

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE  
PORTO ALEGRE – UFCSPA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

Dayane Bohn Koshiyama Rodrigues

**Avaliação Clínica e Citogenética  
Molecular de uma Amostra de  
Glioblastomas em Pacientes  
Adultos: Frequência e Significado  
Clínico das Aneuploidias dos  
Cromossomos 7 e 10, Amplificação  
do Gene *EGFR*, Deleção dos Genes  
*PTEN* e *TP53* e Deficiência de 1p/19q**

Universidade Federal de Ciências da Saúde  
de Porto Alegre

Porto Alegre  
2017

**Dayane Bohn Koshiyama Rodrigues**

**Avaliação Clínica e Citogenética  
Molecular de uma Amostra de  
Glioblastomas em Pacientes  
Adultos: Frequência e Significado  
Clínico das Aneuploidias dos  
Cromossomos 7 e 10, Amplificação  
do Gene *EGFR*, Deleção dos Genes  
*PTEN* e *TP53* e Deficiência de 1p/19q**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Ricardo Gazzola Zen  
Co-orientador: Prof. Dr. Rafael Fabiano Machado Rosa

**Porto Alegre  
2017**

### Catálogo na Publicação

Bohn Koshiyama Rodrigues, Dayane

Avaliação Clínica e Citogenética Molecular de uma Amostra de Glioblastomas em Pacientes Adultos: Frequência e Significado Clínico das Aneuploidias dos Cromossomos 7 e 10, Amplificação do Gene EGFR, Deleção dos Genes PTEN e TP53 e Deficiência de 1p/19q / Dayane Bohn Koshiyama Rodrigues. -- 2017.

142 p. : il., graf., tab. ; 30 cm.

Tese (doutorado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Patologia, 2017.

Orientador(a): Prof. Dr. Paulo Ricardo Gazzola Zen ;  
coorientador(a): Prof. Dr. Rafael Fabiano Machado Rosa.

1. glioblastoma. 2. hibridização in situ fluorescente.  
3. deleção de genes. 4. amplificação de genes. I. Título.

## Sumário

<b>1. Introdução</b>	9
1.1. Gliomas	11
1.2. Glioblastoma	14
1.2.1. Aspectos epidemiológicos	16
1.2.2. Histopatogênese	20
1.2.3. Diagnóstico	23
1.2.4. Subtipos	25
1.2.5. Biomarcadores moleculares e metabólicos	27
1.2.5.1. O6-metilguanina-DNA-metiltransferase	29
1.2.5.2. Perda da heterozigosidade 1p/19q	31
1.2.5.3. Perda de heterozigosidade 10q e gene <i>PTEN</i>	33
1.2.5.4. Isocitrato desidrogenase	34
1.2.5.5. Receptor do fator de crescimento epidérmico	35
1.2.5.6. Fator de crescimento vascular endotelial	36
1.2.5.7. <i>TP53</i>	36
1.2.5.8. <i>p16<sup>INK4a</sup></i>	37
1.2.5.9. Citocromo c oxidase	39
1.2.6. Vias de sinalização envolvidas na patogênese dos glioblastomas	40
1.2.6.1. Via PI3K/PTEN/AKT	40
1.2.6.2. Via TP53/p14ARF/MDM2	43
1.2.6.3. Via CDKN2A-CDKN2B,CDK4-CDK6,RB1	46
1.2.7. Tratamento	47
1.2.8. Classificação molecular dos glioblastomas	52
1.2.9. Alterações genéticas dos glioblastomas	55
1.2.10. Alterações genéticas em glioblastomas primários e secundários	58
1.2.11. A técnica de hibridização in situ fluorescente (FISH)	59
1.2.12. A técnica de FISH e alterações dos cromossomos 1, 7 (gene <i>EGFR</i> ), 10 (gene <i>PTEN</i> ), 17 (gene <i>TP53</i> ) e 19	63

<b>1.3. Justificativa</b>	85
<b>1.4. Referências bibliográficas</b>	87
<b>2. Objetivos</b>	101
<b>3. Artigo científico redigido em inglês</b>	102
<b>4. Considerações finais</b>	124
<b>5. Anexos</b>	126
5.1. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da UFCSPA	126
5.2. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo Hospitalar Conceição	128
5.3. Protocolo clínico	129
5.4. Protocolo da técnica de FISH	131
5.5. Sondas de DNA utilizadas na técnica de FISH	133
5.6. Ficha de análise ao microscópio	139
5.7. Interpretação dos resultados	140
5.8. Imagens	141

**Lista de abreviaturas utilizadas**

AKT: *Protein kinase B*

BCPC: Células de propagação dos tumores cerebrais

CBTRUS: *Central Brain Tumor Registry of the United States*

CcO: Citocromo c oxidase

CDKs: cinases dependentes de ciclina

*DBMT1: Deleted In Malignant Brain Tumors 1*

*CDKN2A: Cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A*

CSC: Célula-tronco cancerosa

Dmins: *Double minutes*

*EGFR*: Receptor do fator de crescimento epidérmico

FISH: Hibridização *in situ* fluorescente

GABRA1: *Gamma-Aminobutyric Acid Type A Receptor Alpha1 Subunit*

GBM: Glioblastoma

GBMO: Glioblastoma com componente oligodendroglial

GFAP: Proteína glial fibrilar ácida

IDH: Isocitrato desidrogenase

INCA: Instituto Nacional do Câncer

Kb: Kilobases

LOH: Perda de heterozigosidade

*MDM2: Mouse double minute 2 homolog*

*MGMT*: O6-metilguanina-DNA-metiltransferase

ND: Não disponível

NF-1: Neurofibromatose 1

OMS: Organização Mundial da Saúde

*PDGFRA: Platelet-derived growth factor receptor alpha*

PI3K: Fosfatidilinositol-3-cinase

PIP2: Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato

PIP3: Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato

*PTEN: Phosphatase and tensin homolog*

Rb: Retinoblastoma

*SEER: Surveillance, Epidemiology, and End Results Program Registry*

*SLC12A5: Solute Carrier Family 12 Member 5*

SNC: Sistema Nervoso Central

*SYT1: Synaptotagmin-1*

*TGCA: The Cancer Genome Atlas*

TMZ: Temozolamida

*TP53: Tumor protein 53*

*TTFields: Tumor Treating Fields*

VEGF: Fator de crescimento vascular endotelial

## **Resumo da Tese**

### **Introdução:**

Dentre os tumores malignos que acometem o sistema nervoso central, os glioblastomas destacam-se como os mais frequentes e mais agressivos, sendo que seu prognóstico permanece extremamente limitado.

### **Objetivos:**

Verificar a frequência e o significado clínico da aneuploidia dos cromossomos 7 e 10, amplificação do gene *EGFR*, deleção dos genes *PTEN* e *TP53* e deficiência de 1p/19q em uma amostra de glioblastomas de pacientes adultos através da técnica de FISH.

### **Material e Métodos:**

A amostra foi composta por 40 pacientes adultos com diagnóstico de glioblastoma que foram atendidos de novembro de 2011 a março de 2015. A análise citogenética molecular foi realizada através da técnica de FISH. As variáveis clínicas avaliadas foram idade, sexo, localização do tumor, sintomas clínicos, história familiar de câncer, tipo de ressecção e sobrevida.

### **Resultados:**

A idade média dos pacientes foi 59,3 anos (41-83 anos), sendo que a maioria era do sexo masculino (70%). A mediana de sobrevida foi 145 dias. As alterações mais frequentes foram a monossomia do cromossomo 10 (52,5%), a polissomia do cromossomo 7 (50%), a amplificação do gene *EGFR* (42,5%) e a deleção de *PTEN* (35%). A deleção de *TP53* foi observada em 9 pacientes (22,5%), e foram identificados 2 casos (5%) com deleção de 1p e 3 casos (7,5%) com deleção de 19q. Não foram detectados em nossa coorte casos com

codeleção 1p/19q. Deleções dos genes *TP53* e *PTEN* apresentaram impacto negativo sobre a sobrevida ( $p=0,011$  e  $p=0,037$ , respectivamente). A idade demonstrou ser um fator prognóstico, sendo que pacientes com menor idade apresentaram maior sobrevida ( $p=0,042$ ).

**Conclusão:**

Nossos dados sugerem que as deleções de *TP53* e *PTEN* podem apresentar impacto negativo sobre o prognóstico, sendo que são necessários mais estudos para esclarecer o papel dessas alterações sobre a sobrevida desses pacientes.

**Palavras-chave:** Glioblastoma, FISH, gene *EGFR*, gene *PTEN*, gene *TP53*, codeleção 1p19q.

## 1. Introdução

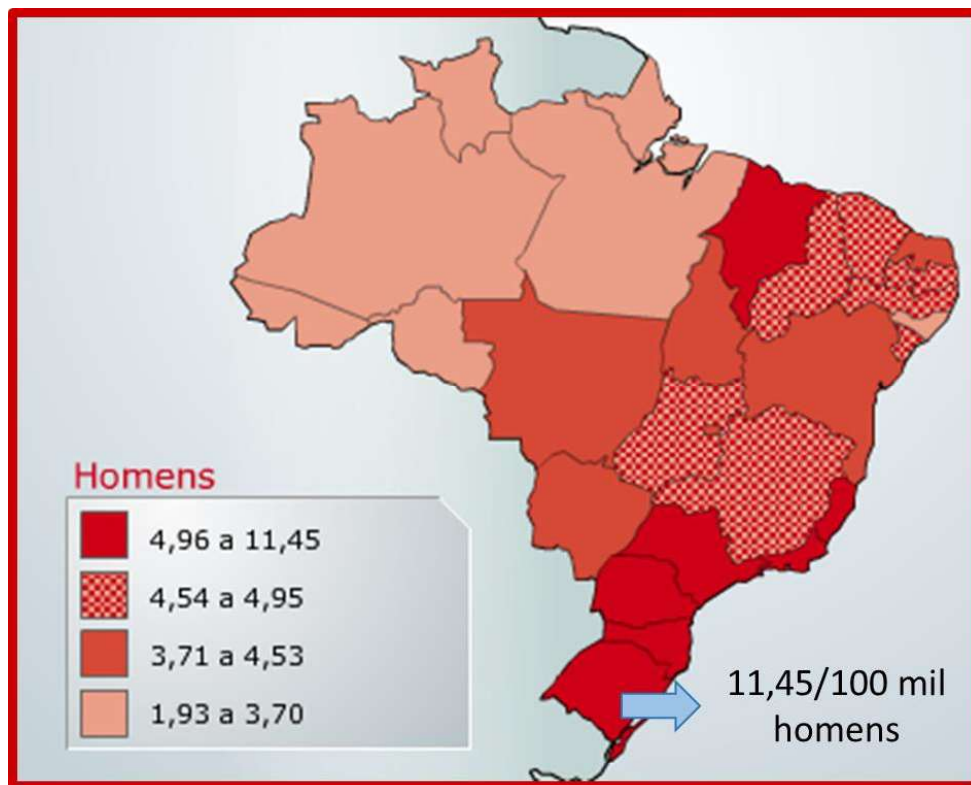
Dentre o vasto rol de enfermidades que assolam a humanidade, o câncer merece posição de destaque. Segundo dados disponibilizados pela Organização Mundial da Saúde (OMS), as neoplasias são uma das principais causas de óbito no mundo, contabilizando 8,2 milhões de mortes em 2012. Sua incidência e mortalidade tendem a aumentar significativamente nas próximas décadas, podendo chegar a 13,1 milhões de óbitos em 2030. De acordo com dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), estima-se que em 2016 serão diagnosticados 596.070 casos novos de câncer no Brasil, sendo 295.200 em indivíduos do sexo masculino.

Os tumores do sistema nervoso central (SNC) englobam uma ampla gama de doenças que apresentam características clínicas, biológicas e histológicas variadas. Em 2002, os tumores do SNC foram responsáveis, em nível mundial, por 189.000 casos novos e 142.000 mortes, o que corresponde a 1,7% dos casos novos de câncer e a 2,1% de mortes por câncer (Parkin e cols., 2005).

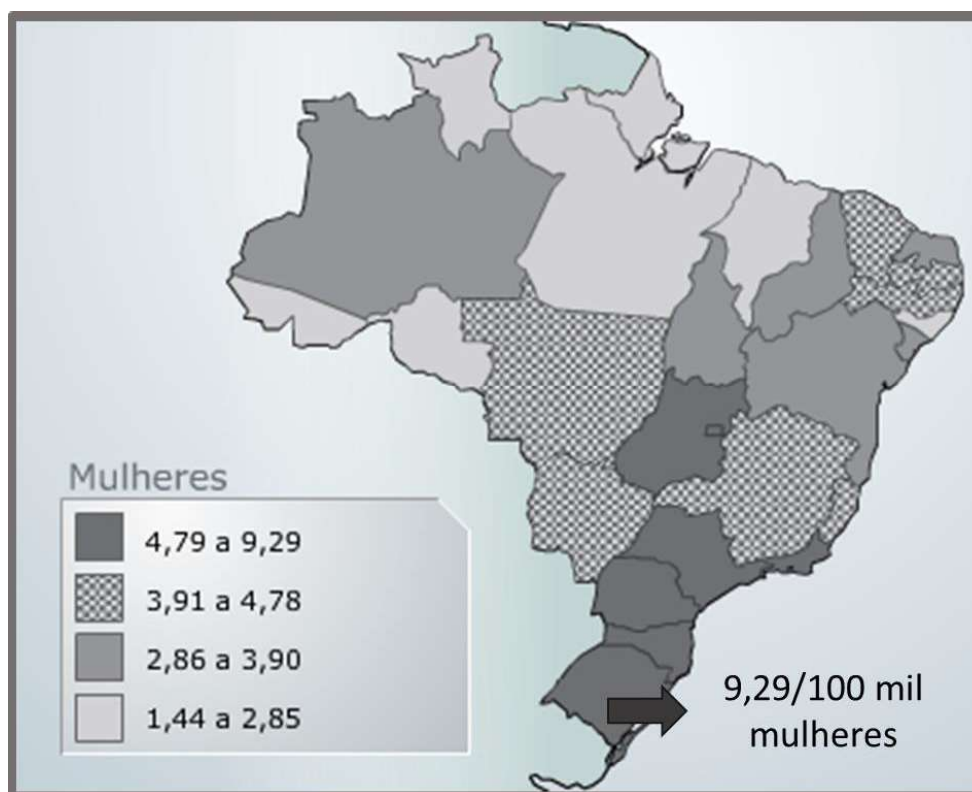
Estimativas divulgadas pelo INCA apontam que em 2016 será efetuado o diagnóstico, em âmbito nacional, de 10.270 casos novos de câncer do SNC. Em homens, o câncer do SNC é o 10º mais frequente na região Norte e Centro-Oeste, enquanto que nas regiões Sul e Nordeste ele ocupa a oitava posição. Já em mulheres, ele é o oitavo tipo de câncer mais frequente na região Centro-Oeste, o décimo na região Norte e o sexto na região Sul.

Os Estados da Região Sul foram os que apresentaram maior incidência de tumores do SNC, sendo que o Rio Grande do Sul demonstrou a maior taxa

bruta de incidência (11,45 casos para cada 100.000 homens e 9,29 casos para cada 100.000 mulheres) (Figuras 1 e 2).



**Figura 1:** Representação espacial das taxas brutas de incidência de neoplasia maligna do SNC por 100 mil homens estimadas para o ano de 2016, segundo a Unidade da Federação. Fonte: Instituto Nacional do Câncer (INCA).



**Figura 2:** Representação espacial das taxas brutas de incidência de neoplasia maligna do SNC por 100 mil mulheres estimadas para o ano de 2016, segundo a Unidade da Federação. Fonte: Instituto Nacional do Câncer (INCA).

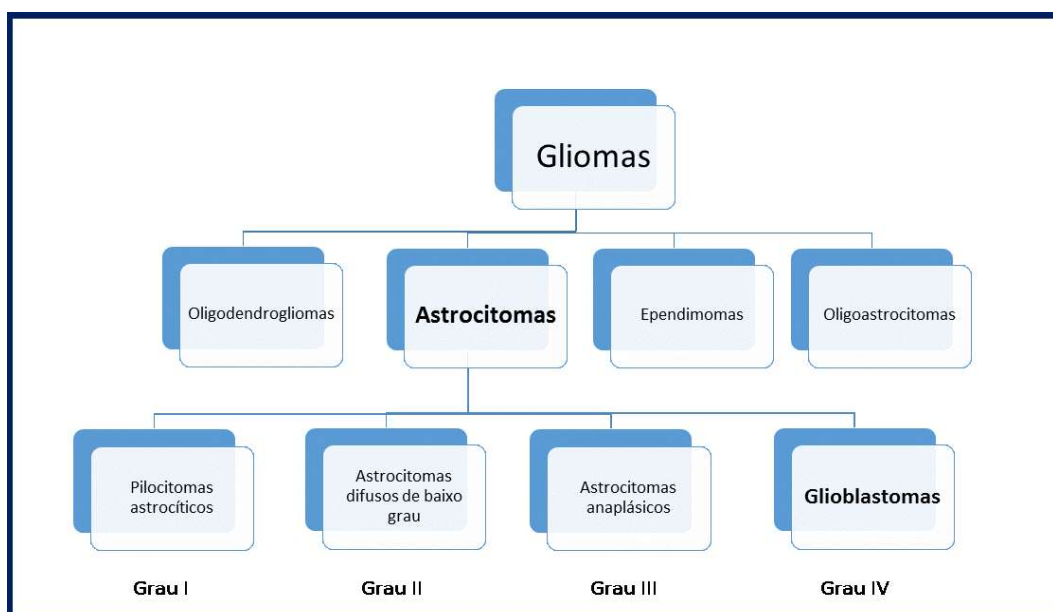
### 1.1. Gliomas

Os gliomas são os tumores primários do SNC mais comuns em adultos, correspondendo a 32% dos tumores de SNC e 80% dos tumores malignos de SNC (Marumoto e Saya, 2012).

Eles representam um grupo de tumores cerebrais de baixo e alto grau que se formam a partir da glia (palavra grega para "cola"), tecido cerebral que, em uma abordagem mais tradicional, apresenta funções de suporte para as células neurais proporcionando nutrientes, oxigênio, suporte mecânico, orientação

durante o desenvolvimento, dentre outras. Contudo, as células gliais atuam como verdadeiros parceiros dos neurônios, sendo que estão envolvidas em processos complexos que incluem transdução de sinal e neurotransmissão (Van Meier e cols., 2010).

Histologicamente, os gliomas são diferenciados como astrocitomas, oligodendrogliomas, ependimomas e oligoastrocitomas (Marumoto e Saya, 2012) (Figura 3).



**Figura 3:** Representação esquemática dos tipos de gliomas.

O tipo mais comum de glioma é o astrocitoma, que representa cerca de 76% de todos os gliomas. Os astrocitomas são extremamente heterogêneos e podem apresentar infiltração difusa de estruturas cerebrais adjacentes ou distantes. Segundo critérios adotados pela OMS, os tumores astrocitários podem ser classificados de acordo com seu nível de malignidade em quatro graus distintos (Kleihues e Cavane, 2000).

Os tumores de grau I são representados pelos pilocitomas astrocíticos, que são tumores benignos e relativamente circunscritos. Os astrocitomas difusos de baixo grau (grau II) são histologicamente caracterizados por celularidade moderada e atipia nuclear leve, sendo moderadamente proliferativos e invasivos. Já os astrocitomas de grau III, também conhecidos como astrocitomas anaplásicos, são caracterizados pelo aumento da celularidade, atipia nuclear e atividade mitótica.

Os glioblastomas (GBMs) são os gliomas de nível IV, sendo significativamente mais proliferativos, invasivos e angiogênicos quando comparados com os tumores de graus II e III (Quadro 1) (Kleihues e Cavane, 2000).

**Quadro 1:** Características e frequências dos diferentes tipos de astrocitomas.

<b>Tumor</b>	<b>Grau OMS</b>	<b>Características</b>	<b>Sobrevida (%) 1 ano*</b>	<b>Sobrevida (%) 5 anos*</b>
Astrocitoma pilocítico	I	Tumores benignos e relativamente circunscritos	ND	ND
Astrocitoma difuso de baixo grau	II	Celularidade moderada Atipia nuclear leve Moderadamente proliferativos e invasivos	ND	ND
Astrocitoma anaplásico	III	Aumento da celularidade, atipia nuclear e atividade mitótica	60,1	25,9
Glioblastoma	IV	Histologicamente similar ao astrocitoma anaplásico Presença de necrose e proliferação microvascular glomerulóide	35,7	4,7

\*Sobrevida de acordo com dados do Programa SEER (*Surveillance, Epidemiology, and End Results Program Registry*) (Adaptado de Omuro e DeAngelis, 2013). ND= não disponível nesse banco de dados.

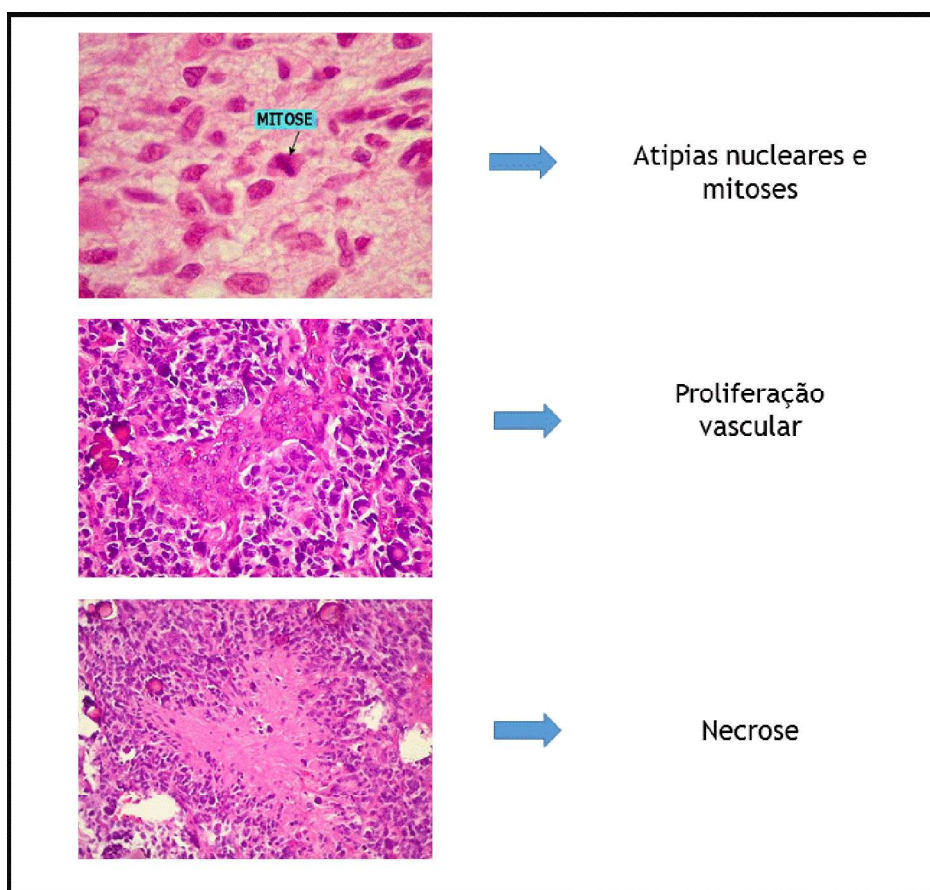
Em 2016, foi proposta uma atualização dos critérios adotados pela OMS (2007) para a classificação de tumores do SNC, com a incorporação de parâmetros moleculares na classificação de gliomas difusos. Anteriormente, os tumores astrocíticos pertenciam ao mesmo grupo, mas agora todos os gliomas difusos (astrocíticos ou não), estão agrupados, com base em seu padrão de crescimento e comportamento, bem como no status genético de *IDH1* e *IDH2*. Essa alteração promove uma classificação dinâmica, baseada em fenótipo e genótipo, agrupa tumores que apresentam os mesmos marcadores prognósticos, e pode orientar o tratamento de entidades biologicamente semelhantes. Na nova classificação, os gliomas difusos englobam os tumores astrocíticos de graus II e III, oligodendrogliomas graus II e III, oligoastrocitomas graus II e III, e glioblastomas (Louis e cols., 2016).

## **1.2. Glioblastoma**

É o tumor de sistema nervoso central mais comum e mais letal (Wen e Kesari, 2008). Ocorre nas células da glia, mais especificamente nos astrócitos, que são responsáveis por diversas funções cerebrais, como organização estrutural dos neurônios, remoção de neurotransmissores do espaço sináptico, e interface entre os vasos sanguíneos e os neurônios (Necsalová e cols., 2007).

O GBM foi descrito pela primeira vez em 1863 pelo patologista alemão Rudolf Virchow que, através do uso de técnicas macroscópicas e microscópicas, caracterizou-o como sendo um tumor originário de células gliais. Inicialmente o GBM foi denominado esponglioblastoma multiforme até que, em 1926, os

neurocirurgiões Harvey Cushing e Percival Bailey criaram o termo “glioblastoma” (Agnihotri e cols., 2013). É um tumor extremamente heterogêneo, apresentando prevalência de células pobremente diferenciadas, pleomórficas, fusiformes ou arredondadas. Entretanto, muitas vezes é possível a identificação de astrócitos neoplásicos mais diferenciados, mesmo que de forma focal. Para que o diagnóstico de GBM seja confirmado, torna-se necessária a identificação de células gliais anaplásicas, atividade mitótica e proliferação vascular e/ou necrose (Figura 4) (Kleihues e cols., 2007).



**Figura 4:** Principais achados histopatológicos. Fonte:

<http://anatpat.unicamp.br>.

Localiza-se, de forma mais frequente, na substância branca subcortical dos hemisférios cerebrais. As regiões mais afetadas são os lobos: temporal (31%), parietal (24%), frontal (23%) e occipital (16%), sendo que a combinação fronto-temporal é típica (Ohgaki e cols., 2004).

A apresentação clínica inicial dos GBMs é extremamente variável, dependendo principalmente de sua localização e do seu tamanho. Dentre os sintomas mais comuns pode-se citar: sinais focais neurológicos (afasia, parestesia, hemiparesia e distúrbios visuais), mudanças de humor e de personalidade, convulsões e sintomas decorrentes do aumento da pressão intracraniana, como, por exemplo, náuseas, vômitos e dores de cabeça, sendo este último o mais frequente, presente em 50% dos pacientes no momento do diagnóstico (Preusser e cols., 2011).

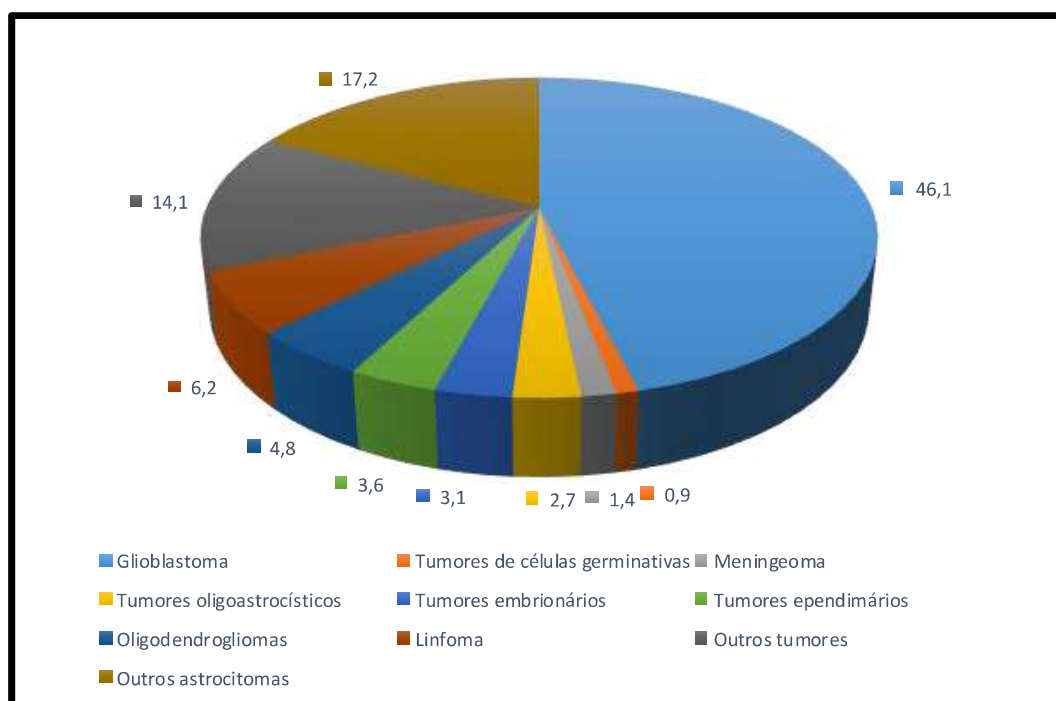
Na maioria dos casos, os pacientes morrem em decorrência de progressão local do tumor ou de complicações associadas, como por exemplo trombose e embolia pulmonar. O GBM é particularmente notório pela rápida invasão de estruturas cerebrais adjacentes. Metástases sistêmicas são extremamente raras, contudo já foram descritos casos com metástases em outros órgãos (Templeton e cols., 2008).

### **1.2.1. Aspectos epidemiológicos**

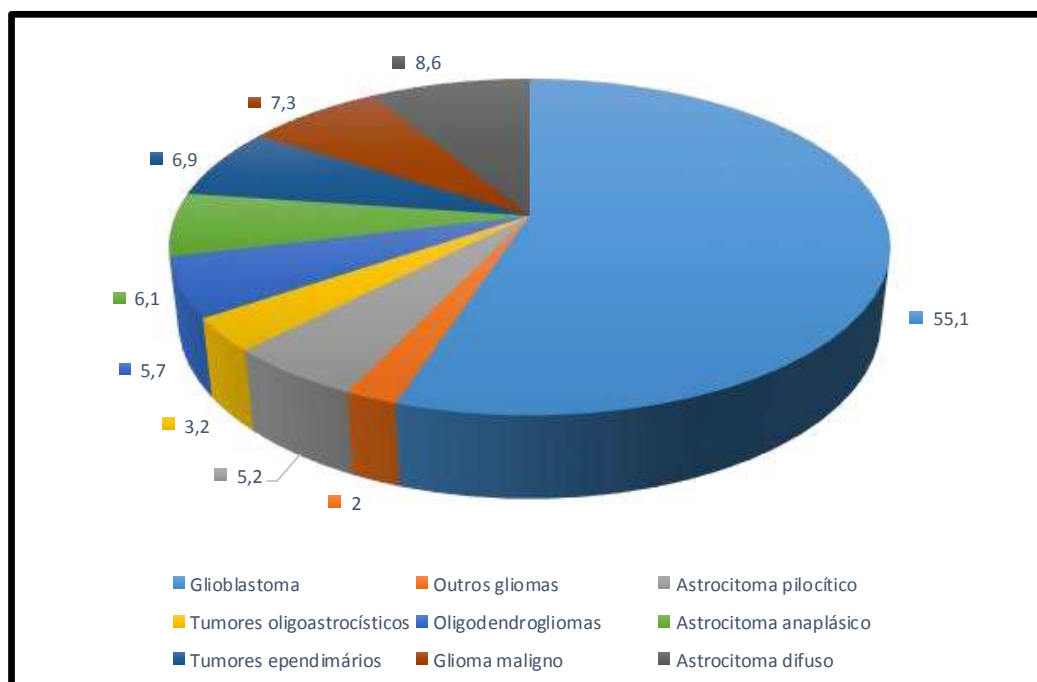
Apesar de sua baixa incidência anual (3-5 casos/100.000 indivíduos), os GBMs são um dos tipos de câncer mais temidos, em virtude de sua localização, seu caráter invasivo e seu prognóstico desfavorável. A sobrevida média geral é de 15 meses, apesar da existência de diversas modalidades terapêuticas, a

saber: neurocirurgia, radioterapia e quimioterapia (Preusser e cols., 2011). Em um estudo populacional conduzido na Suíça, observaram-se taxas de sobrevivência de 42,4% aos seis meses, 17,7% aos 12 meses e 3,3% aos 24 meses (Ohgaki e cols., 2004).

De acordo com dados divulgados pelo CBTRUS (*Central Brain Tumor Registry of the United States*), o GBM corresponde a 15,1% de todos os tumores cerebrais primários e a 46,1% dos tumores cerebrais primários malignos diagnosticados no período de 2008 a 2012 (Figura 5). Representa cerca de 55,1% dos gliomas (Figura 6). Estima-se que serão diagnosticados 11.890 casos novos de GBM em 2015 e 12.120, em 2016 (Ostrom e cols., 2015).



**Figura 5:** Distribuição dos tumores primários malignos do cérebro e do sistema nervoso central de acordo com os tipos histológicos (CBTRUS, 2008 a 2012). Dados em percentagem (%) (adaptado de Ostrom e cols., 2015).



**Figura 6:** Distribuição dos gliomas primários do cérebro e do sistema nervoso central de acordo com os tipos histológicos (CBTRUS, 2008 a 2012). Dados em porcentagem (%) (adaptado de Ostrom e cols., 2015).

O GBM apresenta uma frequência maior em indivíduos do sexo masculino, sendo a proporção homem/mulher de 1,6:1. A idade média dos pacientes ao diagnóstico é de 64 anos. Sua incidência aumenta com a idade, com taxas maiores em indivíduos com 75 a 84 anos (Ostrom e cols., 2015). Contudo, ele pode se manifestar em qualquer faixa etária, mas é raro em crianças, sendo que este tumor compreende aproximadamente 2,9% de todos os tumores cerebrais diagnosticados em indivíduos de 0 a 19 anos (Ohgaki e Kleihues, 2005; Wohrer e cols., 2009; Ostrom e cols., 2015).

Aproximadamente 5% dos pacientes com gliomas malignos apresentam história familiar desta neoplasia. Quando presente, está associada a um risco duas vezes maior de desenvolvimento da doença. Em alguns casos, existe uma associação com síndromes genéticas raras, dentre as quais podem-se citar: neurofibromatose do tipo 1 e tipo 2, síndrome de Li-Fraumeni, síndrome de Cowden, síndrome de Turcot, esclerose tuberosa e schwannomatose familiar (Farrel e Plotkin, 2007; Hottinger e Khakoo, 2007). Familiares de primeiro grau de pacientes com glioma apresentam um risco duas vezes maior de desenvolvimento do mesmo tipo tumoral, o que indica que existe uma predisposição genética para o surgimento desses tumores (Malmer e cols., 2003). Contudo, até os dias de hoje, não foi possível identificar a causa subjacente à maioria dos gliomas.

A maioria dos primeiros estudos que avaliaram a associação entre o uso de telefones celulares e risco para desenvolvimento de glioma não demonstraram indícios de que esta relação de fato exista (Ahlbom e cols., 2004). Em 2007, Lahkola e cols. conduziram um grande estudo populacional de caso controle, o qual contava com 1522 casos de glioma, e não encontraram evidências consistentes de que o uso de telefones celulares aumente o risco para glioma. Os estudos são limitados por diversos fatores como, por exemplo, viés de memória, variações no tempo de exposição e variação na tecnologia empregada nos celulares ao longo do tempo (Omuro e DeAngelis, 2013).

