

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

Patrícia Trevisan

**Avaliação Clínica e Citogenética
Molecular Através da Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH):
Frequência e Significado Clínico de
Aneuploidias, Deleção, Amplificação
e Fusões Gênicas em Glioblastomas**

Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

Porto Alegre
2018

Patrícia Trevisan

**Avaliação Clínica e Citogenética
Molecular Através da Hibridização in
situ Fluorescente (FISH):
Frequência e Significado Clínico de
Aneuploidias, Deleção, Amplificação
e Fusões Gênicas em Glioblastomas**

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: Dr. Paulo Ricardo Gazzola Zen
Co-orientadora: Dra. Marileila Varella-Garcia
Co-orientador: Dr. Rafael Fabiano Machado Rosa

**Porto Alegre
2018**

Catálogo na Publicação

Trevisan, Patrícia

Avaliação Clínica e Citogenética Molecular Através da Hibridização in situ Fluorescente (FISH): Frequência e Significado Clínico de Aneuploidias, Deleção, Amplificação e Fusões Gênicas em Glioblastomas / Patrícia Trevisan. -- 2018.

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

Tese (doutorado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Patologia, 2018.

Orientador(a): Paulo Ricardo Gazzola Zen ;
coorientador(a): Marileila Varella-Garcia, Rafael Fabiano Machado Rosa.

1. Glioblastoma. 2. Hibridização in situ fluorescente.
3. Citogenética molecular. I. Título.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos aqueles que com carinho, dedicação e contribuição, tornaram possível a realização do presente trabalho:

- aos pacientes e suas famílias, pela eterna contribuição e apoio, permitindo que a ciência continue o seu caminho;

- ao meu marido Julio por todo o seu amor, apoio, confiança, dedicação e por aceitar se aventurar comigo nessa jornada que não foi fácil, e que com certeza sem o seu apoio eu não teria suportado;

- aos meus pais Isaltino (*in memorian*) e Cladis, meus grandes incentivadores, por tudo o que fizeram e representam para mim. Mesmo que fisicamente ausente, meu pai foi e sempre será meu exemplo de dedicação, seriedade e humildade;

- aos meus irmãos e cunhados, Marcelo, Ana, Rafael, Gabriela e Eduardo que mesmo distantes fisicamente, sempre me apoiaram, incentivaram e me ajudaram muito nesse período;

- as minhas afilhadas e sobrinhos Luana, Cecília, Maria Laura, Ana Clara e João Guilherme que mesmo tão pequenos foram grandes incentivadores e fizeram com que esse período fosse mais leve e feliz;

- a minha sogra querida, Dona Eta, pelo apoio, ajuda e carinho recebido e a todos os meus familiares e amigos que de alguma forma ou outra estiveram comigo me apoiando e incentivando;

- ao professor, orientador e, acima de tudo, amigo, Dr. Paulo Ricardo Gazzola Zen, por toda orientação e ensinamentos recebidos durante minha formação e no doutorado;

- a minha querida co-orientadora Dra Marileila Varella-Garcia por todos os ensinamentos, dedicação, paciência, acolhida e carinho desde o início do desenvolvimento do projeto para Doutorado Sanduiche. É para mim um exemplo de profissional, com certeza levarei seus ensinamentos para minha vida profissional;

- ao meu co-orientador Rafael Fabiano Machado Rosa, por toda a dedicação, paciência, carinho e ensinamentos recebidos desde que entrei para o grupo;

- a professora Dra. Carla Graziadio por toda amizade, ensinamentos e apoio recebidos. Uma das maiores incentivadoras, me ajudando com o possível e o impossível para que esse trabalho desse certo;

- ao meu eterno professor e mestre Dr Giorgio Adriano Paskulin, por todo apoio, auxílio, ensinamentos e carinho. Sem o seu apoio e de sua família, nada disso seria possível. Agradeço por ter nos apresentado as pessoas mais especiais com quem convivemos em Denver;

- aos meus colegas e amigos do laboratorio de Citogenética da University of Colorado, Aline, Jamie, Hala e Ying, pelo apoio, ensinamentos e carinho recebidos. E a todos os amigos que fizemos durante o período que moramos em Denver. Foram minha segunda família durante esse período;

- as minhas colegas e amigas Juliane Nascimento da Silva, Dayane Koshyiama, Danielle Silveira, Vera Lúcia Torres Andrade, Juliete Scholl e Bibiana Cunegatto pela amizade e auxílio no desenvolvimento do presente trabalho me acompanhando nas viagens para coleta das autorizações dos familiares dos pacientes e na organização de todo o material;

- às queridas funcionárias e amigas da UFCSPA, Rosalva, Teresinha e Keli que me auxiliaram realizando os blocos de parafina e as lâminas para hibridização *in situ*;

- à querida médica patologista, Valentina Provenzi que revisou os diagnósticos patológicos, marcou as lâminas para hibridização *in situ* e me ensinou com muita paciência os achados histológicos para que as hibridizações fossem realizadas com sucesso;

- ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFCSPA, em especial à querida Maristela Pasin pelo apoio e auxílio sempre que precisei;

- à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa recebida.

