço ao Professor Dr. Fábio Rocha Fernandes Távora por ter me orientado nesta pesquisa e sempre ter estado presente em minha carreira como docente e médico patologista; ressalto seu compromisso com a formação e ensino de jovens patologistas e sua dedicação com a Patologia Cirúrgica no Brasil; seu exemplo e retidão profissional são estímulos para sermos melhores profissionais.

Agradeço aos colegas patologistas do Laboratório de Patologia Cirúrgica, Argos que estiveram presentes nesta minha caminhada profissional, ajudando-me e orientando-me em diversas etapas desta pesquisa.

Agradeço aos colegas mestrandos da turma 2017.2 por estarem comigo ao longo deste período, partilhar angústias e desafios, por serem auxílio e parceiros em muitos momentos. Agradeço a todos os professores, coordenadores, mestres e doutores do Programa de Pós-Graduação em Patologia, funcionários do Departamento de Patologia e Medicina Legal que estiveram presentes ao longo destes dois anos e proporcionaram este momento de crescimento profissional de minha carreira.

RESUMO

Os meningiomas são os tumores intracranianos mais comuns em adultos, representam, aproximadamente, 35% dos tumores primários do sistema nervoso central (SNC). Um dos mecanismos utilizados por células tumorais para escapar da morte por células imunes é interferir em *checkpoints* imunológicos, impedindo, assim, o estabelecimento de resposta imune adequada. Seguindo este conceito, um alvo promissor para uma terapia imunomoduladora é o bloqueio do eixo morte celular programada 1 (PD-1) / ligante de morte celular programada 1 (PD-L1), que é conhecido por ser crucial para mecanismos de escape imune. O interferon gama (IFN- γ) se relaciona com a expressão de PD-L1, sendo produzido por células T ativadas e podendo promover a hiper-regulação da expressão de PD-L1 em células tumorais. Este estudo avaliou a expressão de PD-L1 e IFN- γ e sua relação com o tempo livre de progressão de doença no período do estudo e recidiva tumoral em meningiomas, além de ter analisado a correlação entre aspectos clínicos e morfológicos com a imunoeexpressão destes marcadores. O estudo foi um coorte transversal retrospectivo, que estudou 93 pacientes diagnosticados com meningioma de diversos graus. Foram confeccionados blocos de parafina contendo amostras de todos os tumores utilizando a técnica de TMA – *tissue micro-array*, sendo realizadas reações imuno-histoquímicas das proteínas PD-L1 e do IFN- γ . O estudo confirmou que diversas variáveis clínicas e morfológicas relacionam-se a um pior prognóstico com maiores taxas de recidiva e redução do tempo livre de progressão da doença. Este estudo não detectou imunoeexpressão de PD-L1 em nenhum dos 93 casos analisados, e mostrou que os pacientes com imunoeexpressão de IFN- γ tiveram menores taxas de recidiva tumoral e maior tempo livre de progressão de doença, constatando-se ainda relação com ausência de pleomorfismo, melhor diferenciação e menor grau tumoral. Constatou-se ainda uma diferença da imunoeexpressão deste marcador em relação ao sexo do paciente, mulheres apresentaram maior expressão de IFN- γ que homens, e maior expressão em meningiomas localizados em lobos cerebrais. A expressão de PDL1 em células de meningioma e seu papel potencial na imunossupressão local não estão totalmente estabelecida e sua indicação de terapia anti-PD-L1 como tratamento alternativo para meningiomas ainda é controversa. O IFN- γ parece ser um biomarcador em meningiomas, tendo em vista diversas publicações, relatórios e ensaios clínicos que propõe a utilização do interferon como alternativa terapêutica.

Palavras-chave:

Meningiomas. Microambiente tumoral. PD-L1. Interferon-Gama. Prognóstico.

ABSTRACT

Meningiomas are the most common intracranial tumors in adults, accounting for approximately 35% of primary tumors of the central nervous system (CNS). One of the mechanisms used by tumor cells to escape death by immune cells is to interfere with immunological checkpoints, thereby preventing the establishment of adequate immune response. Following this concept, a promising target for an immunomodulatory therapy is programmed cell death block 1 (PD-1) / programmed cell death ligand 1 (PD-L1), which is known to be crucial for immune escape mechanisms. Interferon gamma (IFN- γ) is related to the expression of PD-L1, being produced by active T cells and may promote hyper-regulation of PD-L1 expression in tumor cells. The present work proposes to evaluate the expression of PD-L1 and IFN- γ and its relation with progression-free time and tumor recurrence in meningiomas, and to analyze the correlation between clinical and morphological aspects with the immunoexpression of these markers. The study was a cross-sectional retrospective cohort that analyzed 93 patients diagnosed with meningioma of varying degrees. Paraffin blocks containing samples from all tumors were made using the TMA - tissue micro array technique, and immunohistochemical reactions of PD - L1 and IFN - γ proteins were performed. The study confirmed that several clinical and morphological variables are related to a worse prognosis with higher rates of recurrence and reduction of progression-free time of the disease. This study did not detect PD-L1 immunoexpression in any of the 93 analyzed cases and showed that patients with IFN- γ immunoexpression had lower rates of tumor recurrence and longer disease progression free time, absence of pleomorphism, better differentiation and lower tumor grade. The expression of PDL1 in meningioma cells and their potential role in local immunosuppression is not fully established and their indication of anti-PD-L1 therapy as an alternative treatment for meningiomas is still controversial. Patients with IFN- γ immunoexpression had lower rates of tumor recurrence, longer disease-free survival time. The IFN- γ immunoexpression was also related to the absence of pleomorphism in the tumor cells and lower tumor degree.

Key-words: Meningiomas. Tumor microenvironment. PD-L1. Interferon-Gamma. Prognosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Blocos de TMA	17
Figura 2 -	Fotomicrografia de meningiomas grau I, subtipo meningotelial (A), fibroso (B), psamomatoso (C) e transicional (D).....	22
Figura 3 -	Fotomicrografia de meningiomas grau I (A), grau II (B) e grau III (C).....	22
Figura 4 -	Fotomicrografia de alterações morfológicas de meningiomas que conferiram pior prognóstico, necrose tumoral (A) e figuras de mitose (B).....	24
Figura 5 -	Fotomicrografia de meningiomas mostrando ausência de imunexpressão para PD-L1 nos dois clones testados, Clone Dako 22C3(A), Clone Ventana SP263(B).....	30
Figura 6 -	Fotomicrografia de controle externo utilizando de tecido placentário por reação imuno-histoquímica com anticorpo anti-PD-L1 (marcação membranar e circunferencial completa).....	30
Figura 7 -	Fotomicrografia de meningioma exibindo intensa e difusa imunexpressão de IFN- γ em células tumorais.....	31

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Distribuição dos pacientes do estudo por subtipos morfológicos.....	21
Gráfico 2 -	Curvas de Kaplan-Meier relacionando os pacientes sem recorrência da doença no estudo e o tempo livre de progressão de doença por grau histológico.....	29
Gráfico 3 -	Imunoexpressão de IFN- γ nos subtipos morfológicos de meningiomas	34
Gráfico 4 -	Curva de Kaplan-Meier relacionando os pacientes sem recorrência da doença no estudo e o tempo livre de progressão de doença por imunoexpressão de IFN- γ	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Classificação das variantes de meningioma agrupadas por grau da OMS, e comportamento biológico.....	12
Tabela 2 -	Visão geral dos pacientes portadores de meningioma com distribuição de variáveis clínicas e morfológicas (N =93).....	20
Tabela 3 -	Análise das variáveis clínicas e sua relação com taxa de recidiva tumoral em pacientes portadores de meningiomas.....	23
Tabela 4 -	Análise comparativa entre o grau dos meningiomas e sua relação com o sexo dos pacientes.....	24
Tabela 5 -	Análise de variáveis morfológicas e sua relação com a taxa de recidiva tumoral em pacientes portadores de meningioma	25
Tabela 6 -	Análise de subtipos morfológicos e grau tumoral, e sua relação com a taxa de recidiva tumoral em pacientes portadores de meningioma	26
Tabela 7 -	Análise de variáveis clínicas e morfológicas, e sua relação com o tempo médiolivre de progressão de doença (TLPD) em meses em pacientes portadores de meningiomas.....	27
Tabela 8 -	Análise da imunoexpressão de INF- γ e sua relação com variáveis clínicas em pacientes portadores de meningioma	31
Tabela 9 -	Análise da imunoexpressão de IFN- γ e sua relação com variáveis morfológicas em pacientes portadores de meningioma	32
Tabela 10 -	Análise da imunoexpressão de IFN- γ e sua relação com a taxa de recidiva tumoral em pacientes portadores de meningioma	34
Tabela 11 -	Análise multivariada de variáveis clínicas e morfológicas, utilizando o INF como variável de entrada forçada	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PD-1	Morte celular programada 1
PD-L1	Ligante de morte celular programada 1
IFN- γ	Interferon gama
IFN- α	Interferon alfa
IFN- β	Interferon beta
IHQ	Imuno-histoquímica
OMS	Organização Mundial de Saúde
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase pela Transcriptase Reversa
SNC	Sistema Nervoso Central
Células NK	Células Natural killer
TMA	Tissue micro-array
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TLPD	Tempo livre de progressão de doença

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	Justificativa	13
1.2	Fisiopatologia	14
2	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivo Geral	15
2.2	Objetivos Específicos	15
3	MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1	Critérios de Inclusão	18
3.2	Critérios de Exclusão	18
3.3	Análise de Dados	18
3.4	Aspectos Éticos	18
3.5	Local do estudo	19
4	RESULTADOS	20
5	DISCUSSÃO	37
6	CONCLUSÃO	42
	REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

Os meningiomas são originados de células aracnoides das meninges e são os tumores intracranianos mais comuns em adultos (VAN ALKEMADE *et al.*, 2012; LAMSZUS, 2012; BITZER *et al.*, 1997; RAGEL; JENSEN, 2010). Representam, aproximadamente, 35% dos tumores primários do sistema nervoso central (SNC), com incidência de 7,44 casos por cada 100.000 habitantes nos Estados Unidos da América (OSTROM *et al.*, 2013). Os meningiomas podem se desenvolver em pacientes em qualquer idade, embora sejam mais comuns entre 60 e 70 anos (OSTROM *et al.*, 2013; COLAKOGLU *et al.*, 2003). As mulheres possuem três vezes mais chances de desenvolver meningiomas do que homens (COLAKOGLU *et al.*, 2003).

A maioria dos meningiomas são tumores benignos que crescem lentamente, com baixa taxa de recorrência e longo tempo de sobrevivência (RIEMENSCHNEIDER *et al.*, 2006); tendem, em sua maioria, a serem localizados e não invasivos. No entanto, alguns meningiomas comportam-se agressivamente com invasão do cérebro adjacente, alta propensão à recorrência e, em casos raros, metástases extracranianas (DOMINGUES *et al.*, 2012).