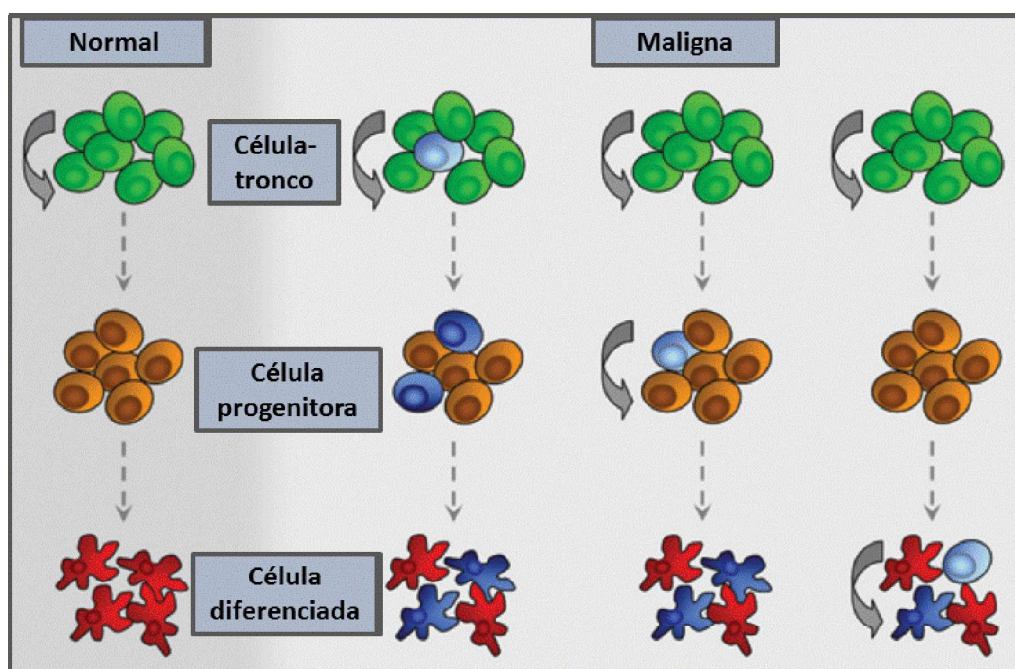
Em maio de 2011, a Agência Internacional para Pesquisa em Câncer da OMS classificou os campos de radiofrequência eletromagnética emitidos pelos telefones celulares como sendo do grupo 2B, ou seja, “possível” carcinógeno humano. Esta relação causal poderia adquirir mais força se fosse demonstrado

que telefones celulares têm impacto na sobrevida de pacientes com glioma. De fato, estudos recentes têm demonstrado associação entre sobrevida diminuída em pacientes com GBM e uso a longo prazo de celulares (Hardell e Carlberg, 2013; Akhavan-Sigari e cols., 2014; Hardell e Carlberg, 2014).

Contudo, a relação entre o uso de aparelhos celulares e risco aumentado para tumor cerebral permanece sem uma resposta definitiva. Devido à natureza inconclusiva dos dados disponíveis na literatura, torna-se necessária a execução de novos estudos com protocolos padronizados para esclarecer a questão (Corle e cols., 2012).

### **1.2.2. Histopatogênese**

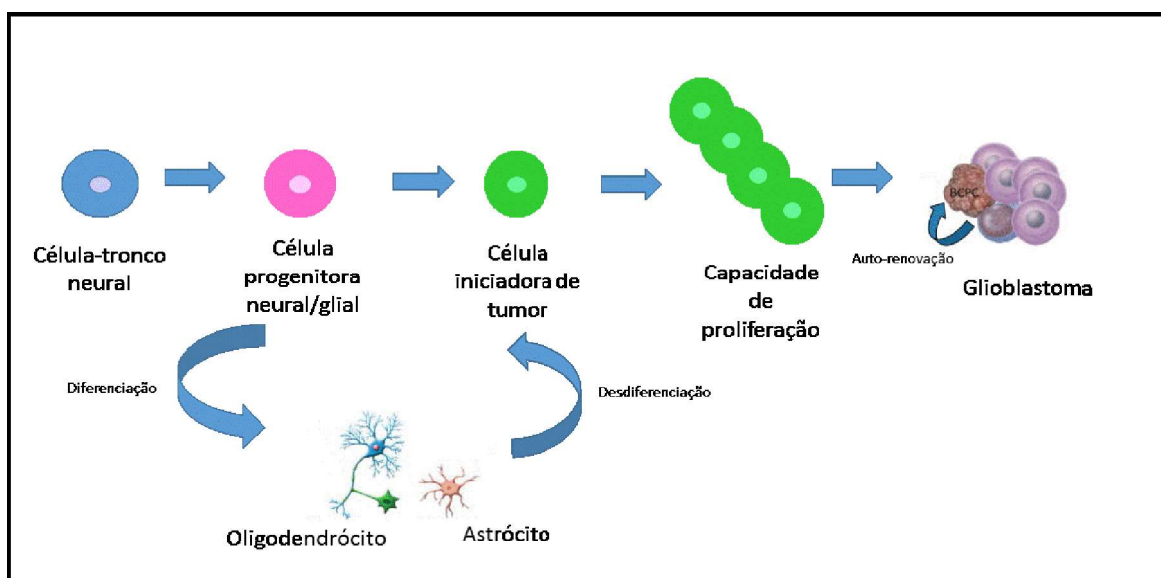
Os mecanismos envolvidos na gênese do câncer são muito complexos e ainda não foram totalmente elucidados. No final da década de 50, o termo célula-tronco cancerosa (CSC), também chamada de célula de propagação tumoral, foi proposto por Saji-ro Makino, caracterizando uma subpopulação de células resistentes à quimioterapia e com características cromossômicas distintas das outras células. Experimentos realizados comprovaram que os tumores podem se originar de raras células com capacidade de auto-renovação e de estabelecer linhagens celulares imortais. As CSCs podem se originar tanto a partir da transformação maligna de uma célula-tronco normal como de uma célula progenitora. Elas também podem ser oriundas da desdiferenciação de células mais maduras, que readquirem características de células-tronco relacionadas à auto-renovação e transformação tumoral (Figura 5) (Welte e cols., 2010).



**Figura 5:** Representação da origem das células-tronco cancerosas. Em um tecido normal, as células-tronco (representadas em verde) se dividem de forma assimétrica em células progenitoras (laranja), a partir das quais as células diferenciadas (vermelho) são oriundas. Mutações relacionadas a gênese tumoral podem transformar células-tronco em células-tronco cancerosas (azul claro), o que implica na formação de células progenitoras tumorais e células diferenciadas tumorais (azul escuro). Pode ocorrer também a desdiferenciação de células mais maduras, que readquirem propriedades semelhantes às das células-tronco. Adaptado de Welte e cols., 2010.

Nos glioblastomas, as células de propagação dos tumores cerebrais (BCPC) constituem uma parcela da população celular do tumor, podendo ser responsáveis pelo crescimento tumoral. Acredita-se que sua gênese esteja relacionada com a transformação de células-tronco neurais e células progenitoras neurais ou pela desdiferenciação de células neurais maduras

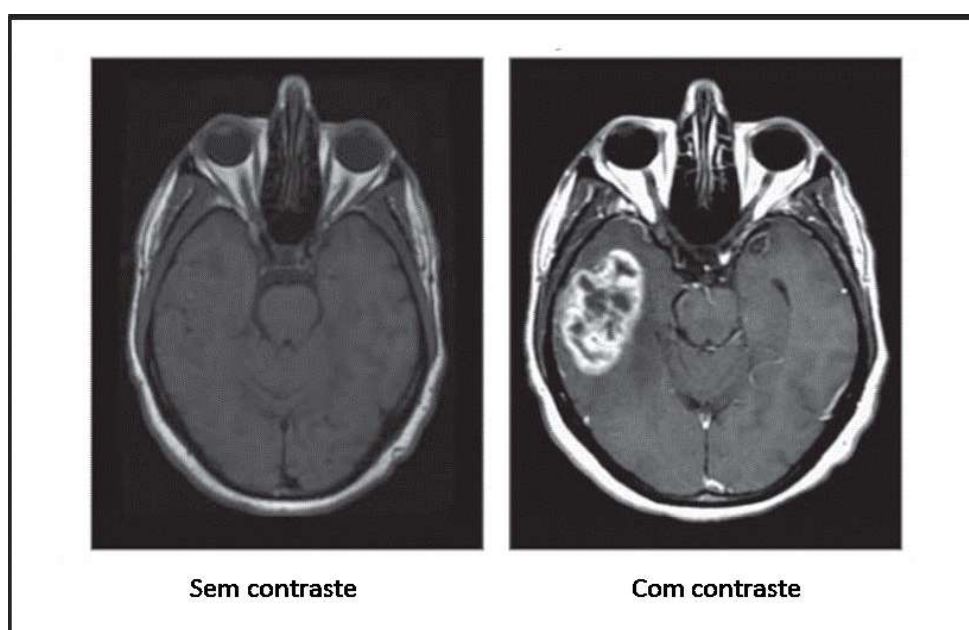
(Figura 6). As BCPCs exibem características semelhantes às células-tronco neurais, a saber: expressão de marcadores de células-tronco neurais, como por exemplo nestina e CD133, capacidade de auto-renovação, proliferação a longo prazo e habilidade de se diferenciar em neurônios, astrócitos e oligodendrócitos. Estudos recentes demonstram que a presença de BCPCs possibilita a progressão tumoral em virtude de sua resistência preferencial a radiação e quimioterapia e também por promover a angiogênese, invasão e metástase tumoral. As BCPCs são mais eficientes no reparo de DNA danificado do que células tumorais mais diferenciadas (Van Meier e cols., 2010).



**Figura 6:** Representação da formação das células de propagação dos tumores cerebrais (BCPCs) com geração de glioblastoma. As células-tronco neurais (azul) se diferenciam em células progenitoras neurais/gliais (rosa), que podem produzir oligodendrócitos ou astrócitos. Mutações que acarretarão na formação de glioblastoma podem surgir em todos os níveis desta linhagem e produzir células iniciadoras de tumor (Adaptado de Van Meier e cols., 2010).

### 1.2.3. Diagnóstico

A ressonância nuclear magnética constitui a principal ferramenta para o diagnóstico dos glioblastomas e, quando realizada com contraste gadolínio, permite uma melhor visualização do tumor (Figura 7) (Omuro e DeAngelis, 2013). O diâmetro do tumor no momento do diagnóstico é, em geral, de aproximadamente 4 centímetros. Dados obtidos por Simpson e cols. em 1993 demonstraram que, em 38% da amostra composta por 645 pacientes, o diâmetro do tumor era inferior a 5 cm no momento do diagnóstico, em 56% dos casos era de 5-10 cm e em 6% dos pacientes era superior a 10 cm.



**Figura 7:** Ressonância nuclear magnética de um paciente com glioblastoma no lobo temporal direito. Na imagem à esquerda, observa-se o exame sem contraste, que exibe uma massa pobremente delimitada. Já à direita, pode-se perceber que o gadolínio realça a lesão de forma heterogênea (Omuro e DeAngelis, 2013).

A confirmação do diagnóstico primário é baseada na pesquisa imunohistoquímica da presença de proteína glial fibrilar ácida (GFAP), que é um filamento protéico encontrado em astrócitos maduros e constitui o marcador mais específico dos astrócitos, tanto em condições normais como patológicas. Acredita-se que essa proteína esteja envolvida no processo de maturação dos astrócitos. A perda da expressão de GFAP está associada com o aumento da malignidade de tumores de origem astrocítica, indicando a presença de células significativamente indiferenciadas, contudo não é fator determinante para a progressão e desenvolvimento tumoral. Células de glioma negativas para GFAP se proliferam de forma mais rápida do que células positivas (Urbańska e cols., 2014).

Atualmente, os procedimentos neurocirúrgicos necessários para a confirmação do diagnóstico são métodos invasivos e que apresentam riscos, por isso estão limitados a pacientes em boas condições gerais e com tumores em locais acessíveis. A identificação de marcadores em espécimes como sangue periférico pode ser uma alternativa para o diagnóstico de pacientes que não preenchem os requisitos mencionados. Nos últimos anos, várias proteínas liberadas por células tumorais foram avaliadas como potenciais marcadores para gliomas malignos (Gállego Pérez-Larraya e cols., 2014).

Estudos apontam que a avaliação dos níveis de GFAP no soro pode atuar como um marcador para diagnóstico de glioblastoma (Brommeland e cols., 2007; Jung e cols., 2011; Gállego Pérez-Larraya e cols., 2014, Tichy e cols., 2016). Esses autores demonstraram que os níveis de GFAP estão aumentados em pacientes com glioblastoma e estão diretamente correlacionados com o tamanho

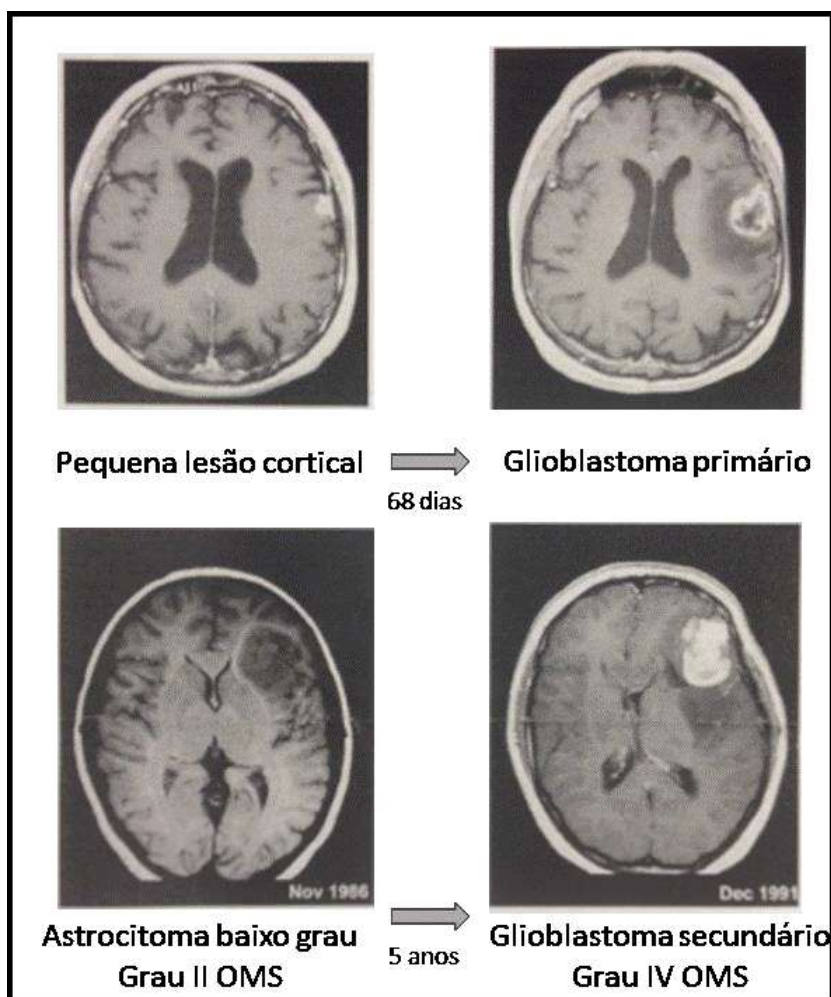
tumoral. Contudo, esses dados não podem ser utilizados como uma ferramenta diagnóstica isolada.

#### **1.2.4. Subtipos**

Os GBMs podem ser classificados em dois subtipos (primário ou secundário) com base em suas características clínicas, embora morfológicamente esta distinção não possa ser evidenciada. Esses subtipos constituem entidades distintas, que afetam pacientes em idades diferentes e se desenvolvem através de diferentes vias genéticas (Ohgaki e Kleihues, 2005). Esse conceito foi proposto em 1940 pelo neuropatologista alemão Joachim Scherer (Burger e cols., 2001).

A maioria dos casos (>90%) manifesta-se como tumores primários *de novo*, desenvolvendo-se de forma rápida, com uma história clínica de dias ou semanas. Estes casos, em geral, ocorrem em indivíduos mais velhos, com idade média de 62 anos. Tipicamente se apresentam como tumores grandes com necrose central e edema perifocal (Ohgaki, 2005).

Alguns GBMs (10%) progridem gradualmente de astrocitomas de graus mais baixos (astrocitoma difuso de baixo grau e astrocitoma anaplásico) e, por isso, são denominados GBMs secundários, apresentando uma tendência para se manifestar em pacientes com menos de 45 anos (Ohgaki e cols., 2004; Ohgaki e Kleihues, 2013). (Figura 8).



**Figura 8:** Acima pode-se observar a rápida evolução de um glioblastoma primário em um indivíduo de 79 anos. A ressonância magnética permite a identificação de uma pequena lesão cortical que, em 68 dias, evoluiu para um glioblastoma com edema perifocal e necrose central. Em contrapartida, abaixo está demonstrado o desenvolvimento de um glioblastoma secundário através da progressão de um astrocitoma de baixo grau (Kleihues e cols., 2007).

Em 2016 foi proposta uma atualização das diretrizes estabelecidas pela OMS em 2007, a qual incorporou parâmetros moleculares para a classificação dos tumores de sistema nervoso central. De acordo com essas novas diretrizes, os glioblastomas podem ser divididos em: glioblastoma *IDH-wildtype*

(aproximadamente 90% dos casos), que corresponde mais frequentemente com os casos clinicamente classificados como primários; glioblastoma *IDH-mutated* (cerca de 10% dos casos), que equivale aos glioblastomas secundários (Quadro 2); e glioblastoma NOS, diagnóstico reservado para os tumores em que a avaliação de *IDH* não foi realizada (Louis e cols., 2016).

**Quadro 2:** Características dos glioblastomas *IDH-wildtype* e *IDH-mutated*.

	<b>GBM <i>IDH-wildtype</i></b>	<b>GBM <i>IDH-mutated</i></b>
<b>Sinônimo</b>	GBM primário	GBM secundário
<b>Lesão precursora</b>	Não identificável, desenvolve-se de novo	Astrocitoma difuso Astrocitoma anaplásico
<b>Proporção dos GBM</b>	~90%	~10%
<b>Idade média ao diagnóstico</b>	~62 anos	~44 anos
<b>Razão homem/mulher</b>	1.42:1	1.05:1
<b>Sobrevida média</b>		
<b>Cirurgia + radioterapia</b>	9,9 meses	24 meses
<b>Cirurgia + radioterapia + quimioterapia</b>	15 meses	31 meses
<b>Necrose</b>	Extensa	Limitada

Adaptado de Louis e cols., 2016.

### 1.2.5. Biomarcadores moleculares e metabólicos

Nos últimos anos, vários biomarcadores moleculares e metabólicos, que podem contribuir para o diagnóstico, bem como para a avaliação do prognóstico e resposta ao tratamento, foram identificados, podendo desempenhar importante

papel no manejo clínico de pacientes com GBM. Dentre os principais biomarcadores moleculares e metabólicos destacam-se: silenciamento epigenético do gene *MGMT*, perda da heterozigosidade (LOH) dos cromossomos 1p e 19q, LOH 10q, mutações nos genes *PTEN*, *IDH* e *TP53*, amplificação do gene *EGFR*, expressão de VEGF, deleção do gene *p16<sup>INK4a</sup>* e nível de atividade da citocromo c oxidase (Quadro 3) (McNamara e cols., 2013).

**Quadro 3:** Alterações moleculares e metabólicas em glioblastomas e seu potencial status de biomarcador.

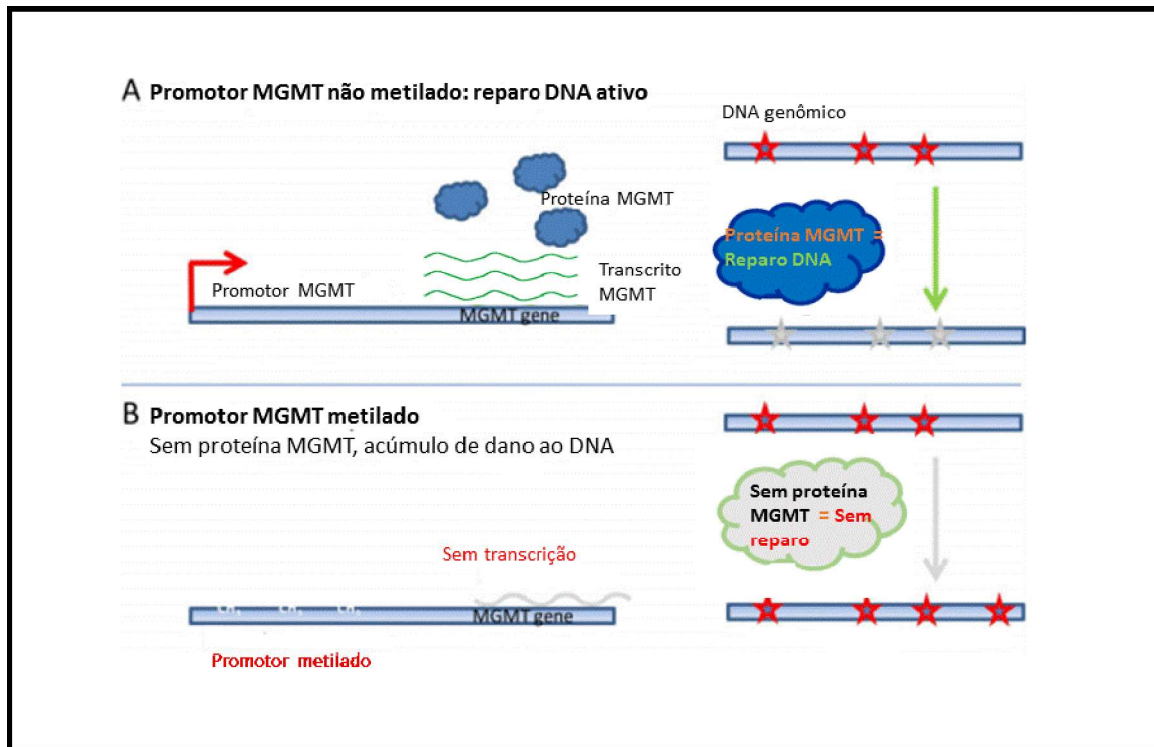
<b>Alteração molecular/metabólica</b>	<b>Possível status de biomarcador</b>
<i>MGMT</i>	Prognóstico, preditivo
LOH 1p/19q	Sem significado prognóstico
Mutações <i>IDH</i>	Prognóstico
<i>EGFR</i>	Diagnóstico, potencialmente prognóstico
<i>VEGF</i>	Potencialmente prognóstico
<i>TP53</i>	Diagnóstico
<i>PTEN</i>	Prognóstico, potencialmente preditivo
<i>CDKN2A</i>	Achados inconsistentes
Citocromo c oxidase	Potencialmente prognóstico

Modificado de McNamara e cols., 2013.

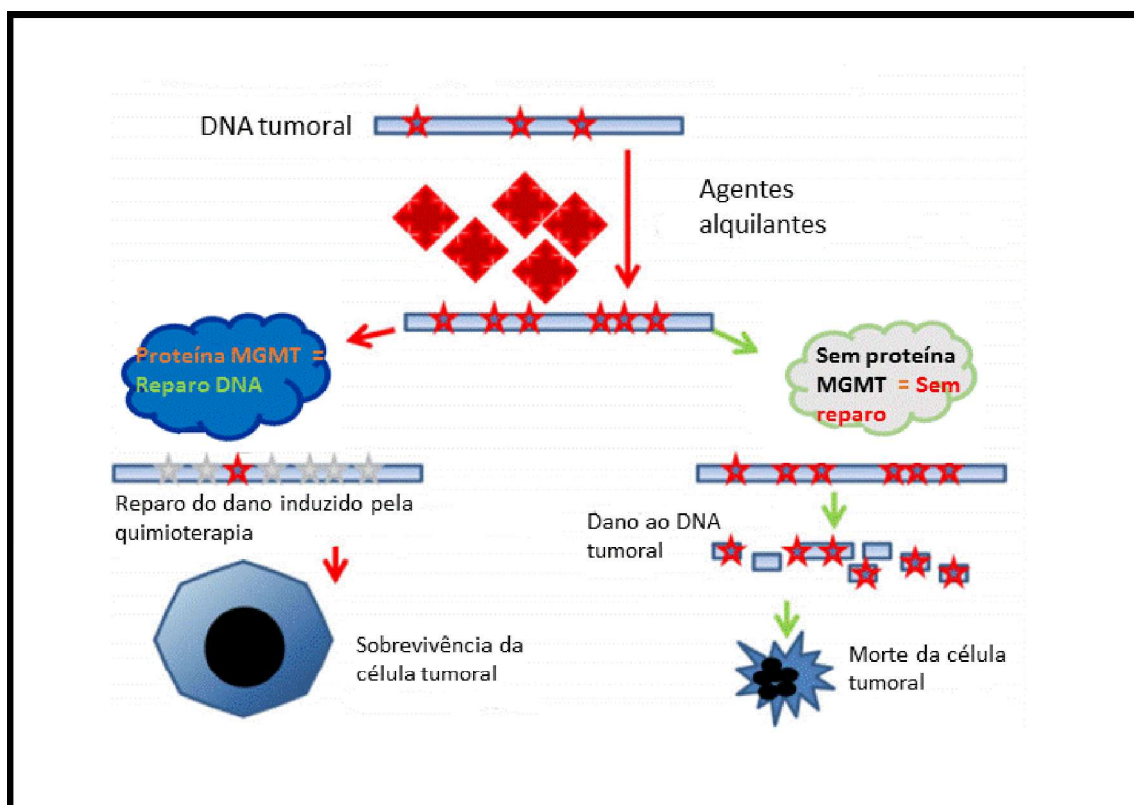
### 1.2.5.1. O6-metilguanina-DNA-metiltransferase

A O6-metilguanina-DNA-metiltransferase (MGMT) é uma enzima de reparo de DNA que pode remover diretamente o grupo alquila da posição O6 da guanina, impedindo erros durante a replicação do DNA (Figura 9) (Wang e cols., 2015). No contexto da terapia com agentes alquilantes, a ação dessa enzima remove a lesão citotóxica provocada, o que neutraliza os efeitos quimioterápicos da droga e acarreta, dessa forma, uma diminuição da resposta das células tumorais a agentes quimioterápicos (Figura 10) (Brander e von Deimling, 2015; Wang e cols., 2015).

O silenciamento epigenético do gene *MGMT* através da metilação do promotor, o que leva a uma subsequente diminuição da atividade da enzima, compromete o reparo de DNA (McNamara e cols., 2013). Estudos demonstraram que essa metilação é um marcador preditivo positivo para a resposta de gliomas recém diagnosticados à ação de agentes alquilantes e, conseqüentemente, para uma maior sobrevida (Wang e cols., 2015). Dessa forma, a detecção dos níveis de expressão do gene *MGMT* pode desempenhar um papel crucial na indicação do agente alquilante que será utilizado no tratamento ou na seleção direta de pacientes para outras abordagens terapêuticas (Cabrini e cols., 2015).



**Figura 9:** Metilação do promotor do gene *MGMT*. **(A)** A *MGMT* é uma enzima de reparo de DNA que remove o grupo alquila da posição O6 da guanina. **(B)** A metilação do promotor do gene *MGMT* é um evento epigenético que culmina com o silenciamento do promotor e, por isso, leva a redução da expressão da enzima ativa (Modificado de Brander e von Deimling, 2015).

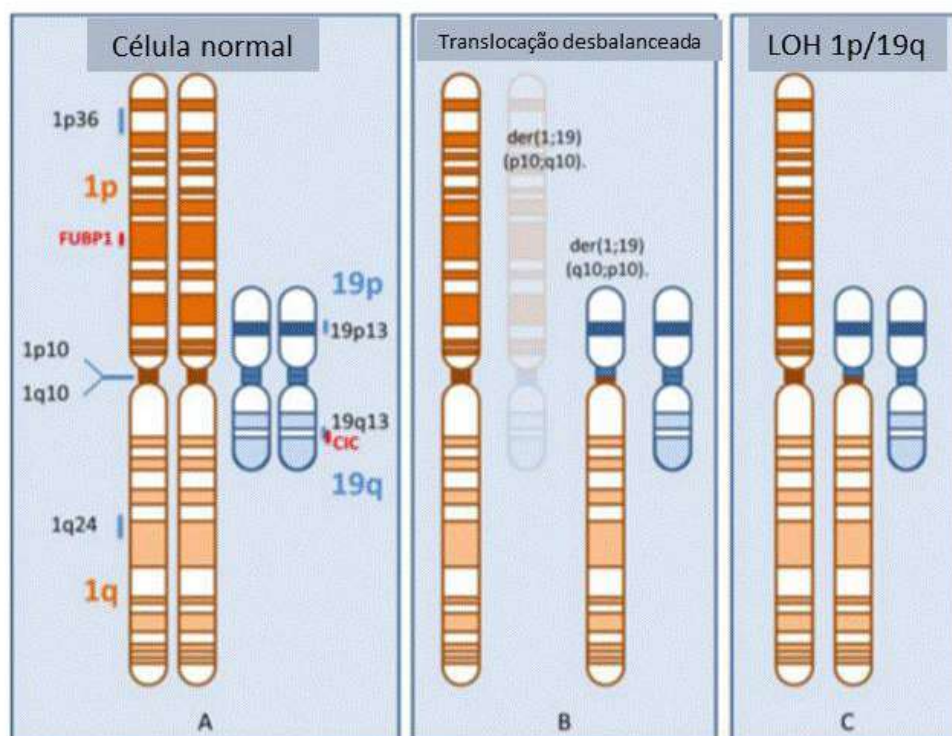


**Figura 10:** Efeitos da metilação do promotor MGMT sobre a eficácia dos agentes alquilantes. Níveis elevados de atividade da MGMT em tecidos tumorais conferem resistência aos agentes alquilantes (esquerda), enquanto a metilação do promotor do gene *MGMT* resulta na redução da atividade de reparo, o que está associado a uma sensibilidade aumentada aos agentes alquilantes (direita) (Adaptado de Brander e von Deimling, 2015).

#### 1.2.5.2. Perda de heterozigidade 1p/19q

Estudos apontam que a LOH dos cromossomos 1p e 19q (Figura 11), comumente encontrada em oligodendrogliomas, está relacionada a uma resposta favorável à quimioterapia e radioterapia, sendo que os pacientes afetados apresentam melhor sobrevida. Nos glioblastomas, esta alteração não é tão frequente, sendo observada em menos de 10% dos casos. Contudo, é muito

visualizada em casos de glioblastoma com componente oligodendroglial, que perfazem 15% dos glioblastomas. Mais estudos precisam ser conduzidos a fim de elucidar o valor prognóstico deste achado em GBM (McNamara e cols., 2013).



**Figura 11:** Translocações cromossômicas responsáveis pela codeleção 1p/19q. (A) Uma célula normal possui 2 cópias dos cromossomos 1 e 19, cada qual apresenta um braço curto (p) e longo (q). As localizações dos genes *CIC* (em 19q13.2) e *FUBP1* (1p31.10) estão indicadas, bem como as sondas mais utilizadas em 1p36 e 19q13 e controles em 1q24 e 19p13; (B) Uma translocação não balanceada leva a uma transposição em nível centromérico de 19q para 1p (esquerda, sombreado) e sua subsequente perda, e à formação de um cromossomo derivado  $der(1;19)(q10;p10)$ , no qual p10 e q10 indicam a localização centromérica no cromossomo; (C) A perda dos braços 1p e 19q

resulta em uma cópia de 1p e 19q e duas cópias de 1q e 19p (Adaptado de Brander e von Deimling, 2015).

### **1.2.5.3. Perda de heterozigosidade 10q e gene *PTEN***

Diversos estudos apontam que a perda de um ou mais genes supressores de tumor que estão localizados em 10q está diretamente associada com a gênese do glioblastoma. De fato, perdas do cromossomo 10 são as alterações genéticas mais frequentes, podendo ser identificadas em 60 a 80% dos casos (Ohgaki, 2005). Embora a maioria dos casos apresente a perda de uma cópia do cromossomo 10, deleções parciais também podem ocorrer (James e cols., 1988). Duas regiões comumente deletadas são 10q23 (Li e cols., 1997), que contém o gene *PTEN* (*Phosphatase and tensin homolog*) e 10q25-26, onde está localizado o gene *DMBT1* (*Deleted In Malignant Brain Tumors 1*) (Mollenhauer e cols., 1997).

Embora a LOH 10q apresente frequência similar em glioblastomas primários e secundários, a maioria dos tumores primários demonstram LOH de todos os marcadores, o que sugere perda de todo o cromossomo 10, ao passo que os secundários exibem perda completa ou parcial de 10q mas não de 10p (Ohgaki, 2005).

*PTEN* é um gene supressor tumoral localizado em 10q23 e desempenha um papel importante na regulação da proliferação celular, apoptose e invasão tumoral. Estudos apontam que esse gene está mutado em 15-40% dos glioblastomas, sendo que mutações de *PTEN* são detectadas quase que exclusivamente em glioblastomas primários (Ohgaki, 2005). A deleção em

homozigose pode ocorrer, mas é rara em glioblastomas (Knobbe e Reifenberger, 2003).

Diversos autores descrevem que perdas do braço longo do cromossomo 10 estão associadas a um pior prognóstico (Leenstra e cols., 1994; Lin e cols., 1998; Tada e cols., 2001; Korshunov e cols., 2004; Srividya e cols., 2011; Kakkar e cols., 2012). Por outro lado, outros estudos não corroboram esses achados (Houllier e cols., 2006; Rodriguez e cols., 2008; Wager e cols., 2008). Korshunov e cols. (2005) demonstraram que perdas de 10q somente apresentam importância clínica em pacientes com > 40 anos.

#### **1.2.5.4. Isocitrato desidrogenase**

A isocitrato desidrogenase (IDH) é um fator chave no metabolismo que catalisa a descarboxilação oxidativa do isocitrato e produz alfa-cetoglutarato e CO<sub>2</sub> (Wang e cols., 2015). IDH1 e IDH2 estão envolvidas em vários processos metabólicos, a saber: transdução de sinal, síntese lipídica, estresse oxidativo e respiração oxidativa (McNamara e cols., 2013).

Mutações nos genes *IDH1* e *IDH2* são observadas em aproximadamente 70% dos gliomas de baixo grau e parte dos glioblastomas. Uma das mutações mais frequentes, encontrada em mais de 95% dos casos, ocorre no códon 132 do gene *IDH1* e implica na catalisação de alfa-cetoglutarato em 2-hidroxi-glutarato, que é um oncometabólito associado com instabilidade genética e transformação maligna (McNamara e cols., 2013).

As mutações nos genes *IDH* são eventos precoces, algumas vezes até mesmo iniciais na patogênese da doença, e estão relacionados com vários

parâmetros clinicamente relevantes, como sobrevida dos pacientes (Brandner e von Deimling, 2015; Wang e cols., 2015). Uma associação favorável entre mutações de *IDH1/2* e um prognóstico favorável já foi estabelecida. Em 2010, Jansen e cols. encontraram sobrevida geral de 31 meses no grupo de pacientes com mutações *IDH* e 15 meses no grupo sem mutações.

#### **1.2.5.5. Receptor do fator de crescimento epidérmico**

O gene *EGFR* (receptor do fator de crescimento epidérmico) é o gene mais comumente amplificado em glioblastomas primários (30-70%) (McNamara e cols., 2013). O *EGFR* está envolvido na transdução de sinal através de várias vias importantes para a célula, como por exemplo PI3K. Esse gene desempenha um importante papel no controle da apoptose, proliferação e diferenciação celular (Banaszczyk e cols., 2013).

Quando a regulação de *EGFR* é interrompida, o estímulo para a replicação celular persiste, o que contribui para o desenvolvimento e manutenção de câncer através da proliferação celular continuada. Diferentes vias podem levar à essa desregulação, a saber: amplificação de *EGFR*, o que implica no aumento de receptores de fatores de crescimento na superfície celular, e aumento da sinalização mediada por *EGFR*, que também pode estar relacionada a outros processos regulatórios, como angiogênese e disseminação metastática (Layfield e cols., 2006).

A amplificação gênica é um processo caracterizado pelo aumento do número de cópias de uma determinada região cromossômica e está frequentemente associada a superexpressão do gene amplificado

correspondente. Em glioblastomas, as cópias do gene amplificado geralmente encontram-se organizadas como cópias extracromossômicas, denominadas *double minutes* (dmins) (Lopez-Gines e cols., 2010).

Estudos indicam que pode haver uma forte relação entre amplificação do *EGFR* e aumento da sobrevida geral (McNamara e cols., 2013).

#### **1.2.5.6. Fator de crescimento vascular endotelial**

A característica que diferencia o glioblastoma de outros tumores gliais é a proliferação microvascular em conjunto com necrose. A angiogênese é um processo necessário para o crescimento de tumores sólidos além de um raio de 0,125 mm, em virtude de limitações na capacidade de difusão de oxigênio e nutrientes (Folkman, 1971). O fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) é um fator angiogênico indispensável para o crescimento de inúmeros tumores (Hormigo e cols., 2011), sendo identificado em 64,1% dos glioblastomas.

Acredita-se que o VEGF seja um potencial fator prognóstico em pacientes com gliomas, visto que existe uma forte correlação entre sua expressão e a sobrevida dos pacientes (McNamara e cols., 2013).

#### **1.2.5.7. TP53**

O gene *TP53* (tumor protein 53) codifica a proteína supressora tumoral p53 e está envolvido com a regulação do ciclo celular, apoptose, diferenciação celular e outros mecanismos de regulação celular após exposição a agentes que

causam dano ao DNA, como por exemplo radiação ultravioleta e toxinas (McNamara e cols., 2013).

A expansão clonal dos astrocitomas em geral está associada a alterações de *TP53*, que podem desempenhar papel importante na gênese tumoral de muitos astrocitomas (von Deimling e cols., 1992). Fults e cols. (1992) relataram mutação de *TP53* em 62% dos casos com LOH de 17p, e von Deimling e cols. (1992) reportaram que metade dos astrocitomas de graus II e III apresentam tanto mutação de *TP53* como perda de 17p. Mutações nesse gene são muito frequentes em glioblastoma, ocorrendo em 28% dos glioblastomas primários e 65% dos secundários (Karsy e cols., 2015).

Embora estudos demonstrem que existe associação entre mutações de *TP53* e pior prognóstico (Shih e cols., 2005), podendo inclusive estar associadas à perda de resposta a temozolamida (Wang e cols., 2013; Wang e cols., 2014), enquanto outros apontam um impacto limitado sobre o prognóstico (Rich e cols., 2005; Felsberg e cols., 2009; Stancheva e cols., 2014).

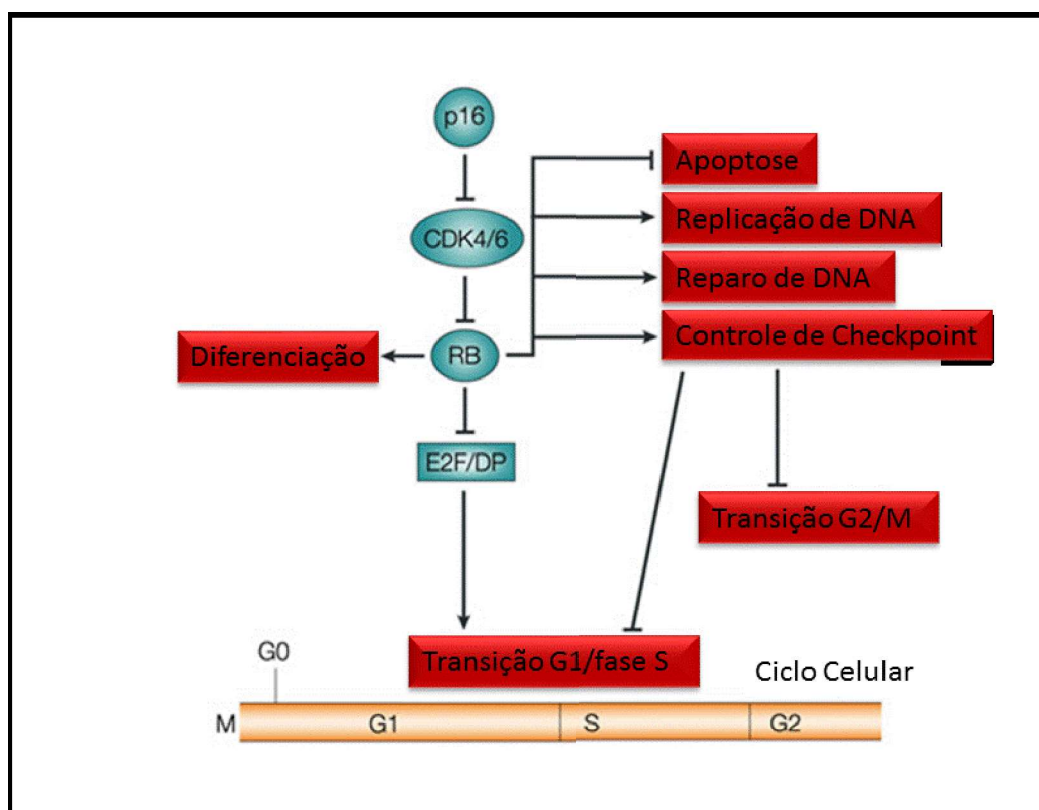
Existem inúmeras razões que contribuem para a falta de uma correlação clara entre p53 e prognóstico dos pacientes, a saber: a complexidade da via de sinalização p53, a importância de outros reguladores na via p53 que podem estar alterados em glioblastomas e a heterogeneidade de tipos de mutação *TP53* e seus efeitos (Karsy e cols., 2015).

#### **1.2.5.8. *p16<sup>INK4a</sup>***

A proteína Retinoblastoma (Rb) é considerada o protótipo das proteínas supressoras de tumor. Além de bloquear a progressão de G1 para a fase S do

ciclo celular, ela está relacionada com a regulação de vários processos celulares, como a apoptose, replicação de DNA, reparo de DNA, controle de *checkpoint* e diferenciação. Sua inativação pode ser encontrada em uma ampla gama de cânceres (McNamara e cols, 2013).

A expressão da Rb é regulada pelas CDKs que, por sua vez, são inibidas pela proteína codificada pelo gene  $p16^{INK4a}$  (Figura 12) (Classon e Harlow, 2002). A perda da expressão da proteína p16 ocorre em cerca de 20-57% dos casos de glioblastoma.



**Figura 12:** Representação esquemática das principais funções da proteína Rb e da regulação de sua atividade. A Rb regula negativamente a transcrição mediada por E2F bloqueando, dessa forma, a progressão de G1 para a fase S. A atividade da Rb é regulada pelas CDKs que, por sua vez, são inibidas pela p16 (Modificado de Classon e Harlow, 2002).

Embora o valor preditivo da deleção homozigótica de  $p16^{INK4a}$  ainda não tenha sido esclarecido, dados disponíveis na literatura indicam a existência de uma associação significativa entre a amplificação de  $EGFR$  e deleção de  $p16^{INK4a}$  (McNamara e cols., 2013).

#### **1.2.5.9. Citocromo c oxidase**

A citocromo c oxidase (CcO) é uma enzima terminal da cadeia respiratória mitocondrial responsável por catalisar a transferência de elétrons do citocromo c para o oxigênio. Ela é uma enzima complexa, formada por 13 subunidades, três das quais são codificadas pelo DNA mitocondrial e possuem função catalítica. As outras dez subunidades são codificadas por DNA nuclear e apresentam função regulatória (Griguer e cols., 2013).

Em gliomas malignos, aquisição de resistência à terapia com temozolamida foi associada com níveis aumentados de atividade da CcO (Oliva e cols., 2010).

Em 2013, um estudo retrospectivo conduzido por Griguer e cols. com 84 casos de glioblastoma obteve uma sobrevida média de 14,3 meses para pacientes com baixos níveis de atividade de CcO. Em contrapartida, a sobrevida de pacientes com níveis mais altos de atividade de CcO foi de 6,3 meses. A atividade aumentada de CcO demonstrou ser um fator preditor independente de pronóstico pobre e, no futuro, pode se tornar uma ferramenta importante na classificação dos glioblastomas bem como no desenvolvimento de novas terapias.

### 1.2.6. Vias de sinalização envolvidas na patogênese dos glioblastomas

As diversas alterações genéticas e moleculares que estão implicadas na gênese do glioblastoma levam a modificações das principais vias de sinalização, tendo como resultado o crescimento e progressão tumoral (Dunn e cols., 2012). Apesar de o envolvimento de várias vias de sinalização na patogênese dos glioblastomas ser irrefutável, existem interações complexas entre elas, incluindo interações com outros fatores ainda desconhecidos, que podem contribuir para a iniciação e transformação tumoral (Crespo e cols., 2015).

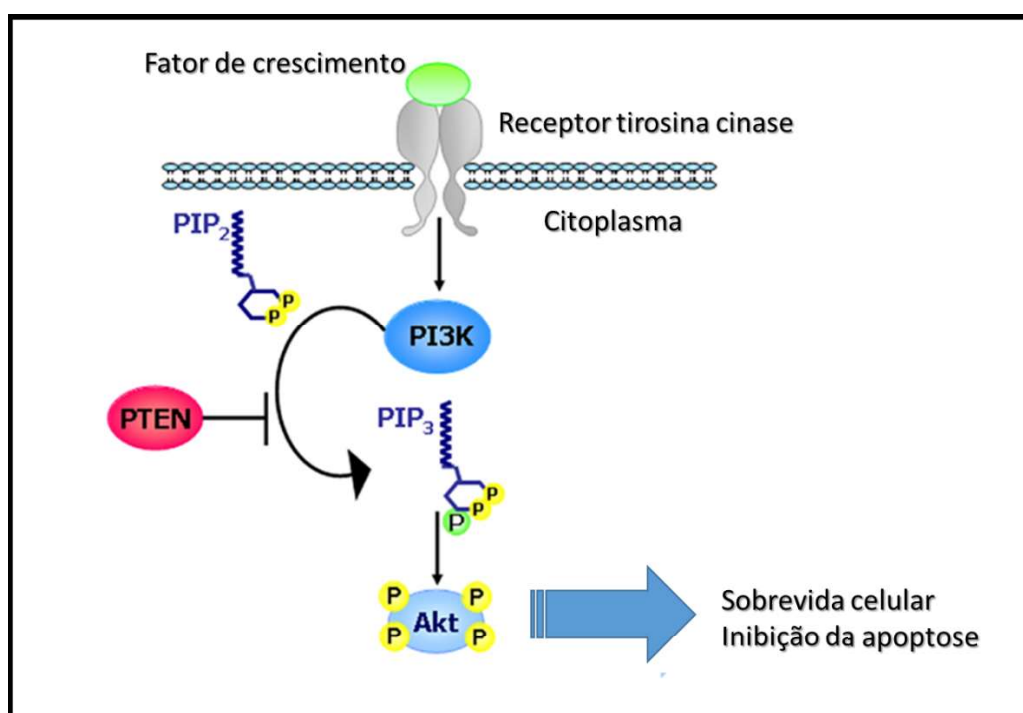
As vias de sinalização mais relevantes envolvidas na gênese dos glioblastomas incluem, dentre outras, a via PI3K/PTEN/AKT, a via p53 (*TP53/p14ARF/MDM2*) e a via RB (*CDKN2A-CDKN2B,CDK4-CDK6,RB1*).

#### 1.2.6.1. Via PI3K/PTEN/AKT

As fosfatidilinositol-3-cinases (PI3Ks) são cinases lipídicas que fosforilam fosfoinosítídeos na posição D-3 do anel inositol, gerando segundos mensageiros que regulam atividades celulares e promovem várias propriedades celulares que incluem proliferação, sobrevivência, motilidade e mudanças morfológicas (Kumar e Carrera, 2007).

Dentre os diferentes tipos de proteína PI3K, a mais relevante para a regulação da divisão celular e tumorigênese pertence à classe IA, sendo composta por um heterodímero formado pela subunidade catalítica p110 $\alpha$  e sua subunidade reguladora associada p85. Em células quiescentes, a subunidade p85 mantém a p110 $\alpha$  em um estado de baixa atividade. Quando há estímulo por fator

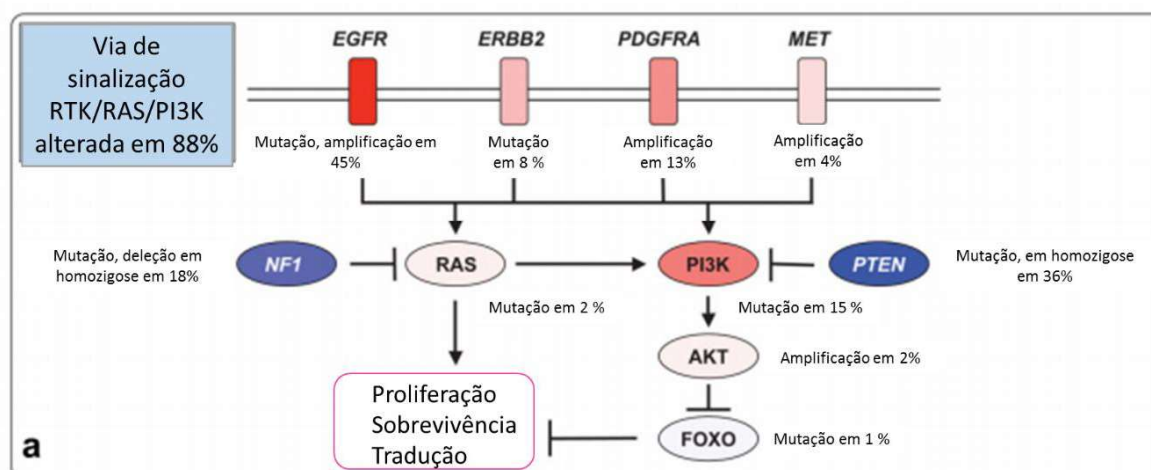
de crescimento, a subunidade p85 se liga à tirosina fosforilada dos receptores de tirosina cinases ou suas proteínas adaptadoras de substrato, o que ativa a subunidade p110 $\alpha$  (Bader e cols., 2006). Isso leva à produção de fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3), que ativa moléculas efetoras *downstream* como AKT (Figura 13), promovendo proliferação celular e aumento da sobrevivência da célula através do bloqueio da apoptose (Furnari e cols., 2007).



**Figura 13:** Esquema da via PI3K/PTEN/AKT. Em resposta a um estímulo celular, como por exemplo fator de crescimento, PI3K é ativada pelos receptores de tirosina cinase e fosforila PIP2 para gerar PIP3 que, por sua vez, fosforila e ativa AKT. PTEN é uma fosfatase lipídica que antagoniza a ação de PI3K através da conversão de PIP3 em PIP2 bloqueando, dessa forma, a cascata de sinalização PI3K (Adaptado de Molinari e Frattini, 2014).

PIP3 é um substrato da fosfatase PTEN, que defosforila PIP3 a fim de produzir fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2). Portanto, o gene *PTEN* regula de forma negativa a ação do PI3K e inibe, dessa forma, a proliferação celular. Contudo, esta função é frequentemente perdida em glioblastomas devido a LOH 10q, o que ocasiona a ativação constitutiva da via PI3K e, conseqüentemente, níveis maiores de AKT ativa nas células tumorais (Koul, 2008).

Acredita-se, portanto, que a via *PI3K/PTEN/AKT* está diretamente envolvida na gliomagênese, o que é corroborado por achados do projeto piloto TGCA (*The Cancer Genome Atlas*) de 2008, que apontam alterações na via EGFR/Ras/NF1/PTEN/PI3K em 88% dos pacientes com glioblastoma (Figura 14).



**Figura 14:** Alterações genéticas frequentes na via de sinalização RTK/RAS/PI3K. As alterações de ativação genética estão representadas em vermelho, sendo que os genes mais frequentemente alterados estão destacados com tom de vermelho mais escuro. As alterações que levam à perda de função estão marcadas em azul, sendo que azul escuro indica as alterações mais comuns (Adaptado de *The Cancer Genome Atlas Research Network*, 2008).

### 1.2.6.2. Via *TP53/p14ARF/MDM2*

A proteína p53, codificada pelo gene *TP53*, está envolvida em diversas etapas do ciclo celular, resposta celular ao dano do DNA, morte e diferenciação celular. Ela atua como um fator de transcrição que se liga a regiões específicas do DNA, afetando a transcrição dos seus genes alvo através de ativação da transcrição ou modulação da ativação de outras proteínas (Shangary e Wang, 2009).

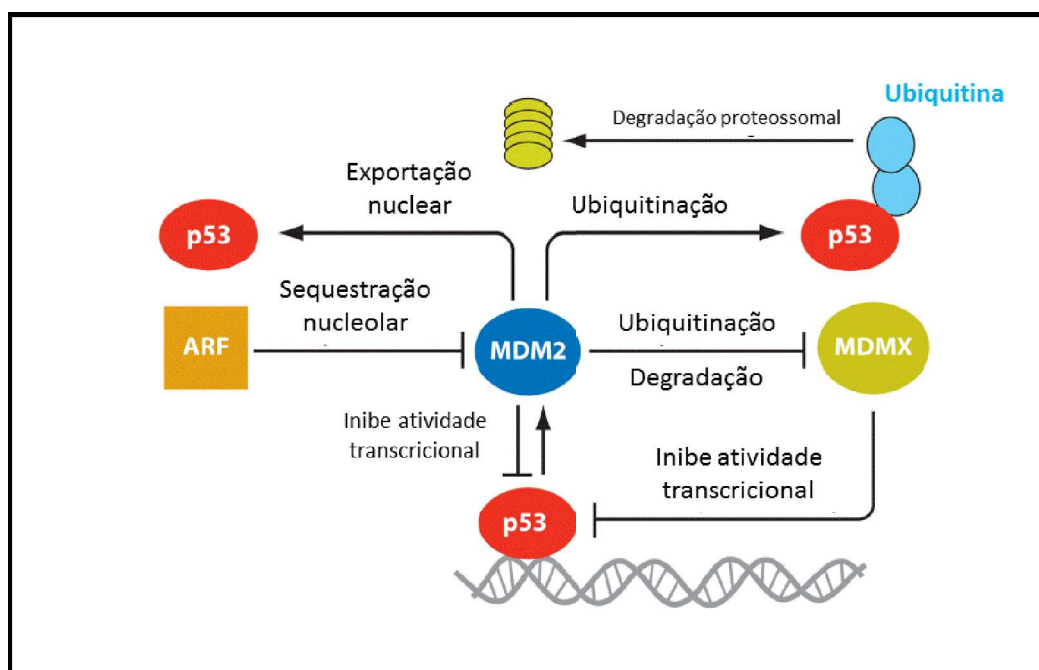
Condições que desencadeiam estresse celular ativam a rede do *TP53*, a qual é responsável por facilitar o reparo de DNA ou induzir a morte celular caso o dano seja excessivo, evitando, conseqüentemente, que células alteradas se dividam. Esse gene regula os promotores de potenciais genes efetores, como *p21*, que bloqueia a progressão do ciclo celular na fase G1 através da inibição da função de proteínas ciclinas-D (Van Meir e cols., 2010). Este mecanismo possibilita o reparo de DNA antes da replicação e mitose e, portanto, associa de forma direta o *p21* com a função supressora tumoral do *TP53* (Crespo e cols., 2015).

Após estresse, a proteína p53 se liga ao promotor do gene *MDM2* e induz a expressão da proteína MDM2. Por sua vez, a MDM2 se liga à p53, inibindo-a através de vários mecanismos e gerando um *loop* de *feedback* negativo que regula tanto a atividade da p53 como a expressão de *MDM2* (Figura 15) (Shangary e Wang, 2009).

Além disso, o gene *p14ARF*, que faz parte do complexo *CDKN2A*, codifica uma proteína que inibe o silenciamento da degradação e transativação da p53

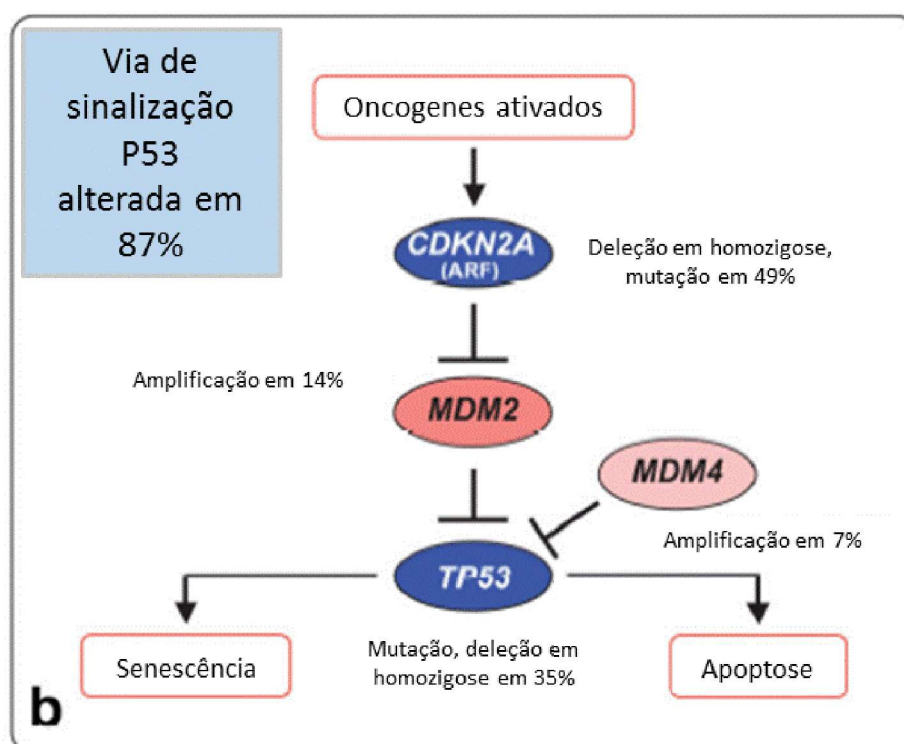
ao se ligar de forma direta à MDM2. A expressão desse gene é regulada de forma negativa pela p53 (Kleihues e cols., 2007).

A via de sinalização TP53 pode ser interrompida em casos de glioblastoma devido a mutações de *TP53* e/ou superexpressão/amplificação de *MDM2* e/ou perda da expressão de *CDKN2A-p14ARF*. Todas estas alterações bloqueiam a atividade de p53, podendo levar à proliferação celular descontrolada e formação tumoral (Crespo e cols., 2015).



**Figura 15:** Feedback autoregatório da inibição da p53 por MDM2. A MDM2 se liga diretamente à p53 e inibe sua atividade transcricional, causa ubiquitinação e degradação proteossomal da p53, e exporta a p53 para fora do núcleo. MDMX, um homólogo de MDM2, também se liga diretamente à p53, contudo não causa degradação da p53. O supressor tumoral ARF se liga ao MDM2, sequestrando-o para o interior do nucléolo, e, dessa forma, promove a estabilização da p53 (Adaptado de Shangary e Wang, 2009).

O projeto piloto TGCA (2008) demonstrou que 87% dos glioblastomas apresentam alterações genéticas nessa via complexa, estando associadas a mutação/deleção de *TP53* em 35% dos casos, amplificação de *MDM2* em 14%, amplificação de *MDM4* em 7% e deleção/mutação de *CDKN2A*-p14ARF em 49% (Figura 16).



**Figura 16:** Alterações genéticas frequentes na via de sinalização p53. As alterações de ativação genética estão representadas em vermelho, sendo que os genes mais frequentemente alterados estão destacados com tom de vermelho mais escuro. As alterações que levam à perda de função estão marcadas em azul, sendo que azul escuro indica as alterações mais comuns (Adaptado de *The Cancer Genome Atlas Research Network*, 2008).

### 1.2.6.3. Via *CDKN2A-CDKN2B, CDK4-CDK6, RB1*

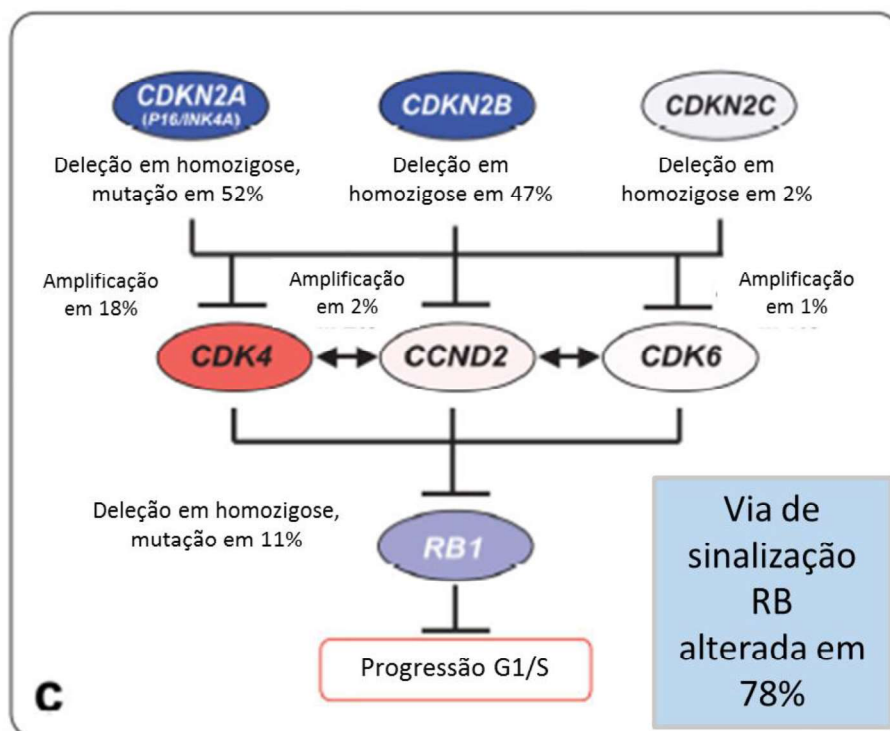
Essa via desempenha um papel central na regulação da proliferação e ciclo celular uma vez que seus componentes podem ser ativados e/ou inibidos sinais promotores ou supressores de crescimento (Knudsen e Wang, 2010).

O gene *RB*, localizado no braço longo do cromossomo 13, codifica a fosfoproteína Rb que, em células quiescentes, encontra-se em estado hipofosforilado (ativo) e ligada ao fator de transcrição E2F, evitando a transcrição de genes importantes para a mitose. Este mecanismo impede a progressão da fase G1 para a fase S do ciclo celular. O complexo CDK4/ciclinaD1 fosforila a Rb, inativando-a e possibilitando a liberação de E2F, o que leva à ativação transcricional de genes necessários para a síntese de DNA e crescimento celular (Furnari e cols., 2007).

Dentre os principais reguladores negativos da via de sinalização *RB*, as proteínas da família Ink4 (*CDKN2A-p16<sup>INK4a</sup>*, *CDKN2B-p15<sup>INK4b</sup>*, *CDKN2C-p18<sup>INK4c</sup>* e *CDKN2D-p19<sup>INK4d</sup>*) merecem destaque. Elas inibem a formação do complexo que fosforila a Rb, regulando, portanto, de forma negativa a transição da fase G1 para a fase S (Knudsen e Wang, 2010).

De acordo com resultados do projeto TGCA (2008), a via de sinalização RB está alterada em 78% da amostra composta por 206 pacientes com diagnóstico de glioblastoma (Figura 17). Essas alterações incluem deleção em homozigose e mutação de *CDKN2A-p16<sup>INK4a</sup>* e *RB* em 52% e 11% da amostra, respectivamente, e deleção em homozigose de *CDKN2B-p15<sup>INK4b</sup>* e *CDKN2C-p18<sup>INK4c</sup>* em 47% e 2% dos tumores, respectivamente. Já a amplificação dos genes

*CDK4*, *CDK6* e *CCND2* (ciclina D2) em 18%, 1% e 2% dos casos, respectivamente.



**Figura 17:** Alterações genéticas frequentes na via de sinalização RB. As alterações de ativação genética estão representadas em vermelho, sendo que os genes mais frequentemente alterados estão destacados com tom de vermelho mais escuro. As alterações que levam à perda de função estão marcadas em azul, sendo que azul escuro indica as alterações mais comuns (Adaptado de The Cancer Genome Atlas Research Network, 2008).

### 1.2.7. Tratamento

Atualmente, o tratamento dos glioblastomas se baseia na remoção cirúrgica do tumor com posterior radioterapia associada à quimioterapia com

temozolamida (TMZ), que é um agente alquilante oral (Wesolowski e cols., 2010).

Na década de 20, o neurocirurgião Walter Dandy ficou conhecido por sua tentativa de remover todo um hemisfério cerebral de dois pacientes com GBM que estavam em coma. Apesar de seus esforços, os pacientes acabaram sucumbindo à doença, evidenciando pela primeira vez o caráter extremamente invasivo deste tumor (Agnihotri e cols., 2013).

Os agentes alquilantes foram inicialmente desenvolvidos como armas químicas durante o início do século XX. Somente após a Segunda Guerra Mundial suas propriedades antineoplásicas tornaram-se alvo de estudos. Esses agentes atuam de forma inespecífica, afetando tanto células normais como cancerosas. No entanto, as células neoplásicas se dividem de forma mais rápida que as células normais, sendo, portanto, mais sensíveis aos seus efeitos (Wesolowski e cols., 2010).

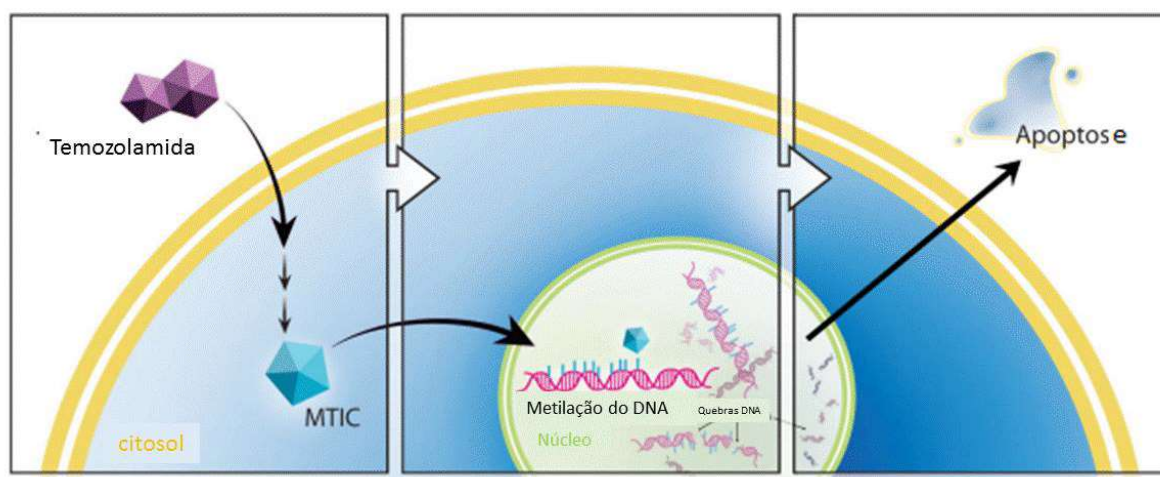
Em 2005, um ensaio clínico randomizado fase 3 conduzido por Stupp e cols. comprovou que a adição da TMZ aumentou a sobrevida média dos pacientes para 15 meses em comparação com 12 meses nos casos em que só foi utilizada a radioterapia. Aos dois anos, a taxa de sobrevida foi de 27% e 10%, respectivamente.

A TMZ foi inicialmente desenvolvida no início da década de 1980 na *Aston University* da Grã-Bretanha (Newlands e cols., 1997). Seu mecanismo de ação se baseia na capacidade de seus metabólitos depositarem grupamentos metil nas bases de DNA guanina, formando O<sup>6</sup>-metilguanina no DNA, que vai se parear de forma errônea com timina no próximo ciclo de replicação de DNA. Esse

pareamento ocorre de forma sucessiva em diversos ciclos acarretando, por fim, a morte celular (Wesolowski e cols., 2010; Jovcevska e cols., 2013).

Após administração via oral, a TMZ é prontamente absorvida no intestino delgado, sendo que consegue atravessar a barreira hematoencefálica devido ao seu tamanho (194 Da). Em modelos animais, comprovou-se a capacidade da TMZ em atravessar a barreira hematoencefálica e atingir concentrações intratumorais maiores do que outros agentes citotóxicos (Grossman e cols., 2012).

A TMZ sofre, então, conversão intracelular espontânea via hidrólise em um potente agente de metilação, MTIC, que metila a base guanina (Agarwala e Kirkwood, 2000). Esse mecanismo implica na formação de *nicks* no DNA e, em última instância, na apoptose, uma vez que os mecanismos de reparo de DNA são incapazes de se ajustar à base metilada (Figura 18) (Friedman e cols., 2000).



**Figura 18:** Ilustração esquemática do mecanismo de ação do agente alquilante temozolamida. A TMZ é convertida no meio intracelular em MTIC, que é responsável por causar a metilação da base guanina. Os mecanismos de

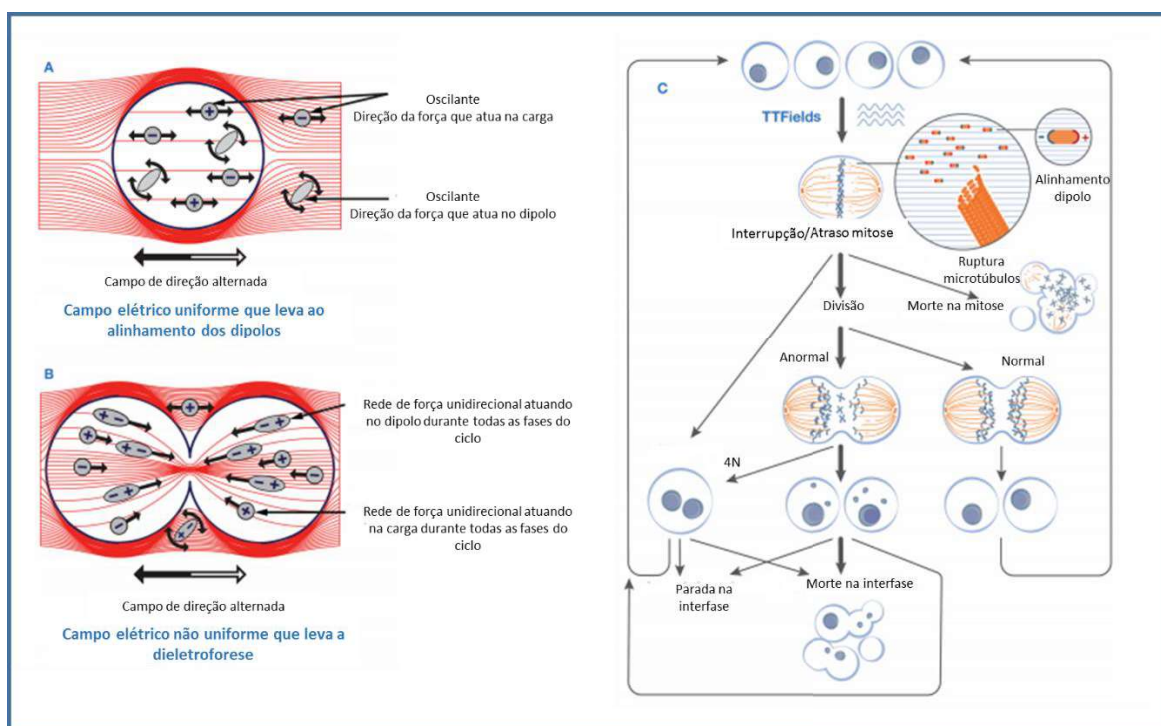
reparo de DNA não conseguem se adaptar, formando *nicks* de DNA e, por fim, acarretando a apoptose celular (Wesolowski e cols., 2010).

Na teoria, o uso concomitante de um inibidor da angiogênese (como por exemplo bevacizumab) e um agente citotóxico pode apresentar resultados melhores, uma vez que seus efeitos podem se complementar e ser mais efetivos em diminuir a proliferação celular tumoral, acarretando a morte celular das células cancerosas e diminuindo a inflamação associada ao tumor (Grossman e cols., 2012). De fato, diversos estudos estão avaliando o uso de bevacizumab em associação à TMZ como tratamento de primeira linha para os glioblastomas.