Os meningiomas são classificados em graus, sendo os tumores de grau I considerados de baixo grau e os tumores grau II ou III considerados de alto grau. Os meningiomas grau I apresentam diversos tipos morfológicos: meningotelial, fibroso, transicional, psamomatoso, metaplásico, angiomatoso, microcístico, rico em linfomononucleares e secretor. Os meningiomas grau II são chamados meningiomas atípicos e apresentam comportamento mais agressivo, com maiores taxas de recidiva local (RIEMENSCHNEIDER *et al.*, 2006; DOMINGUES *et al.*, 2012). A Classificação dos Tumores do Sistema Nervoso Central da Organização Mundial de Saúde, em sua última edição de 2016, coloca critérios bem estabelecidos para a definição de meningiomas grau II, sendo os critérios maiores: invasão de parênquima cerebral ou índice mitótico maior que 4 mitoses por 10 campos de grande aumento; critérios menores: presença de macronúcleo, necrose espontânea, hiper celularidade, padrão morfológico de pequenas células com alta relação núcleo/citoplasma, disposição em lençóis ou mantas difusas; sendo necessário apenas um critério maior ou pelo menos três critérios menores para confirmação de grau II. Os subtipos morfológicos células claras e cordoide já são, por definição, considerados grau II. Para a classificação dos tumores em grau III considera-se a morfologia anaplásica, muitas

vezes simulando um carcinoma, melanoma ou sarcoma de alto grau e/ou critério de índice mitótico maior que 20 figuras de mitose por 10 campos de grade aumento, sendo estes tumores altamente agressivos e refratários ao tratamento. Segundo David *et al.* (2016), os subtipos morfológicos papilífero e rabdoide já são, por definição, considerados tumores grau III (tabela 1).

Tabela 1: Classificação das variantes de meningioma agrupadas por grau da OMS, e comportamento biológico.

MENINGIOMAS COM BAIXO RISCO DE RECORRÊNCIA E COMPORTAMENTO AGRESSIVO	
Meningioma meningotelial	OMS grau I
Meningioma fibroso (fibroblástico)	OMS grau I
Meningioma transicional (misto)	OMS grau I
Meningioma psamomatoso	OMS grau I
Meningioma angiomatoso	OMS grau I
Meningioma microcístico	OMS grau I
Meningioma secretor	OMS grau I
Meningioma rico em linfomononucleares	OMS grau I
Meningioma metaplásico	OMS grau I
MENINGIOMAS COM MAIOR RISCO DE RECORRÊNCIA E COMPORTAMENTO AGRESSIVO	
Meningioma cordoide	OMS grau II
Meningioma de células claras	OMS grau II
Meningioma atípico	OMS grau II
Meningioma papilar	OMS grau III
Meningioma rabdoide	OMS grau III
Meningioma anaplásico	OMS grau III

Fonte: Adaptado de Classificação dos Tumores do Sistema Nervoso Central da Organização Mundial de Saúde 2016.

Interações entre células imunes e neoplásicas desempenham um papel importante durante a progressão maligna, sendo designado como o conceito de imunodeficiência do

câncer (SIEGEL *et al.*, 2003). Um dos mecanismos utilizados por células tumorais para escapar da morte por células imunes é interferir em *checkpoints* imunológicos, impedindo, assim, o estabelecimento de resposta imune adequada (CHEN *et al.*, 2015). Seguindo este conceito, um alvo promissor para uma terapia imunomoduladora é o bloqueio do eixo morte celular programada 1 (PD-1) / ligante de morte celular programada 1 (PD-L1), que é conhecido por ser crucial para mecanismos de escape imune (LUO *et al.*, 2017; GIBNEY *et al.*, 2016).

O interferon gama (IFN- γ) é produzido por células T ativadas que fazem parte do microambiente tumoral. Alguns estudos revelam uma concordância significativa entre a expressão de PD-L1 e a expressão desta citocina inflamatória, sugerindo que a infiltração de células imunes nos tumores possa produzir fatores, ainda não completamente elucidados, que impulsionem a expressão de PD-L1, como um mecanismo de *feedback* negativo, resultando no que pode ser considerado como resistência imune adaptativa exercida pelo tumor. Deste modo, a imunoexpressão de IFN- γ promoveria a hiper-regulação da expressão de PD-L1 em células tumorais (TAUBE *et al.*, 2012).

Alguns estudos apresentam a terapia com interferon como alternativa para tratamento de meningiomas recorrentes e refratários (JONASCH; HALUSKA, 2001; KOPER *et al.*, 1991; VON MARSCHALL *et al.*, 2003). Evidências sugerem sua ação antiproliferativa, imunomoduladora e antiangiogênica nestes tumores (KOPER *et al.*, 1991; VON MARSCHALL *et al.*, 2003).

1.1 Justificativa

A pesquisa da imunoexpressão de PD-L1 em cânceres vem ganhando destaque global e sendo tema de diversas publicações na literatura atual devido à possibilidade de terapia alvo direcionada e impacto prognóstico favorável com resultados bastante animadores em diversas áreas da oncologia. Para tumores cerebrais, contudo, há poucas publicações e este tema permanece pouco conhecido e incipiente. Recentemente este marcador foi encontrado expresso em glioblastomas e em meningiomas, elevando a possibilidade de inibição do ponto de checagem imune para tumores do sistema nervoso. O tratamento de meningiomas com o anticorpo monoclonal anti-PD-L1 mostrou diminuição significativa no tamanho dos tumores e estabilidade da doença em relatos de casos e ensaios publicados.

A pesquisa da imunoexpressão de IFN- γ também vem ganhando força e destaque, tendo em vista ensaios clínicos e publicações que utilizam interferon recombinante como

terapia alternativa para casos de meningiomas refratários e recidivados. Estudos mostraram que o tratamento de meningiomas com interferon inibiu o crescimento de células de meningioma *in vitro*. Em ensaios clínicos realizados, o tratamento com interferon também apontou melhora de sobrevida livre de progressão de doença.

1.2 Fisiopatologia

O papel de PD-1 na morte celular programada - apoptose - foi reconhecido pela primeira vez na década de 1990 (ISHIDA *et al.*, 1992). Foi, posteriormente, demonstrado que a expressão de PD-1 em células T ativadas resulta em morte celular, e proposto que a autoimunidade observada em camundongos *knockout* de PD-1 era devida a uma quebra de tolerância aos autoantígenos (NISHIMURA *et al.*, 1999). Logo após sua descoberta, PD-L1 foi reconhecido como um alvo de imunoterapia para o câncer, devido a sua ampla ação em células cancerígenas, e porque o bloqueio da via da PD-1 reduziu a progressão tumoral, enquanto a superexpressão de PD-L1 estava associada à progressão tumoral em camundongos (IWAI *et al.*, 2002; BROWN *et al.*, 2003; CURIEL *et al.*, 2003; DONG *et al.*, 2002). Múltiplos estudos com camundongos deficientes em PD-1 demonstram seu papel crítico em amortecer respostas celulares T após a depuração de patógenos e na prevenção da autoimunidade. O caminho parece afetar a capacidade de células T ativadas para matar células tumorais (KEIR *et al.*, 2008), bem como a sobrevivência de células T ativadas (BLANK *et al.*, 2004). O PD-L1 está presente no citoplasma e na membrana plasmática de células tumorais em modelos animais de ratos e humanos; no entanto, nem todos os tumores ou todas as células dentro de um tumor expressam PD-L1 (PETROVAS *et al.*, 2006). Células imunológicas ativadas, incluindo células dendríticas, células NK, macrófagos, monócitos, células B e T, bem como células não hematopoiéticas, podem expressar PD-L1 (DONG *et al.*, 2002; FREEMAN *et al.*, 2000). Os receptores do ponto de checagem imune nas células imunes, quando envolvidos por seus ligantes, transmitem um sinal inibitório, mantêm a autotolerância e regulam a duração e a amplitude das respostas imunes nos tecidos periféricos, a fim de minimizar a patologia tecidual (TUMEH *et al.*, 2014).

O interferon gama (IFN- γ) é produzido por células T ativadas que fazem parte do microambiente tumoral. Alguns estudos revelam uma concordância significativa entre a expressão de PD-L1 e a expressão desta citocina inflamatória, sugerindo que a infiltração de células imunes nos tumores possa produzir fatores, ainda não completamente elucidados, que

impulsionem a expressão de PD-L1, como um mecanismo de *feedback* negativo, resultando no que pode ser considerado como resistência imune adaptativa exercida pelo tumor. Deste modo, a imunoeexpressão de IFN- γ promoveria a hiper-regulação da expressão de PD-L1 em células tumorais (TAUBE *et al.*, 2012).

O IFN- γ apresenta importantes funções imunorreguladoras, é um potente ativador de macrófagos e teve efeitos antiproliferativos sobre células transformadas. Para Meager *et al.*, (1984), o principal meio pelo qual as células T ativam macrófagos, aumentando sua capacidade de matar bactérias, parasitas e tumores, além de promover a potencialização de efeitos antivirais e antitumorais dos demais interferons do tipo I (IFN- α , IFN- β).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a expressão do modulador imune PD-L1 e do IFN- γ em meningiomas e sua relação com o tempo livre de progressão de doença no período do estudo e recidiva tumoral.

2.2 Objetivos Específicos

Analisar a correlação entre aspectos clínicos e morfológicos dos meningiomas com a imunoeexpressão de PD- L1 e IFN- γ :

- a) Idade e imunoeexpressão de PD- L1 e IFN- γ ;
- b) Sexo e imunoeexpressão de PD-L1 e IFN- γ ;
- c) Localização do tumor e imunoeexpressão de PD-L1 e IFN- γ ;
- d) Grau tumoral e imunoeexpressão de PD-L1 e IFN- γ ;
- e) Invasão de parênquima cerebral pelo tumor e imunoeexpressão de PD-L1 e IFN- γ ;
- f) Presença de macronúcleo no tumor e imunoeexpressão de PD-L1 e IFN- γ ;
- g) Necrose espontânea no tumor e imunoeexpressão de PD-L1 e IFN- γ ;
- h) Hiper celularidade do tumor e imunoeexpressão de PD-L1 e IFN- γ ;
- i) Subtipos morfológicos do tumor e imunoeexpressão de PD-L1 e IFN- γ ;
- j) Pleomorfismo tumoral e imunoeexpressão de PD-L1 e IFN- γ ;
- k) Atividade mitótica do tumor e imunoeexpressão de PD-L1 e IFN- γ ;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

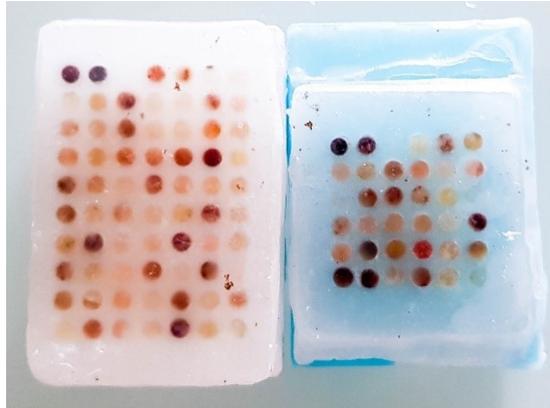
O estudo foi um coorte transversal retrospectivo, que analisou pacientes diagnosticados com meningioma provenientes de banco de dados e arquivos de laboratório particular de patologia cirúrgica da cidade de Fortaleza, Ceará, Brasil, no período de 2010 até 2018.