Novas modalidades terapêuticas estão sendo avaliadas com relação à sua eficácia em glioblastomas, como por exemplo os TTFields (*Tumor Treating Fields*), que são campos elétricos alternados, de frequência intermediária e intensidade baixa cujo objetivo é interromper a divisão celular e inibir o crescimento tumoral (Figura 19). Alguns experimentos iniciais demonstraram que várias linhagens tumorais, quando expostas aos TTFields, apresentaram uma diminuição expressiva de seu crescimento, ao passo que esse efeito não é observado em células que não estão em divisão (Kirson e cols., 2004). Esses achados foram reproduzidos *in vivo* em modelos animais (Kirson e cols., 2009). Um modelo experimental de ratos com células de glioblastoma inoculadas intracranialmente, tratados com TTFields com uma frequência de 200 kHz por 6 dias, demonstraram tumores menores em comparação com ratos não tratados (Kirson e cols., 2007).

O efeito inibitório dos TTFields é amplamente mediado pela interferência na formação do fuso mitótico, tendo como alvo componentes essenciais, como septinas e microtúbulos, para os estágios do ciclo mitótico em que há separação

e distribuição dos cromossomos (metáfase e anáfase) (Gera e cols., 2015; Giladi e cols., 2015). Além disso, a inibição da polimerização dos microtúbulos interfere na montagem adequada do fuso mitótico. Na telófase, o formato de ampulheta das células-filhas que estão se separando induzem a formação de um campo elétrico não uniforme que pode comprometer a citocinese normal (Kirson e cols., 2004). Portanto, os efeitos antitumorais dos TTFIELDS são resultado do bloqueio da formação do fuso mitótico e da separação das duas células-filhas, além de segregação cromossômica desigual e diminuição do potencial clonogênico da progênie celular (Hottinger e cols., 2016).



**Figura 19:** Mecanismos de ação dos TTFIELDS nas células em divisão e quiescentes. (A) Dentro das células quiescentes o campo é uniforme, e as forças elétricas acarretam apenas vibração dos íons e dipolos. (B) O campo não uniforme dentro das células em divisão induz forças empurrando todos os dipolos em direção ao sulco. (C) TTFIELDS exercem forças direcionais e implicam em

formação anormal do fuso e subsequente interrupção ou atraso da mitose, possivelmente devido à ligação inadequada dos cromossomos às fibras do fuso. As células podem morrer na interrupção da mitose ou progredir para divisão celular, o que vai gerar uma progênie anormal. As células-filhas anormais podem morrer na interfase subsequente, ficar permanentemente na interfase ou proliferar através de mitoses adicionais, que estarão sujeitas novamente à ação dos TTFs (Adaptado de Hottinger e cols., 2016).

### **1.2.8. Classificação molecular dos glioblastomas**

Nos últimos anos, a categorização dos GBMs com base em seu perfil genético ganhou destaque. Estudos recentes têm demonstrado que pacientes que apresentam o mesmo subtipo de glioblastoma podem apresentar respostas mais homogêneas a determinada terapia. Uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na gênese tumoral em cada subtipo de glioblastoma pode viabilizar a seleção de terapias mais específicas para o comportamento biológico dos tumores daquele grupo. Isso constitui um grande avanço haja vista que resultados obtidos em estudos clínicos anteriores podem não ter dado a devida importância a agentes terapêuticos promissores devido a heterogeneidade dos pacientes em nível molecular (Van Meir e cols., 2010).

Em 2010, uma relevante subclassificação molecular dos GBMs (proneural, neural, clássico e mesenquimal) baseada nas alterações genéticas e expressão dos genes *EGFR*, *NF1*, *PDGFR* e *IDH1* foi proposta, contudo ainda não é de uso corrente (Verhaak e cols., 2010) (Quadro 4).

**Quadro 4:** Subclassificação molecular dos GBMs segundo Verhaak e cols. (2010).

<b>Proneural</b>	<b>Neural</b>	<b>Clássico</b>	<b>Mesenquimal</b>
Mutação <i>IDH1</i>	Aumento da expressão de EGFR	Mutação/Amplificação <i>EGFR</i>	Mutação/Perda <i>NF1</i>
Amplificação <i>PDGFRA</i>	Ativação marcadores neuronais (NEFL, GABRA1, SYT1 e SLC12A5)	Perda <i>PTEN</i>	Mutação/Perda <i>TP53</i>
Mutação <i>TP53</i>		Perda <i>CDKN2A</i>	Mutação/Perda <i>PTEN</i>
Perda do <i>PTEN</i>		Aumento expressão <i>NES</i>	Aumento da expressão <i>MET</i> , <i>CD44</i> , <i>CHIL31</i>

As duas principais características do grupo "proneural" incluem as alterações de *PDGFRA* e mutações de ponto em *IDH1*. Além disso, mutações de *TP53* e perda de heterozigossidade 10q foram eventos frequentemente encontrados nesse subtipo. Acredita-se que esse subtipo apresente uma melhor resposta aos inibidores das vias do fator de indução à hipóxia (HIF), PI3K e *PDGFRA*. Por outro lado, são menos responsivos à uma abordagem mais agressiva das terapias clássicas. Mesmo assim, a sobrevida dos pacientes com o subtipo proneural foi um pouco maior do que a dos indivíduos com os outros subtipos (Verhaak e cols., 2010).

O subtipo "neural" apresenta perfil de expressão gênica que se assemelha de forma significativa àquela encontrada em tecido cerebral normal, incluindo a ativação de marcadores neuronais como *NEFL*, *GABRA1*, *SYT1* e *SLC12A5* (Verhaak e cols., 2010).

No terceiro subtipo, denominado "clássico", o aumento do número de cópias do cromossomo 7 associado a perdas no cromossomo 10 e perdas focais no braço curto do cromossomo 9 é um evento frequente, que leva à amplificação do gene *EGFR* e perda do gene *PTEN* e do locus *CDKN2A*. Em geral, os glioblastomas do subtipo clássico exibem boa resposta às terapias clássicas (radiação associada à quimioterapia). Inibidores da Mdm2, a reguladora negativa da p53, também podem ser uma alternativa terapêutica para o tratamento desses tumores (Verhaak e cols., 2010).

O subtipo "mesenquimal" frequentemente apresenta inativação dos genes *NF1*, *TP53* e *PTEN*. Os tumores desse subtipo apresentam resposta satisfatória às terapias clássicas agressivas, sendo que podem ser responsivos aos inibidores da Ras, da PI3K e da angiogênese (Verhaak e cols., 2010).

Recentemente, uma abordagem simplificada dessa subclassificação foi proposta por Purkait e cols. (2015), a fim de criar um sistema que possa facilmente ser aplicado de forma rotineira na maioria dos laboratórios de neuropatologia. Ela tem como base a pesquisa de 6 alterações genéticas, a saber: amplificação de *EGFR* e *PDGFRA* em conjunto com mutação dos genes *IDH-1*, *TP53* e *NF-1* (Quadro 5).

**Quadro 5:** Subclassificação molecular dos GBMs segundo Purkait e cols. (2015)

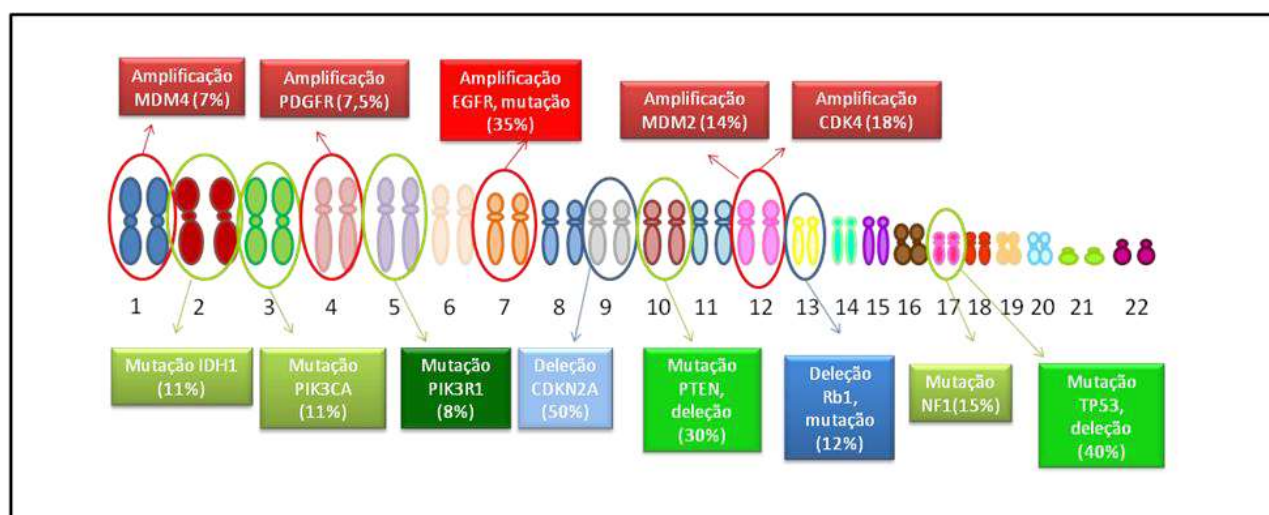
<b>Subtipos moleculares</b>	<b>Critérios utilizados</b>
Similar ao Clássico ("Classic like")	Amplificação de <i>EGFR</i>
Similar ao Proneural ("Proneural like")	Presença de mutação <i>IDH-1</i> e/ou amplificação de <i>PDGFRA</i> e/ou mutação de <i>TP53</i> , sem alterações de NF-1/YKL-40
Similar ao Mesenquimal ("Mesenquimal like")	Presença de <i>up-regulation</i> de YKL 40 e/ou <i>down-regulation</i> de NF-1 ± mutação de <i>TP53</i> Ausência de amplificação de <i>EGFR/PDGFRA</i> Ausência de mutação de <i>IDH-1</i>
Similar ao Neural ("Neural like")	Ausência de todas as alterações mencionadas

Dos 114 glioblastomas estudados por Purkait e cols. (2015), 44 (38,6%) foram classificados como subtipo "clássico", 37 (32,5%) como subtipo "proneural" e 23 (20,2%) como subtipo "mesenquimal". Dez casos (8,8%) não exibiram as alterações genéticas investigadas e, por isso, foram caracterizados como subtipo "neural".

### 1.2.9. Alterações genéticas dos glioblastomas

Atualmente, a classificação baseada na análise citogenética molecular vem representando uma das mais importantes ferramentas no diagnóstico dos

glioblastomas, sendo que a mesma está ajudando a caracterizar diferentes subtipos da neoplasia com potencial impacto na escolha da terapia e no prognóstico. Hoje, já existem mais de 60 alterações genéticas descritas (Parsons e cols., 2008; Shete e cols., 2009), sendo que as principais podem ser visualizadas na Figura 19.



**Figura 19:** Alterações genéticas em glioblastoma. Imagem demonstra as alterações genéticas comumente encontradas em casos de glioblastoma (que tem mais de 60 alterações genéticas descritas), com suas respectivas porcentagens. Círculos vermelhos= alterações que são mais comumente amplificações, círculos azuis= alterações que são mais comumente deleções homocigóticas, círculos verdes= alterações que são mais comumente mutações (Adaptado de Belden e cols., 2011).

As principais alterações citogenéticas observadas em GBMs incluem a perda total ou parcial do cromossomo 10 e a trissomia/polissomia do cromossomo 7. O ganho dos cromossomos 12, 13, 17 e 20, bem como a perda dos cromossomos 1, 8, 13, 14, 17, 19, 22 e Y também podem ser evidenciados

em casos de GBMs. Já as alterações estruturais mais frequentes incluem deleções de 9p, 13q, 14q, 17p, 19q e 22q e ganho de 3q, 4p, 7p, 7q, 12q, 19p, 20p e 20q (Necsalová e cols., 2007).

A trissomia do cromossomo 7, bem como a perda do cromossomo 10, estão associadas com o pior prognóstico da doença, além de conferir ao paciente resistência à quimioterapia. A presença de polissomia do cromossomo 7 apresenta relação direta com resistência à radioterapia e pior prognóstico dos pacientes. Ademais, a perda do cromossomo 10 é usualmente associada com uma menor sobrevida em pacientes idosos e com um melhor prognóstico naqueles com idade inferior a 45 anos (Nečsalová e cols., 2007).

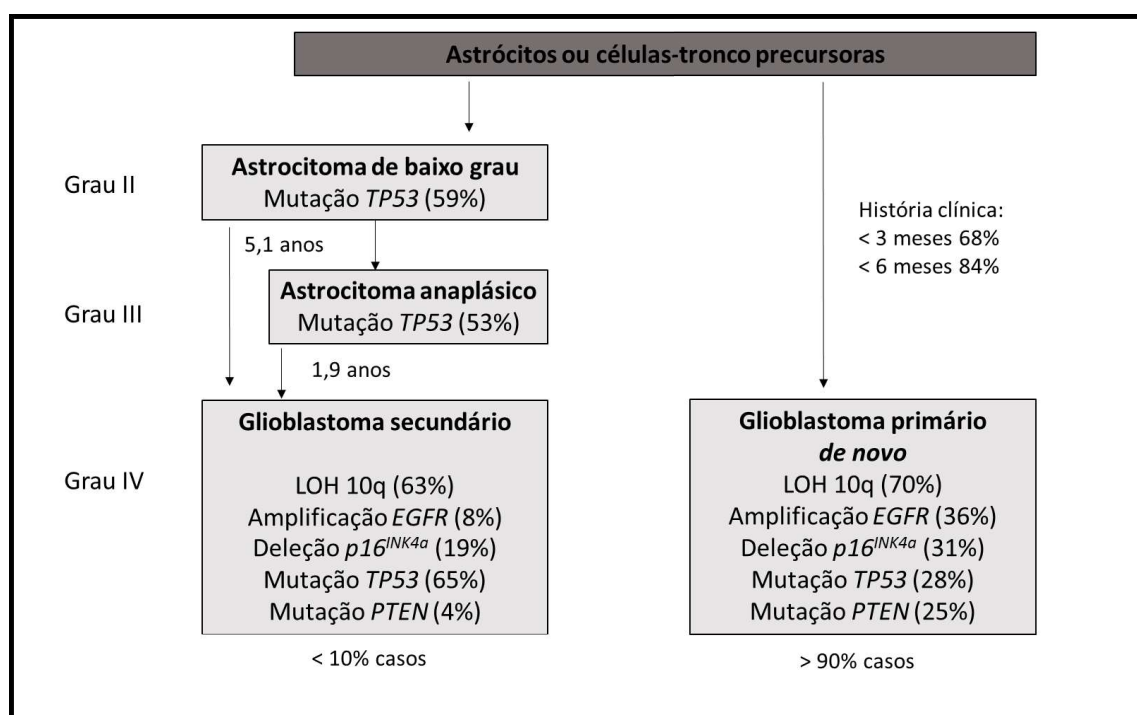
Por sua vez, acredita-se que as alterações genéticas mais importantes para a gênese do GBM são a amplificação do gene do receptor do fator de crescimento epidérmico (*EGFR*) e a mutação ou perda do gene *TP53*. O gene *EGFR* está envolvido no controle de mecanismos de proliferação celular. Sua expressão aumentada acarreta neovascularização, proliferação celular e resistência à sinalização da morte celular, estando correlacionada com uma resistência aumentada à radioterapia. Mutações do *EGFR* têm sido usualmente detectadas de modo associado com monossomia do cromossomo 10, ao passo que a presença de amplificação do gene *EGFR* e deleção do *TP53* são mais incomuns (Horiguchi e cols., 1999; Shapiro, 2002; Nečsalová e cols., 2007).

Uma pequena fração dos glioblastomas está associada também com perdas cromossômicas específicas de 1p e 19q, que são comumente encontradas em oligodendrogliomas (tumores gliais) (Magnani e cols., 2005). Este achado, combinado com o achado histológico de diferenciação celular tumoral similar ao oligodendroglioma, indica um aumento da sobrevida. Vários

autores têm descrito tais tumores como glioblastomas com componente oligodendroglial (Nagasaka e cols., 2007).

### 1.2.10. Alterações genéticas em glioblastomas primários e secundários

Sabe-se que os GBMs primários e secundários constituem doenças distintas com alterações genéticas específicas, embora sejam indistinguíveis do ponto de vista histológico (Figura 20).



**Figura 20:** Tempo de evolução e principais alterações genéticas em glioblastomas primários e secundários (Adaptado de Kleihues e cols., 2007).

Os GBMs primários são caracterizados pela mutação e amplificação gênica do receptor do fator de crescimento epidermóide (*EGFR*), localizado no

braço curto do cromossomo 7; perda da heterozigosidade (LOH) do braço longo do cromossomo 10, região onde está localizado o gene *PTEN*; aumento da expressão do gene *MDM2*; e deleção do braço curto do cromossomo 16. Já nos GBMs secundários, podem-se observar mutações dos genes *TP53* e *RB* (retinoblastoma); aumento da expressão de *PDGFA/PDGFR $\alpha$* ; e LOH do braço longo do cromossomo 19 (Furnari e cols., 2007; Wen e Kesari, 2008) (Quadro 6).

**Quadro 6:** Alterações citogenéticas e moleculares observadas em GBMs primários e secundários.

<b>GBM Primário</b>	<b>GBM Secundário</b>
Mutação e amplificação gênica de <i>EGFR</i>	Mutações de <i>TP53</i> e <i>RB</i>
LOH 10q ( <i>PTEN</i> )	Aumento da expressão de <i>PDGFA/PDGFR<math>\alpha</math></i> ;
Aumento da expressão de <i>MDM2</i>	LOH 19q
Deleção 16p	

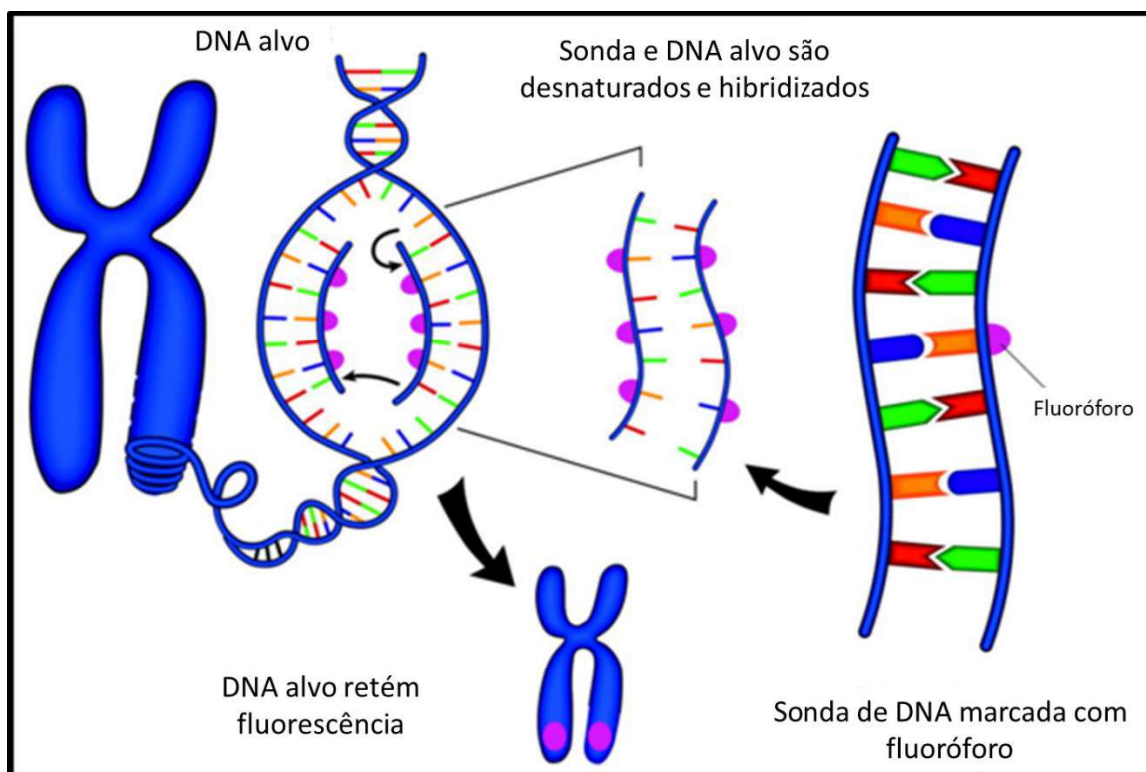
### 1.2.11. A técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

O advento da técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) em 1986, descrita por Pinkel e cols., marcou o início de uma nova era para o estudo de anormalidades cromossômicas numéricas e estruturais ao combinar citogenética com biologia molecular. As técnicas de bandamento usualmente empregadas na análise cromossômica de alta resolução podem obter até 1000 bandas por

genoma; no entanto, mesmo em tal nível de resolução, deleções, duplicações ou até mesmo translocações podem ser difíceis de discernir. De fato, a menor alteração cromossômica detectada por esse método é de aproximadamente 2000-3000 kilobases (kb), enquanto que as sondas de FISH são capazes de detectar regiões de 0,5 kb em cromossomos metafásicos (McNeil e Ried, 2000).

Basicamente, a técnica de FISH consiste na hibridização de uma sonda de DNA com o DNA alvo em uma lâmina, a uma temperatura apropriada (Figura 21). Inicialmente, o DNA alvo e a sonda de DNA são desnaturados, o que faz com que as fitas de DNA se separem. Subsequentemente, a sonda de DNA se liga à região complementar no DNA alvo. Para que a sonda possa ser visualizada, ela é marcada pela incorporação de nucleotídeos marcados com fluoróforo. Sequências complementares de DNA se unem, sendo que as sondas mapeiam regiões alvo tanto em cromossomos metafásicos como em núcleos interfásicos. Os sinais são então analisados em um microscópio de epifluorescência (Stumm e cols., 1999; Wippold e Perry, 2007; Volpi e Bridger, 2008).

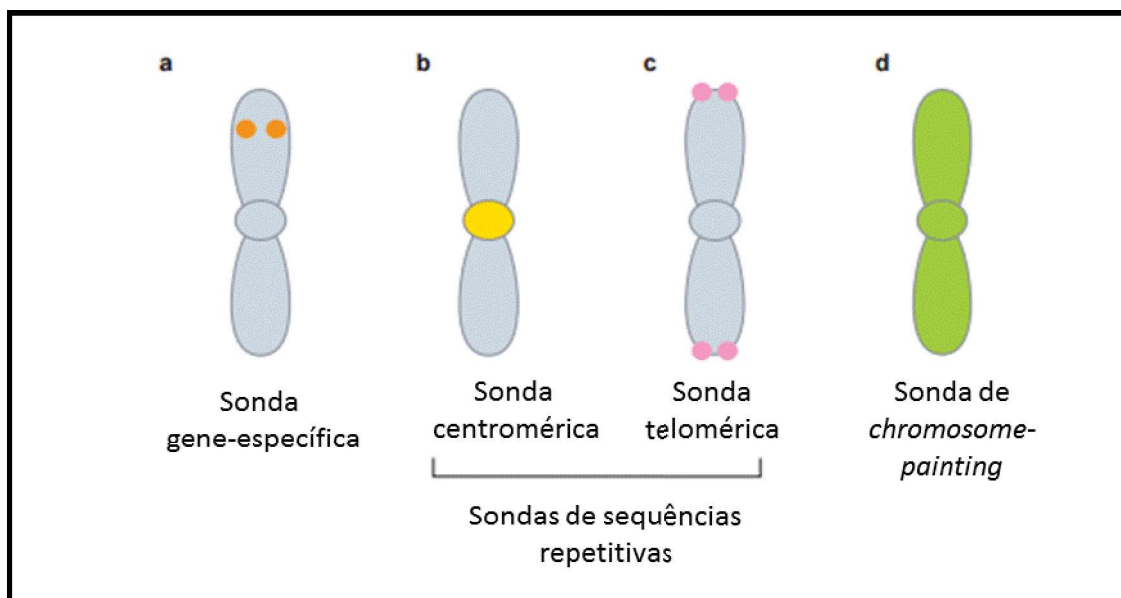
As sondas de FISH são altamente específicas para sua sequência-alvo, sendo que precisam ser longas o suficiente para se ligarem de forma eficaz à região-alvo e produzir um sinal com a intensidade necessária para sua visualização. Em geral, o tamanho das sondas pode variar de 30 kb (1kb=1000 pares de base) a mais de 1 Mb, mas a maioria fica entre 100-300 kb (Wippold e Perry, 2007).



**Figura 21:** Representação esquemática da técnica de FISH. A sonda de DNA é marcada com material fluorescente. A sonda e o DNA alvo são desnaturados, e a sonda pode, então, hibridizar com a região alvo. A marcação com material fluorescente é detectada com microscópio de fluorescência (Adaptado de Wippold e Perry, 2007).

As sondas de FISH podem ser divididas em sondas gene-específicas, sondas de sequências repetitivas e sondas de *chromosome-painting* (pintura cromossômica) (Figura 22). As sondas gene-específicas têm como alvo sequências específicas de ácidos nucleicos dentro dos cromossomos. As sondas de sequências repetitivas, por sua vez, se ligam a regiões que são ricas em sequências repetitivas de pares de bases, como por exemplo as regiões centroméricas, ricas em regiões com repetição em tandem de T-A, e teloméricas, reconhecidas pelas sequências repetitivas TTAGGG. Já as sondas de

*chromosome-painting* contêm sequências que são específicas para um cromossomo ou para um braço de um cromossomo (McNeil e Ried, 2000).



**Figura 22:** Exemplos de diferentes tipos de sondas de FISH. (a) Sondas gene-específicas, que têm como alvo sequências específicas de ácidos nucléicos no cromossomo. (b) Sondas centroméricas, que se ligam a sequências repetitivas que são específicas da região centromérica do cromossomo. (c) Sondas teloméricas reconhecem a sequência repetitiva TTAGGG. (d) Sondas de *chromosome painting* consistem em um *pool* de sondas cromossomo-específicas (Adaptado de McNeil e Ried, 2000).

O advento da técnica de FISH contribuiu de forma considerável para a pesquisa de tumores sólidos, uma vez que possibilita o uso de materiais previamente fixados em formalina e embebidos em blocos de parafina tanto em estudos prospectivos como retrospectivos. A maior vantagem dessa técnica está baseada em sua habilidade de oferecer um grau intermediário de resolução entre análise de DNA e investigações cromossômicas, além de manter íntegra a

arquitetura tecidual, o que permite a avaliação da heterogeneidade célula a célula e a detecção de pequenos clones (Varela-Garcia, 2003).

#### **1.2.12. A técnica de FISH e alterações dos cromossomos 1, 7 (gene *EGFR*), 10 (gene *PTEN*), 17 (gene *TP53*) e 19**

Diversos estudos foram conduzidos em glioblastomas com o objetivo de avaliar as aneuploidias dos cromossomos 7 e 10, amplificação do gene *EGFR* e deleções de 1p19q, 10q (gene *PTEN*) e 17p (gene *TP53*) através da técnica de FISH (Tabelas 1 a 6).

A heterogeneidade tumoral em tumores sólidos constitui uma barreira significativa para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficazes, uma vez que a eficácia do tratamento vai refletir a diversidade molecular em tumores individuais. Em glioblastomas, a heterogeneidade tumoral pode remeter à observação concomitante de múltiplas morfologias celulares, diferentes padrões de proliferação vascular e padrões distintos de expressão protéica bem como diversidade genética. A amplificação dos genes dos receptores de tirosina quinase, incluindo *EGFR*, são eventos frequentes em glioblastomas. Embora a clonalidade tumoral possa implicar na presença dessas alterações em todas as células neoplásicas, diversos autores observaram, através da técnica de FISH, que nem todas as células apresentam essas amplificações. Em 2012, Little e cols. avaliaram 240 casos de glioblastoma em relação à amplificação dos genes dos receptores de tirosina quinase, dentre os quais o gene *EGFR*. Os autores identificaram 106 amostras com amplificação de *EGFR* (44%) e observaram um

alto grau de variabilidade no número de cópias do gene em células individuais ao longo do espécime patológico.

A amplificação do gene *EGFR* foi investigada em uma amostra de 47 glioblastomas, dos quais 43 eram glioblastomas primários, por Joensuu e cols. em 2005 através da técnica de FISH. A amplificação foi observada em 30 dos 43 glioblastomas primários (69,76%), sendo que uma amplificação de alto nível (mais de sete cópias do gene para cada centrômero) foi visualizada em 22 desses casos (51,16%). Por outro lado, não foi identificada essa alteração nos quatro glioblastomas secundários pertencentes à amostra.

Resultados semelhantes foram obtidos por Lopez-Gines e cols. (2010) que, em um grupo de 35 glioblastomas, identificaram 22 casos com amplificação de *EGFR* (62,85%). Ganho do cromossomo 7 foi encontrado em 92% dos casos com amplificação. Nesse estudo, a amplificação de *EGFR* não resultou em diferença significativa nas taxas de sobrevida. Durand e cols. (2010) identificaram 60% de casos de amplificação de *EGFR* em uma amostra de 11 glioblastomas primários, mas não encontraram associação com idade e sexo dos pacientes. Já Hinkle e cols. (2011) conduziram um estudo com 40 casos de glioblastoma. Vinte e seis pacientes apresentaram amplificação de *EGFR* (65%). Kakkar e cols. (2012), por sua vez, verificaram a presença desta alteração em 10 casos (45,45%), além de identificar ganho de cromossomo 7 em 5 casos (22,73%).

Mott e cols. (2008) avaliaram as alterações de *EGFR* em astrocitomas infiltrativos difusos, dentre os quais estavam incluídos 129 casos de glioblastoma. Destes, 45 apresentaram amplificação de *EGFR*. Essa alteração correlacionou-se de forma significativa com o grau histológico, sendo mais

frequentemente observada em glioblastoma (grau IV) e astrocitoma anaplásico (grau III).

Em 2009, Gaiser e cols. realizaram um estudo comparando o método automatizado de hibridização *in situ* pela prata com a técnica de hibridização *in situ* fluorescente para a detecção da amplificação do gene *EGFR*. Foi possível realizar com sucesso FISH em 93 das 95 amostras incluídas na pesquisa, com uma taxa de amplificação de 30%. Em comparação, 90 das 95 amostras foram informativas para o método automatizado de hibridização *in situ* pela prata, com uma taxa de amplificação de 28%. Discrepância entre os dois métodos foi observada em apenas 2 de 90 casos, ambos positivos pela técnica de FISH e negativos pelo outro método. A alta concordância entre as duas técnicas indica que o método automatizado de hibridização *in situ* pela prata constitui uma alternativa à técnica de FISH para a detecção de amplificação de *EGFR* em amostras de glioblastomas.

A amplificação de *EGFR* foi identificada em 44 (38,6%) dos 114 glioblastomas investigados por Purkait e cols. (2015). A sobrevida dos pacientes com idade inferior a 40 anos foi significativamente maior do que pacientes mais velhos.

Em 2010, Kim e cols. avaliaram a amplificação de *EGFR* em 74 pacientes com glioblastoma e o seu valor prognóstico. Foram identificados 48 indivíduos com essa alteração. Na análise de sobrevida, o grupo de pacientes com idade inferior a 40 anos apresentou sobrevida maior do que os indivíduos com idade igual ou superior a 40 anos. No grupo dos indivíduos mais velhos, os pacientes com tumores menores apresentaram sobrevida mais longa. Pacientes com melhor sobrevida tinham menor chance de manifestar amplificação de *EGFR*.

Quan e cols. (2005) também avaliaram o significado prognóstico da amplificação do gene *EGFR* em 107 pacientes com glioblastoma, dos quais 36 (33,64%) apresentaram a alteração. A sobrevida média geral foi de 9,8 meses, com sobrevida de 40% após um ano. Os autores não encontraram associação entre amplificação de *EGFR* e sobrevida geral.

Estudo semelhante foi relatado por Layfield e cols. (2006), no qual a amplificação do gene *EGFR* foi investigada em uma amostra composta por 34 casos de glioblastoma, sendo que os resultados obtidos foram correlacionados com a sobrevida do paciente, além de outros marcadores prognósticos, como p53, idade do paciente e sexo. Através da técnica de FISH, foram identificados 9 casos (26,47%) com amplificação de *EGFR*. A sobrevida desses pacientes variou de 3 a 30 meses, já a sobrevida dos pacientes sem amplificação variou de 1 a 73 meses. A análise dos resultados demonstrou que a idade possui valor prognóstico significativo, uma vez que pacientes mais jovens apresentam maior sobrevida. Contudo a mesma correlação não foi verificada entre sexo e status de amplificação de *EGFR*. A combinação da amplificação de *EGFR* e a expressão da proteína p53 também não apresentou impacto sobre a sobrevida dos pacientes.

Faulkner e cols. (2014) testaram 51 amostras de glioblastomas para amplificação de *EGFR*. Desses, 22 casos (43%) foram positivos para essa alteração. Nesse estudo, a amplificação não demonstrou ter influência significativa sobre a sobrevida dos pacientes. Além disso, a idade do paciente, tratamento e grau de amplificação também não tiveram impacto sobre a sobrevida.

Em um estudo conduzido por Hobbs e cols. (2012), o grau de amplificação de *EGFR* foi comparado com o comportamento tumoral e resposta ao tratamento em uma coorte de 532 glioblastomas. Os indivíduos foram classificados em 3 subgrupos distintos: sem amplificação (301 casos; 56%), nível baixo a moderado de amplificação (71 casos; 13,3%) e nível alto de amplificação (160 casos, 30%). A média de sobrevida foi 39% maior no grupo com alto nível de amplificação em comparação com o grupo sem amplificação e 43% maior em comparação com o grupo com nível baixo a moderado de amplificação. Além disso, os grupos sem amplificação e com alto nível de amplificação responderam melhor ao tratamento com TMZ do que o grupo com nível baixo a moderado de amplificação. Esses resultados sugerem que o comportamento tumoral pode diferir de acordo com o nível de amplificação, embora isso não ocorra de forma linear.

Como a média de sobrevida dos indivíduos com glioblastoma é inferior a um ano, Das e cols. (2011) estudaram 7 pacientes que apresentaram sobrevida superior a 3 anos a fim de averiguar a existência de fatores prognósticos, como amplificação de *EGFR* e codeleção 1p19q, que podem contribuir para o aumento da sobrevida. Quatro casos (57,14%) demonstraram amplificação de *EGFR*; contudo não foram identificados casos com deleção 1p e/ou deleção 19q. Neste estudo, mesmo casos com amplificação de *EGFR* exibiram sobrevida longa, o que pode ser atribuído à idade média mais baixa dos pacientes incluídos no estudo (48,8 anos).

Recentemente, Ghasimi e cols. (2016) avaliaram uma amostra de glioblastomas com relação à amplificação de *EGFR* e codeleção 1p19q. Em 18/47 casos (38,3%) e 8/50 (16%) foi verificada amplificação de *EGFR* e codeleção de 1p19q, respectivamente.

Okada e cols., em 2003, conduziram um estudo com 14 casos de glioblastoma para avaliar a presença de mutação do gene *TP53* e amplificação do gene *EGFR*. Quatro dos seis casos com mutação do *TP53* exibiram células isoladas com amplificação de *EGFR* em diferentes regiões, o que demonstra que a amplificação desse gene, em nível celular, é um evento frequente em glioblastomas com mutação de *TP53*. Já nos casos sem mutação de *TP53*, cinco deles apresentaram amplificação disseminada de *EGFR*. Além disso, foi possível identificar nesses casos uma graduação da amplificação desse gene, sendo que células com alto nível de amplificação estavam localizadas principalmente nas bordas e não no centro do tumor, o que sugere que a superexpressão de *EGFR* possa estar relacionada com a invasão tumoral.