Foram considerados inicialmente um total de 125 pacientes. Deste total, 32 pacientes foram excluídos do estudo por não haver informações clínicas adequadas, material suficiente para a realização de exame imuno-histoquímica ou por não ser possível haver contato com o paciente e/ou familiares para obtenção de novos dados sobre recidiva, complicações e óbito relacionados à doença. Todos os diagnósticos patológicos foram revisados e confirmados por dois neuropatologistas de acordo com os critérios da OMS em sua última edição de 2016.

Os parâmetros clínicos analisados foram: idade mediana, sexo, localização do tumor e tempo livre de progressão de doença no período do estudo, este definido como tempo desde o diagnóstico inicial dos pacientes até a data da detecção de progressão da doença ou conclusão do período de seguimento do estudo no ano de 2018. Considerou-se como progressão de doença a recidiva tumoral após tratamento inicial ou morte do paciente por complicação da doença.

Os parâmetros morfológicos analisados foram: grau tumoral, índice mitótico, invasão de parênquima cerebral, presença de macronúcleolos, necrose espontânea, hiper celularidade e pleomorfismo. Foram confeccionados dois blocos de parafina contendo amostras de todos os tumores utilizando a técnica de TMA –*tissue micro-array*. Foram realizados *punchs* de 2,0 mm em áreas previamente estabelecidas dos tumores em blocos de parafina selecionados de cada caso, utilizando-se o conjunto Quick-Ray® - manual *tissuemicro-arrayer* (UnitmaCo., Ltd. Seoul, Korea). No total, 93 *punchs* foram realizados, sendo confeccionados 2 blocos de TMA. Adicionou-se em cada bloco de TMA 4 *punchs* de 2 mm (nos vértices) contendo material externo de placenta humana do terceiro trimestre gestacional com o objetivo de servirem como controle externo da reação imuno-histoquímica. Cortes de 4 micrômetros de espessura de cada bloco de TMA foram realizados e colocados em lâminas de silano adequadas para reação de imuno-histoquímica. Micrótomo da marca LEICA RM2125 RTS foi utilizado para confecção dos cortes de parafina.

Figura 1 – Blocos de TMA



Fonte: Elaborada pelo autor.

A reação imuno-histoquímica da proteína PD-L1 foi realizada utilizando-se dois clones em plataforma automatizada: 1– Clone Ventana SP263 (Roche Diagnostics, 740-4907), utilizando o Kit amplification OptiView e Kit de Detecção OptiView DAB IHC, em plataforma automatizada BenchMark GX IHC/ISH Staining (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson-AZ); 2 – Clone Dako 22C3 (DAKO Autostainer, AS480), seguindo o protocolo PD-L1 DAKO. O contraste foi feito com hematoxilina e controles negativos também foram avaliados.

Para interpretação dos resultados, avaliou-se a expressão de PD-L1 apenas em células tumorais. A imunoexpressão de PD-L1 em linfócitos ou demais células imunes associadas às células tumorais não foi considerada devido à ausência ou raridade dessas células no microambiente dos meningiomas. A positividade de PD-L1 foi definida pela porcentagem positiva de qualquer intensidade de marcação membranar. A expressão de PD-L1 foi agrupada em casos positivos e negativos.

A reação imuno-histoquímica do IFN- γ foi realizada utilizando o clone 4SB3, em plataforma automatizada BenchMark GX IHC/ISH Staining (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson-AZ). Avaliou-se a expressão de IFN- γ apenas em células tumorais. A imunoexpressão de IFN- γ em linfócitos ou demais células imunes associadas às células tumorais também não foi considerada neste estudo. A marcação tumoral intracelular de qualquer intensidade foi considerada como positiva e a ausência de marcação tumoral como negativa. A expressão de IFN- γ foi agrupada em casos positivos e negativos.

3.1 Critérios de Inclusão

Os pacientes foram selecionados a partir de banco de dados e arquivo de laboratório particular de patologia cirúrgica da cidade de Fortaleza, Ceará, Brasil, que foram diagnosticados com meningioma de qualquer grau ou subtipo morfológico e que apresentavam informações clínicas devidamente reportadas em formulários de solicitação para realização de estudo anatomo-patológico, além de possibilidade de contato para obtenção de informações sobre recidiva tumoral e óbito relacionado à doença.

3.2 Critérios de Exclusão

Foram excluídos pacientes que não apresentavam disponibilidade de tecido tumoral suficiente para análise imuno-histoquímica, registros inadequados de informações clínicas, que não receberam tratamento padrão com cirurgia e/ou radioterapia ou que não foi possível realizar contato para obtenção de novas informações.

3.3 Análise de Dados

Os dados foram tabulados no Microsoft Excel e exportados para o software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 20.0 para Windows, no qual as análises foram realizadas com intervalo de confiança de 95%. Foram expressas as frequências absolutas e percentual de cada variável as quais foram cruzadas por meio dos testes exato de Fisher ou qui-quadrado de Pearson, além do teste de Long-Rank Mantel-Cox e regressão de Cox.

3.4 Aspectos Éticos

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de ética e pesquisa da UFC - Universidade Federal do Ceará/PROPEQS-UFC, CAAE: 99578718.8.0000.5054, em 22 de outubro de 2018. O investigador principal e os demais colaboradores envolvidos no projeto utilizaram os dados provenientes dessa pesquisa apenas para os fins descritos e cumpriram todas as diretrizes e normas regulamentadoras descritas na Resolução N° 466/12 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares, no que diz respeito ao sigilo e confidencialidade

dos dados coletados. Ressalta-se que a divulgação das informações coletadas ocorreu somente de forma anônima.

3.5 Local do Estudo

Laboratório particular de patologia cirúrgica da cidade de Fortaleza, Ceará, Nordeste, Brasil.

4 RESULTADOS

Os pacientes com tumores primários que não recidivaram corresponderam a 78,5% do total de casos estudados, os pacientes que tiveram tumores recidivados corresponderam a 21,5%. Os pacientes analisados tinham idade mediana de 55 anos, mínima de 25 anos e máxima de 82 anos. Os tumores grau I corresponderam a 79,6%, grau II a 16,1%, grau III a 4,3%. A doença predominou em mulheres, correspondendo a 71% dos casos. A localização mais prevalente foi em lobos cerebrais, 52,7% dos casos (tabela 2).

Tabela 2–Visão geral dos pacientes portadores de meningioma com distribuição de variáveis clínicas e morfológicas (N =93).

	Total	
	N	%
Tumor		
Tumores recidivados	20	21,5
Tumores não-recidivados	73	78,5
Idade		
Até 55	47	50,5
>55	46	49,5
Sexo		
Feminino	66	71,0
Masculino	27	29,0
Localização		
Lobos cerebrais	49	52,7
Meninges	5	5,4
Esfenoide	4	4,3
Extra-axial	7	7,5
Extra-dural	3	3,2
Bulbo / goteira olfatória	5	5,4
Não informada	20	21,5
Grau histológico		
I	74	79,6
II	15	16,1
III	4	4,3
Grau histológico		
Baixo grau – grau I	74	79,6

 Alto grau – graus II e III

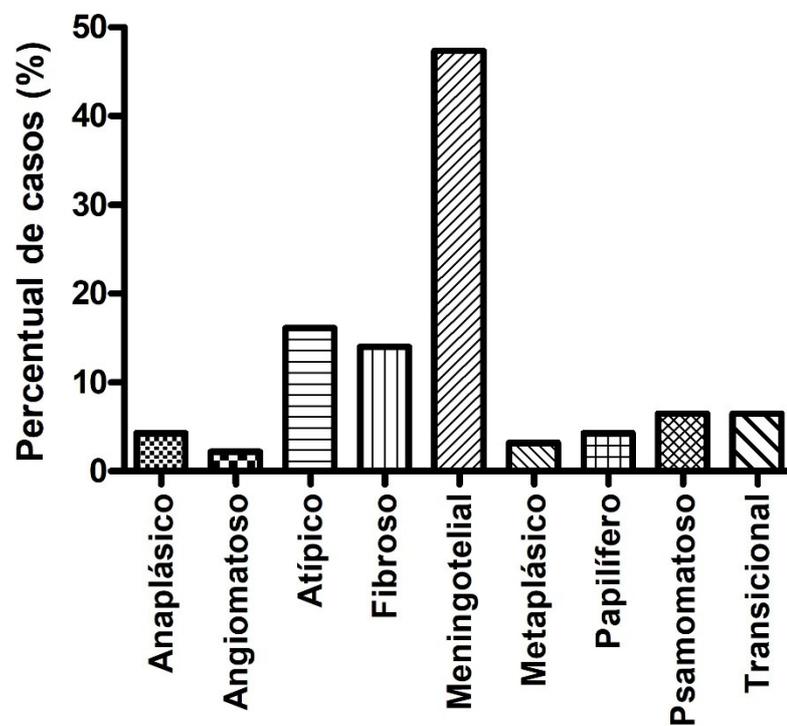
19

20,4

 Fonte: Elaborada pelo autor.

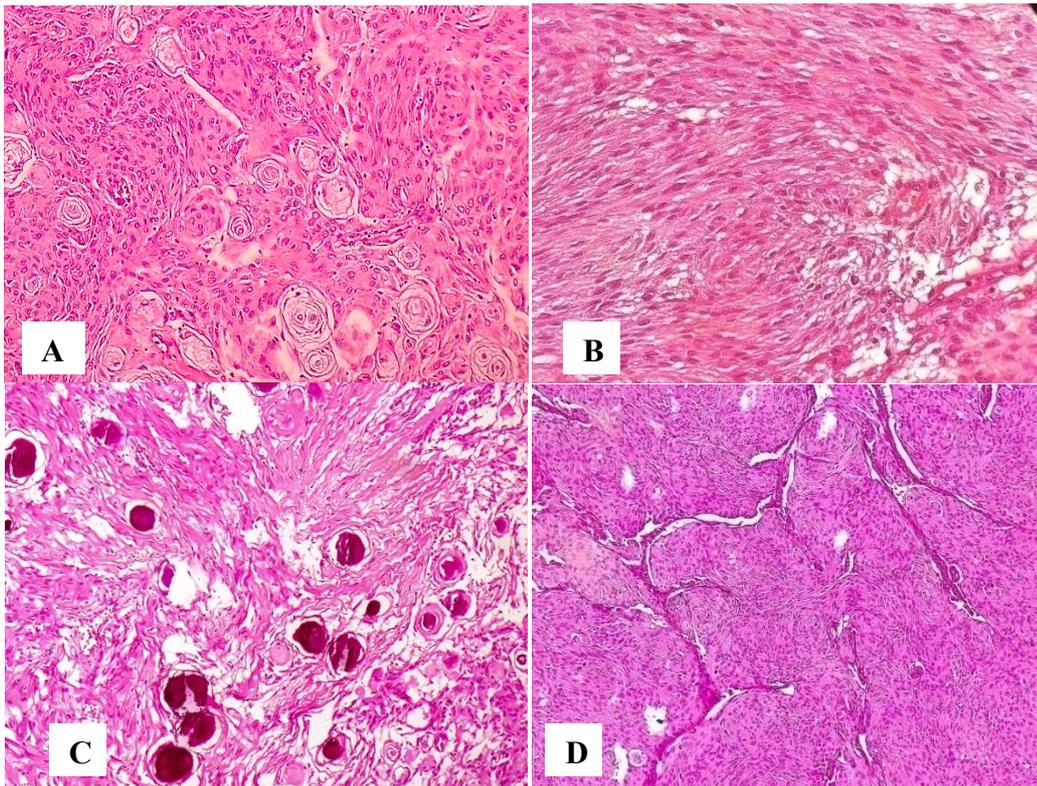
Dos meningiomas grau I, o subtipo morfológico mais comum foi o meningotelial com 47,3% do total de casos, seguido por fibroso com 14,0%, psamomatoso e transicional com 6,5% cada (gráfico 1, figura 2), metaplásico com 3,2% e angiomatoso com 2,2%. Os meningiomas atípicos corresponderam a 16,1% do total de casos. Os meningiomas papilíferos e anaplásicos (figura 3), ambos graus III, corresponderam a 4,3% dos casos.