Em 2009, Ruano e cols. também exploraram a relevância prognóstica de amplificação de *EGFR* e mutação de *TP53*. A amplificação de *EGFR* foi visualizada em 75 (51,02%) dos 147 glioblastomas em que foi possível a realização da técnica de FISH. Embora a maioria dos tumores tenha exibido um padrão mutuamente excludente, alterações concomitantes de *EGFR* e *TP53* foram encontradas. Os glioblastomas que exibiram essas alterações simultâneas apresentaram pior sobrevida, o que pode indicar seu valor prognóstico sobre a evolução de pacientes com glioblastoma primário.

Benito e cols. (2009) avaliaram a associação entre a amplificação de *EGFR* e parâmetros clínicos e genéticos em 45 casos de glioblastomas primários. A amplificação de *EGFR*, avaliada por PCR, foi observada em 24 casos (53%), dos quais 79% exibiram superexpressão de *EGFR*. Apenas um caso com amplificação de *EGFR* exibiu simultaneamente mutação de *TP53*, ao passo que 7 dos 21 casos sem amplificação apresentaram mutações de *TP53*.

A polissomia do cromossomo 7 foi identificada em 34 de 40 casos (85%) e a monossomia do cromossomo 10 em 26 de 37 casos (70%). Em 59% dos tumores a polissomia do cromossomo 7 estava combinada com a monossomia do cromossomo 10. A presença ou não de amplificação de *EGFR* não apresentou impacto significativo na média de sobrevida.

Em 2011, Coulibaly e cols., a fim de ampliar o conhecimento relacionado ao melhor método para determinação do status de *EGFR* em glioblastomas, investigaram a associação da expressão da proteína por imunohistoquímica, o status gênico através da técnica de FISH e a amplificação de *EGFR* determinada por PCR quantitativo em 99 casos diagnosticados com esse tumor. Além disso, os autores avaliaram a existência de correlação entre o prognóstico dos pacientes e o status de *EGFR* avaliado com base nessas três técnicas. Dos pacientes incluídos no estudo, 47 (47,47%) exibiram amplificação de *EGFR* e 18 (18,18%) demonstraram polissomia do cromossomo 7. Um score imunohistoquímico elevado para *EGFR* foi verificado em 29 pacientes. Destes, 96,5% demonstraram amplificação gênica detectada por FISH e PCR quantitativo. Em contraste, dos casos com baixo score imunohistoquímico, cerca de 25% exibiram amplificação gênica pelas duas técnicas. Portanto, esses achados sugerem que, nos casos em que há superexpressão da proteína, não há necessidade da execução de PCR e FISH, pois seu valor preditivo positivo para amplificação é de 97%. Contudo, em casos com scores mais baixos, testes adicionais por PCR e FISH tornam-se necessários. Em uma análise multivariada, os autores identificaram uma tendência em direção a associação entre menor tempo de sobrevida e amplificação de *EGFR* detectada por FISH.

Estudos recentes apontam que existem diferenças biológicas fundamentais em relação ao efeito da amplificação do *EGFR* sobre a sobrevida de pacientes mais velhos quando comparados com indivíduos mais jovens. Embora o prognóstico seja, de forma geral, precário em casos de glioblastoma, acredita-se que idade mais avançada no momento do diagnóstico seja o preditor negativo da sobrevida mais consistente, superando o grau ou tamanho do tumor, extensão da ressecção e tipos de terapia pós-cirurgia. Apesar de o efeito adverso da idade do paciente sobre seu prognóstico ser conhecido, pouco se sabe a respeito das características biológicas dos glioblastomas em pacientes mais velhos, sendo que indivíduos com mais de 70 anos constituem menos de 10% do total da população de pacientes diagnosticados com esse tumor. Em contraste com seu impacto negativo sobre a sobrevida de pacientes mais jovens, acredita-se que a amplificação do gene *EGFR* possa estar associada a um prognóstico mais favorável em indivíduos com mais de 55 anos, contudo pouco se sabe a respeito do seu efeito sobre indivíduos com mais de 70 anos. Dessa forma, Kleinschmidt-DeMasters e cols. (2005) avaliaram o status da amplificação do gene *EGFR* e polissomia do cromossomo 7 em uma amostra composta por 20 pacientes com idade superior a 75 anos. Um total de cinco casos (25%) apresentaram amplificação de *EGFR*, ao passo que a polissomia do cromossomo 7 foi observada de forma considerável nos pacientes, sendo que três dos cinco tumores com amplificação e 14 dos 15 tumores sem amplificação gênica exibiram mais de 18% das células com essa alteração. Em suma, 19 dos 20 tumores (95%) apresentaram mais de 10% das células com polissomia. A sobrevida geral dos pacientes foi pobre, mas significativamente mais longa em pacientes com amplificação gênica. Esses achados corroboram que a presença

de amplificação de *EGFR* constitui um preditor significativo de tempo de sobrevida em indivíduos mais velhos.

Em 2001, alterações dos genes *EGFR* e *PTEN* e dos cromossomos 7 e 10 foram avaliadas em 111 pacientes com glioblastoma e 63 casos de astrocitoma anaplásico por Smith e cols. Os dados foram comparados entre os dois grupos a fim de investigar se alterações genéticas semelhantes às encontradas em casos de glioblastoma podem ser detectadas em pacientes com astrocitoma anaplásico e usadas para identificar os pacientes com tumor mais agressivo. Nos casos de glioblastoma a amplificação de *EGFR*, a polissomia do cromossomo 7 e a perda da heterozigidade de 10q foram identificadas em 41,44% (46/111), 38,73% (43/111) e 44,85% (48/107) dos pacientes, respectivamente. Já nos casos de astrocitoma anaplásico amplificação de *EGFR*, a polissomia do cromossomo 7 e a perda da heterozigidade de 10q foram evidenciadas em 17,46% (11/63), 40,32% (25/62) e 7,27% (4/55) dos indivíduos, respectivamente.

Os glioblastomas exibem uma notável tendência para diversidade morfológica. Apesar de raros, os componentes pseudoepiteliais (adenoide ou epitelióide) ou diferenciação epitelial verdadeira podem ocorrer e constituem um desafio para o diagnóstico. Com o objetivo de explorar as anormalidades moleculares que ocorrem nesses tumores incomuns, Rodriguez e cols. (2009) avaliaram 58 casos através da técnica de FISH. A sobrevida média foi de 7 meses. Os glioblastomas do tipo adenoide (GBM-A) foram os mais frequente (48%), seguidos pelos glioblastomas com diferenciação epitelial verdadeira (GBM-TE) (35%) e do tipo epitelióide (GBM-E) (17%). As anormalidades citogenéticas encontradas nos GBM-A, GBM-E e GBM-TE incluem,

respectivamente, perda do cromossomo 10 (40%, 63%, 57%), polissomia do cromossomo 7 (70%, 38%, 40%), amplificação de *EGFR* (10%, 50%, 27%) e deleção de *PTEN* (10%, 25%, 29%). De modo geral, a monossomia do cromossomo 10 foi identificada em 17 casos, deleção de *PTEN* em 7, amplificação de *EGFR* em 9 e polissomia do cromossomo 7 em 16. Em suma, os tumores raros incluídos nesse estudo exibiram prognóstico pobre além de demonstrarem proporções de alterações moleculares genéticas variando um pouco dos glioblastomas convencionais.

Com o objetivo de criar uma estratificação molecular para casos de glioma de alto grau com morfologia ambígua, em que o diagnóstico de glioblastoma *versus* oligodendroglioma anaplásico é controverso, Korshunov e cols. avaliaram 114 pacientes com esse tumor em 2004. A amplificação de *EGFR* foi encontrada em 40,35% da amostra, polissomia do cromossomo 7 em 58,77%, deleção de *PTEN* em 53,50%, monossomia do cromossomo 10 em 31,57%, codeleção de 1p/19q em 12,28% e deleção isolada de 19q em 10,52%. A partir dos resultados obtidos, os autores conseguiram identificar quatro subgrupos clinicamente relevantes que demonstraram perfis moleculares e taxas de sobrevida distintos, sendo que pacientes com amplificação de *EGFR*, deleção de *PTEN* e polissomia do cromossomo 7 exibiram tempo de sobrevida mais curto. Em contrapartida, pacientes com codeleção de 1p/19q apresentaram tempo de sobrevida significativamente aumentado. Dessa forma, amplificação de *EGFR* e deleção de *PTEN* representaram variáveis prognósticas desfavoráveis e a codeleção de 1p/19q foi fortemente associada à sobrevida prolongada.

Em glioblastomas, a idade menor do que 50 anos foi identificada como uma variável prognóstica consistente. Além disso, o prognóstico desses

pacientes pode ser determinado pela complexa interação entre idade e alterações genéticas. Em 2005, Korshunov e cols. conduziram uma análise molecular de 189 glioblastomas em pacientes com menos de 50 anos de idade ("jovens adultos"), sendo que a alteração mais frequente foi a polissomia do cromossomo 7 (90%). A amplificação de *EGFR* foi observada em 60 casos (31,74%), deleção de *PTEN* em 111 (58,73%), monossomia do cromossomo 10 em 60 (31,74%), codeleção de 1p/19q em 8 (4,23%), deleção isolada de 1p em 14 (7,40%) e deleção isolada de 19q em 31 (16,40%). A amplificação do *EGFR* sempre foi acompanhada de ganho do cromossomo 7, já a deleção isolada de 19q não foi identificada em pacientes com amplificação de *EGFR*. Os autores encontraram associação significativa entre amplificação de *EGFR* e LOH 10q e correlação inversa entre ganho de cromossomo 7 e deleção de 19q. Os tumores de pacientes com idade maior ou igual a 40 anos frequentemente apresentaram amplificação de *EGFR* e deleção de *PTEN*. Em contrapartida, a vasta maioria dos pacientes com deleção isolada de 19q tinham menos de 40 anos de idade. Com base nos resultados, idade menor do que 40 anos e deleção isolada de 19q foram associadas de forma significativa a um prognóstico favorável, e amplificação de *EGFR*, polissomia do cromossomo 7 e deleção de *PTEN* foram identificadas em pacientes com menor sobrevida.

Estudo similar foi executado por Kleinschmidt-DeMasters (2006), que examinaram jovens adultos (>16 anos e ≤ 35 anos) com glioblastoma a fim de correlacionar a amplificação de *EGFR* e polissomia do cromossomo 7 com a sobrevida. De um total de 26 casos, 7 pacientes (26,92%) possuíam amplificação de *EGFR* e 20 (76,92%), polissomia do cromossomo 7. O tempo médio de sobrevida dos pacientes com amplificação foi de 61 semanas, ao passo que no

grupo sem amplificação esse tempo foi de 49 semanas. Contudo, esses resultados não apresentaram significância estatística.

Embora os gliomas astrocíticos sejam os tumores cerebrais mais comuns em crianças, os glioblastomas são extremamente raros, correspondendo a aproximadamente 3% de todas as neoplasias do sistema nervoso central na infância. Com o intuito de otimizar as estratégias terapêuticas ofertadas a pacientes pediátricos com glioblastoma, torna-se necessária uma melhor compreensão das bases celulares e moleculares relacionadas a esse tumor. Nesse sentido, Korshunov<sup>b</sup> e cols., em 2005, conduziram um estudo focado na análise molecular e correlações clinico-patológicas em uma amostra composta por 44 casos de glioblastomas em pacientes com idade inferior a 18 anos. A alteração mais frequente foi a polissomia do cromossomo 7, encontrada em 32 casos (72,72%). Outras alterações moleculares observadas, em ordem decrescente de frequência, foram: deleção de *PTEN* (27 casos; 61,36%), monossomia do cromossomo 10 (9 casos; 20,45%), deleção isolada de 1p (18 casos; 40,9%), amplificação de *EGFR* (4 casos; 9,09%), deleção isolada de 19q (2 casos, 4,54%) e codeleção de 1p/19q (1 caso; 2,27%). Através de análise de correlação, observou-se associação significativa entre ganho do cromossomo 7 e perda de 10q. Após revisão dos casos a fim de estabelecer possíveis associações entre variáveis clínicas e características moleculares, os autores não identificaram associação entre idade do paciente, sexo e localização tumoral com as alterações encontradas. O tempo de sobrevida só foi acentuadamente menor em pacientes com deleção de *PTEN*.

Estudo semelhante foi conduzido por Suri e cols. (2009), que avaliaram as alterações de *EGFR* e deleção de *PTEN* em 18 casos de glioblastoma em

indivíduos com idade igual ou inferior a 18 anos. A amplificação de *EGFR* e a deleção de *PTEN* foram identificadas em 1 caso (5,55%) cada. Esses achados sugerem que os gliomas malignos em pacientes pediátricos e glioblastomas em pacientes adultos constituem entidades distintas, o que reforça a necessidade da identificação de alvos moleculares que possam ser adotados para novas estratégias terapêuticas.

Anormalidades cromossômicas numéricas foram descritas em gliomas de alto grau e incluem ganho do cromossomo 7, perda do cromossomo 10 e perda dos cromossomos sexuais X e Y. Em 2000, Amalfitano e cols. analisaram a frequência dessas aneuploidias em uma série de 44 glioblastomas primários e 20 secundários. Além disso, investigaram se a presença dessas anormalidades pode ser utilizada para diferenciar glioblastomas primários de secundários. A trissomia do cromossomo 7 foi observada em 35 dos glioblastomas primários (79%) e 17 dos secundários (85%). Já a monossomia do cromossomo 10 foi também encontrada em 35 dos glioblastomas primários (79%) e em 14 dos secundários (70%). Os autores concluíram que essas alterações não são características de um subtipo de glioblastoma, portanto não podem ser empregadas na diferenciação de glioblastomas primários e secundários.

Com o objetivo de comparar a variação de número de cópias do cromossomo 10 em astrocitomas II e IV, Wessels e cols. (2003) investigaram 10 casos de cada tipo tumoral através da técnica de FISH. Os autores encontraram 6 dos 10 casos de astrocitoma grau IV com monossomia do cromossomo 10.

Srividya e cols. (2011) avaliaram o impacto da deleção em homozigose do gene *PTEN* em uma coorte de 73 pacientes, dos quais 31 (42,46%) exibiram tal alteração. Neste estudo, a deleção em homozigose foi associada a um pior

prognóstico, com uma média de sobrevida de 14 meses para o subgrupo com deleção enquanto o outro subgrupo exibiu uma média de sobrevida de 24 meses. A deleção foi mais frequente em pacientes com idade superior a 45 anos, sendo que a média de idade desses pacientes foi significativamente superior à dos pacientes sem a deleção.

Uma pequena fração dos glioblastomas pode apresentar áreas com diferenciação de células tumorais semelhantes a oligodendroglioma. Vários autores descrevem tais tumores como glioblastoma com componente oligodendroglial (GBMO), que pode representar o último nível de malignidade na linhagem oligodendroglial. A presença desse componente e da perda combinada de 1p e 19q em glioblastoma implica em maior sobrevida. Nagasaka e cols. (2007) analisaram o status de 1p e 19q bem como amplificação de *EGFR* em 12 casos de glioblastoma e 8 de tumores oligodendrogliais. Dois dos 12 glioblastomas foram classificados como GBMO. A codeleção de 1p/19q foi detectada em 3 dos 12 glioblastomas (25%). Em contrapartida, todos os tumores oligodendrogliais exibiram tal alteração. A amplificação de *EGFR* foi visualizada em 5 casos de glioblastoma (41,67%), incluindo os dois casos classificados como GBMO. Os resultados obtidos apontam que o GBMO pode ser um subtipo distinto de glioblastoma que possui um perfil molecular característico.

Em 2011, Klink e cols. caracterizaram as alterações genéticas encontradas em um grupo de 23 glioblastomas, dos quais 13 eram do tipo GBMO, e correlacionaram os achados morfológicos e genéticos com os dados clínicos dos pacientes. As alterações genéticas mais frequentes foram ganho do cromossomo 7 (22/23) e monossomia do cromossomo 10 (19/23), sendo que ambas as anormalidades foram identificadas de forma simultânea em 19 dos 23

casos. Ganhos de 19q (9/23) e 1q (9/23) e perdas de 17p (6/23) e 19q (6/23) também foram observadas. A sobrevida geral foi maior no grupo de pacientes com GBMO. Além disso, pacientes mais jovens (idade < 60 anos) apresentaram melhor sobrevida geral, bem como pacientes que receberam radioterapia depois da cirurgia.

Appin e cols. (2012) também investigaram as características clínicas e moleculares de uma série de 236 glioblastomas, dos quais 28 (11,9%) foram diagnosticados como GBMO. A amplificação de *EGFR* foi identificada em 6 de 26 GBMO (23%) e 59 de 161 dos outros glioblastomas. A deleção de *PTEN* foi menos frequente em GBMO, com 10 de 13 (77%) apresentando a deleção em comparação com 93 de 98 (95%) dos glioblastomas clássicos. O status de 1p e 19q só foi avaliado em GBMO, sendo que 8 casos (29,6%) apresentaram codeleção, 3 (11,1%) exibiram apenas deleção 1p e 1 (3,7%) apenas a deleção 19q. A sobrevida dos pacientes com GBMO foi superior à dos indivíduos com glioblastoma clássico. Dentro do grupo com GBMO, os pacientes cujos tumores demonstraram deleção de 1p, independentemente do status de 19q, tiveram uma vantagem significativa de sobrevida em comparação com os indivíduos com os braços cromossômicos de 1p e 19q intactos. A idade também foi um fator prognóstico significativo, com pacientes mais jovens sobrevivendo mais do que os mais velhos. Senetta e cols. (2013) identificaram 3 casos (18,7%) com codeleção de 1p19q dentre 16 GBMOs e não identificaram correlação entre essa alteração e a sobrevida geral.

Os GBMOs também foram estudados por Jiang<sup>b</sup> e cols. (2014), que avaliaram 35 casos com relação ao status de 1p19q. Desses pacientes, 12 (34,28%) apresentaram codeleção de 1p19q e 13 (37,14%), copolissomia 1p19q.

A sobrevivência dos indivíduos com codeleção 1p19q foi significativamente maior em comparação com os indivíduos sem essa alteração. Já os pacientes com copolissomia exibiram menor sobrevivência em comparação com pacientes sem essa aneuploidia.

Em 2001, Horiguchi e cols., com o objetivo de designar quantitativamente as células com deleção de *TP53* em glioblastomas primários, avaliaram o padrão de sinais CEP17 e TP53 em células individuais de uma amostra composta por 9 pacientes. Núcleos com dois sinais CEP17 e um sinal TP53 foram identificados em 1,9-27,5% dos núcleos contados. Já núcleos com as combinações de um sinal CEP17 e um sinal TP53 e dois sinais CEP17 e TP53 foram visualizados em 2,9-13,9% e 53,8-74,8%, respectivamente. Os resultados desse estudo sugerem que glioblastomas primários também apresentam subpopulações de células com deleção de *TP53*. Essa alteração, embora não seja necessariamente o evento principal, tem participação na proliferação celular de glioblastomas primários.

Necsalová e cols. (2007) avaliaram a polissomia do cromossomo 7, monossomia do cromossomo 10, amplificação de *EGFR* e deleção de *TP53* em 21 casos de glioblastoma. Além disso, investigaram as possíveis diferenças com relação à incidência nas partes central e periférica dos tumores. A monossomia do cromossomo 10 e a polissomia do cromossomo 7 foram as alterações mais frequentes, sendo identificadas em 95% e 90%, respectivamente. A amplificação de *EGFR* foi visualizada em 5 pacientes (24%) e a deleção de *TP53*, em 4 pacientes (19%). Os resultados não demonstraram diferença significativa na ocorrência desses marcadores genéticos em regiões centrais e periféricas.

Pinto e cols. (2008) avaliaram 88 glioblastomas, 24 dos quais com características oligodendrogliais, com relação ao status de 1p e 19q. Dos

glioblastomas convencionais, 4 casos demonstraram deleção de 1p e 5, deleção de 19q. Não foram identificados tumores com codeleção de 1p19q. Com relação aos glioblastomas com componente oligodendroglial, 3 exibiram deleção de 1p, 3 deleção de 19q e 1 codeleção de 1p19q. A sobrevida dos pacientes com deleções de 1p ou 19q não diferiu da sobrevida dos indivíduos sem essas alterações. Embora a frequência das deleções de 1p e 19q seja maior no grupo com componente oligodendroglial, esta diferença não foi estatisticamente significativa.

Em 2013, Clark e cols., com o objetivo de investigar se as perdas de 1p e 19q, isoladas ou associadas, apresentam impacto sobre a avaliação de glioblastomas, realizaram FISH e pesquisa de LOH por PCR em uma grande coorte composta por 491 glioblastomas. Foram identificados 28 casos com codeleção por essas técnicas, contudo apenas 1/26 exibiu codeleção por ambos os testes. Mais de 90% dos tumores com codeleção apresentaram LOH 10q e/ou amplificação de *EGFR*, alterações relacionadas de forma inversa com a codeleção total de 1p e 19q. Em 58/456 casos (12,7%) foi verificada perda isolada de 1p36 e 41/453 (9,1%) perda isolada de 19q. A presença de codeleção, bem como as perdas isoladas de 1p e 19q não tiveram impacto sobre a sobrevida dos pacientes. Os autores também sugerem que outros testes moleculares, como amplificação de *EGFR*, LOH 10q e mutação de *IDH1* podem atuar como um controle para resultados falso-positivos.

Kaneshiro e cols. (2009) realizaram a triagem de 337 glioblastomas a fim de identificar deleções de 1p19q e correlacionaram os resultados com dados clínicos e sobrevida dos pacientes. A deleção de 1p foi constatada em 17 casos (5,1%), e 18 casos (5,3%) demonstraram deleção de 19q. As deleções isoladas

de 1p e 19q não apresentaram correlação significativa com a sobrevida, contudo, ao se realizar ajuste para idade, sexo e quimioterapia, o grupo com deleção de 19q exibiu sobrevida significativamente menor em comparação com os outros grupos. Em 2014, Ideguchi e cols. avaliaram 5 glioblastomas com relação a essas alterações, mas não identificaram casos com codeleção 1p19q.

Jha e cols. (2010) conduziram um estudo a fim de avaliar a frequência de LOH 1p e 19q e sua correlação com alterações de p53 e amplificação de *EGFR* em uma série de 41 glioblastomas. A amplificação de *EGFR* foi evidenciada em 12 pacientes (29,26%). LOH de 1p e 19q, isolada ou combinada, foi mais frequentemente vista em glioblastomas p53-positivos do que em glioblastomas com amplificação de *EGFR*.

Jiang e cols. (2014) investigaram o significado clínico da polissomia dos cromossomos 1 e 19 em uma amostra de 66 glioblastomas primários. Desses, a polissomia dos cromossomos 1 e 19 foi identificada em 23 (34,9%) e 26 (39,4%), respectivamente, sendo que em 18 pacientes (27,27%) foi observada co-polissomia. A deleção de 1p e de 19q foi visualizada em 11 e 9 casos, respectivamente, com 4 casos de codeleção (6,06%). As médias de sobrevida livre de progressão e sobrevida geral foram de 10 e 16 meses, respectivamente. Os autores não identificaram potencial prognóstico em 1p, 19q ou co-polissomia.

**Tabela 1:** Estudos que avaliaram a amplificação do gene *EGFR* em amostras de glioblastomas através da técnica de FISH.

	<b>N</b>	<b>Núcleos</b>	<b>Ampl. EGFR</b>	<b>Frequência (%)</b>
Smith, 2001	111	ND	46	41,4
Okada, 2003	14	100	9	64,3
Korshunov, 2004	114	300	46	40,4
Korshunov, 2005	189	200	60	31,7
Korshunov <sup>b</sup> , 2005	44	200	4	9,1
Joensuu, 2005	47	50	30	63,8
Kleinschmidt-DeMasters, 2005	20	100	5	25
Quan, 2005	107	40	36	33,6
Kleinschmidt-DeMasters, 2006	26	100	7	26,9
Layfield, 2006	34	40	9	26,5
Nagasaka, 2007	12	200	5	41,7
Necasalová, 2007	21	100-200	5	24
Mott, 2008	129	100	45	34,9
Rodriguez, 2008	58	100	9	15,5
Gaiser, 2009	93	60	28	30,1
Suri, 2009	18	200	1	5,6
Ruano, 2009	147	ND	75	51
Coulibaly, 2010	99	200	47	47,5
Durand, 2010	11	ND	6	60
Hinkle, 2010	40	60	26	65
Jha, 2010	38	200	12	31,6
Kim, 2010	74	100	48	64,9
Lopez-Gines, 2010	35	100	22	62,9
Das, 2011	7	200	4	57,1
Hobbs, 2012	532	60	231	43,4
Kakkar, 2012	22	200	10	45,5
Little, 2012	240	100	106	44
Appin, 2013	187	200	65	34,8
Faulkner, 2014	51	30	22	43,1
Ghasimi, 2016	47	100	18	38,3

N: número total de pacientes investigados; Núcleos: total de núcleos avaliados por caso; ND: não descrito; Ampl. *EGFR*: total de casos que exibiram amplificação do gene *EGFR*.

**Tabela 2:** Estudos que avaliaram a polissomia do cromossomo 7 em amostras de glioblastomas através da técnica de FISH.

	<b>N</b>	<b>Núcleos</b>	<b>Pol. 7</b>	<b>Frequência (%)</b>
Amalfitano, 2000	64	100	52	81,3
Smith, 2001	111	ND	43	38,7
Korshunov, 2004	114	300	67	58,8
Korshunov, 2005	189	200	171	90,5
Korshunov <sup>b</sup> , 2005	44	200	32	72,7
Kleinschmidt-DeMasters, 2005	20	100	19	95
Kleinschmidt-DeMasters, 2006	38	100	20	76,9
Necesarlová, 2007	21	100-200	19	90
Mott, 2008	129	100	70	52
Rodriguez, 2008	58	100	16	27,6
Benito, 2009	40	100	34	85
Coulibaly, 2010	99	200	18	18,2
Klink, 2011	23	200	22	95,7
Kakkar, 2012	91	ND	22	24,2

N: número total de pacientes investigados; Núcleos: total de núcleos avaliados por caso; ND: não descrito; Pol. 7: total de casos que exibiram polissomia do cromossomo 7.

**Tabela 3:** Estudos que avaliaram a deleção do gene *PTEN* em amostras de glioblastomas através da técnica de FISH.

	<b>N</b>	<b>Núcleos</b>	<b>Del. <i>PTEN</i></b>	<b>Frequência (%)</b>
Smith, 2001	107	ND	48	44,9
Korshunov, 2004	114	300	61	53,4
Korshunov, 2005	189	200	111	58,7
Korshunov <sup>b</sup> , 2005	44	200	27	61,4
Mott, 2008	98	100		32,5
Rodriguez, 2008	58	100	17	29,3
Suri, 2009	18	200	1	5,55
Srividya, 2011	73	100	31	42,5
Appin, 2013	111	200	103	92,8

N: número total de pacientes investigados; Núcleos: total de núcleos avaliados por caso; ND: não descrito; Del. *PTEN*: total de casos que apresentaram deleção do gene *PTEN*.

**Tabela 4:** Estudos que avaliaram a monossomia do cromossomo 10 em amostras de glioblastomas através da técnica de FISH.

	<b>N</b>	<b>Núcleos</b>	<b>Mon. 10</b>	<b>Frequência (%)</b>
Amalfitano, 2000	64	100	49	76,6
Wessel, 2003	10	100	6	60
Korshunov, 2004	114	300	36	31,6
Korshunov, 2005	189	200	60	31,7
Korshunov <sup>b</sup> , 2005	44	200	9	20,45
Necosalová, 2007	21	100-200	20	95
Mott, 2008	120	100		22,5
Rodriguez, 2008	58	100	7	12
Benito, 2009	37	100	26	70,3
Klink, 2011	23	200	19	82,6

N: número total de pacientes investigados; Núcleos: total de núcleos avaliados por caso; ND: não descrito; Mon. 10: total de casos que apresentaram monossomia do cromossomo 10.

**Tabela 5:** Estudos que avaliaram a codeleção 1p19q em amostras de glioblastomas através da técnica de FISH.

	N	Núcleos	Del			Frequência 1p19q (%)
			1p	19q	1p19q	
Korshunov, 2004	114	300	0	12	14	12,3
Korshunov, 2005	189	200	14	31	8	4,23
Korshunov <sup>b</sup> , 2005	44	200			1	2,3
Nagasaka, 2007	12	200	4	5	3	25
Pinto, 2008	88	100	7	8	1	1,1
Reddy, 2008	4	100-250			0	0
Kaneshiro, 2009	337	40	17	18	0	0
Das, 2011	7	200			0	0
Appin, 2013	27	200	3	1	8	29,6
Clark, 2013	491	60	58	41	1	0,20
Senetta, 2013*	16	200	0	4	3	18,7
Jiang, 2014*	35	100			12	34,3
Jiang, 2014	66	100	11	9	4	6

\*Amostra composta somente por glioblastomas com componente oligodendroglial; N: número total de pacientes investigados; Núcleos: total de núcleos avaliados por caso; ND: não descrito; Del 1p: total de casos com apenas deleção de 1p; Del 19q: total de casos com apenas deleção de 19q; Del 1p19q: total de casos que apresentaram codeleção 1p19q; Frequência 1p19q (%): frequência de casos com codeleção 1p19q no total da amostra.

**Tabela 6:** Estudos que avaliaram a deleção de *TP53* em amostras de glioblastomas através da técnica de FISH.

	<b>N</b>	<b>Núcleos</b>	<b>Del. <i>TP53</i></b>	<b>Frequência (%)</b>
Necosalová, 2007	21	100-200	4	19
Klink, 2011	23	200	6	26

N: número total de pacientes investigados; Núcleos: total de núcleos avaliados por caso; Del. *TP53*: total de casos que apresentaram deleção do gene *TP53*.

### 1.3 Justificativa

A importância das anormalidades citogenéticas em pacientes portadores de neoplasias, em especial as hematológicas, é muito bem reconhecida desde os anos 1980. Estas alterações têm um significado muito importante no diagnóstico, na designação de terapia específica e no prognóstico, servindo inclusive como fatores preditores independentes da resposta ao tratamento.

Com relação aos tumores sólidos, embora muitos estudos já tenham sido conduzidos com o objetivo de esclarecer aspectos relevantes associados à patogênese e a fatores prognósticos dos GBMs, o caminho para a completa elucidação das alterações genéticas envolvidas e como elas afetam o prognóstico, bem como a resposta do paciente ao tratamento, é longo.

Deste modo, se fossem obtidos dados tumorais através de citogenética convencional e molecular, os médicos poderiam dispor de diagnósticos mais específicos, possibilitando um melhor delineamento da terapêutica a ser ofertada ao paciente.

O advento da análise citogenética molecular potencializou a caracterização de diferentes subtipos desta neoplasia, podendo vir a constituir

uma ferramenta de extrema importância na escolha da terapêutica a ser administrada ao paciente bem como na definição do prognóstico.

#### 1.4. Referências bibliográficas

Agarwala SS, Kirkwood JM. Temozolomide, a novel alkylating agent with activity in the central nervous system, may improve the treatment of advanced metastatic melanoma. *Oncologist*. 2000;5(2):144-51.

Agnihotri S, Burrell KE, Wolf A, Jalali S, Hawkins C, Rutka JT, et al. Glioblastoma, a brief review of history, molecular genetics, animal models and novel therapeutic strategies. *Arch. Immunol. Ther. Exp*. 2013;61:25-41.

Ahlbom A, Green A, Kheifets L, Savitz D, Swerdlow A. *Environ Health Perspect* 2004;112(17):1741-54.

Akhavan-Sigari R, Baf MM, Ariabod V, Rohde V, Rahighi S. Connection between Cell Phone use, p53 Gene Expression in Different Zones of Glioblastoma Multiforme and Survival Prognoses. *Rare Tumors* 2014;6(3):5350.

Amalfitano G, Chatel M, Paquis P, Michiels JF. Fluorescence in situ hybridization study of aneuploidy of chromosomes 7, 10, X, and Y in primary and secondary glioblastomas. *Cancer Genet Cytogenet*. 2000 Jan 1;116(1):6-9.

Appin CL, Gao J, Chisolm C, Torian M, Alexis D, Vincentelli C, et al. Glioblastoma with oligodendroglioma component (GBM-O): molecular genetic and clinical characteristics. *Brain Pathol*. 2013 Jul;23(4):454-61.

Bader AG, Kang S, Vogt PK. Cancer-specific mutations in PIK3CA are oncogenic in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:1475-9.

Banaszczyk M, Stoczynska-Fidelus E, Winiiecka-Klimek M, Bienkowski M, Och W, Rieske P, et al. EGFRvIII-a stable target for anti-EGFRvIII therapy. *Anticancer Res*. 2013 Dec;33(12):5343-8.

Belden CJ, Valdes PA, Ran C, Pastel DA, Harris BT, Fadul CE, et al. Genetics of glioblastoma: a window into its imaging and histopathologic variability. *Radiographics*. 2011;31(6):1717-40.

Benito R, Gil-Benso R, Quilis V, Perez M, Gregori-Romero M, Roldan P, et al. Primary glioblastomas with and without EGFR amplification: relationship to genetic alterations and clinicopathological features. *Neuropathology*. 2010 Aug;30(4):392-400.

Brandner S, von Deimling A. Diagnostic, prognostic and predictive relevance of molecular markers in gliomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2015;41(6):694-720.

Brommeland T, Rosengren L, Fridlund S, Hennig R, Isaksen V. Serum levels of glial fibrillary acidic protein correlate to tumour volume of high-grade gliomas. *Acta Neurol Scand*. 2007 Dec;116(6):380-4.

Burger PC, Pearl DK, Aldape K, Yates AJ, Scheithauer BW, Passe SM, et al. Small cell architecture--a histological equivalent of EGFR amplification in glioblastoma multiforme? *J Neuropathol Exp Neurol*. 2001 Nov;60(11):1099-104.

Cabrini G, Fabbri E, Lo Nigro C, Dehecchi MC, Gambari R. Regulation of expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase and the treatment of glioblastoma. *Int J Oncol* 2015;47(2):417-28.

Clark KH, Villano JL, Nikiforova MN, Hamilton RL, Horbinski C. 1p/19q testing has no significance in the workup of glioblastomas. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2013 Oct;39(6):706-17.

Classon M, Harlow E. The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. *Nat Rev Cancer* 2002;2:910-7.

Corle C, Makale M, Kesari S. Cell phones and glioma risk: a review of the evidence. *J Neurooncol* 2012;106:1-13.

Coulibaly B, Nanni I, Quilichini B, Gaudart J, Metellus P, Fina F, et al. Epidermal growth factor receptor in glioblastomas: correlation between gene copy number and protein expression. *Hum Pathol*. 2010 Jun;41(6):815-23.

Crespo I, Vital AL, Gonzalez-Tablas M, Patino Mdel C, Otero A, Lopes MC, et al. Molecular and Genomic Alterations in Glioblastoma Multiforme. *Am J Pathol*. 2015;185(7):1820-33.

Das P, Puri T, Jha P, Pathak P, Joshi N, Suri V, et al. A clinicopathological and molecular analysis of glioblastoma multiforme with long-term survival. *J Clin Neurosci*. 2011 Jan;18(1):66-70.

Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Disponível em <http://anatpat.unicamp.br>. Acessado em 15 de julho de 2014.

Dunn GP, Rinne ML, Wykosky J, Genovese G, Quayle SN, Dunn IF, et al. Emerging insights into the molecular and cellular basis of glioblastoma. *Genes Dev* 2012;26:756-84.

Durand KS, Guillaudeau A, Weinbreck N, DeArmas R, Robert S, Chaunavel A, et al. 1p19q LOH patterns and expression of p53 and Olig2 in gliomas: relation with histological types and prognosis. *Mod Pathol*. 2010 Apr;23(4):619-28.

Farrel CJ, Plotkin SR. Genetic causes of brain tumors: neurofibromatosis, tuberous sclerosis, von Hippel-Landau and other syndromes. *Neurol Clin* 2007;25:925-946 (VIII).

Faulkner C, Palmer A, Williams H, Wragg C, Haynes HR, White P, et al. EGFR and EGFRvIII analysis in glioblastoma as therapeutic biomarkers. *Br J Neurosurg*. 2014 Aug 20:1-7.