Gráfico 1 - Distribuição dos pacientes do estudo por subtipos morfológicos.



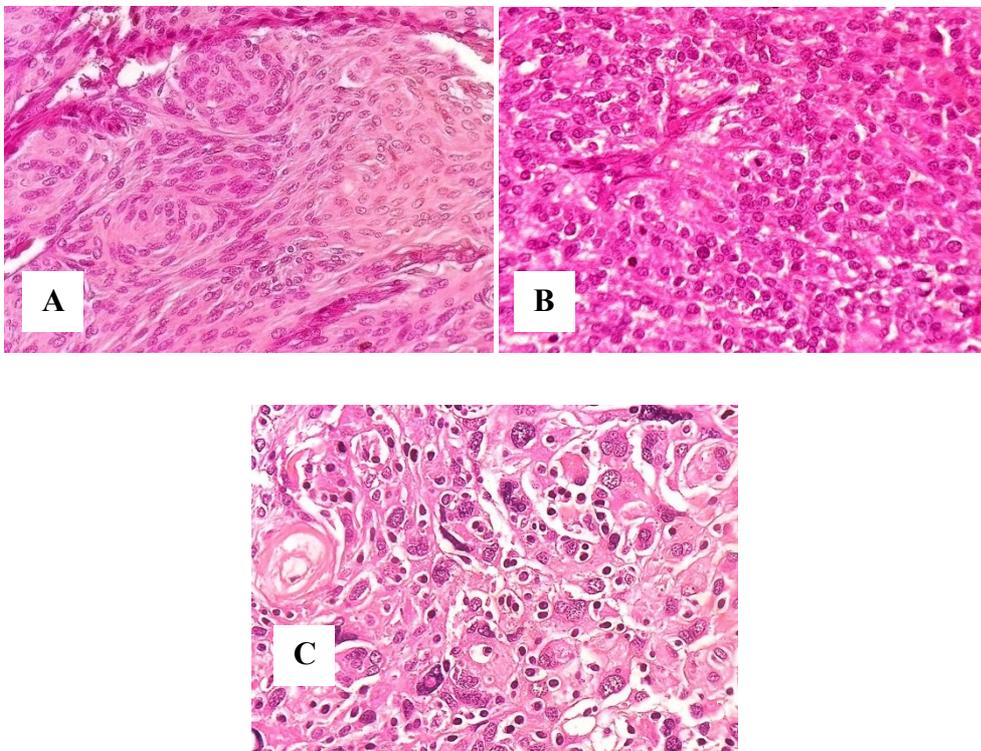
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 2 - Fotomicrografia de Meningiomas grau I, subtipos meningotelial (A), fibroso (B), psamomatoso (C) e transicional (D).



Coloração HE, aumento intermediário 200x.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 3 - Fotomicrografia de Meningiomas grau I (A), grau II (B) e grau III (C).



Coloração HE, aumento intermediário 200x. Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 3 - Análise de variáveis clínicas e sua relação com a taxa de recidiva tumoral em pacientes portadores de meningiomas.

	Recidiva						Valor de p
	Total		Não		Sim		
	n	%	n	%	n	%	
Idade							
Até 55	47	50,5	37	50,7	10	50,0	0,95
>55	46	49,5	36	49,3	10	50,0	
Sexo							
Feminino	66	71,0	56	76,7*	10	50,0	0,02
Masculino	27	29,0	17	23,3	10	50,0	
*							
Localização							
Lobos cerebrais	49	52,7	37	50,7	9	51,9	0,38
Meninges	5	5,4	4	5,5	1	9,1	
Esfenoide	4	4,3	4	5,5	0	0,0	
Extra-axial	7	7,5	6	8,2	1	3,3	
Extra-dural	3	3,2	3	4,1	0	0,0	
Bulbo / goteira	5	5,4	5	6,8	0	0,0	
olfatória							
Não informada	20	21,5	14	19,2	6	9,7	

*p<0,05, teste exato de Fisher ou qui-quadrado de Pearson. Fonte: Elaborada pelo autor.

Observou-se que o sexo influenciou na taxa de recidiva dos tumores. Do total de pacientes que não apresentavam recidiva tumoral 76,7% eram do sexo feminino e apenas 23,3% eram do sexo masculino (p: 0,02; tabela3). Quando comparamos o grau dos meningiomas e sua relação com o sexo dos pacientes, também encontramos a influência do sexo. Do total de pacientes do sexo masculino analisados, 37% exibiam tumores grau II e 7,4% tumores grau III; do total de pacientes do sexo feminino, 7,6% apresentaram tumores grau II e 3,0% tumores grau III(p: 0,001; tabela 4).

Tabela 4 - Análise comparativa entre o grau dos meningiomas e sua relação com o sexo dos pacientes.

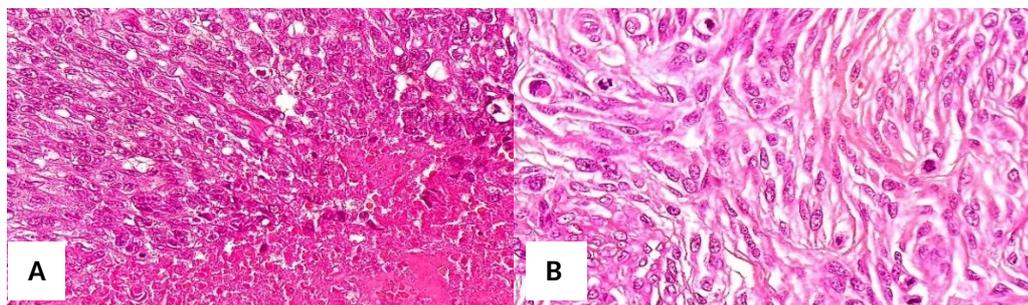
		Total	Sexo		p-valor
			Feminino	Masculino	
Grau histológico	I	74	59	15	0,001
		79,6%	89,4%*	55,6%	
	II	15	5	10	37,0%*
		16,1%	7,6%		
	III	4	2	2	7,4%*
		4,3%	3,0%		

*p<0,05, teste exato de Fisher ou qui-quadrado de Pearson. Fonte: Elaborada pelo autor.

A associação entre recidiva tumoral e índice mitótico mostrou que, do total de pacientes que recidivaram, 60,0% apresentaram pelo menos 1 figura de mitose ou mais em 10 campos de grande aumento tiveram recidiva da doença (p: < 0,001; figura 4; tabela 5). Os tumores que recidivaram também apresentaram outras características morfológicas relevantes: presença de macronúcleolo em 25% dos casos (p: 0,001) e presença de necrose em 30% dos casos (p: 0,02; figura 4; tabela5).

A infiltração de parênquima cerebral também foi outro critério que se correlacionou com recidiva da doença, estando presente em 20% do total de casos recidivados (p: 0 001). O pleomorfismo, quando presente em qualquer grau (leve, moderado ou intenso), mostrou 35% de taxa de recidiva tumoral (p-valor: 0 001; tabela 5).

Figura 4 -Fotomicrografia de alterações morfológicas de meningiomas que conferiram pior prognóstico, necrose tumoral (A) e figuras de mitose (B).



Coloração HE, aumento intermediário 200x(A), maior aumento 400x(B) . Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 5 - Análise de variáveis morfológicas e sua relação com a taxa de recidiva tumoral em pacientes portadores de meningioma.

		Recidiva						
		Total		Não		Sim		p-valor
		n	%	n	%	n	%	

Subtipo morfológico							
Anaplásico	3	3,2	0	0,0	3	15,0*	<0,00 1
Angiomatoso	2	2,2	2	2,7	0	0,0	
Atípico	15	16,1*	7	9,6	8	40,0*	
Fibroso	13	14,0	13	17,8*	0	0,0	
Meningotelial	44	47,3	38	52,1*	6	30,0	
Metaplásico	3	3,2	3	4,1	0	0,0	
Papilífero	1	1,1	0	0,0	1	5,0	
Psamomatoso	6	6,5	5	6,8	1	5,0	
Transicional	6	6,5	5	6,8	1	5,0	
Grau histológico							
I	74	79,6	66	90,4*	8	40,0	<0,00 1
II	15	16,1	7	9,6	8	40,0*	
III	4	4,3	0	0,0	4	20,0	
Grau histológico							
I	74	79,6	66	90,4*	8	40,0	<0,00 1
II / III	19	20,4	7	9,6	12	60,0*	

*p<0,05, teste exato de Fisher ou qui-quadrado de Pearson. Fonte: Elaborada pelo autor.

Em relação ao tempo livre de progressão de doença (TLPD) durante o período de realização do estudo, os pacientes que tinham recidiva de doença tiveram menor tempo, média de 21 meses, comparado com os pacientes que não tiveram recidiva, média de 73 meses (p-valor: < 0,001; tabela 7). No presente estudo, os pacientes do sexo masculino apresentaram pior TLPD, média de 42 meses, em comparação com as mulheres que tiveram média de 71 meses (p-valor: 0,01; tabela 7). A presença de necrose também diminuiu o TLPD, média de 50 meses (p-valor: 0,01; tabela 7). Os pacientes que apresentaram invasão de parênquima cerebral e atividade mitótica também tiveram redução de TLPD, média de 29 e 42 meses, respectivamente (p-valor:< 0,001; tabela 7). A presença de macronucléolo, na análise morfológica, também conferiu redução de TLPD com média de 45 meses (p-valor: 0,01; tabela 7). O critério de hiper celularidade tumoral apontou média de 23 meses (p-valor: 0,004). A presença de pleomorfismo também indicou piora do TLPD, com média de 40 meses (p-valor:<0,001; tabela 7).

Tabela 7-Análise de variáveis clínicas e morfológicas, e sua relação com o tempo médio livre de progressão de doença (TLPD) em meses em pacientes portadores de meningiomas.

Tempo livre de progressão de doença	
Média±EPM	IC 95%

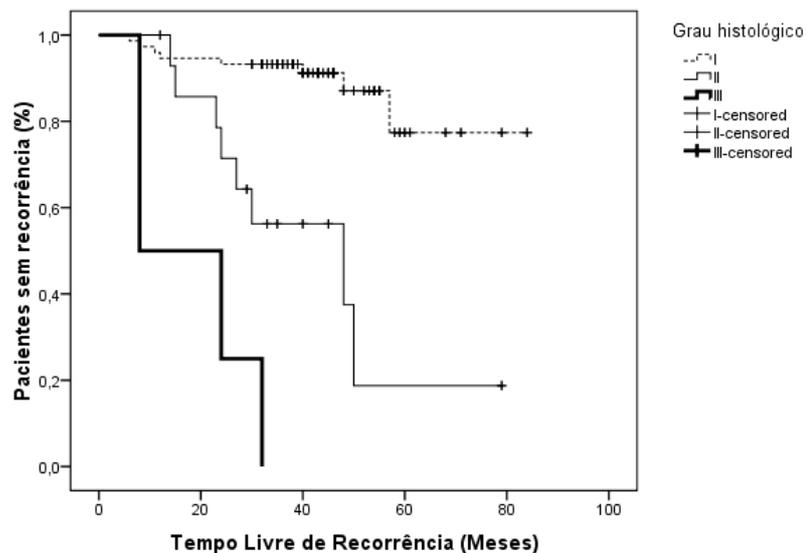
Toda a amostra	67,02±3,48	60,19-73,84	-
Tumor			
Tumores recidivados	21,23±4,32	12,77-29,70	<0,001
Tumores não-recidivados	73,75±3,29*	67,30-80,21	
Sexo			
Feminino	71,85±3,66*	64,68-79,02	0,010
Masculino	42,74±3,00	36,87-48,62	
Índice mitótico			
0 céls	73,53±3,76*	66,16-80,89	<0,001
>0 céls	42,32±6,20	30,17-54,47	
Invasão parênquima cerebral			
Não	68,75±3,53*	61,83-75,68	<0,001
Sim	29,00±1,96	25,16-32,84	
Macronúcleo			
Não	70,93±3,13*	64,79-77,07	0,010
Sim	45,57±8,42	29,06-62,08	
Necrose			
Não	69,03±3,72*	61,75-76,31	0,011
Sim	50,14±8,62	33,24-67,04	
Hiper celularidade			
Não	67,50±3,49*	60,67-74,34	0,004
Sim	23,00±,00	23,00-23,00	
Pleomorfismo			
Ausente	71,05±3,56*	64,08-78,02	<0,001
Presente	40,00±7,65	25,00-55,00	
Grau histológico			
I	74,15±3,50*	67,29-81,02	<0,001
II / III	37,46±5,91	25,88-49,04	
Imunoexpressão de IFN			
Não	65,30±4,26*	56,96-73,64	0,228
Sim	70,55±4,33	62,07-79,03	

*p<0,05, teste de Long-Rank Mantel-Cox. Fonte: Elaborada pelo autor.

Os pacientes com meningioma de baixo grau, grau I, tiveram TLPD, média de 74 meses, contra média de 37 meses dos pacientes com meningioma de alto grau, grau II e III, (p-valor:<0,001) (tabela 7). A curva de Kaplan-Meier corrobora este dado, relacionando os pacientes sem recorrência da doença no estudo e o TLPD por grau histológico, destacando

que pacientes com tumores grau III, têm menor TLPD, seguidos pelos tumores grau II e pelos tumores grau I (gráfico 2).

Gráfico 2 – Curva de Kaplan-Meier relacionando os pacientes sem recorrência da doença no estudo e o tempo livre de progressão de doença por grau histológico.

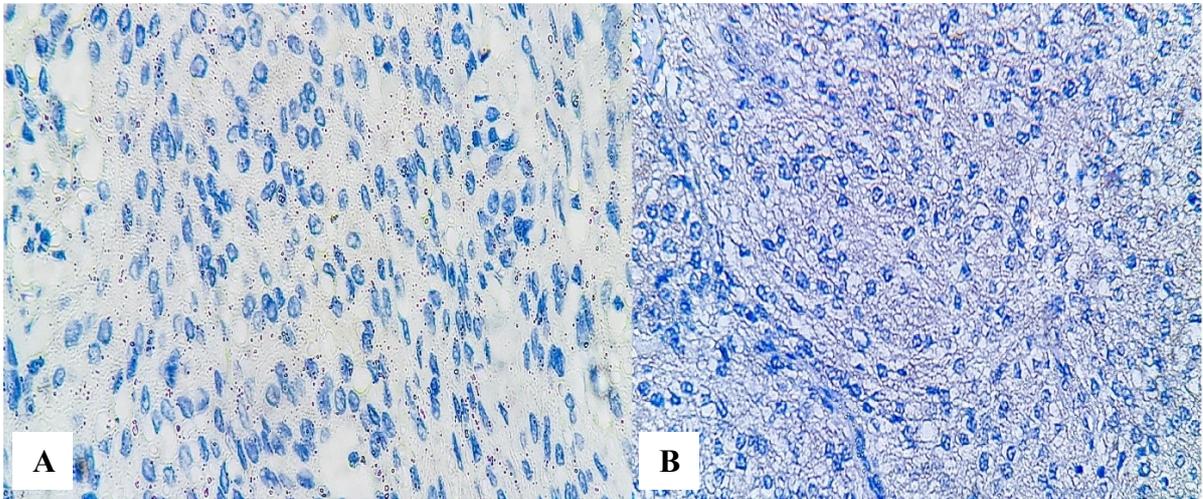


Fonte: Elaborado pelo autor.

Não houve imunoposição de PD-L1 em nenhum dos 93 casos analisados, avaliando-se os dois clones utilizados. As reações imuno-histoquímicas foram validadas com

controles externos positivos e protocolos específicos seguidos para cada anticorpo testado (figuras 5 e 6).

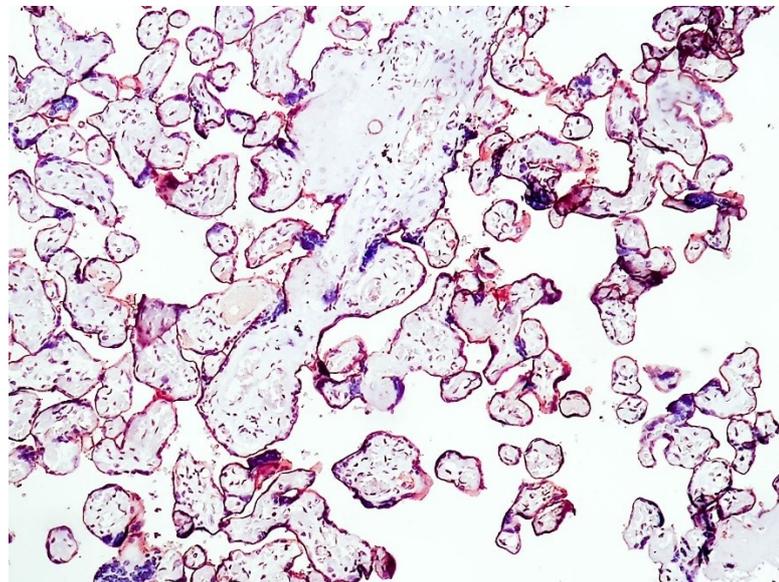
Figura 5 –Fotomicrografia de meningiomas mostrando ausência de imunoposição para PD-L1 nos dois clones testados, Clone Dako 22C3(A), Clone Ventana SP263(B).



Técnica de imuno-histoquímica para PD-L1. Fonte: Elaborada pelo autor.



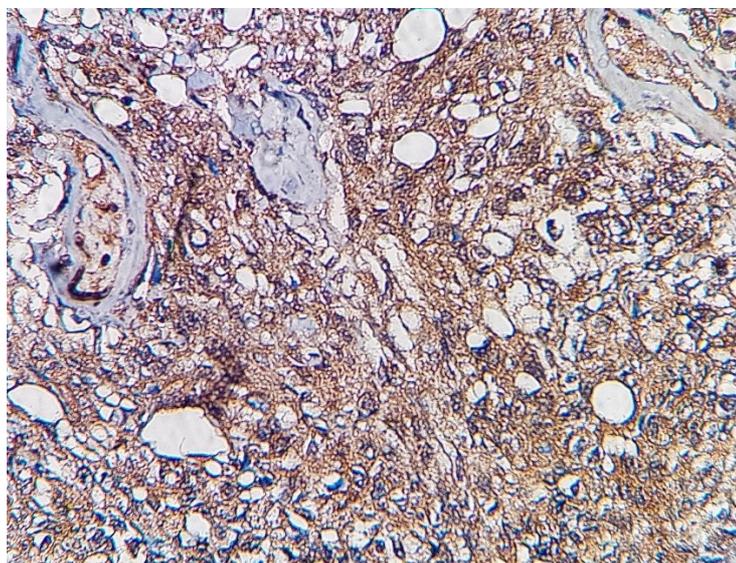
Figura 6 - Fotomicrografia de controle externo utilizando tecido placentário por reação imuno-histoquímica com anticorpo anti-PD-L1 (marcação membranar e circunferencial completa).



Técnica de imuno-histoquímica para PD-L1. Fonte: Elaborada pelo autor

Dos 93 pacientes avaliados, 21 deles (22,6%) apresentaram imunoposição de IFN- γ (figura 7). Observou-se ainda que do total de pacientes com imunoposição positiva para este marcador, 52,4% eram do sexo feminino (p: 0,03; tabela 8).

Figura 7 - Fotomicrografia de meningioma exibindo intensa e difusa imunoexpressão de IFN- γ em células tumorais.



Técnica de imuno-histoquímica para IFN- γ . Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 8 - Análise da imunoexpressão de IFN- γ e sua relação com variáveis clínicas em pacientes portadores de meningioma

	IFN- γ				p-valor
	Não		Sim		
Idade					
Até 55	37	51,4%	10	47,6%	0,761
>55	35	48,6%	11	52,4%	
Sexo					
Feminino	55	76,4%*	11	52,4%	0,033
Masculino	17	23,6%	10	47,6%*	
Localização					
Lobos cerebrais	40	55,5%*	9	42,3%	0,014
Meninges	5	6,9%	0	0,0%	
Esfenoide	4	5,6%	0	0,0%	
Extra-axial	2	2,8%	5	23,8%*	
Extra-dural	3	4,2%	0	0,0%	
Bulbo / goteira olfatória	5	6,9%*	0	0,0%	
Não informada	13	18,1%	7	33,9%*	

*p<0,05, teste exato de Fisher ou qui-quadrado de Pearson. Fonte: Elaborada pelo autor.

O presente estudo constatou que do total de tumores com imunoexpressão de IFN- γ , a maioria se localizava em topografia de lobos cerebrais (42,3%) quando comparada com todas as outras topografias (p: 0,014; tabela 8).

A imunoexpressão de IFN- γ também se relacionou com ausência de pleomorfismo nas células tumorais, revelando que este marcador confere melhor diferenciação e menor grau tumoral. Do total de pacientes que apresentavam imunoexpressão de IFN- γ , 85,7% não

exibiam pleomorfismo celular e 14,3% exibiam apenas pleomorfismo leve. Nenhum dos tumores com pleomorfismo moderado ou acentuado apresentou imunoeexpressão de IFN- γ (p: 0,04; tabela 9).

Apesar de não haver significância estatística na relação entre a imunoeexpressão de IFN- γ e as variáveis de grau dos meningiomas e subtipos morfológicos, destaca-se que do total de pacientes que apresentavam imunoeexpressão de IFN- γ , 71,4% foram meningiomas grau I, 28,6% foram meningiomas atípicos. Nenhum dos tumores grau III apresentaram imunoeexpressão de IFN- γ (p: 0,13; tabela 9). Dos tumores grau I, os subtipos meningotelial e fibroso foram os que mais expressaram IFN- γ com 33% e 19% respectivamente (p: 0,57; tabela 9; gráfico 3).