Felsberg J, Rapp M, Loeser S, Fimmers R, Stummer W, Goepfert M, et al. Prognostic significance of molecular markers and extent of resection in primary glioblastoma patients. *Clin Cancer Res* 2009;15:6683-93.

Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971;285(21):1182-6.

Friedman HS, Kerby T, Calvert H. Temozolomide and treatment of malignant glioma. *Clin Cancer Res*. 2000;6(7):2585-97.

Fults D, Brockmeyer D, Tullous MW, Pedone CA, Cawthon RM. p53 mutation and loss of heterozygosity on chromosomes 17 and 10 during human astrocytoma progression. *Cancer Res*. 1992 Feb 1;52(3):674-9.

Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev*. 2007;21(21):2683-710.

Gaiser T, Waha A, Moessler F, Bruckner T, Pietsch T, von Deimling A. Comparison of automated silver enhanced in situ hybridization and fluorescence in situ hybridization for evaluation of epidermal growth factor receptor status in human glioblastomas. *Mod Pathol*. 2009 Sep;22(9):1263-71

Gállego Pérez-Larraya J, Paris S, Idbaih A, Dehais C, Laigle-Donadey F, et al. Diagnostic and prognostic value of preoperative combined GFAP, IGFBP-2, and YKL-40 plasma levels in patients with glioblastoma. *Cancer*. 2014 Dec 15;120(24):3972-80.

Gera N, Yang A, Holtzman TS, Lee SX, Wong ET, Swanson KD. Tumor treating fields perturb the localization of septins and cause aberrant mitotic exit. *PLoS One*. 2015 May 26;10(5):e0125269.

Ghasimi S, Wibom C, Dahlin AM, Brännström T, Golovleva I, Andersson U, et al. Genetic risk variants in the CDKN2A/B, RTEL1 and EGFR genes are associated with somatic biomarkers in glioma. *J Neurooncol*. 2016 May;127(3):483-92.

Giladi M, Schneiderman RS, Voloshin T, Porat Y, Munster M, Blat R, et al. Mitotic Spindle Disruption by Alternating Electric Fields Leads to Improper Chromosome Segregation and Mitotic Catastrophe in Cancer Cells. *Sci Rep*. 2015 Dec 11;5:18046.

Griguer C, Cantor AB, Fathallah-Shaykh HM, Gillespie GY, Gordon AS, Markert JM, et al. Prognostic relevance of Cytochrome c Oxidase in primary Glioblastoma Multiforme. *PLoS One* 2013;8:e61035.

Grossman R, Rudek MA, Brastianos H, Zadnik P, Brem H, Tyler B, et al. The impact of bevacizumab on temozolomide concentrations in intracranial U87 gliomas. *Cancer Chemother Pharmacol* 2012;70:129-39.

Hardell L, Carlberg M. Use of mobile and cordless phones and survival of patients with glioma. *Neuroepidemiology* 2013;40(2):101-8.

Hardell L, Carlberg M. Decreased survival of glioma patients with astrocytoma grade IV (glioblastoma multiforme) associated with long-term use of mobile and cordless phones. *Int J Environ Res Public Health* 2014;11(10):10790-805.

Hinkle DA, Mullett SJ, Gabris BE, Hamilton RL. DJ-1 expression in glioblastomas shows positive correlation with p53 expression and negative correlation with epidermal growth factor receptor amplification. *Neuropathology*. 2011 Feb;31(1):29-37.

Hobbs J, Nikiforova MN, Fardo DW, Bortoluzzi S, Cieply K, Hamilton RL, et al. Paradoxical relationship between the degree of EGFR amplification and outcome in glioblastomas. *Am J Surg Pathol*. 2012 Aug;36(8):1186-93

Horiguchi H, Hirose T, Sano T, Nagahiro S. Loss of chromosome 10 in glioblastoma: relation to proliferation and angiogenesis. *Pathol Int*. 1999;49(8):681-6.

Horiguchi H, Sano T, Hirose T. TP53 deleted cells in de novo glioblastomas using fluorescence in situ hybridization. *Pathol Int*. 2001 Mar;51(3):187-92.

Hormigo A; Ding B; Rafii S. A target for antiangiogenic therapy: Vascular endothelium derived from glioblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108(11): 4271-2.

Hottinger AF, Khakoo Y. Update on the management of familial central nervous system tumor syndromes. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2007;7(3):200-7.

Hottinger AF, Pacheco P, Stupp R. Tumor treating fields: a novel treatment modality and its use in brain tumors. *Neuro Oncol*. 2016 Oct;18(10):1338-49.

Houillier C, Lejeune J, Benouaich-Amiel A, Laigle-Donadey F, Criniere E, Mokhtari K, Thillet J, Delattre JY, Hoang-Xuan K, Sanson M. 2006. Prognostic impact of molecular markers in a series of 220 primary glioblastomas. *Cancer*. 106(10):2218-23.

Ideguchi M, Kajiwara K, Goto H, Sugimoto K, Nomura S, Ikeda E, et al. MRI findings and pathological features in early-stage glioblastoma. *J Neurooncol*. 2015 Jun;123(2):289-97.

Instituto Nacional do Câncer (INCA). Estimativa 2016: Incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016>. Acessado em 19 de agosto de 2016.

James CD, Carlom E, Dumanski JP, Hansen M, Nordenskjold M, Collins VP, et al. Clonal genomic alterations glioma malignancy stages. *Cancer Res*. 1988 Oct 1;48(19):5546-51.

Jansen M, Yip S, Louis DN. Molecular pathology in adult neuro-oncology: an update on diagnostic, prognostic and predictive markers. *Lancet Neuro* 2010;9:717-26.

Jha P, Agarwal S, Pathak P, Srivastava A, Suri V, Sharma MC, et al. Heterozygosity status of 1p and 19q and its correlation with p53 protein expression and EGFR amplification in patients with astrocytic tumors: novel series from India. *Cancer Genet Cytogenet*. 2010 Apr 15;198(2):126-34.

Jiang H, Ren X, Zhang Z, Zeng W, Wang J, Lin S. Polysomy of chromosomes 1 and 19: an underestimated prognostic factor in oligodendroglial tumors. *J Neurooncol*. 2014 Oct;120(1):131-8.

Jiang<sup>b</sup> H, Zhang Z, Ren X, Zeng W, Jia W, Wang J, et al. 1p/19q-driven prognostic molecular classification for high-grade oligodendroglial tumors. *J Neurooncol*. 2014 Dec;120(3):607-14.

Joensuu H, Pupa M, Sihto H, Tynnen O, Nupponen NN. Amplification of genes encoding KIT, PDGFRalpha and VEGFR2 receptor tyrosine kinases is frequent in glioblastoma multiforme. *J Pathol*. 2005 Oct;207(2):224-31.

Jovčevska I, Kočevar N, Komel R. Glioma and glioblastoma – how much do we (not) know? *Mol Clin Oncol*. 2013 Nov;1(6):935-941.

Jung CS, Foerch C, Schänzer A, Heck A, Plate KH, Seifert V, et al. Serum GFAP is a diagnostic marker for glioblastoma multiforme. *Brain*. 2007 Dec;130(Pt 12):3336-41.

Kakkar A, Suri V, Jha P, Srivastava A, Sharma V, Pathak P, et al. Loss of heterozygosity on chromosome 10q in glioblastomas, and its association with other genetic alterations and survival in Indian patients. *Neurol India*. 2011 Mar-Apr;59(2):254-61.

Kaneshiro D, Kobayashi T, Chao ST, Suh J, Prayson RA. Chromosome 1p and 19q deletions in glioblastoma multiforme. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2009 Dec;17(6):512-6.

Karsy M, Neil JA, Guan J, Mahan MA, Colman H, Jensen RL. A practical review of prognostic correlations of molecular biomarkers in glioblastoma. *Neurosurg Focus*. 2015;38(3):E4.

Kim B, Myung JK, Seo JH, Park CK, Paek SH, Kim DG, et al. The clinicopathologic values of the molecules associated with the main pathogenesis of the glioblastoma. *J Neurol Sci*. 2010 Jul 15;294(1-2):112-8

Kirson ED, Gurvich Z, Schneiderman R, Dekel E, Itzhaki A, Wasserman Y, et al. Disruption of cancer cell replication by alternating electric fields. *Cancer Res*. 2004 May 1;64(9):3288-95.

Kirson ED, Dbalý V, Tovarys F, Vymazal J, Soustiel JF, Itzhaki A, et al. Alternating electric fields arrest cell proliferation in animal tumor models and human brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jun 12;104(24):10152-7.

Kirson ED, Giladi M, Gurvich Z, Itzhaki A, Mordechovich D, Schneiderman RS, et al. Alternating electric fields (TFields) inhibit metastatic spread of solid tumors to the lungs. *Clin Exp Metastasis*. 2009;26(7):633-40.

Kleihues P, Burger PC, Aldape KD, Brat DJ, Biernat W, Bigner DD, et al. Glioblastoma. IN: Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavanee WK, editors. WHO Classification of tumours of the central nervous system. Lyon:IARC;2007, p 33-49.

Kleihues P, Cavanee WK. World Health Organization classification of tumours of the nervous system. 2000. WHO\IARC, Lyon, France, p 29-39.

Kleinschmidt-DeMasters BK, Lillehei KO, Varella-Garcia M. Glioblastomas in the older old. Arch Pathol Lab Med. 2005 May;129(5):624-31.

Kleinschmidt-DeMasters BK, Meltesen L, McGavran L, Lillehei KO. Characterization of glioblastomas in young adults. Brain Pathol. 2006 Oct;16(4):273-86.

Klink B, Schlingelhof B, Klink M, Stout-Weider K, Patt S, Schrock E. Glioblastomas with oligodendroglial component-common origin of the different histological parts and genetic subclassification. Cell Oncol (Dordr). 2011 Jun;34(3):261-75.

Knobbe CB, Reifenberger G. Genetic alterations and aberrant expression of genes related to the phosphatidylinositol-3'-kinase/protein kinase B (Akt) signal transduction pathway in glioblastomas. Brain Pathol. 2003 Oct;13(4):507-18.

Knudsen ES, Wang JY: Targeting the RB-pathway in cancer therapy. Clin Cancer Res 2010;16:1094-9.

Korshunov A, Sycheva R, Golanov A. Molecular stratification of diagnostically challenging high-grade gliomas composed of small cells: the utility of fluorescence in situ hybridization. Clin Cancer Res. 2004 Dec 1;10(23):7820-6.

Korshunov A, Sycheva R, Golanov A. The prognostic relevance of molecular alterations in glioblastomas for patients age < 50 years. Cancer. 2005 Aug 15;104(4):825-32.

Korshunov<sup>b</sup> A, Sycheva R, Gorelyshev S, Golanov A. Clinical utility of fluorescence in situ hybridization (FISH) in nonbrainstem glioblastomas of childhood. Mod Pathol. 2005 Sep;18(9):1258-63.

Koul D: PTEN signaling pathways in glioblastoma. Cancer Biol Ther 2008, 7:1321-25.

Kumar A, Carrera AC. New functions for PI3K in the control of cell division. *Cell Cycle* 2007;6: 1696-8.

Lahkola A, Auvinen A, Raitanen J, Schoemaker MJ, Christensen HC, Feychting M, et al. Mobile phone use and risk of glioma in 5 North European countries. *Int J Cancer* 2007;120(8):1769-75.

Layfield LJ, Willmore C, Tripp S, Jones C, Jenses RL. Epidermal growth factor receptor gene amplification and protein expression in glioblastoma multiforme: prognostic significance and relationship to other prognostic factors. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2006 Mar;14(1):91-6.

Leenstra S, Bijlsma EK, Troost D, Oosting J, Westerveld A, Bosch DA, et al. Allele loss on chromosomes 10 and 17p and epidermal growth factor receptor gene amplification in human malignant astrocytoma related to prognosis. *Br J Cancer*. 1994 Oct;70(4):684-9.

Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science*. 1997 Mar 28;275(5308):1943-7.

Lin H, Bondy ML, Langford LA, Hess KR, Delclos GL, Wu X, et al. Allelic deletion analyses of MMAC/PTEN and DMBT1 loci in gliomas: relationship to prognostic significance. *Clin Cancer Res*. 1998 Oct;4(10):2447-54.

Little SE, Popov S, Jury A, Bax DA, Doey L, Al-Sarraj S, et al. Receptor tyrosine kinase genes amplified in glioblastoma exhibit a mutual exclusivity in variable proportions reflective of individual tumor heterogeneity. *Cancer Res*. 2012 Apr 1;72(7):1614-20.

Lopez-Gines C, Gil-Benso R, Ferrer-Luna R, Benito R, Serna E, Gonzalez-Darder J, et al. New pattern of EGFR amplification in glioblastoma and the relationship of gene copy number with gene expression profile. *Mod Pathol*. 2010 Jun;23(6):856-65.

Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*. 2016 Jun;131(6):803-20.

Magnani I, Ramona RF, Roversi G, Beghini A, Pfundt R, Schoenmakers EF, et al. Identification of oligodendroglioma specific chromosomal copy number

changes in the glioblastoma MI-4 cell line by array-CGH and FISH analyses. *Cancer Genet Cytogenet.* 2005;161(2):140-5.

Malmer B1, Henriksson R, Grönberg H. Familial brain tumours-genetics or environment? A nationwide cohort study of cancer risk in spouses and first-degree relatives of brain tumour patients. *Int J Cancer.* 2003 Aug 20;106(2):260-3.

Marumoto T, Saya H. Molecular biology of glioma. *Adv Exp Med Biol.* 2012;746:2-11.

McNamara M, Sahebjan S, Mason WP. Emerging biomarkers in glioblastoma. *Cancers* 2013;5:1103-19.

McNeil N, Ried T. Novel molecular cytogenetic techniques for identifying complex chromosomal rearrangements: technology and applications in molecular medicine. *Expert Rev Mol Med.* 2000;2000:1-14.

Molinari F, Frattini M. Functions and Regulation of the PTEN Gene in Colorectal Cancer. *Front Oncol* 2014;3:326.

Mollenhauer J, Wiemann S, Scheurlen W, Korn B, Hayashi Y, Wilgenbus, et al. DMBT1, a new member of the SRCR superfamily, on chromosome 10q25.3-26.1 is deleted in malignant brain tumours. *Nat Genet.* 1997 Sep;17(1):32-9.

Mott RT, Turner KC, Bigner DD, McLendon RE. Utility of EGFR and PTEN numerical aberrations in the evaluation of diffusely infiltrating astrocytomas. Laboratory investigation. *J Neurosurg.* 2008 Feb;108(2):330-5.

Nagasaka T, Gunji M, Hosokai N, Hayashi K, Ikeda H, Ito M, et al. FISH 1p/19q deletion/imbalance for molecular subclassification of glioblastoma. *Brain Tumor Pathol.* 2007;24(1):1-5.

Necasalová E, Vranová V, Kuglík P, Cejpek P, Jarosová M, Pesáková M, et al. Incidence of the main genetic markers in glioblastoma multiforme is independent of tumor topology. *Neoplasma.* 2007;54(3):212-8.

Newlands ES, Stevens MF, Wedge SR, Wheelhouse RT, Brock C. Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials. *Cancer Treat Rev.* 1997;23(1):35-61.

Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, et al. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res.* 2004;64(19):6892-9.

Ohgaki H. Genetic pathways to glioblastomas. *Neuropathology.* 2005 Mar;25(1):1-7.

Ohgaki H, Kleihues P. Epidemiology and and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol* 2005;109:93–108.

Ohgaki H, Kleihues P. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res.* 2013 Feb 15;19(4):764-72.

Okada Y, Hurwitz EE, Esposito JM, Brower MA, Nutt CL, Louis DN. Selection pressures of TP53 mutation and microenvironmental location influence epidermal growth factor receptor gene amplification in human glioblastomas. *Cancer Res.* 2003 Jan 15;63(2):413-6.

Oliva CR, Nozell SE, Diers A, McClugage SG, Sarkaria JN, Markert JM, et al. Acquisition of temozolomide chemoresistance in gliomas leads to remodeling of mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem* 2010;285:39759-67.

Omuro A, DeAngelis L. Glioblastoma and other malignant gliomas – a clinical review. *JAMA* 2013; 310(17):1842-1850.

Organização Mundial da Saúde (OMS). Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets>. Acessado em 30 de abril de 2014.

Ostrom QT, Gittleman H, Fulop J, Liu M, Blanda R, Kromer C, et al. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro Oncol* 2015;Suppl 4:iv-iv62.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005;55:74-108.

Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science.* 2008 Sep 26;321(5897):1807-12.

Pinkel D, Gray JW, Trask B, van den Engh G, Fuscoe J, van Dekken H. Cytogenetic analysis by in situ hybridization with fluorescently labeled nucleic acid probes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986;51 Pt 1:151-7.

Pinto LW, Araújo MB, Vettore AL, Wernersbach L, Leite AC, Chimelli LM, et al. Glioblastomas: correlation between oligodendroglial components, genetic abnormalities, and prognosis. *Virchows Arch*. 2008 May;452(5):481-90.

Preusser M, de Ribaupierre S, Wohrer A, Erridge SC, Hegi M, Weller M, et al. Current concepts and management of glioblastoma. *Ann Neurol*. 2011;70:9–21.

Purkait S, Mallick S, Sharma V, Kumar A, Pathak P, Jha P, et al. A simplified approach for molecular classification of glioblastomas (GBMs): experience from a tertiary care center in India. *Brain Tumor Pathol*. 2016 Jul;33(3):183-90.

Quan AL, Barnett GH, Lee SY, Vogelbaum MA, Toms SA, Staugaitis SM, et al. Epidermal growth factor receptor amplification does not have prognostic significance in patients with glioblastoma multiforme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2005 Nov 1;63(3):695-703.

Reddy KS. Assessment of 1p/19q deletions by fluorescence in situ hybridization in gliomas. *Cancer Genet Cytogenet*. 2008 Jul 15;184(2):77-86.

Rich JN, Hans C, Jones B, Iversen ES, McLendon RE, Rasheed BKA, et al. Gene expression profiling and genetic markers in glioblastoma survival. *Cancer Res* 2005;65:4051-8.

Rodriguez FJ, Scheithauer BW, Giannini C, Bryant SC, Jenkins RB. Epithelial and pseudoepithelial differentiation in glioblastoma and gliosarcoma: a comparative morphologic and molecular genetic study. *Cancer*. 2008 Nov 15;113(10):2779-89.

Ruano Y, Ribalta T, de Lope AR, Campos-Martin Y, Fiano C, Perez-Magan E, et al. Worse outcome in primary glioblastoma multiforme with concurrent epidermal growth factor receptor and p53 alteration. *Am J Clin Pathol*. 2009 Feb;131(2):257-63.

Senetta R, Verdun di Cantogno L, Chiusa L, Castellano I, Gugliotta P, Sapino A, et al. A "weighted" fluorescence in situ hybridization strengthens the favorable prognostic value of 1p/19q codeletion in pure and mixed oligodendroglial tumors. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2013 May;72(5):432-41.

Shangary S, Wang S: Small-molecule inhibitors of the MDM2-p53 protein-protein interaction to reactivate p53 function: a novel approach for cancer therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2009, 49:223-41.

Shapiro JR. Genetic alterations associated with adult diffuse astrocytic tumors. *Am J Med Genet.* 2002;30;115(3):194-201.

Shete S, Hosking FJ, Robertson LB, Dobbins SE, Sanson M, Malmer B, et al. Genome-wide association study identifies five susceptibility loci for glioma. *Nat Genet.* 2009 Aug;41(8):899-904.

Shih HA, Betensky RA, Dorfman MV, Louis DN, Loeffler JS, Batchelor TT. Genetic analyses for predictors of radiation response in glioblastoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2005 Nov 1;63(3):704-10.

Simpson JR, Horton J, Scott C, Curran WJ, Rubin P, Fischbach J, et al. Influence of location and extent of surgical resection on survival of patients with glioblastoma multiforme: results of three consecutive Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) clinical trials. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1993;26(2):239-44.

Smith JS, Tachibana I, Passe SM, Huntley BK, Borell TJ, Iturria N, et al. PTEN mutation, EGFR amplification, and outcome in patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme. *J Natl Cancer Inst.* 2001 Aug 15;93(16):1246-56.

Stancheva G, Goranova T, Laleva M, Kamenova M, Mitkova A, Velinov N, et al. IDH1/IDH2 but not TP53 mutations predict prognosis in Bulgarian glioblastoma patients. *Biomed Res Int* 2014;2014:654727.

Stumm M, Tönnies H, Wieacker PF. Molecular cytogenetic techniques for the diagnosis of chromosomal abnormalities in childhood disease. *Eur J Pediatr.* 1999;158(7):531-6.

Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolamide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005;352(10):987-96.

Suri V, Das P, Pathak P, Jain A, Sharma MC, Borkar SA, et al. Pediatric glioblastomas: a histopathological and molecular genetic study. *Neuro Oncol.* 2009 Jun;11(3):274-80.1

Srividya MR, Thota B, Shailaja BC, Arivazhagan A, Thennarasu K, Chandramouli BA, et al. Homozygous 10q23/PTEN deletion and its impact on outcome in glioblastoma: a prospective translational study on a uniformly treated cohort of adult patients. *Neuropathology.* 2011 Aug;31(4):376-83.

Tada K, Shiraishi S, Kamiryo T, Nakamura H, Hirano H, Kuratsu J, et al. Analysis of loss of heterozygosity on chromosome 10 in patients with malignant astrocytic tumors: correlation with patient age and survival. *J Neurosurg.* 2001 Oct;95(4):651-9.

Tichy J, Spechtmeyer S, Mittelbronn M, Hattingen E, Rieger J, Senft C, et al. Prospective evaluation of serum glial fibrillary acidic protein (GFAP) as a diagnostic marker for glioblastoma. *J Neurooncol.* 2016 Jan;126(2):361-9.

Templeton A, Hofer S, Topfer M, Sommacal A, Fretz C, Cerny T, et al. Extraneural spread of glioblastoma – report of two cases. *Onkologie* 2008;31:192-194.

The Cancer Genome Atlas (TCGA) Research Network: Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 2008;455:1061-8.

Urbańska K, Sokołowska J, Szmidi M, Sysa P. Glioblastoma multiforme - an overview. *Contemp Oncol (Pozn)* 2014;18(5):307-12.

Van Meier EG, Hadjipanayis CG, Norden AD, Shu HK, Wen PY, Olson JJ. Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. *CA Cancer J Clin* 2010;60(3):166-93.

Varella-Garcia M. Molecular cytogenetics in solid tumors: laboratorial tool for diagnosis, prognosis, and therapy. *Oncologist.* 2003;8(1):45-58.

Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 2010;17(1):98–110.

Volpi EV, Bridger JM. FISH glossary: an overview of the fluorescence in situ hybridization technique. *Biotechniques.* 2008;45(4):385-6.

von Deimling A, Eibl RH, Ohgaki H, Louis DN, von Ammon K, Petersen I, et al. p53 mutations are associated with 17p allelic loss in grade II and grade III astrocytoma. *Cancer Res.* 1992 May 15;52(10):2987-90.

Wager M, Menei P, Guilhot J, Levillain P, Michalak S, Bataille B, et al. Prognostic molecular markers with no impact on decision-making: the paradox of gliomas based on a prospective study. *Br J Cancer.* 2008 Jun 3;98(11):1830-8.

Wang X, Chen JX, Liu YH, You C, Mao Q. Mutant TP53 enhances the resistance of glioblastoma cells to temozolomide by up-regulating O(6)-methylguanine DNA-methyltransferase. *Neurol Sci.* 2013 Aug;34(8):1421-8.

Wang X, Chen JX, Liu JP, You C, Liu YH, Mao Q. Gain of function of mutant TP53 in glioblastoma: prognosis and response to temozolomide. *Ann Surg Oncol.* 2014 Apr;21(4):1337-44.

Wang J, Su HK, Zhao HF, Chen ZP, To SS. Progress in the application of molecular biomarkers in gliomas. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;465(1):1-4

Welte Y, Adjaye J, Lehrach HR, Regenbrecht CR. Cancer stem cells in solid tumors: elusive or illusive? *Cell Commun Signal.* 2010;8(1):6

Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med.* 2008;31;359(5):492-507.

Wessels PH, Twijnstra A, Kubat B, Ummelen MI, Claessen SM, Sciort R, et al. 10q25.3 (DMBT1) copy number changes in astrocytoma grades II and IV. *Genes Chromosomes Cancer.* 2004 Jan;39(1):22-8.

Wesolowski JR, Rajdev P, Mukherji SK. Temozolomide (Temodar). *AJNR Am J Neuroradiol.* 2010;31(8):1383-4.

Wippold FJ 2nd, Perry A. Neuropathology for the neuroradiologist: fluorescence in situ hybridization. *AJNR Am J Neuroradiol* 2007;28(3):406-10.

Wöhrer A, Waldhör T, Heinzl H, Hackl M, Feichtinger J, Gruber-Mösenbacher U, et al. The Austrian Brain Tumour Registry: a cooperative way to establish a population-based brain tumour registry. *J Neurooncol* 2009;95:401–411.

## 2. Objetivos

Face à oportunidade de investigar alterações citogenéticas moleculares em uma amostra de pacientes adultos com diagnóstico de glioblastoma, os objetivos específicos do presente estudo foram:

1. Determinar a frequência das aneuploidias dos cromossomos 7 e 10, amplificação do gene *EGFR*, deleção dos genes *PTEN* e *TP53* e deficiência de 1p/19q em uma amostra de glioblastomas em pacientes adultos identificados através da técnica de FISH.
2. Correlacionar essas anormalidades citogenéticas moleculares com o prognóstico dos pacientes

**Frequency and clinical significance of chromosome 7 and 10 aneuploidies, amplification of *EGFR* gene, deletion of *PTEN* and *TP53* genes, and 1p/19q deficiency in a sample of adult patients diagnosed with glioblastoma from Southern Brazil**

Dayane B. Koshiyama<sup>1</sup>, Patrícia Trevisan<sup>1</sup>, Carla Graziadio<sup>2</sup>, Rafael F. M. Rosa<sup>1,2,3</sup>, Bibiana Cunegatto<sup>4</sup>, Juliete Scholl<sup>4</sup>, Valentina O. Provenzi<sup>5</sup>, Alexandre P. de Sá<sup>6</sup>, Fabiano P. Soares<sup>7</sup>, Maíra C. Velho<sup>7</sup>, Nelson de A. P. Filho<sup>7</sup>, Ceres A. Oliveira<sup>8</sup>, Paulo R. G. Zen<sup>1,2,3</sup>.

<sup>1</sup> Graduate Program in Pathology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>2</sup> Clinical Genetics, UFCSPA and Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre (CHSCPA), Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>3</sup> Graduate Program in Biosciences, UFCSPA, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>4</sup> Graduation in Biomedicine, UFCSPA, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>5</sup> Department of Pathology, Grupo Hospitalar Conceição (GHC), Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>6</sup> Graduation in Medicine, UFCSPA, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>7</sup> Department of Neurosurgery, Hospital Beneficência Portuguesa, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>8</sup> Institute of Education and Research, Hospital Moinhos de Vento, RS, Brazil.

**Short title:** Glioblastoma and Cytogenetic Markers in Southern Brazil.

Enviado para publicação na revista "Journal of Neuro-Oncology"

## Abstract

Glioblastoma stands out as the most frequent central nervous system neoplasia, presenting a poor prognosis. The aim of this study was to verify the frequency and clinical significance of the aneuploidy of chromosomes 7 and 10, *EGFR* amplification, *PTEN* and *TP53* deletions, and 1p/19q deficiency in adult patients diagnosed with glioblastoma. The sample consisted of 40 patients treated from November 2011 to March 2015 at two major Neurosurgery Services from Southern Brazil. Molecular cytogenetic analyses of the tumor were performed through fluorescent in situ hybridization (FISH). The clinical features evaluated consisted of age, sex, tumor location, clinical symptoms, family history of cancer, type of resection and survival. The mean age of the patients was 59.3 years (ranged from 41 to 83). Most of them were males (70%). The median survival was 145 days. Chromosome 10 monosomy was detected in 52.5% of the patients, chromosome 7 polysomy in 50%, *EGFR* amplification in 42.5%, *PTEN* deletion in 35%, *TP53* deletion in 22.5%, 1p deletion in 5% and 19q deletion in 7.5%. Age was shown to be a prognostic factor, and patients with lower age presented higher survival ( $p=0.042$ ). *TP53* and *PTEN* deletions had a negative impact on survival ( $p=0.011$  and  $p=0.037$ , respectively). Our data suggest that *TP53* and *PTEN* deletions may be associated to a poorer prognosis. These findings may have importance over prognosis determination and choice of the therapy to be administered.

**Keywords:** Glioblastoma, FISH, *EGFR*, *PTEN*, *TP53*, 1p19q codeletion, survival.

## Introduction

Glioblastoma is the most common and more lethal central nervous system (CNS) tumor [1]. It occurs in glial cells, more specifically in astrocytes, and it is an extremely heterogeneous entity, presenting a predominance of poorly differentiated, pleomorphic, fusiform or rounded cells [2, 3]. Glioblastoma has an annual incidence of 3-5 cases/100,000 individuals and, despite the different therapeutic modalities available, such as neurosurgery, chemotherapy and radiotherapy, its prognosis remains poor, with a median survival of 15 months [4]. In USA the estimative for 2015 and 2016 was respectively 11890 and 12120 new glioblastoma cases [5].

In the past years, several cytogenetic and molecular changes, which may contribute to the diagnosis as well as the assessment of prognosis and response to treatment, have been identified. This diversity should be considered in the design of the therapy to be offered to patients, thus selecting more specific treatments for a particular pattern of tumor genetic alterations [6]. This is already done in some types of tumors, such as some kind of leukemias, where cytogenetic changes have even been part of clinical treatment protocols for many years [7].

Thus, our aim was to verify the frequency and clinical significance of aneuploidies of chromosomes 7 and 10, *EGFR* amplification, *PTEN* and *TP53* genes deletion, and 1p/19q deficiency in a sample of adult patients with glioblastoma.

## **Materials and Methods**

### **Sample**

The sample consisted of 40 patients diagnosed with glioblastoma treated at Neurosurgery Service of the Beneficência Portuguesa Hospital and at Neurosurgery Service of the Hospital Cristo Redentor/Grupo Hospitalar Conceição (GHC) during the period from November 2011 to March 2015. Two pathologists evaluated the cases and confirmed the diagnosis of glioblastoma following the WHO criteria (2007) [3]. For each patient a research protocol was filled out, containing clinical information and results of complementary tests. These included data such as age, sex, tumor location, clinical symptoms, family history of cancer, type of resection and survival.

For purposes of statistical analysis, patients were subdivided into two age groups (patients > 50 years and <50 years) [8]. The anatomical location was defined as "frontal," "parietal," "temporal," or "other" and the extent of resection was classified as "subtotal" (10% to 90% resected) or "total" (more than 90% resected) [9]. We classified the clinical symptoms in five distinct groups: focal disturbance, decreased consciousness, intracranial hypertension (including headache, nausea and vomits), behavioral changes and seizures.

### **Cytogenetic Molecular Analysis**

The molecular cytogenetic analysis was performed through fluorescence in situ hybridization (FISH) technique. For this, sections of 4  $\mu$ m of the paraffin blocks from each case were used, using the LSI EGFR/CEP 7, LSI PTEN/CEP 10, LSI 1p36/LSI 1q25 & LSI 19q13/19p13 Dual C and LSI p53 probes -

17p13.1 & CEP17 (Vysis, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). For each probe, the manufacturer protocol was followed. Only samples with > 90% of the nuclei with signals were evaluated. For each case, 200 intact interphase nuclei were analyzed for the presence of the respective hybridization signals of the used probes.

For results interpretation, the following criteria were adopted: *EGFR* amplification when more than 10% of the nuclei exhibited  $EGFR/CEP7 > 2$ ; polysomy of chromosome 7 when more than 20% of the nuclei showed 3 or more signals for CEP7, and monosomy of chromosome 10 when only one CEP10 signal was found in > 50% of the nuclei [10]. Deletions of the *PTEN* gene were reckoned when  $PTEN/CEP10 < 0.8$  [11]. The codeletion of 1p/19q was considered when  $1p36/1q25$  and  $19q13/19p13$  was  $< 0.86$  [12], and *TP53* deletion when at least 8% of the nuclei exhibited one red signal and  $\geq 2$  green signals [2].

### **Statistical analysis**

The quantitative variables were described in the form of mean and standard deviation, and the categorical variables, through absolute and relative frequencies. For categorical data, Chi Square test with Yates correction and Fisher's exact test were used. To evaluate survival, Kaplan-Meier method was applied and the curves were compared with the use of the log-rank test. The effect measure used was the *Hazard Ratio* (HR) in conjunction with a confidence interval of 95%. The significance level adopted was 5% ( $p < 0.05$ ) and analyzes were performed in the SPSS program version 21.0.

## Results

Detailed clinical and cytogenetic findings of the patients are presented in Table 1. The mean age of the 40 patients was 59.3 years, ranging from 41 to 83 years. Eight individuals (20%) were younger than 50 years old at the time of diagnosis. Most of them were males (70%). Three tumors had previous central nervous system tumors (7.5%).

The main first clinical symptom presented by the patients was intracranial hypertension (n=25 - 62.5%), being the headache described in 55%. Focal disturbances and seizures were reported respectively in 42.5% and 12.5% of the cases. Seven patients (17.5%) had relatives with cancer history, including 2 cases (5%) of CNS tumors. In 27 patients (67.5%), the tumor affected the right cerebral hemisphere, and the frontal and parietal regions were the most affected (30% and 25% of the cases, respectively). From 36 cases in which the type of surgery was known, the tumor resection was total in 19 patients (47.5%) and subtotal in 17 (42.5%) (Table 1). The median survival time was 145 days (128–162.1). At end of the study, only three patients (7.5%) were still alive.

There was no statistically significant association between the variables gender, tumor location, clinical symptoms, presence of seizures at diagnosis, extent of tumor resection, and patient survival. However, age evaluated in a continuously manner was a prognostic factor, and patients with lower age presented a higher survival (HR=1.04; CI 95%:1.00–1.08; p=0.042). There was a 4% increase in risk of death for each year of life.

From the cytogenetic point of view, the most frequent alterations were monosomy of chromosome 10 (52.5%), polysomy of chromosome 7 (50%), *EGFR* amplification (42.5%) and *PTEN* deletion (35%). In 14 cases (35%), the first two changes (chromosome 10 monosomy and chromosome 7 polysomy) were identified in association (Table 1).

In 76.5% of cases with *EGFR* amplification, this change was visualized in association with chromosome 7 polysomy. All cases with *EGFR* amplification also exhibited alterations in chromosome 10: 15 cases (88.2%) with monosomy of chromosome 10 and 7 cases (41.2%) with *PTEN* deletion (Table 1).

*TP53* deletion was observed in 9 patients (22.5%). The distribution of *TP53* deletions verified in our sample ranged from 8.5% to 25% (mean 14.4%). Two cases with *TP53* deletion also presented *EGFR* amplification. In addition, 2 cases (5%) with 1p deletion and 3 cases (7.5%) with 19q deletion were identified. We did not detect cases with 1p/19q codeletion (Table 1).

Patients with chromosome 7 polysomy were older ( $p=0.016$ ) and tumors with *TP53* deletion were more frequently centered in the temporal lobe ( $p=0.029$ ). We did not verify an association between survival with *EGFR* amplification, chromosome 7 polysomy, chromosome 10 monosomy and 1p/19q codeletion. Nevertheless, deletions of *TP53* ( $p=0.011$ ) and *PTEN* ( $p=0.037$ ) had a negative impact on survival (Figure 1).