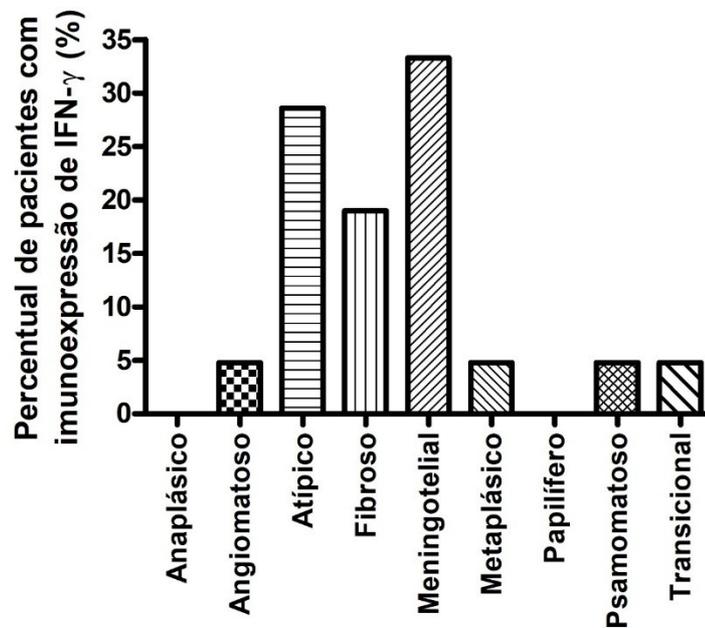
Tabela 9 - Análise da imunoeexpressão de IFN- γ e sua relação com variáveis morfológicas em pacientes portadores de meningioma.

	IFN				p-valor
	Não		Sim		
	n	%	n	%	
Índice mitótico					
0 céls	58	80,6	14	66,7	0,18
>0 céls	14	19,4	7	33,3	
Invasão parênquima cerebral					
Não	68	94,4	20	95,2	0,887
Sim	4	5,6	1	4,8	
Macronúcleo					
Não	67	93,1	19	90,5	0,693
Sim	5	6,9	2	9,5	
Necrose					
Não	64	88,9	16	76,2	0,14
Sim	8	11,1	5	23,8	
Hiper celularidade					
Não	71	98,6	21	100,0	0,587
Sim	1	1,4	0	0,0	
Pleomorfismo					
Ausente	65	90,3*	18	85,7	0,044
Leve	1	1,4	3	14,3*	
Moderado	5	6,9	0	0,0	
Intenso	1	1,4	0	0,0	
Subtipo morfológico					

Anaplásico	3	4,2	0	0,0	0,571
Angiomatoso	1	1,4	1	4,8	
Atípico	9	12,5	6	28,6	
Fibroso	9	12,5	4	19,0	
Meningotelial	37	51,4	7	33,3	
Metaplásico	2	2,8	1	4,8	
Papilífero	1	1,4	0	0,0	
Psamomatoso	5	6,9	1	4,8	
Transicional	5	6,9	1	4,8	
Grau histológico					
I	59	81,9	15	71,4	0,136
II	9	12,5	6	28,6	
III	4	5,6	0	0,0	
Grau histológico					
I	59	81,9	15	71,4	0,293
II / III	13	18,1	6	28,6	

*p<0,05, teste exato de Fisher ou qui-quadrado de Pearson. Fonte: Elaborada pelo autor.

Gráfico 3 – Imunoexpressão de IFN- γ nos subtipos morfológicos de meningiomas



Fonte: Elaborado pelo autor.

Do total de casos que recidivaram, cerca de 85% não exibiam imunoposição de IFN- γ (p-valor: 0,36; tabela 10). Este resultado também não mostra significância estatística.

Tabela 10 - Análise da imunoposição de IFN- γ e sua relação com a taxa de recidiva tumoral em pacientes portadores de meningioma.

	Recidiva				p-valor		
	Total	Não	Sim				
IFN- γ							
Não	72	77,4%	55	75,3%	17	85,0%	0,360
Sim	21	22,6%	18	24,7%	3	15,0%	

*p<0,05, teste exato de Fisher ou qui-quadrado de Pearson. Fonte: Elaborada pelo autor.

Ressalta-se ainda que, neste estudo, os casos que apresentaram expressão de IFN- γ tiveram média de 71 meses de TLPD, contra 65 meses dos casos que não apresentavam imunoposição deste marcador (p-valor: 0,228; tabela 7).

Quando se considera a imunoposição de IFN- γ como variável de entrada forçada (variável que, mesmo não influenciando significativamente o desfecho de sobrevida livre de progressão de doença, apresenta-se como foco de estudo), encontrou-se que a ausência da expressão deste marcador relaciona-se com aumento do risco de progressão de doença em até 3,46 vezes (p-valor: 0,01; tabela 11). A curva de Kaplan-Meier corrobora este dado, relacionando os pacientes sem recorrência da doença no estudo e o TLPD por imunoposição de IFN- γ , destacando que pacientes com expressão deste marcador tem maior TLPD (gráfico 4).

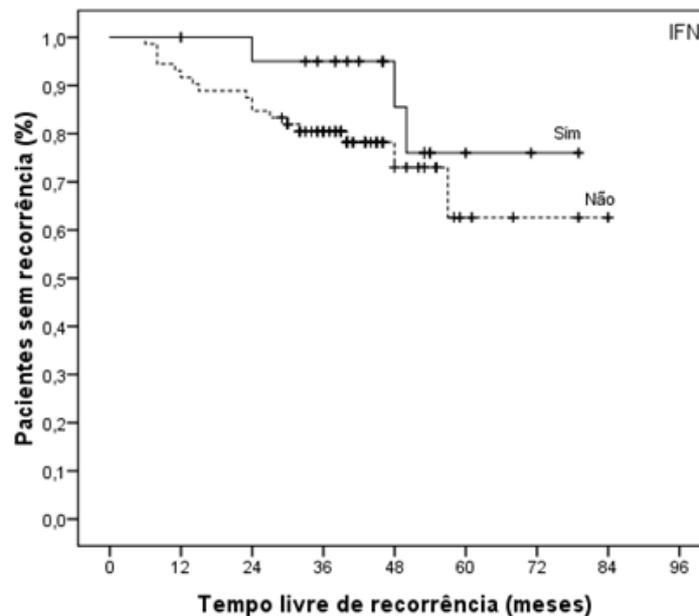
Tabela 11 - Análise multivariada de variáveis clínicas e morfológicas, utilizando o IFN- γ como variável de entrada forçada para o risco de progressão de doença.

	p-valor	HR	IC 95%	
Risco de progressão de doença				
Sexo (masculino)	0,623	1,37	0,39	4,73
Índice mitótico (>0)	0,482	1,96	0,30	12,75
Invasão do parênquima cerebral (Sim)	0,595	1,48	0,35	6,23
Macronúcleo (Sim)	0,383	0,43	0,06	2,86
Necrose (Sim)	0,692	1,30	0,35	4,79
Hiperplasticidade (Sim)	0,375	3,00	0,27	33,94
Pleomorfismo (Presente)	0,358	2,26	0,40	12,89

Subtipo morfológico (anaplásico / atípico)	0,474	3,26	0,13	82,87
Grau histológico (II/III)	0,306	7,79	0,15	396,31
Risco de progressão de doença com INF				
Sexo (masculino)	0,392	1,52	0,58	3,94
Índice mitótico (>0)	0,623	1,49	0,30	7,31
Invasão do parênquima cerebral (Sim)	0,965	0,98	0,33	2,89
Macronúcleo (Sim)	0,478	0,63	0,18	2,23
Necrose (Sim)	0,288	1,71	0,64	4,56
Hiper celularidade (Sim)	0,420	2,00	0,37	10,78
Pleomorfismo (Presente)	0,353	1,73	0,54	5,51
Subtipo morfológico (anaplásico / atípico)	0,482	2,19	0,25	19,47
Grau histológico (II/III)	0,127	8,33	0,55	126,77
IFN (Ausente)	0,012	3,46*	1,31	9,15

* $p < 0,05$, teste exato de Fisher ou qui-quadrado de Pearson. Fonte: Elaborada pelo autor.

Gráfico 4: Curva de Kaplan-Meier relacionando os pacientes sem recorrência da doença no estudo e o tempo livre de progressão de doença por imunoposição de IFN- γ .



Fonte: Elaborado pelo autor.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo confirma o perfil epidemiológico já amplamente relatado na literatura dos meningiomas (JAASKELAINEN *et al.*, 1986), revelando uma faixa etária de idade mediana de 55 anos com prevalência em sexo feminino (71% dos casos; tabela 2). Os tumores grau I corresponderam a 79,6%, grau II a 16,1%, grau III a 4,3%, corroborando a afirmação de Cordera *et al.* (2002) de que a maioria dos casos é de tumores grau I, em relação aos tumores grau II e grau III (tabela 2 e 4; gráfico 1). O subtipo morfológico mais comum também está em acordo com os estudos sobre meningiomas que ressaltam a maior frequência do subtipo meningotelial (KLAEBOE *et al.*, 2005).

O estudo confirmou que diversos critérios clínicos e morfológicos relacionam-se a um pior prognóstico com maiores taxas de recidiva e redução da sobrevida livre de progressão de doença (tabelas 3, 5,6 e 7). Estes critérios já são fortemente estabelecidos como critérios de malignidade em meningiomas (PERRY *et al.*, 1997).

O índice mitótico é um forte critério de atipia em meningiomas (MAIER *et al.*, 1992), neste estudo, esteve relacionado à recidiva e menor sobrevida livre de progressão de doença (tabelas 5 e 7). A infiltração de parênquima cerebral também foi outro critério de impacto prognóstico, o que também está de acordo com a edição da OMS 2016 que orienta que tumores apresentando infiltração do parênquima cerebral já sejam classificados como tumores grau II (tabelas 5 e 7), independente de outros critérios (DAVID *et al.*, 2016). A presença de macronucléolo, necrose, pleomorfismo moderado ou intenso e aumento da celularidade, também foram relacionadas com pior prognóstico e confirmam que estes aspectos morfológicos devem ser amplamente avaliados no estudo histopatológico destes tumores, como evidenciado nas tabelas 5, 6 e 7 (JAASKELAINEN *et al.*, 1986; PERRY *et al.*, 1997; MAIER *et al.*, 1992).

O grau tumoral encontra-se claramente relacionado ao prognóstico dos pacientes (PERRY *et al.*, 1999); neste estudo, todos os casos de meningiomas grau III recidivaram e 53,3% dos tumores grau II também recidivaram quando comparados com apenas 10% dos tumores grau I (tabelas 6 e 7, gráfico 2).

O pior prognóstico em pacientes do sexo masculino também está de acordo com a literatura, a qual mostrava que estes casos já apresentavam maiores taxas de mitose e proliferação celular quando comparados com a população feminina (MATSUNO *et al.*, 1996). Os pacientes do sexo masculino avaliados neste estudo tiveram maior percentual de tumores

de alto grau, além de elevadas taxas de recidiva e menor sobrevida livre de progressão de doença (tabelas 3, 4 e 7).

Trabalhos como os de Parsa *et al.* (2007) e Nduom *et al.* (2016) mostraram que o PD-L1 foi encontrado expresso em glioblastoma, bem como em meningiomas de alto grau, elevando a possibilidade de inibição do ponto de checagem imune nos tumores do sistema nervoso central para os quais ensaios clínicos estão em andamento (DU *et al.*, 2015).

Estudos por imuno-histoquímica avaliaram a expressão de PD-L1 em células tumorais e concluíram que a maior expressão de PD-L1 no tumor e no microambiente tumoral se correlaciona com prognóstico pior e tempo de sobrevida reduzido e/ou maior grau tumoral (GAO *et al.*, 2009; WU *et al.*, 2006). Alguns ensaios clínicos recentes de agentes visando PD-1 ou PD-L1 demonstraram regressão tumoral durável e estabilização prolongada da doença em pacientes com carcinoma pulmonar não-pequenas células, melanoma, carcinoma de células clara renal e Linfoma de Hodgkin (GERLINGER *et al.*, 2012; TUMEH *et al.*, 2014; MATSUSHITA *et al.*, 2012; YADAV *et al.*, 2014; GUIDOBONI *et al.*, 2001).

Nosso estudo, contudo, não detectou imunoexpressão de PD-L1 em nenhum dos 93 casos analisados.

Wang *et al.* (2018) estudaram a imunoexpressão de PD-L1 em tumores relacionados à neurofibromatose tipo 1 e 2, analisando um total de 10 meningiomas de grau não especificado em portadores de neurofibromatose tipo 2. Este estudo trabalhou com blocos de TMA e realizou reações imuno-histoquímicas com dois clones de anticorpos anti-PD-L1 (clones SP142 e E1L3N), considerou como sendo positivo os casos que apresentaram mais de 5% de expressão membranar de PD-L1 em células tumorais. Os resultados mostraram imunoexpressão de PD-L1 em 4 dos 10 casos para o clone SP142 e em 2 para o clone E1L3N. Estas divergências em relação ao nosso estudo parecem estar associadas à diferença de clones utilizados e ao fato da amostragem de meningiomas selecionados serem todos relacionados a portadores de neurofibromatose e apresentarem populações significativas de linfócitos infiltrantes tumorais, que também foram contabilizados por este grupo de pesquisadores.

Em contraste, Du *et al.* (2014) encontraram alta expressão da proteína PD-L1 em cerca de 40% de grau I, 60% de grau II e 80 de grau III. Este estudo detectou a presença de RNAm relacionado ao PD-L1 pela técnica de RT-PCR com extração de RNA de amostra de meningiomas de diversos graus congeladas, além da pesquisa da imunoexpressão da proteína PD-L1 pela técnica de *immunoblot*. Estas diferenças na imunoexpressão de PD-L1

encontradas podem refletir a necessidade de se utilizar técnicas moleculares mais acuradas que reflitam a real expressão desta proteína.

Aponta-se ainda o fato deste estudo ter utilizado a técnica de representação de material por TMA, onde algumas áreas representativas do tumor são selecionadas para realização das reações imuno-histoquímicas, pode haver viés de amostragem na análise dos tumores, tendo em vista que apenas uma área será sujeita a análise e não toda a extensão tumoral.

Um relatório publicado recentemente mostrou o caso de um paciente com adenocarcinoma pulmonar metastático que também apresentava diagnóstico de meningioma, tendo sido tratado com o anticorpo monoclonal anti-PD-L1 Nivolumabe, para o primeiro. Houve diminuição no tamanho do meningioma (GELERSTEIN *et al.*, 2017).

O tratamento de meningiomas com o anticorpo monoclonal anti-PD-L1 foi relatado em um caso e mostrou diminuição significativa no tamanho do tumor (BI *et al.*, 2016). PD-L1 também foi encontrado expresso em macrófagos infiltrantes em meningiomas, além das células tumorais (HAN *et al.*, 2016). Isso pode apontar que as populações de células imunes no microambiente tumoral interferem na imunoexpressão do PD-L1.

Em estudo recente, Hao *et al.* (2019) avaliaram 92 casos de meningiomas de base de crânio, realizando sequenciamento gênico para verificação de mutações que possam estar associadas às vias de inibição de *checkpoint* imunológico. Concluíram que os meningiomas que apresentavam a mutação TRAF7 apresentavam maiores níveis de expressão de PD-L1, a qual foi mensurada por técnicas de imuno-histoquímica e *Western blot*, afirmando ainda o papel crucial de vias mutagênicas na supressão da resposta imune no microambiente tumoral. Este estudo nos proporciona a reflexão sobre o papel de diversas vias mutagênicas que guardam relação com os mecanismos de escape imune tumoral e que influenciam na expressão do PD-L1 e que ainda não são totalmente elucidadas.

Porém, estudos como os de Aizer *et al.* (2014) e Wang *et al.* (2018) mostraram resultados semelhantes aos nossos, revelando baixa expressão de PD-L1, sugerindo, inclusive, que a expressão desse biomarcador seja incomum em meningiomas.

Alguns autores chegam a questionar a aplicabilidade da imunoterapia em meningiomas e argumentam que este tratamento torne-se uma opção excepcional em casos de meningiomas recorrentes que possuam um rico infiltrado de células T inflamatórias (CHAMBERLAIN, 2012; JENKINS *et al.*, 2015; AIZER *et al.*, 2014).

Portanto, a expressão de PDL1 em células de meningioma e seu papel potencial na imunossupressão local parecem não está totalmente estabelecida, e sua indicação como tratamento alternativo para meningiomas ainda é controversa (HAN *et al.*, 2016; DU *et al.*, 2014; BI *et al.*, 2016; GELERSTEIN *et al.*, 2017).

Verificou-se que o tratamento com IFN- α inibe o crescimento de linhas celulares de meningioma humano cultivadas *in vitro* (KOPER *et al.*, 1991). Estudos mostram ainda ser uma terapia alternativa para meningiomas recorrentes e refratários. Evidências sugerem sua ação antiproliferativa, imunomoduladora e antiangiogênica nestes tumores (JONASCH *et al.*, 2001, KOPER *et al.*, 1991; VON MARSCHALL *et al.*, 2003).

Em um ensaio clínico realizado com meningiomas recorrentes e refratários grau I da OMS que realizaram cirurgia e radioterapia, o tratamento com IFN- α demonstrou sobrevida livre de progressão de doença em 6 e 12 meses de 52 e 29% respectivamente (CHAMBERLAIN; GLANTZ, 2008).

O tratamento atual do meningioma de alto grau utiliza cirurgia citorrredutora com a intenção de ressecção completa, muitas vezes envolvendo mais de uma cirurgia, bem como radioterapia. Chamberlain *et al.*(2012) estudaram a utilização de IFN- α no tratamento de meningiomas de alto grau, mas concluíram não haver impacto em sobrevida. Outro estudo realizado em seis pacientes com quadro de meningioma não ressecável e recorrente que receberam IFN- α durante cinco dias por semana, um paciente teve menor redução do tumor e quatro pacientes mostraram doença estável que durou até 14 meses (KABA *et al.*, 1997).

Muhr *et al.* (2001) realizaram um estudo maior e mais longo com 12 pacientes, no qual relataram que 9 pacientes tiveram doença estável após tratamento com IFN- α , que durou até oito anos. Em estudo realizado por Chamberlain e Glantz (2008) com 35 pacientes com meningioma grau I, que receberam diariamente INF- α subcutâneo, mostrou que dez pacientes tiveram toxicidade leve, necessitando de redução da dose da droga, mas, no geral, a droga era segura. Vinte e cinco pacientes (74%) apresentaram doença estável com tempo mediano até a progressão tumoral de sete meses e apenas nove pacientes (26%) tiveram progressão da doença.

O presente estudo mostrou resultados interessantes em relação à imunoexpressão de IFN- γ . Apesar de não haver significância estatística em algumas destas análises realizadas, provavelmente em virtude do baixo número de casos com imunoexpressão para IFN- γ amostrados, parece haver uma tendência em considerar a imunoexpressão do IFN- γ como variável redutora de risco de recidiva e melhora do tempo livre de progressão de doença.

Observou-se que os pacientes com imunexpressão de IFN- γ apresentaram menores taxas de recidiva tumoral e maior tempo livre de progressão de doença (tabelas 7, 8, 9 e 10; gráficos 3 e 4).

Quando se analisa o IFN- γ como variável de entrada forçada, destaca-se que a ausência da expressão deste marcador aumenta o risco de progressão de doença em 3,46 vezes (tabela 11; gráfico 4).

Constatou-se ainda uma diferença da imunexpressão em relação ao sexo do paciente, mulheres apresentaram maior expressão de IFN- γ que homens (tabela 8). Evidenciou-se também que a maioria dos tumores com imunexpressão de IFN- γ estavam localizados em lobos cerebrais, 42,3% (tabela 8).

A imunexpressão de IFN- γ também se relacionou com ausência de pleomorfismo nas células tumorais, revelando que este marcador confere melhor diferenciação e menor grau tumoral. Do total de pacientes que apresentavam imunexpressão de IFN- γ , 85,7% não exibiam pleomorfismo celular e 14,3% exibiam apenas pleomorfismo leve. Nenhum dos tumores com pleomorfismo moderado ou acentuado apresentou imunexpressão de IFN- γ (tabela 9). Viu-se ainda que do total de pacientes que apresentavam imunexpressão de IFN- γ , 71,4% foram meningiomas grau I, 28,6% foram meningiomas atípicos. Nenhum dos tumores grau III apresentaram imunexpressão de IFN- γ (tabela 9; gráfico 3).

Neste estudo, aponta-se que do total de casos que recidivaram, cerca de 85% não exibiam imunexpressão de IFN- γ (tabela 8). Ressalta-se ainda que os casos que apresentaram expressão de IFN- γ tiveram média de 71 meses de SLPD, contra 65 meses dos casos que não apresentavam imunexpressão deste marcador (tabela 7).

6 CONCLUSÃO

A expressão de PDL1 em células de meningioma e seu papel potencial na imunossupressão local não estão totalmente estabelecidos e sua indicação de terapia anti-PD-L1 como tratamento alternativo para meningiomas ainda é controversa. Não se encontrou imunoeexpressão de PD-L1 nos casos analisados, concordando com diversas publicações que sugerem a baixa expressão de PD-L1 nestes tumores, orientando que o papel da imunoterapia com anticorpos anti-PD-L1 em meningiomas pode não ter aplicabilidade e resultados favoráveis.

Os pacientes com imunoeexpressão de IFN- γ apresentaram menores taxas de recidiva tumoral, maior tempo de sobrevida livre de progressão de doença. Constatou-se ainda uma diferença da imunoeexpressão em relação ao sexo do paciente, mulheres apresentaram maior expressão de IFN- γ que homens, e maior expressão em meningiomas localizados em lobos cerebrais. A imunoeexpressão de IFN- γ em células tumorais também se relacionou com ausência de pleomorfismo nas células tumorais e menor grau tumoral. Concluimos ser este um possível biomarcador em meningiomas, tendo em vista diversas publicações, relatórios e ensaios clínicos que propõe a utilização do interferon como alternativa terapêutica.