## Discussion

According to our literature review, this is the first study with Brazilian patients diagnosed with glioblastoma that investigated the association between

aneuploidies of chromosomes 7 and 10, amplification of the *EGFR* gene, *PTEN* and *TP53* deletions with its clinical status and prognosis. It is noteworthy that there is a scarcity of studies in general involving patients with glioblastoma and FISH analysis not only in Brazil but also in whole Latin America. Pinto et al. (2008) [12] investigated 1p and/or 19q losses in a series of 88 Brazilian patients presenting glioblastoma with oligodendroglial component. We also did not find similar studies in Portuguese and African literature.

Glioblastomas can affect individuals of all age groups, yet it is a rare tumor in children, comprising approximately 2.9% of all brain tumors diagnosed in individuals aged 0-19 years old [5]. It has a higher incidence in individuals aged 45-75 years, with a mean age at diagnosis of 64 years old [1, 5], similar to that observed in our study (59.3 years). We observed an association between lower age at diagnosis and longer survival, what is in agreement with the literature [10, 13, 14].

In our study, most of the individuals were males, which is also in accordance with the literature data (male/female ratio=1.6:1) [5]. Approximately 5% of patients with malignant gliomas present a family history of this neoplasm. When present, it is associated with a two-fold increased risk of developing the disease. This may be related to rare genetic syndromes, such as neurofibromatosis type 1 and 2 and Li-Fraumeni syndrome [15]. However, in our sample, we did not find patients who filled the clinical criteria for them. First-degree relatives of patients with glioma present a two-fold increased risk of developing the same tumor type, indicating a possible genetic predisposition to the onset of these tumors [16]. In our study, 5% of the cases had a history of tumor occurrence in first-degree relatives.

The initial clinical presentation of glioblastomas is extremely variable, but mainly depends on their location and size. Headache is the most frequent, being present in 50% of patients at time of diagnosis [4]. In our cohort, it was also the first most common clinical symptom, being observed in 22 patients (55%). Toledo et al. (2015) [17] described that the occurrence of seizures as one of the first symptoms would be correlated with a better survival, since they could be associated with a reduction in tumor aggressiveness. We also believe that the presence of this finding could draw more attention for an earlier diagnosis of the glioblastoma. In our cohort, we observed that patients with seizures only tended to present a higher survival ( $p=0.079$ ). Perhaps, with an increase in our sample, such difference could be really proven.

The use of molecular and cytogenetic techniques has enabled the identification of several genetic alterations in brain tumors, which may contribute to the diagnosis as well as the assessment of prognosis and response to therapy [6]. The expression of *MGMT* gene, for example, is a positive predictive marker for newly diagnosed glioma response to the action of alkylating agents [18]. A favorable association has also been described between *IDH1/2* and *ATRX* mutations status and survival [19,20]. The 2016 WHO incorporated molecular parameters, such as *IDH* mutations, for the classification of tumors of the central nervous system in order to group tumors with the same prognostic markers, thus guiding the treatment of biologically similar entities [21].

Amplification of the *EGFR* gene is a common event in glioblastomas. However, data from different studies have showed that there is a great variability in the frequency of this alteration [13, 22, 23]. This discrepancy can be attributed to tumor heterogeneity, since not all cells show this amplification

[24]. Okada et al. (2003) [22] identified that cells with a high level of amplification were located mainly at the edges of the tumor, suggesting that *EGFR* overexpression may be related to tumor invasion. Although it is usual to analyze different quadrants of the slide in order to minimize the loss of areas with amplification, it is still possible that there are regions that may have escaped to the detection.

In our study, *EGFR* amplification was observed in 17 cases (42.5%), being associated with chromosome 7 polysomy in 76.5% of them. Several studies have shown that this combination is a frequent event in glioblastomas [10, 25, 26]. In our cohort, patients with chromosome 7 polysomy were older ( $p=0.016$ ), which is in accordance with other reports [8].

Similarly to other studies [11, 23, 25-28], the presence of alterations in chromosome 7 did not have an impact on the overall survival of the patients included in our study. Paradoxically, some authors report that these changes could be correlated with a worse prognosis [8, 10, 13]. Some studies have even observed an improved survival [26]. Although Kleinschmidt-DeMasters et al. (2005) [30] have identified the presence of *EGFR* amplification as a significant predictor of survival time in individuals over 75 years of age such findings were not evidenced in our sample.

*EGFR* mutations/amplifications have usually been detected associated with monosomy of chromosome 10 [2, 31]. Similarly, in our cohort all cases with *EGFR* amplification exhibited alteration on chromosome 10, from which 15 (88.2%) consisted of chromosome 10 monosomy.

Losses of chromosome 10 are the most common genetic alterations in glioblastoma, and can be identified in up to 60-80% of the cases [32]. In our cohort, they were also frequent, being visualized in 70% of the patients. Chromosome 10 monosomy was identified in 52.5%. However, in an analysis of published studies, there is a great variability in the frequency of this alteration. The frequency observed in our sample is within the expected range from 31.4% to 82.6% [8, 10, 11, 25].

Although most cases present loss of an entire copy of chromosome 10, partial deletions of the gene may also occur and are considered a common finding [33]. The frequency of *PTEN* deletion ranges from 29.3% to 92.8% in glioblastomas [8, 10, 11, 29, 34], and the frequency of this alteration in our sample was 40%. Some authors have described that losses of the long arm of chromosome 10 could be associated with a worse prognosis [8, 35], in similarity with us. In contrast, other studies do not corroborate these findings [11, 36]. On the other hand, Korshunov et al. (2005) [10] demonstrated that losses of 10q are only clinically important in patients >40 years of age. Despite these reports, we did not know how the mutations in the *PTEN* not detected by FISH analysis may contribute for the results verified in our study. Gene mutations have been described in 24.9% to 51.2% of the glioblastomas [37, 38].

Mutation or loss of *TP53* appears to be one of the most important genetic alteration in glioblastomas, with direct impact on their genesis [2]. Few studies have evaluated the deletion of *TP53* through FISH [2, 14, 39]. In our sample, *TP53* deletion was visualized in 9 patients (22.5%), an index similar to that described in other studies [2, 14]. It was noteworthy that tumors with *TP53* deletion were more frequently centered in the temporal lobe.

Two cases with *TP53* deletion of our sample also exhibited *EGFR* amplification. Although studies have indicated that in the majority of tumors this event presents a mutually exclusive pattern [40], concomitant alterations of *EGFR* and *TP53* have been reported [2, 14, 41]. Okada et al. (2003) [22] identified isolated cells with *EGFR* amplification in different regions of glioblastomas with *TP53* mutation, which demonstrates that amplification of this gene at cellular level may be a frequent event. The authors suggest that genomic instability due to inactivation of p53 may promote gene amplification. According to Ruano et al. (2009) [41], the simultaneous deregulation of these two pathways may indicate a relevant deregulation of the cell cycle that results in the formation of a more aggressive tumor.

In our sample, patients with *TP53* deletion exhibited a significantly worse prognosis. Although studies have pointed out that *TP53* alterations have a limited impact on prognosis [2, 14, 42-44], some authors have found that there is an association between them and a worse prognosis [45], besides a loss of response to temozolamide [46, 47]. On the other hand, Tada et al. (1998) [48] described *TP53* mutation as a marker of better response to radiotherapy, which could imply a significantly longer survival. Shih et al. (2005) [45] failed to reproduce these findings, and only evidenced the prognostic value of the *TP53* mutation in patients aged  $\geq 57$  years, who showed a reduced survival. Momota et al. (2010) [49] observed that *TP53* mutations are frequent events in diffuse or multiple lesion malignant astrocytomas, suggesting that *TP53* abnormalities may affect the aggressive and invasive nature of these tumors. Despite these different outcomes, we did not know how other mutations in the *TP53* not detected by FISH analysis and not evaluated in our study might influence the

observed results. The frequency of gene mutations of the *TP53* ranges from 18.8% to 43% [22, 45].

In our study, two patients with *TP53* deletion also presented monosomy of chromosome 10. Leenstra et al. (1994) [50] demonstrated that these patients with high-grade astrocytomas had a shorter survival (median 3 months) when compared to patients with only loss of 17p (median 17 months). In our cohort, however, these patients did not have a shorter survival ( $P=0.344$ ).

In conventional glioblastomas, although 1p/19q codeletion is an uncommon event, identified in 0-25% of the cases, isolated losses of 1p or 19q are frequent (40% and 30%, respectively) [8, 10, 12, 51-53]. In our study, cases with 1p/19q codeletion were not identified, but there were 2 cases (5%) with isolated 1p deletion and 3 (7.5%) with isolated deletion of 19q. In 2013, Clark et al. (2013) [53], with the objective of investigating whether the losses of 1p and 19q could have an impact on the evaluation of glioblastomas, investigated a large cohort of 491 patients. Only one case of codeletion was identified. The presence of codeletion as well as the isolated losses of 1p and 19q had no impact on patient survival.

The results of the present study suggest that some cytogenetic markers, alone or together, may be related to some clinical findings and present a potential role in the prognostic of patients with glioblastoma. Our data suggest that especially *TP53* and *PTEN* deletions might have a negative impact on prognosis. Further studies with larger samples will be important to clarify the role of these alterations in the patients survival.

## **Compliance with Ethical Standards**

### **Conflict of interest**

The authors declare that they have no conflict of interest.

### **Ethical approval**

This study was approved by the Ethics in Research Committee of the Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) – number 881/09.

## **References**

- [1] Wen PY, Kesari S (2008) Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med.* 359(5):492-507.
- [2] Necesalová E, Vranová V, Kuglík P, Cejpek P, Jarosová M, Pesáková M, Relichová J, Veselská R (2007) Incidence of the main genetic markers in glioblastoma multiforme is independent of tumor topology. *Neoplasma.* 54(3):212-8.
- [3] Kleihues P, Burger PC, Aldape KD, Brat DJ, Biernat W, Bigner DD, Nakazato Y, Plate KH, Giangaspero F, von Deimling A, Ohgaki H, Cavenee WK. (2007) Glioblastoma. IN: Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, editors. *WHO Classification of tumours of the central nervous system.* Lyon:IARC p 33-49.
- [4] Preusser M, de Ribaupierre S, Wohrer A, Erridge SC, Hegi M, Weller M, Stupp R (2011) Current concepts and management of glioblastoma. *Ann Neurol.* 70:9–21.
- [5] Ostrom QT, Gittleman H, Fulop J, Liu M, Blanda R, Kromer C, Wolinsky Y, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS (2015) CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro Oncol Suppl* 4:iv1-iv62.

[6] Hassler M, Seidl S, Fazeny-Doerner B, Preusser M, Hainfellner J, Rössler K, Prayer D, Marosi C (2006) Diversity of cytogenetic and pathohistologic profiles in glioblastoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 166(1):46-55.

[7] Medinger M, Lengerke C, Passweg J (2016) Novel Prognostic and Therapeutic Mutations in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Genomics Proteomics.* 13(5):317-29.

[8] Korshunov A, Sycheva R, Golanov A (2004) Molecular stratification of diagnostically challenging high-grade gliomas composed of small cells: the utility of fluorescence in situ hybridization. *Clin Cancer Res.* 10(23):7820-6.

[9] Lamborn KR, Chang SM, Prados MD (2004) Prognostic factors for survival of patients with glioblastoma: recursive partitioning analysis. *Neuro Oncol.* 6(3):227-35.

[10] Korshunov A, Sycheva R, Golanov A (2005) The prognostic relevance of molecular alterations in glioblastomas for patients age < 50 years. *Cancer.* 104(4):825-32.

[11] Rodriguez FJ, Scheithauer BW, Giannini C, Bryant SC, Jenkins RB (2008) Epithelial and pseudoepithelial differentiation in glioblastoma and gliosarcoma: a comparative morphologic and molecular genetic study. *Cancer.* 113(10):2779-89.

[12] Pinto LW, Araújo MB, Vettore AL, Wernersbach L, Leite AC, Chimelli LM, Soares FA (2008) Glioblastomas: correlation between oligodendroglial components, genetic abnormalities, and prognosis. *Virchows Arch.* 452(5):481-90.

[13] Kim B, Myung JK, Seo JH, Park CK, Paek SH, Kim DG, Jung HW, Park SH (2010) The clinicopathologic values of the molecules associated with the main pathogenesis of the glioblastoma. *J Neurol Sci.* 294(1-2):112-8.

[14] Klink B, Schlingelhof B, Klink M, Stout-Weider K, Patt S, Schrock E (2011) Glioblastomas with oligodendroglial component-common origin of the different histological parts and genetic subclassification. *Cell Oncol (Dordr).* 34(3):261-75.

[15] Farrel CJ, Plotkin SR (2007) Genetic causes of brain tumors: neurofibromatosis, tuberous sclerosis, von Hippel-Landau and other syndromes. *Neurol Clin* 25:925-946 (VIII).

[16] Malmer B, Henriksson R, Grönberg H (2003) Familial brain tumours-genetics or environment? A nationwide cohort study of cancer risk in spouses and first-degree relatives of brain tumour patients. *Int J Cancer*. 106(2):260-3.

[17] Toledo M, Sarria-Estrada S, Quintana M, Maldonado X, Martinez-Ricarte F, Rodon J, Auger C, Salas-Puig J, Santamarina E, Martinez-Saez E (2015) Prognostic implications of epilepsy in glioblastomas. *Clin Neurol Neurosurg* 166-71.

[18] Wang J, Su HK, Zhao HF, Chen ZP, To SS (2015) Progress in the application of molecular biomarkers in gliomas. *Biochem Biophys Res Commun*. 465(1):1-4.

[19] Jansen M, Yip S, Louis DN (2010) Molecular pathology in adult neuro-oncology: an update on diagnostic, prognostic and predictive markers. *Lancet Neuro* 9:717-26.

[20] Mur P, Mollejo M, Hernández-Iglesias T, de Lope ÁR, Castresana JS, García JF, Fiaño C, Ribalta T, Rey JA, Meléndez B (2015) Molecular classification defines 4 prognostically distinct glioma groups irrespective of diagnosis and grade. *J Neuropathol Exp Neurol*. 74(3):241-9.

[21] Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW (2016) The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary 131(6):803-20.

[22] Okada Y, Hurwitz EE, Esposito JM, Brower MA, Nutt CL, Louis DN (2003) Selection pressures of TP53 mutation and microenvironmental location influence epidermal growth factor receptor gene amplification in human glioblastomas. *Cancer Res*. 63(2):413-6.

[23] Faulkner C, Palmer A, Williams H, Wragg C, Haynes HR, White P, DeSouza RM, Williams M, Hopkins K, Kurian KM (2014) EGFR and EGFRvIII analysis in glioblastoma as therapeutic biomarkers. *Br J Neurosurg*. 20:1-7.

- [24] Little SE, Popov S, Jury A, Bax DA, Doey L, Al-Sarraj S, Jurgensmeier JM, Jones C (2012) Receptor tyrosine kinase genes amplified in glioblastoma exhibit a mutual exclusivity in variable proportions reflective of individual tumor heterogeneity. *Cancer Res.* 72(7):1614-20.
- [25] Benito R, Gil-Benso R, Quilis V, Perez M, Gregori-Romero M, Roldan P, Gonzalez-Darder J, Cerdá-Nicolas M, Lopez-Gines C (2010) Primary glioblastomas with and without EGFR amplification: relationship to genetic alterations and clinicopathological features. *Neuropathology* 30(4):392-400.
- [26] Lopez-Gines C, Gil-Benso R, Ferrer-Luna R, Benito R, Serna E, Gonzalez-Darder J, Quilis V, Monleon D, Celda B, Cerdá-Nicolas M (2010) New pattern of EGFR amplification in glioblastoma and the relationship of gene copy number with gene expression profile. *Mod Pathol.* 23(6):856-65.
- [27] Joensuu H, Pupa M, Sihto H, Tynninen O, Nupponen NN (2005) Amplification of genes encoding KIT, PDGFR $\alpha$  and VEGFR2 receptor tyrosine kinases is frequent in glioblastoma multiforme. *J Pathol.* 207(2):224-31.
- [28] Quan AL, Barnett GH, Lee SY, Vogelbaum MA, Toms SA, Staugaitis SM, Prayson RA, Peereboom DM, Stevens GH, Cohen BH, Suh JH (2005) Epidermal growth factor receptor amplification does not have prognostic significance in patients with glioblastoma multiforme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 63(3):695-703.
- [29] Smith JS, Tachibana I, Passe SM, Huntley BK, Borell TJ, Iturria N, O'Fallon JR, Schaefer PL, Scheithauer BW, James CD, Buckner JC, Jenkins RB (2001) PTEN mutation, EGFR amplification, and outcome in patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme. *J Natl Cancer Inst.* 93(16):1246-56.
- [30] Kleinschmidt-DeMasters BK, Lillehei KO, Varella-Garcia M (2005) Glioblastomas in the older old. *Arch Pathol Lab Med.* 129(5):624-31.
- [31] Horiguchi H, Hirose T, Sano T, Nagahiro S (1999) Loss of chromosome 10 in glioblastoma: relation to proliferation and angiogenesis. *Pathol Int.* 49(8):681-6.
- [32] Ohgaki H (2005) Genetic pathways to glioblastomas. *Neuropathology.* 25(1):1-7.

[33] James CD, Carlom E, Dumanski JP, Hansen M, Nordenskjold M, Collins VP, Cavenee WK (1988) Clonal genomic alterations glioma malignancy stages. *Cancer Res.* 48(19):5546-51.

[34] Appin CL, Gao J, Chisolm C, Torian M, Alexis D, Vincentelli C, Schniederjan MJ, Hadjipanayis C, Olson JJ, Hunter S, Hao C, Brat DJ (2013) Glioblastoma with oligodendroglioma component (GBM-O): molecular genetic and clinical characteristics. *Brain Pathol* 23(4):454-61.

[35] Kakkar A, Suri V, Jha P, Srivastava A, Sharma V, Pathak P, Sharma MC, Sharma MS, Kale SS, Chosdol K, Phalak M, Sarkar C (2011) Loss of heterozygosity on chromosome 10q in glioblastomas, and its association with other genetic alterations and survival in Indian patients. *Neurol India.* 59(2):254-61.

[36] Houillier C, Lejeune J, Benouaich-Amiel A, Laigle-Donadey F, Criniere E, Mokhtari K, Thillet J, Delattre JY, Hoang-Xuan K, Sanson M (2006) Prognostic impact of molecular markers in a series of 220 primary glioblastomas. *Cancer.* 106(10):2218-23.

[37] Koul D (2008) PTEN signaling pathways in glioblastoma. *Cancer Biol Ther.* 7(9):1321-5

[38] Xu J, Li Z, Wang J, Chen H, Fang JY (2014) Combined PTEN Mutation and Protein Expression Associate with Overall and Disease-Free Survival of Glioblastoma Patients. *Transl Oncol.* 7(2):196-205.e1.

[39] Horiguchi H, Sano T, Hirose T (2001) TP53 deleted cells in de novo glioblastomas using fluorescence in situ hybridization. *Pathol Int.* 51(3):187-92.

[40] von Deimling A, von Ammon K, Schoenfeld D, Wiestler OD, Seizinger BR, Louis DN (1993) Subsets of glioblastoma multiforme defined by molecular genetic analysis. *Brain Pathol.* 3(1):19-26.

[41] Ruano Y, Ribalta T, de Lope AR, Campos-Martin Y, Fiano C, Perez-Magan E, Hernández-Moneo JL, Mollejo M, Meléndez B (2009) Worse outcome in primary glioblastoma multiforme with concurrent epidermal growth factor receptor and p53 alteration. *Am J Clin Pathol.* 131(2):257-63.

[42] Rich JN, Hans C, Jones B, Iversen ES, McLendon RE, Rasheed BKA, Dobra A, Dressman HK, Bigner DD, Nevins JR, West M (2005) Gene

expression profiling and genetic markers in glioblastoma survival. *Cancer Res* 65:4051-8.

[43] Felsberg J, Rapp M, Loeser S, Fimmers R, Stummer W, Goepfert M, Steiger HJ, Friedensdorf B, Reifenberger G, Sabel MC (2009) Prognostic significance of molecular markers and extent of resection in primary glioblastoma patients. *Clin Cancer Res* 15:6683-93.

[44] Stancheva G, Goranova T, Laleva M, Kamenova M, Mitkova A, Velinov N, Poptodorov G, Mitev V, Kaneva R, Gabrovsky N (2014) IDH1/IDH2 but not TP53 mutations predict prognosis in Bulgarian glioblastoma patients. *Biomed Res Int* 2014:654727.

[45] Shih HA, Betensky RA, Dorfman MV, Louis DN, Loeffler JS, Batchelor TT (2005) Genetic analyses for predictors of radiation response in glioblastoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 63(3):704-10.

[46] Wang X, Chen JX, Liu JP, You C, Liu YH, Mao Q (2014) Gain of function of mutant TP53 in glioblastoma: prognosis and response to temozolomide. *Ann Surg Oncol.* 21(4):1337-44.

[47] Wang X, Chen JX, Liu YH, You C, Mao Q (2013) Mutant TP53 enhances the resistance of glioblastoma cells to temozolomide by up-regulating O(6)-methylguanine DNA-methyltransferase. *Neurol Sci.* 34(8):1421-8.

[48] Tada M, Matsumoto R, Iggo RD, Onimaru R, Shirato H, Sawamura Y, Shinohe Y (1998) Selective sensitivity to radiation of cerebral glioblastomas harboring p53 mutations. *Cancer Res.* 58(9):1793-7.

[49] Momota H, Narita Y, Matsushita Y, Miyakita Y, Shibui S (2010) p53 abnormality and tumor invasion in patients with malignant astrocytoma. *Brain Tumor Pathol.* 27(2):95-101.

[50] Leenstra S, Bijlsma EK, Troost D, Oosting J, Westerveld A, Bosch DA, Hulsebos TJ (1994) Allele loss on chromosomes 10 and 17p and epidermal growth factor receptor gene amplification in human malignant astrocytoma related to prognosis. *Br J Cancer.* 70(4):684-9.

[51] Nagasaka T, Gunji M, Hosokai N, Hayashi K, Ikeda H, Ito M, Inao S (2007) FISH 1p/19q deletion/imbalance for molecular subclassification of glioblastoma. *Brain Tumor Pathol.* 24(1):1-5.

[52] Kaneshiro D, Kobayashi T, Chao ST, Suh J, Prayson RA (2009) Chromosome 1p and 19q deletions in glioblastoma multiforme. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 17(6):512-6.

[53] Clark KH, Villano JL, Nikiforova MN, Hamilton RL, Horbinski C (2013) 1p/19q testing has no significance in the workup of glioblastomas. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 39(6):706-17.

Table 1. Clinical and laboratory characteristics of the patients.

Patient	Sex	Age (years)	Previous tumor	Survival (days)	Local	Seizure	Resect	Cytogenetic abnormalities						
								Ampl <i>EGFR</i>	Pol 7	Mon 10	Deletion			
											<i>PTEN</i>	<i>TP53</i>	1p	19q
1	M	48		137	T		ST	+	+	+	+			
2	F	70		228	FT		TT	+		+	+			
3	M	41	+	59	T		ST					+		
4	F	59		139	PT		TT		+		+			
5	M	52		525	FT	+	ST		+					
6	M	47		351	O		ST	+	+	+	+			
7	M	74		184	O		ST			+	+			
8	F	56		116	FT		ST			+				
9	M	78		39	FT		ST							
10	M	62		81	T		ST						+	
11	M	65		110	O		ST	+		+			+	
12	M	69		541	FT		ST							
13	F	58		706	FT		ST	+	+	+				
14	M	64		296	O		TT	+		+				
15	M	72		147	O		NI							
16	F	71		467	O		TT							
17	M	47		57	O		TT	+	+	+	+			
18	F	61		512	O		TT	+	+	+				
19	F	62		4	O		ST	+	+	+				
20	F	62		79	O		TT	+	+	+				
21	M	42		1647	FT	+	NI							+
22	M	55		1038	FT		TT		+	+				
23	M	53		1127	PT	+	TT	+	+	+				
24	M	60		524	T	+	TT		+					
25	M	56		177	FT		TT	+	+	+				
26	F	53		28	T		TT							
27	M	65		67	FT	+	TT	+		+	+			
28	F	61		554	T		ST	+	+	+				
29	M	69		80	T		ST			+				+
30	M	52		33	O		ST		+					
31	M	55		103	O		ST	+	+	+				
32	M	44		159	O		ST				+	+		
33	M	71		25	FT		TT				+	+		+
34	F	83		25	FT		TT		+	+	+			+
35	F	41		313	T		TT	+			+	+		+
36	M	58		35	O		TT		+		+	+		
37	M	60	+	148	O		TT	+	+		+			
38	M	49		592	O		NI							
39	M	54	+	145	T		TT				+	+		
40	M	73		14	T	+	TT			+		+		

F: female; M: male; T: temporal; FT: frontal; PT: parietal; O: other; + present; Resect: resection; TT: total; ST: subtotal; NI: not informed; Ampl: amplification; Pol: polysomy; Mon: Monosomy.

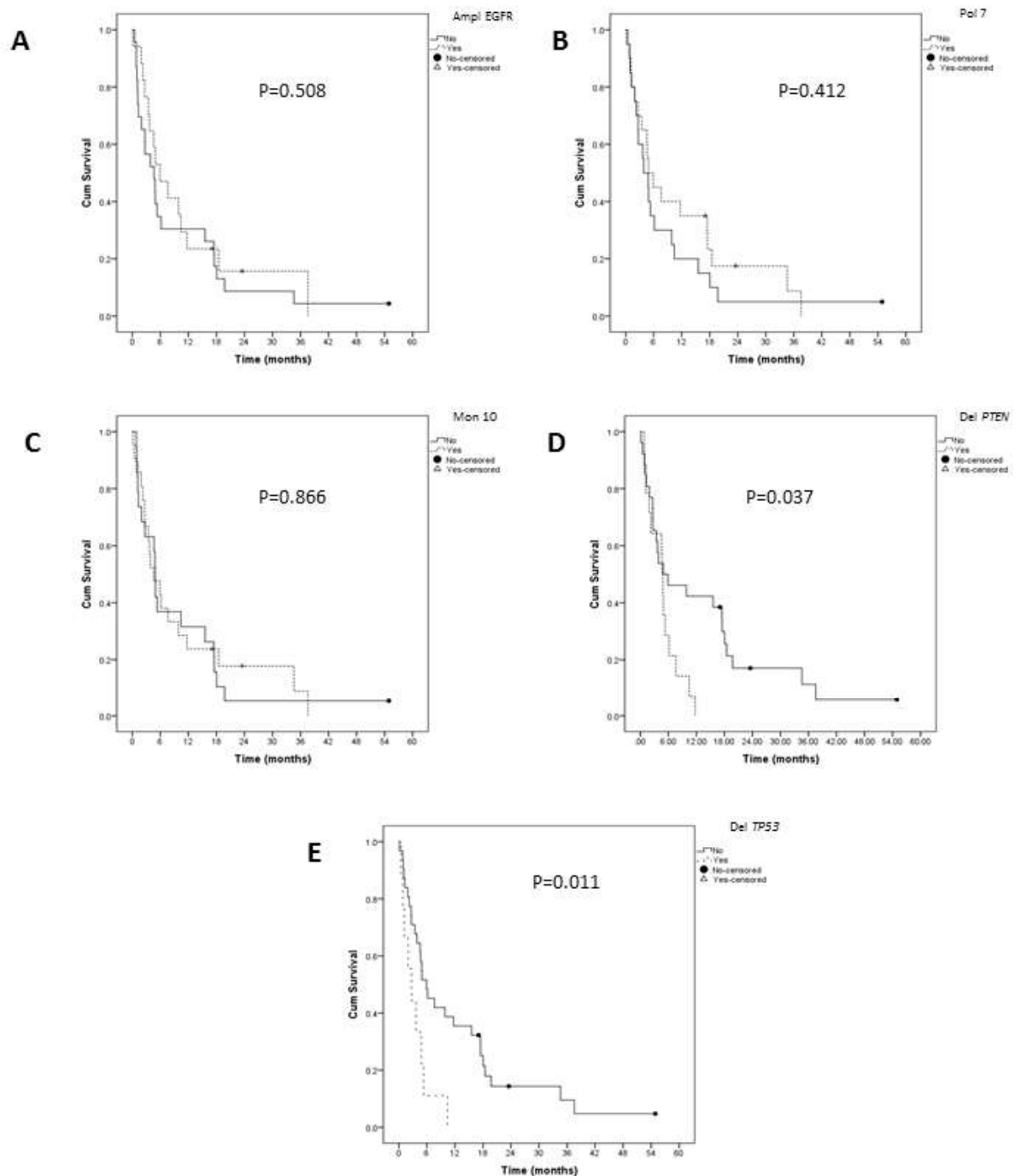


Figure 1: Graphic displaying Kaplan-Meier curves for overall survival times between groups of patients with and without *EGFR* gene amplification (A), chromosome 7 polysomy (B), chromosome 10 monosomy (C), *PTEN* deletion (D) and *TP53* gene deletion. Note especially that a significant association with poor survival was first noted for *PTEN* (D) and *TP53* deletions (E).

#### 4. Considerações finais

Este é o primeiro estudo realizado com pacientes brasileiros diagnosticados com glioblastoma que buscou investigar a associação entre as aneuploidias dos cromossomos 7 e 10, amplificação do gene *EGFR* e deleção dos genes *PTEN* e *TP53* com a história clínica e o prognóstico dos pacientes. Pinto e cols. (2008) avaliaram as perdas de 1p/9q em uma amostra de 88 pacientes com glioblastoma,

Do ponto de vista clínico, a nossa amostra se mostrou similar ao que é descrito na literatura. É importante salientar o papel da idade dos pacientes como fator prognóstico, sendo que pacientes mais jovens apresentaram melhor sobrevida.

Na literatura, há uma grande variação na frequência das alterações avaliadas no presente estudo, mas os dados encontrados estão dentro dos intervalos esperados. Há também uma falta de consenso com relação ao papel dessas alterações sobre o prognóstico dos pacientes. Em nosso estudo, apenas as deleções dos genes *TP53* e *PTEN* apresentaram impacto negativo sobre a sobrevida. Contudo, são necessários mais estudos com amostras maiores para esclarecer o papel dessas alterações sobre a sobrevida dos pacientes com glioblastoma.

O presente estudo faz parte de um projeto maior intitulado “**Estudo citogenético, molecular e imunohistoquímico das neoplasias sólidas e sua aplicação na identificação de marcadores com influência sobre a resposta terapêutica e o prognóstico**”, aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) da UFCSPA (Parecer N° 881/09) e do GHC (Parecer N° 11-

254). A perspectiva é ampliar o número de pacientes da amostra e também realizar análise, através da técnica de FISH, de outros marcadores genéticos como rearranjos envolvendo os genes *ROS1* e *NTRK1*; amplificação dos genes *KIT*, *PDGFRA* e *VEGFR2* e deleção do gene *RB1*.

O aprimoramento do conhecimento acerca das alterações genéticas envolvidas na gênese dos glioblastomas e de seu potencial valor prognóstico poderá contribuir para a escolha da terapêutica a ser ofertada ao paciente.

## 5. Anexos

### 5.1. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da UFCSPA

#### Parecer Consubstanciado de Projeto de Pesquisa

**Título do Projeto:** Estudo citogenético, molecular e imunohistoquímico de neoplasias sólidas e sua aplicação na identificação de marcadores com influência sobre a resposta terapêutica e o prognóstico.

**Pesquisador Responsável** Giorgio Adriano Paskulin

**Parecer** 881/09

**Data da Versão** 10/06/2009

**Cadastro** 485/09

**Data do Parecer** 18/06/2009

**Grupo e Área Temática** I.1 Genética Humana

#### Objetivos do Projeto

**Geral:** Instituir protocolos de cultivo de tumores sólidos para análise citogenética clássica e molecular no Laboratório de Citogenética da UFCSPA, através do estudo de uma amostra de tumores renais, no intuito de disponibilizar futuramente essas técnicas aos pacientes atendidos pelo SUS portadores de outras

#### Específicos:

- 1) Estabelecer técnicas de cultivo de tumores sólidos.
- 2) Estabelecer técnicas de citogenética clássica de tumores sólidos para análise por bandas.
- 3) Estabelecer a técnica de FISH em suspensão de células obtidas em culturas.
- 4) Estabelecer a técnicas de FISH em material em blocos de parafina
- 5) Montar um banco de dados de DNA para análises moleculares futuras
- 6) Treinar alunos nas técnicas de cultivo de tumores sólidos, citogenética clássica e de FISH.
- 7) Desenvolver projetos de pesquisa ligados às técnicas de citogenética clássica, FISH e imunohistoquímica
- 8) Realizar publicações científicas utilizando os dados obtidos nos diferentes trabalhos originários do presente projeto de pesquisa

#### Sumário do Projeto

O projeto visa a instituir protocolos de cultivo de tumores sólidos e de técnicas de hibridização in situ fluorescente (FISH) em amostras de tumores sólidos no Laboratório de Citogenética da UFCSPA. Trata-se de um "projeto guarda-chuva" que pretende integrar diferentes pesquisadores e seus grupos de pesquisa. Em específico, o projeto pretende estabelecer técnicas de cultivo celular, FISH em suspensão de células e em blocos de parafinas e formar um banco de DNA de tumores sólidos, iniciando com a análise de uma amostra de 100 tumores renais.

Itens Metodológicos e Éticos	Situação
Título	Adequado
Autores	Adequados
Local de Origem na Instituição	Adequado
Projeto elaborado por patrocinador	Não informado
Aprovação no país de origem	Não necessita
Local de Realização	Própria instituição
Outras instituições envolvidas	Não
Condições para realização	Adequadas

Comentários sobre os itens de Identificação

Projeto realizado no laboratório de citologia da UFCSPA

<b>Introdução</b>	<b>Adequada</b>
-------------------	-----------------

Comentários sobre a Introdução

<b>Objetivos</b>	<b>Adequados</b>
------------------	------------------

Comentários sobre os Objetivos

<b>Pacientes e Métodos</b>	
Delineamento	Adequado
Tamanho de amostra	Total 100 Local

Cálculo do tamanho da amostra	Adequado
Participantes pertencentes a grupos especiais	Não
Seleção equitativa dos indivíduos participantes	Adequada
Critérios de inclusão e exclusão	Adequados
Relação risco- benefício	Adequada
Uso de placebo	Adequado
Período de suspensão de uso de drogas (wash out)	Adequado
Monitoramento da segurança e dados	Adequado
Avaliação dos dados	Adequada - quantitativa
Privacidade e confidencialidade	Adequada
Termo de Consentimento	Outro tipo (materiais biológicos)
Adequação às Normas e Diretrizes	Sim

Comentários sobre os itens de Pacientes e Métodos

Cronograma	Adequado
Data de início prevista	07/2009
Data de término prevista	06/2014
Orçamento	Adequado
Fonte de financiamento externa	Não

Comentários sobre o Cronograma e o Orçamento

Referências Bibliográficas	Adequadas
----------------------------	-----------

Comentários sobre as Referências Bibliográficas

Recomendação

**Aprovar**

Comentários Gerais sobre o Projeto

-

## 5.2. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo Hospitalar Conceição



HOSPITAL N. 3, DA CONCEIÇÃO S.A.  
R. Fiebrig, 300 - 106  
CEP 91500-000 - Porto Alegre - RS  
Fone: 3014.2000  
CNPJ: 02.797.348/0001-26

HOSPITAL DA CRIANÇA CONCEIÇÃO  
Unidade de Pesquisas do Hospital N. 3  
Bandeira da Conceição S.A. I

HOSPITAL CRISTO REI DENTOR S.A.  
Rua Domingos Rolden, 207  
CEP 91020-900 - Porto Alegre - RS  
Fone: 3017.4100  
CNPJ: 02.797.348/0001-26

HOSPITAL HERMAN S.A.  
Rua Bragança, 17  
CEP 91330-000 - Porto Alegre - RS  
Fone: 3166.5000  
CNPJ: 02.797.348/0001-26



Vinculados ao Ministério da Saúde - Decreto n.º 93.244/90

### COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP/GHC

O Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo Hospitalar Conceição (CEP/GHC), que é reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS desde 31/10/1997, pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB0001105) e pelo FWA - Federalwide Assurance (FWA 00000378), em 30 maio de 2012, reavaliou o seguinte projeto de pesquisa:

**Projeto:** 11-254

**Versão do Projeto:**

**Versão do TCLE:**

**Pesquisadores:**

MARCELO EDUARDO ZANELLA CAPRA  
MARILU FIEGENBAUM  
PAULO RICARDO GAZZOLA ZEN  
RAFAEL FABIANO MACHADO ROSA  
VALENTINA OLIVEIRA PROVENZI  
CARLA GRAZIADIO  
GIORGIO ADRIANO PASKULIN

**Título:** Estudo citogenético, molecular e imunohistoquímico de neoplasias sólidas e sua aplicação na identificação de marcadores com influência sobre a resposta terapêutica e o prognóstico.