REFERÊNCIAS

- AIZER, A. A. *et al.* Adjuvant radiation therapy, local recurrence, and the need for salvage therapy in atypical meningioma. **Neurooncology**, v. 16, p. 1547–53, 2014.
- BI, W. L. *et al.* Checkpoint inhibition in meningiomas. **Immunotherapy**, v. 8, p. 721–31, 2016.
- BITZER, M. *et al.* The importance of pial blood supply to the development of peritumoral brain edema in meningiomas. **J Neurosurg.**, v. 87, p. 368–373, 1997.
- BLANK, C. *et al.* PD-L1/B7H-1 inhibits the effector phase of tumor rejection by T cell receptor (TCR) transgenic CD8+ T cells. **Cancer Res.**, v. 64, p. 1140–1145, 2004.
- BROWN, J. A. *et al.* Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. **J Immunol.**, v. 170, p. 1257–1266, 2003.
- CHAMBERLAIN, M. C. The role of chemotherapy and targeted therapy in treatment of intracranial meningioma. **Curr Opin Oncol**, v. 24, p. 666–71, 2012.
- CHAMBERLAIN, M. C.; GLANTZ, M. J. Interferon-alpha for recurrent world health organization grade 1 intracranial meningiomas. **Cancer**, v. 113, p. 2146–2151, 2008.
- CHEN, W. *et al.* Cancer statistics in China, 2015. **CA Cancer J Clin.**, v. 66, n. 2, p. 115–32, 2016.
- COLAKOGLU, N. Secretory meningiomas. **J Neurooncol.**, v. 62, p. 233–241, 2003. DOI: 10.1215/15228517-2008-109.
- CORDERA, S. *et al.* Epidemiology of primary intracranial tumours in NW Italy, a population based study: stable incidence in the last two decades. **J Neurol**, v. 249, p. 281–284, 2002.
- CURIEL, T. J. *et al.* Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. **Nat Med.**, v. 9, p. 562–567, 2003.
- DAVID, L. *et al.* The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System. **Acta Neuropathol**, v. 131, p. 299–307, 2016.
- DOMINGUES, P. H. *et al.* Immunophenotypic identification and characterization of tumor cells and infiltrating cell populations in meningiomas. **Am J Pathol.**, v. 181, n. 5, p. 1749–1761, 2012.
- DONG, H. *et al.* B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion 10.1038/70932. **Nat Med.**, v. 5, p. 1365–1369, 1999.
- DONG, H. *et al.* Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. **Nat Med.**, v. 8, p. 793–800, 2002.

DU, Z. *et al.* Increased expression of the immune modulatory molecule PD-L1 (CD274) in anaplastic meningioma. **Oncotarget**, v. 6, n. 7, p. 4704-4716, 2015. DOI: 10.18632/oncotarget.3082.

DU, Z. *et al.* Increased expression of the immune modulatory molecule PD-L1 (cD274) in anaplastic meningioma. **Oncotarget**, v. 6, p. 4707-16, 2014.

FREEMAN, G. J. *et al.* Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. **J Exp Med.**, v. 192, p. 1027-1034, 2000.

GAO, Q. *et al.* Overexpression of PD-L1 significantly associates with tumor aggressiveness and postoperative recurrence in human hepatocellular carcinoma. **Clin Cancer Res.**, v. 15, p. 971-979, 2009.

GELERSTEIN, E. *et al.* Regression of intracranial meningioma following treatment with nivolumab; case report and review of the literature. **J Clin Neurosci Case Rep**, v. 37, p. 51-3, 2017.

GERLINGER, M. *et al.* Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. **N Engl J Med.**, p. 366, n. 10, p. 883-92, 2012.

GHEBEH, H. *et al.* The B7-H1 (PD-L1) T lymphocyte-inhibitory molecule is expressed in breast cancer patients with infiltrating ductal carcinoma: correlation with important high-risk prognostic factors. **Neoplasia.**, v. 8, p. 190-198, 2006.

GIBNEY, G. T. *et al.* Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy. **The Lancet Oncology**. v. 17, n. 12, p. e542-e51, 2016.

GUIDOBONI, M. *et al.* Microsatellite instability and high content of activated cytotoxic lymphocytes identify colon cancer patients with a favorable prognosis. **The American Journal of Pathology**, v. 159, n. 1, p. 297-304, 2001.

HAMANISHI, J. *et al.* Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 104, p. 3360-3365, 2007.

HAN, S. J. *et al.* Expression and prognostic impact of immune modulatory molecule PD-L1 in meningiomas. **J Neurooncol**, v. 130, p. 543-52, 2016.

HAO, S. *et al.* Non-NF2 mutations have a key effect on inhibitory immune checkpoints and tumor pathogenesis in skull base meningiomas. **J Neurooncol.**, Publicação eletrônica não impressa. DOI: 10.1007/s11060-019-03198-9

ISHIDA, Y. *et al.* Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. **EMBO J.**, v. 11, p. 3887-3895, 1992.

IWAI, Y. *et al.* Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 99, p. 12293-12297, 2002.

JAASKELAINEN, J. *et al.* Atypical and anaplastic meningiomas: radiology, surgery, radiotherapy, and outcome. **Surg Neurol**, v. 25, p. 233-242, 1986.

JENKINS, M. D. *et al.* Atypical meningioma; current management dilemmas and prospective clinical trials. **J Neurooncol**, v. 121, p. 1-7, 2015.

JONASCH, E.; HALUSKA, F. G. Interferon in oncology practice: review of interferon biology, clinical applications and toxicities. **Oncologist**, v.6, p. 34-55, 2001.

KABA, S.E. *et al.* The treatment of recurrent unresectable and malignant meningiomas with interferon alpha-2B. **Neurosurgery**, v. 40, p. 271-275, 1997.

KEIR, M. E. *et al.* PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. **Annu Rev Immunol.**, v. 26, p. 677-704, 2008.

KLAEBOE, L. *et al.* Incidence of intracranial meningiomas in Denmark, Finland, Norway and Sweden, 1968-1997. **Int J Cancer**, v. 117, p. 996-1001, 2005.

KONISHI, J. *et al.* B7-H1 expression on non-small cell lung cancer cells and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes and their PD-1 expression. **Clin Cancer Res.**, v. 10, p. 5094-5100, 2004.

KOPER, J. W. *et al.* Inhibition of the growth of cultured human meningioma cells by recombinant interferon-alpha. **Eur. J. Cancer**, v. 27, p. 416-419, 1991.

LAMSZUS, K. Meningioma pathology, genetics, and biology. **J Neuropathol Exp Neurol.**, v. 63, p. 275-286, 2004.

LUO, D. *et al.* Chemophototherapy: An Emerging Treatment Option for Solid Tumors. **Advanced science**, Weinheim;v. 4, n. 1, p. 1600106, 2017.

MAIER, H. *et al.* Classic, atypical, and anaplastic meningioma: three histopathological subtypes of clinical relevance. **J Neurosurg**, v. 77, p. 616-623, 1992.

MATSUNO, A. *et al.* Clinical and histopathological analysis of proliferative potentials of recurrent and non-recurrent meningiomas. **Acta Neuropathol**, v. 91, p. 504-510, 1996.

MATSUSHITA, H. *et al.* Cancer exome analysis reveals a T-cell-dependent mechanism of cancer immunoediting. **Nature**, v. 482, n. 7385, p. 400-4, 2012.

MEAGER, A. *et al.* Detection of hybridomas secreting monoclonal antibodies to human gamma interferon using a rapid screening technique and specificity of certain monoclonal antibodies to gamma interferon. **J Interferon Res.**, v. 4, n. 4, p. 619-25, 1984.

MUHR, C. *et al.* Meningioma treated with interferon-alpha, evaluated with [(11)C]-L-methionine positron emission tomography. **Clin. Cancer Res.**, v. 7, p. 2269-2276, 2001.

NAKANISHI, J. *et al.* Overexpression of B7-H1 (PD-L1) significantly associates with tumor grade and postoperative prognosis in human urothelial cancers. **Cancer Immunol Immunother.**, v. 56, p. 1173–1182, 2007.

NDUOM, E.K. *et al.* PD-L1 expression and prognostic impact in glioblastoma. **Neuro Oncol.**, v. 18, n. 2, p. 195-205, 2016.

NISHIMURA, H. *et al.* Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. **Immunity.**, v. 11, p. 141–151, 1999.

OHIGASHI, Y. *et al.* Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 and programmed death-1 ligand-2 expression in human esophageal cancer. **Clin Cancer Res.**, v. 11, p. 2947–2953, 2005.

OSTROM, Q. T. *et al.* CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006–2010. **Neurooncol.**, v. 15 (Suppl 2): ii1–ii56, 2013.

PARSA, A. T. *et al.* Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma. **Nat Med.**, v. 13, n. 1, p. 84-88, 2007.

PERRY, A. *et al.* “Malignancy” in meningiomas: a clinicopathologic study of 116 patients, with grading implications. **Cancer**, v. 85, p. 2046-2056, 1999.

PERRY, A. *et al.* Meningioma grading: an analysis of histologic parameters. **Am J Surg Pathol**, v. 21, p. 1455-1465, 1997.

PETROVAS, C. *et al.* PD-1 is a regulator of virus-specific CD8⁺ T cell survival in HIV infection. **J Exp Med.**, v. 203, p. 2281–2292, 2006.

RAGEL, B. T.; JENSEN, R. L. Aberrant signaling pathways in meningiomas. **J Neurooncol.**, v. 99, p. 315–324. 2010.

RIEMENSCHNEIDER, M. J. *et al.* Histological classification and molecular genetics of meningiomas. **Lancet Neurol.**, v. 5, p. 1045–1054, 2006.

SIEGEL, R. L. *et al.* Cancer Statistics 2017. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 67, n. 1, p. 7-30, 2017.

TAUBE, J. M. *et al.* Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. **Sci Transl Med.**, v. 4, p. 127-137, 2012.

TUMEH, P. C. *et al.* PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. **Nature**, v. 515, n. 7528, p. 568–71, 2014.

VAN ALKEMADE, H. *et al.* Impaired survival and long-term neurological problems in benign meningioma. **Neuro Oncol.**, v. 14, p. 658–666, 2012.

VON MARSCHALL, Z. *et al.* Effects of interferon alpha on vascular endothelial growth factor gene transcription and tumor angiogenesis. **J. Natl Cancer Inst.**, v. 95, p. 437–438, 2003.

WANG, S. *et al.* Programmed cell death ligand 1 expression and tumor infiltrating lymphocytes in neurofibromatosis 1 and 2 associated tumors. **J Neurooncol**, v. 10, p. 1–8, 2018.

WELLENREUTHER, R. *et al.* Analysis of the neurofibromatosis 2 gene reveals molecular variants of meningioma. **Am J Pathol.**, v. 146, n. 4, p. 827–832, 1995.

WU, C. *et al.* Immunohistochemical localization of programmed death-1 ligand-1 (PD-L1) in gastric carcinoma and its clinical significance. **Acta Histochem.**, v. 108, p. 19–24, 2006.

YADAV, M. *et al.* Predicting immunogenic tumour mutations by combining mass spectrometry and exome sequencing. **Nature**, v. 515, n. 7528, p. 572–6, 2014.