Documentação: Aprovados

Aspectos Metodológicos: Aprovados

Aspectos Éticos: Aprovados

**Parecer final:** Este projeto, por estar de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde, obteve o parecer de APROVADO.

**Considerações Finais:**

- Toda e qualquer alteração do projeto, deverá ser comunicada imediatamente ao CEP/GHC.
- Os relatórios parciais e final deverão ser encaminhados para este CEP.
- Salientamos que seu estudo pode ser iniciado a partir desta data.
- Entregue cópia deste documento ao Setor/Serviço onde será realizada a pesquisa.

Porto Alegre, 30 de maio de 2012.

  
Daniel Demétrio Faustino da Silva  
Coordenador-geral do CEP/GHC

### 5.3. Protocolo Clínico

#### PROTOCOLO DE TUMORES ENCEFÁLICOS

#### SERVIÇO DE NEUROLOGIA E NEUROCIRURGIA DR MARIO COUTINHO

NOME: \_\_\_\_\_

REGISTRO: \_\_\_\_\_ SEXO: \_\_\_\_\_ DATA DE NASCIMENTO: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

IDADE (anos) : \_\_\_ DATA DA CIRURGIA: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ INTERNAÇÃO: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

ALTA: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ TEMPO DE INTERNAÇÃO: \_\_\_ dias

PROCEDÊNCIA: \_\_\_\_\_ FONE: (\_\_\_\_) \_\_\_\_\_

APRESENTAÇÃO CLÍNICA:

<input type="checkbox"/> HIC	<input type="checkbox"/> cefaleia	<input type="checkbox"/> papiledema
<input type="checkbox"/> déficit focal	<input type="checkbox"/> motor	<input type="checkbox"/> vômitos
<input type="checkbox"/> crise convulsiva	<input type="checkbox"/> aumento perímetro cefálico	<input type="checkbox"/> síndrome cerebelar
<input type="checkbox"/> ataxia de marcha	<input type="checkbox"/> distúrbio hormonal	GH <input type="checkbox"/> aumentado <input type="checkbox"/> diminuído
Prolactina	Cortisol	Gonadotrofinas
<input type="checkbox"/> aumentada <input type="checkbox"/> diminuída	<input type="checkbox"/> aumentado <input type="checkbox"/> diminuído	<input type="checkbox"/> aumentadas <input type="checkbox"/> diminuídas
TSH	<input type="checkbox"/> paralisia de nervos cranianos - qual:	
<input type="checkbox"/> aumentado <input type="checkbox"/> diminuído		
<input type="checkbox"/> déficit visual lado <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> E	<input type="checkbox"/> outra:	

COMORBIDADES:

\_\_\_\_\_

ANTECEDENTES:

consanguinidade parental tipo: \_\_\_\_\_

história familiar de câncer

familiar: \_\_\_\_\_ idade no diagnóstico: \_\_\_\_\_ neoplasia: \_\_\_\_\_

familiar: \_\_\_\_\_ idade no diagnóstico: \_\_\_\_\_ neoplasia: \_\_\_\_\_

história pessoal de câncer neoplasia: \_\_\_\_\_

Idade no diagnóstico: \_\_\_\_\_

LOCALIZAÇÃO DO TUMOR:

\_\_\_\_\_

HIDROCEFALIA:  sim  não  DVP

RESULTADO DA RESSECÇÃO: Considerando tratamento cirúrgico total, incluindo o resultado após as reintervenções

Ressecção total  Ressecção subtotal \_\_\_\_\_% retirado  Biópsia

VIA DE ABORDAGEM:

\_\_\_\_\_

ANATOMO-PATOLÓGICO:

\_\_\_\_\_

REINTERVENÇÃO NO TUMOR: ( ) sim ( ) não (nº de reintervenções realizadas: \_\_\_\_\_)

COMPLICAÇÕES CIRÚRGICAS:

\_\_\_\_\_

TRATAMENTO COMPLEMENTAR:

( ) quimioterapia - protocolo: \_\_\_\_\_

( ) Radioterapia - dose: \_\_\_\_\_

DATA DA ÚLTIMA REVISÃO: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

( ) vivo SEM doença \_\_\_\_\_ meses após a cirurgia

( ) vivo COM doença estável \_\_\_\_\_ meses após a cirurgia

( ) vivo COM doença em progressão \_\_\_\_\_ meses após a cirurgia

óbito \_\_\_\_\_ meses após a cirurgia DATA DO ÓBITO: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

## 5.4. Protocolo da técnica de FISH

### PROCOLO DE FISH – AMOSTRAS EMBLOCADAS EM PARAFINA

Número do ensaio \_\_\_\_\_ Sonda: \_\_\_\_\_ Número do Lote: \_\_\_\_\_

=====

**I. Preparação da Lâmina** Técnico: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_ Hora de início: \_\_\_\_\_

1. Selecione a área a ser hibridizada baseado na lâmina corada pela Hematoxilina & Eosina \_\_\_\_\_.
2. Marque a área de hibridização com a caneta diamante \_\_\_\_\_.
3. Incube as lâminas a 56°C por 2 a <4 horas \_\_\_\_\_, 4 horas \_\_\_\_\_ ou overnight \_\_\_\_\_, dependendo do tamanho da secção.
4. Imediatamente embeba as lâminas em Xilol 3X por 10 minutos cada. 1 \_\_\_\_\_ 2 \_\_\_\_\_ 3 \_\_\_\_\_ e deixe secar \_\_\_\_\_.
5. Agite as lâminas em etanol a 100% 2X por 5 minutos cada. 1 \_\_\_\_\_ 2 \_\_\_\_\_ e deixe secar \_\_\_\_\_.
6. Incubar as lâminas em 2XSSC a 75°C \_\_\_\_\_.
7. Faça digestão das lâminas em Proteinase K 0,6 mg/mL (500µL de Proteinase K em 17 mL de 2XSSC) a 45°C \_\_\_\_\_.
8. Enxagúe em 2XSSC à temperatura ambiente por 5 minutos \_\_\_\_\_.
9. Desidrate por 2 minutos em etanol a 70% \_\_\_\_\_, 85% \_\_\_\_\_, 100% \_\_\_\_\_ e deixe secar \_\_\_\_\_.

### II. Hibridização com Codesnaturação do DNA

1. Aqueça a sonda de DNA a 37°C por 5 minutos, passe no vórtex e centrifugue a sonda \_\_\_\_\_.
2. Defina parâmetros:

Número da Lâmina de FISH	Espécime	Sonda	Volume da sonda (µL)	Tamanho da Lâmina (mm)	Tempo de tto 2XSSC/PK (min)
1					
2					
3					
4					
5					

3. Aplique a sonda à área selecionada das lâminas \_\_\_\_\_.
4. Aplique a lamínula \_\_\_\_\_ e sele com cimento borracha \_\_\_\_\_.
5. Codesnaturação: Incube a 80°C por 15 minutos \_\_\_\_\_.
6. Incube as lâminas em câmara úmida a 37°C por 16 a 24 horas \_\_\_\_\_.

Incubação iniciada a: \_\_\_\_\_.

=====

**III. Pós-hibridização** Técnico: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_ Hora de início: \_\_\_\_\_

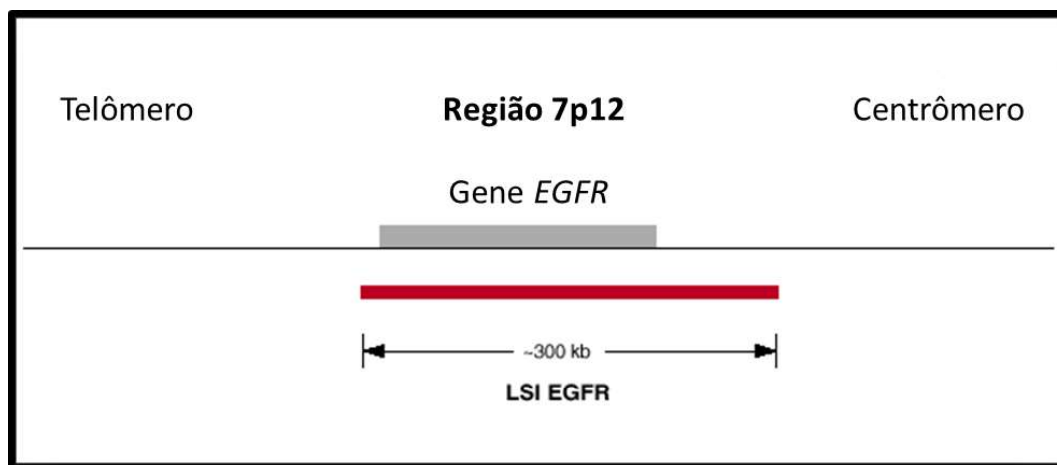
1. Hibridização interrompida às \_\_\_\_\_.
2. Lave as lâminas em 2XSSC/Tween 20 (25µL de Tween 20 em 50 mL de 2XSSC) a  $73\pm 1^{\circ}\text{C}$  por 2 minutos e 30 segundos, agite manualmente várias vezes \_\_\_\_\_.
3. Lave as lâminas em 2XSSC/Tween 20 (25µL de Tween 20 em 50 mL de 2XSSC) à temperatura ambiente por 2 minutos e 30 segundos, agite manualmente várias vezes \_\_\_\_\_.
- 4.. Lave as lâminas em 2XSSC à temperatura ambiente (poucos segundos) \_\_\_\_\_.
5. Desidrate por 2 minutos em etanol a 70% \_\_\_\_\_, 85% \_\_\_\_\_, 100% \_\_\_\_\_ e deixe secar \_\_\_\_\_.
6. Aplique 10 µL de DAPI Vectashield (0,3 µg/µL) à lâmina \_\_\_\_\_.
7. Cubra com uma lamínula de 22X50 mm e armazene a lâmina na geladeira a  $4^{\circ}\text{C}$ , em lugar protegido da luz \_\_\_\_\_.

Finalizado às: \_\_\_\_\_.

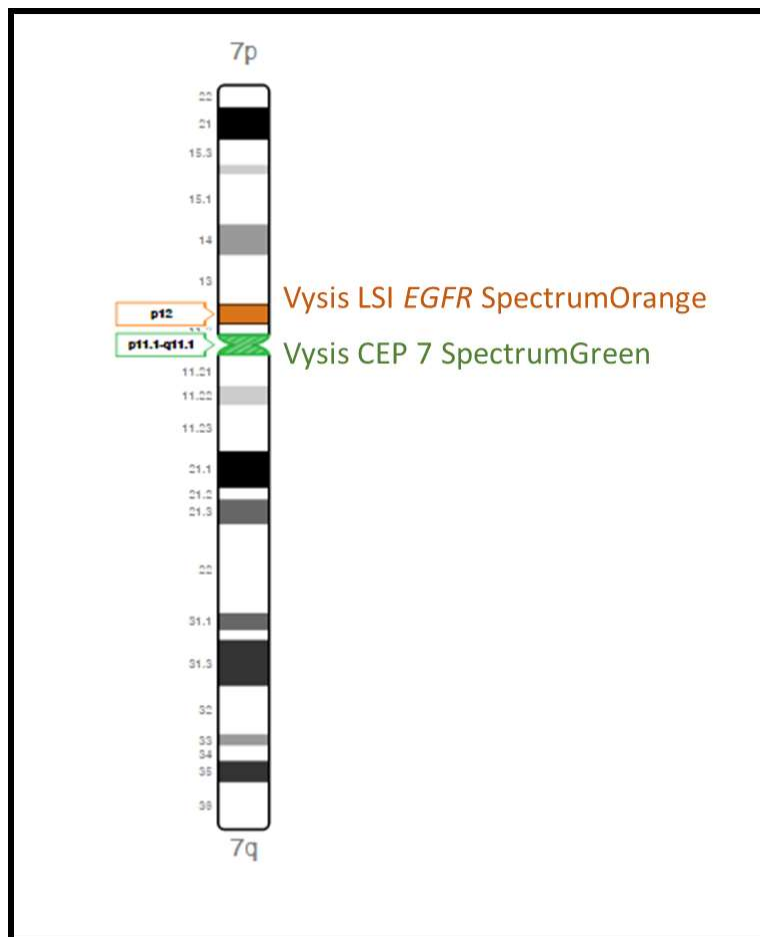
### 5.5. Sondas de DNA utilizadas na técnica de FISH

As sondas de DNA utilizadas no presente estudo foram LSI *EGFR*/CEP 7, LSI *PTEN*/CEP 10, LSI 1p36/LSI 1q25 & LSI 19q13/19p13 Dual C e LSI *p53* - 17p13.1 & CEP17 (Vysis, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL).

A sonda LSI *EGFR*/CEP 7 é composta por dois reagentes: o LSI *EGFR*, marcado com fluorocromo vermelho (*SpectrumOrange*), que se hibridiza a uma região de aproximadamente 300 kb, na qual está localizado o gene *EGFR* (região p12 do cromossomo 7); e o CEP 7, marcado com fluorocromo verde (*SpectrumGreen*), que se hibridiza ao DNA satélite alfa localizado na região centromérica do cromossomo 7 (Figuras 1 e 2).

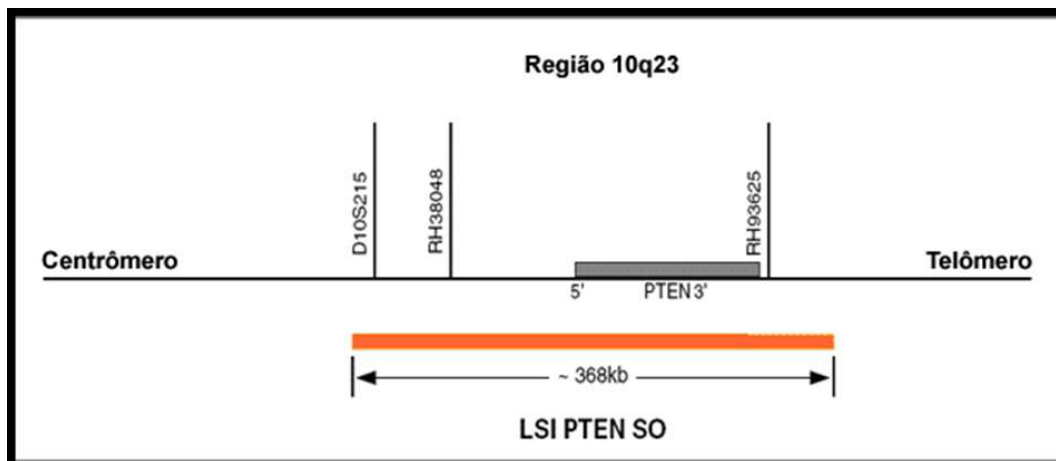


**Figura 1:** Sítio de hibridização de LSI *EGFR* na região 12 do braço curto (p) do cromossomo 7, onde está localizado o gene *EGFR*.

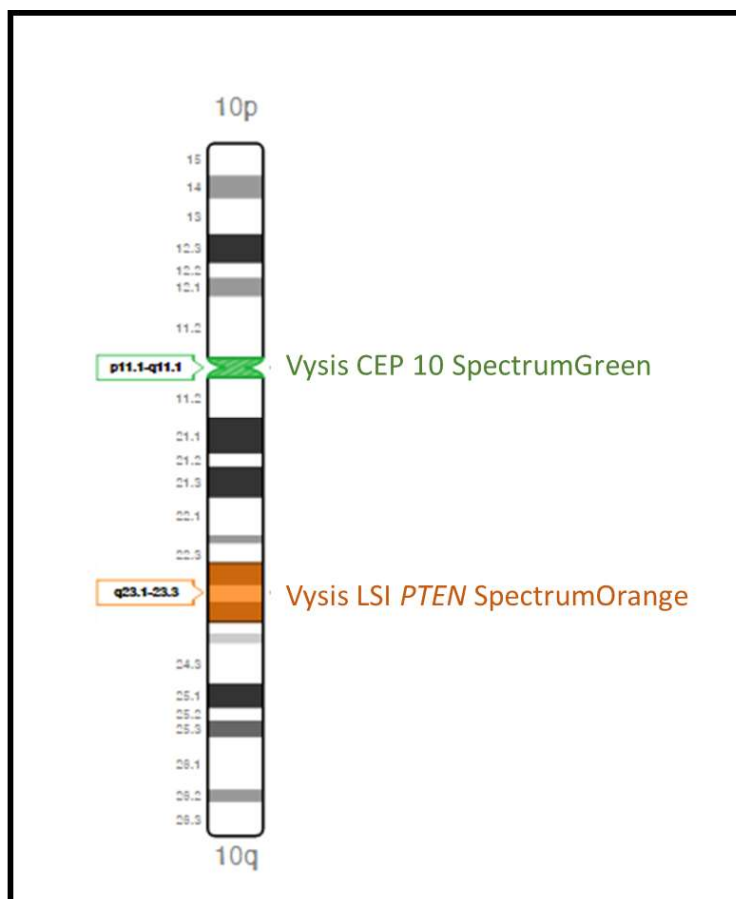


**Figura 2:** Ideograma do cromossomo 7, demonstrando os locais de hibridização dos reagentes LSI *EGFR* e CEP7.

A sonda LSI *PTEN*/CEP 10 é composta por dois reagentes: o LSI *PTEN*, marcado com fluorocromo vermelho (*SpectrumOrange*), que se hibridiza à região de aproximadamente 370 kb que contém as sequências que flanqueiam as extremidades do gene *PTEN* (região q23 do cromossomo 7); e o CEP 10, marcado com fluorocromo verde (*SpectrumGreen*), que se hibridiza às sequências de DNA alfa satélite específicas do cromossomo 10 (Figuras 3 e 4).

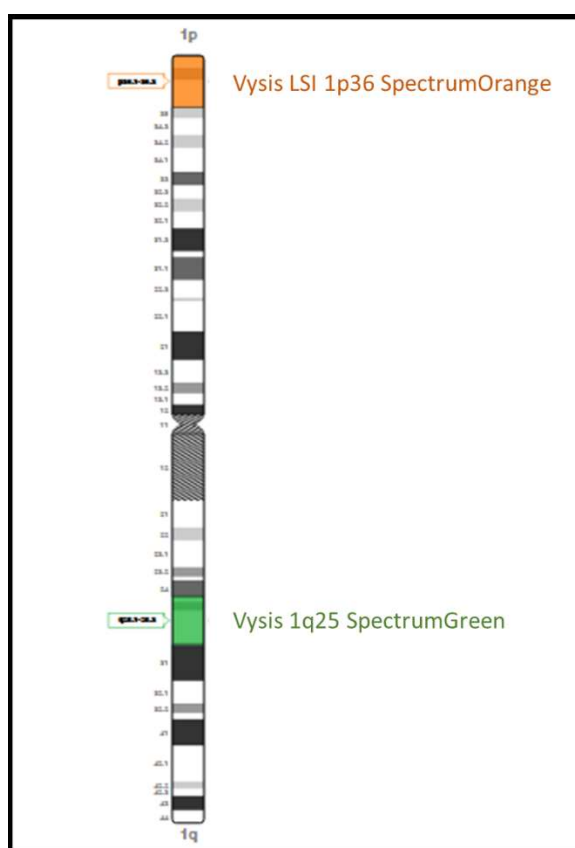


**Figura 3:** Sítio de hibridização de LSI *PTEN* na região 23 do braço longo (q) do cromossomo 10, onde está localizado o gene *PTEN*.

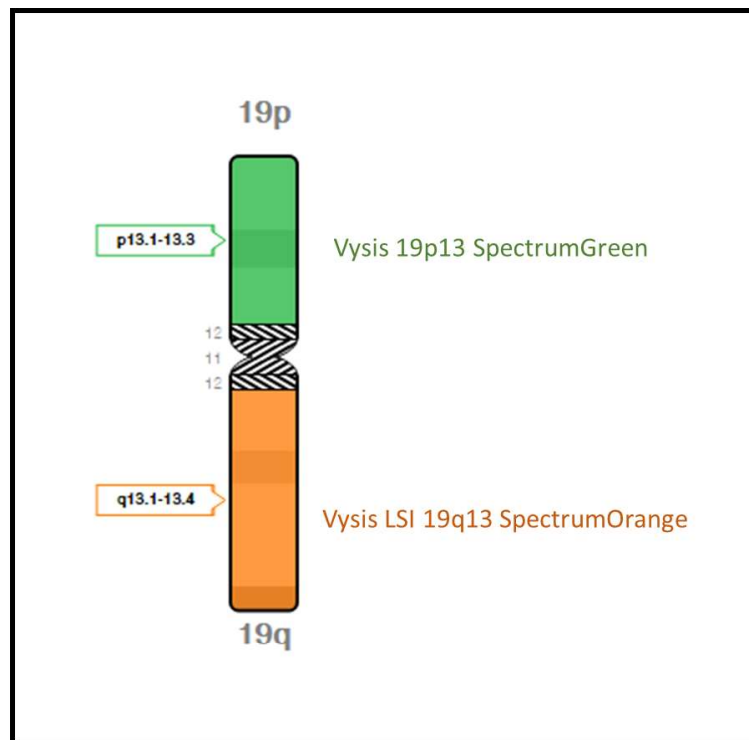


**Figura 4:** Ideograma do cromossomo 10, indicando os locais de hibridização dos reagentes LSI *PTEN* e CEP 10.

A sonda LSI 1p36/LSI 1q25 é composta por dois reagentes: LSI 1p36, marcado com fluorocromo vermelho (*SpectrumOrange*), e LSI 1q25, marcada com fluorocromo verde (*SpectrumGreen*) e utilizada como controle (Figura 5). Já a sonda LSI 19q13/19p13 é composta por LSI 19q13, marcada com fluorocromo vermelho (*SpectrumOrange*), e LSI 19p13, marcada com fluorocromo verde (*SpectrumGreen*) e utilizada como controle (Figura 6).

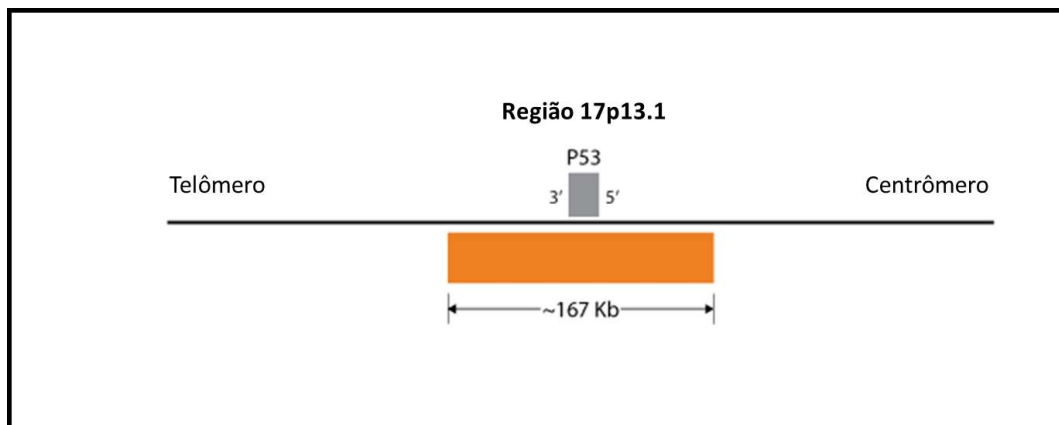


**Figura 5:** Ideograma do cromossomo 1, demonstrando os locais de hibridização dos reagentes LSI 1p36 e LSI 1q25.

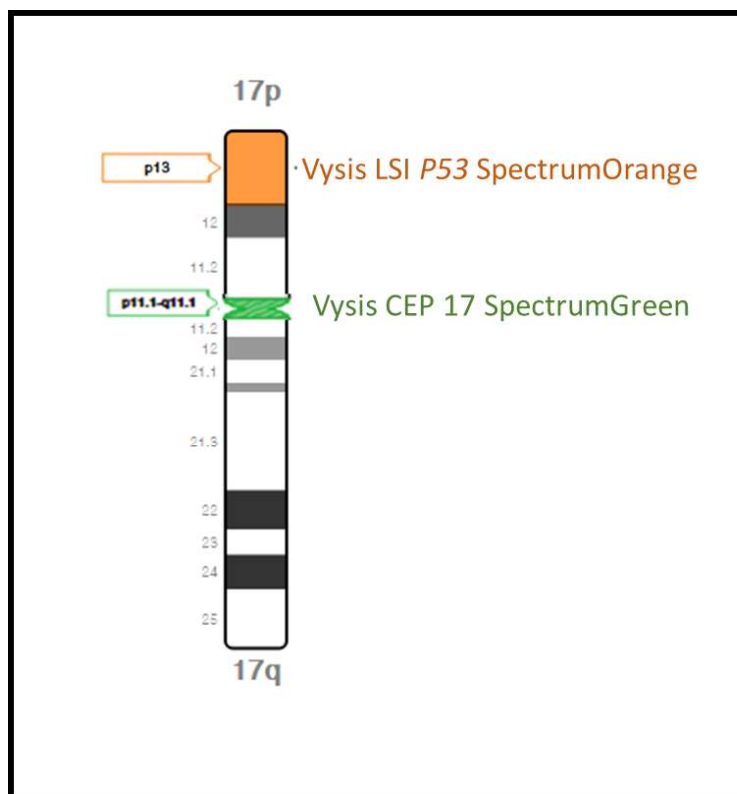


**Figura 6:** Ideograma do cromossomo 19, demonstrando os locais de hibridização dos reagentes LSI 19q13 e LSI 19p13.

A sonda LSI *p53* - 17p13.1 & CEP17 é composta por LSI *p53*, marcado com fluorocromo vermelho (*SpectrumOrange*), que se hibridiza a uma região de aproximadamente 167 kb localizada na região 13.1 do braço curto (p) do cromossomo 17, onde está localizado o gene *TP53*; e o CEP 17, marcado com fluorocromo verde (*SpectrumGreen*), que se hibridiza ao DNA satélite alfa localizado na região centromérica do cromossomo 17 (Figuras 7 e 8).



**Figura 7:** Sítio de hibridização de LSI *p53* na região 13.1 do braço curto (p) do cromossomo 17, onde está localizado o gene *TP53*.



**Figura 8:** Ideograma do cromossomo 17, indicando os locais de hibridização dos reagentes LSI *p53* e CEP 17.

## 5.6. Ficha de análise ao microscópio

### Ficha de análise de FISH – Glioblastomas

Caso: \_\_\_\_\_ Lâmina: \_\_\_\_\_ Sonda: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

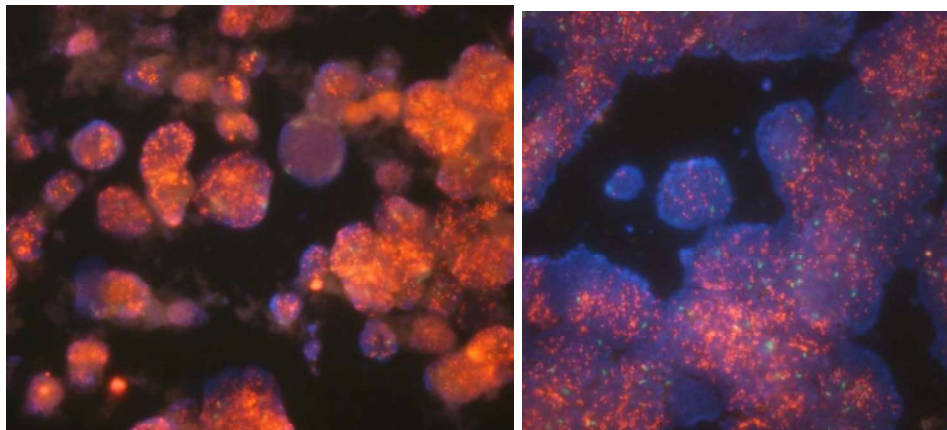
1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.
11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.	18.	19.	20.
21.	22.	23.	24.	25.	26.	27.	28.	29.	30.
31.	32.	33.	34.	35.	36.	37.	38.	39.	40.
41.	42.	43.	44.	45.	46.	47.	48.	49.	50.
51.	52.	53.	54.	55.	56.	57.	58.	59.	60.
61.	62.	63.	64.	65.	66.	67.	68.	69.	70.
71.	72.	73.	74.	75.	76.	77.	78.	79.	80.
81.	82.	83.	84.	85.	86.	87.	88.	89.	90.
91.	92.	93.	94.	95.	96.	97.	98.	99.	100.
101.	102.	103.	104.	105.	106.	107.	108.	109.	110.
111.	112.	113.	114.	115.	116.	117.	118.	119.	120.
121.	122.	123.	124.	125.	126.	127.	128.	129.	130.
131.	132.	133.	134.	135.	136.	137.	138.	139.	140.
141.	142.	143.	144.	145.	146.	147.	148.	149.	150.
151.	152.	153.	154.	155.	156.	157.	158.	159.	160.
161.	162.	163.	164.	165.	166.	167.	168.	169.	170.
171.	172.	173.	174.	175.	176.	177.	178.	179.	180.
181.	182.	183.	184.	185.	186.	187.	188.	189.	190.
191.	192.	193.	194.	195.	196.	197.	198.	199.	200.

Imagens:

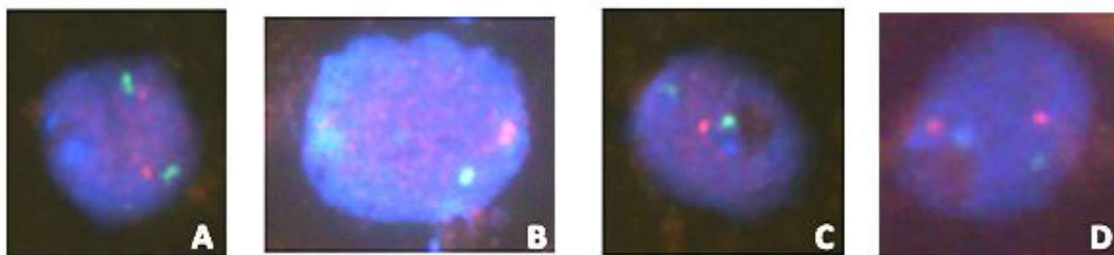
## 5.7. Interpretação dos resultados

De acordo com a revisão da literatura, observa-se não há uma padronização dos critérios adotados para a interpretação dos resultados. No presente estudo, foram adotados critérios previamente utilizados por outros autores, a saber: amplificação de *EGFR* quando mais de 10% dos núcleos exibiram *EGFR/CEP7* >2; polissomia do cromossomo 7 quando mais >20% dos núcleos demonstraram 3 ou mais sinais para CEP7, e monossomia do cromossomo 10 quando foi encontrada presença de apenas um sinal CEP10 em >50% dos núcleos, seguindo os critérios sugeridos por Korshunov e cols. (2005). Para os casos de deleções do gene *PTEN* quando *PTEN/CEP10* <0.8 (Rodriguez e cols., 2008). Considerou-se codeleção 1p/19q quando 1p36/1q25 e 19q13/19p13 foi <0.86 (Pinto e cols., 2008); e deleção de *TP53* nos casos em que no mínimo 8% dos núcleos exibiram um sinal vermelho e  $\geq 2$  sinais verdes (Necsalová e cols., 2010).

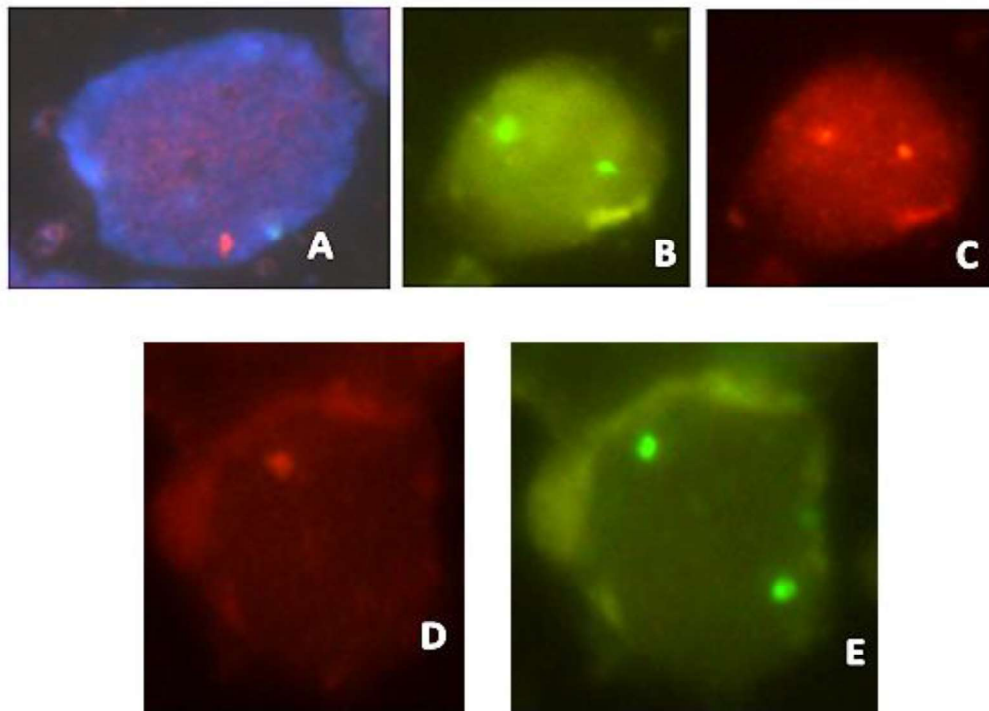
## 5.8. Imagens



**Figura 1:** Fotos (filtro triplo) da técnica de FISH em células tumorais usando as sondas LSI *EGFR/CEP7*. Nas imagens é possível identificar núcleos com amplificação de *EGFR*, que é representada pelos aglomerados de sinais vermelhos.



**Figura 2:** Fotos (filtro triplo) da técnica de FISH em células tumorais usando as sondas LSI *PTEN/CEP10* e LSI *p53 (17p13.1)/CEP17*. A) Núcleo normal, exibindo 2 sinais *PTEN* (vermelho) e 2 sinais CEP 10 (verde). B) Núcleo com monossomia do cromossomo 10, com 1 sinal *PTEN* (vermelho) e 1 sinal CEP 10 (verde). C) Núcleo com deleção do gene *PTEN*, apresentando 2 sinais verdes (CEP 10) e 1 sinal vermelho (*PTEN*). D) Núcleo normal, exibindo 2 sinais *TP53* (vermelho) e 2 sinais CEP 17 (verde).



**Figura 3:** Fotos da técnica de FISH em células tumorais usando as sondas LSI 1p36/LSI 1q25 e LSI 19q13/19p13. A) Núcleo com monossomia do cromossomo 1, exibindo 1 sinal 1p36 (vermelho) e 1 sinal 1q25 (verde) – Filtro triplo. B) e C) Núcleo com 2 sinais 1q25 (verde) – Filtro FITC e Núcleo com 2 sinais 1p36 (vermelho) – Filtro Texas Red. D) e E) Núcleo com 1 sinal 19q13 (vermelho) – Filtro Texas Red e Núcleo com 2 sinais 19p13 (verde) – Filtro FITC.