Sumário

1. Introdução	12
1.1. Glioblastoma	15
1.1.1 Histórico	15
1.1.2. Epidemiologia, achados clínicos, diagnóstico e fatores de risco	16
1.1.3. Características anatomopatológicas e origem dos glioblastomas	24
1.1.4. Marcadores genéticos e classificação molecular dos glioblastomas	28
1.1.4.1. Marcadores genéticos	28
1.1.4.2. Classificação molecular	34
1.1.5. Padrões de sinalização na patogênese dos glioblastomas	37
1.1.5.1. <i>RTK/RAS/PI3K/PTEN</i>	38
1.1.5.2. <i>TP53/p14^{ARF}/MDM2/MDM4</i>	39
1.1.5.3. <i>p16^{INK4a}/CDK4/RB1</i>	41
1.1.6. Tratamento	43
1.1.7. Alterações envolvendo os genes <i>NTRK1</i> , <i>ROS1</i> , <i>KIT</i> , <i>PDGFRA</i> , <i>KDR</i> e <i>RB1</i>	45
1.2. A técnica de hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	54
1.3. Referências bibliográficas	59
2. Objetivos	65
3. Artigo científico redigido em inglês	66
4. Considerações finais	100
5. Anexos	101

Lista de abreviaturas utilizadas

AKT: Protein kinase B

ARHGEF2: Rho/Rac guanine nucleotide exchange factor 2

ASCL1: achaete-scute family bHLH transcription factor 1

AVC: acidente vascular cerebral

BACs: cromossomos artificiais bacterianos

BCAN: brevican

BCPC: células de propagação dos tumores cerebrais

BRAF: B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase

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

CcO: citocromo c oxidase

CD133: prominin 1

CDK: cyclin dependent kinase

CDKN: cyclin-dependent kinase Inhibitor

CEP85L: centrosomal protein 85 like

CGH: hibridização genômica comparativa

CHI3L1: chitinase 3 like 1

CHTOP: chromatin target of PRMT1

CIPA: insensibilidade à dor congênita com anidrose

DCX: doublecortin

DLL3: delta like canonical Notch ligand 3

DNA: ácido desoxirribonucleico

E2F: transcription factor

EGFR: receptor do fator de crescimento epidérmico

EUA: Estados Unidos da América

FIG: golgi associated PDZ and coiled-coil motif containing

FISH: hibridização *in situ* fluorescente

G1: fase G1

GABRA1: Gamma-Aminobutyric Acid Type A Receptor Alpha1 Subunit

GBM: glioblastoma

GFAP: proteína glial fibrilar ácida

GOPC: golgi associated PDZ and coiled-coil motif containing

HIF: fator de indução à hipóxia

HR: hazard ratio

hTERT: telomerase transcriptase reversa humana

IARC: International Agency for Research on Cancer

IC: intervalo de confiança

IDH: isocitrato desidrogenase

IL8: interleucina 8

INCA: Instituto Nacional do Câncer

kb: kilobases

kDa: kilodaltons

KDR: receptor do fator de crescimento endotelial vascular

KIT: receptor do proto-oncogene tirosina quinase

LOH: perda da heterozigosidade

MAP: mitogen-activated protein

MDM2: Mouse double minute 2 homolog

MDM4: p53 regulator

MET: proto-oncogene, receptor tyrosine kinase

MGMT: O(6)-metilguanina-DNA-metiltransferase

mRNA: ácido ribonucleico mensageiro

mTOR: proteína alvo da rapamicina em mamíferos

NE: necrose

NEFL: neurofilament light

NF-1: Neurofibromatose 1

NFASC: neurofascin

NIH: National Institutes of Health

NKX2-2: NK2 homeobox 2

NOS: insufficient information

NTRK1: receptor para o fator neurotrófico 1

OLIG2: oligodendrocyte transcription factor 2

OMS: Organização Mundial da Saúde

p14^{ARF}: cyclin dependent kinase inhibitor 2A

p16^{INK4a}: cyclin dependent kinase inhibitor 2A

PCR: reação em cadeia da polimerase

PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas

PDGFRA: receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas alfa

PI3K: fosfatidilinositol-3-cinase

PIP2: fosfatidilinositol 4,5-bifosfato

PIP3: Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato

PTEN: fosfatase homóloga à tensina

PV: proliferação vascular

RAS: resistance to audiogenic seizures

Rb: proteína retinoblastoma

RB: gene retinoblastoma

RNM: ressonância nuclear magnética

ROS1: receptor do proto-oncogene 1

RTK: receptor tirosina cinase

S: fase S

SCF: stem cell factor

SLC12A5: Solute Carrier Family 12 Member 5

SNC: sistema nervoso central

SOX: sulfite oxidase

SYT1: Synaptotagmin-1

TCF3: transcription factor 3

TCF4: transcription factor 4

TICs: células de iniciação tumoral

TMZ: temozolamida

TP53: tumor protein 53

TTFs: Tumor Treating Fields

VEGF: fator de crescimento vascular endotelial

VEGFR2: receptor do fator de crescimento endotelial vascular

ZCCHC8: zinc finger CCHC-type containing 8

Resumo da Tese

Introdução:

Glioblastoma (GBM) é o tumor cerebral primário mais frequente e também muito agressivo, com baixa sobrevida apesar dos avanços no diagnóstico e na terapia. A nível molecular, esses tumores são objeto de investigação, especialmente com o objetivo de encontrar padrões para o desenvolvimento de novos tratamentos.

Objetivos:

Verificar a frequência de rearranjos envolvendo os genes *NTRK1* e *ROS1*, a amplificação nos genes *KIT*, *PDGFRA*, *KDR* e a deleção do gene *RB1* em uma amostra de glioblastomas de pacientes adultos e correlacionar estas anormalidades citogenéticas com o prognóstico dos pacientes afetados por este tumor.

Material e Métodos:

Foram investigados 113 pacientes adultos brasileiros diagnosticados com GBM, avaliando as suas características clínicas e de citogenética molecular por hibridização *in situ* fluorescente (FISH), com as sondas específicas para cada uma das alterações investigadas: Vysis LSI *NTRK1* (Cen)/Vysis LSI *NTRK1* (Tel), *ROS1-GOPC(FIG)* Distal/*ROS1-GOPC(FIG)* Proximal, Vysis LSI *KIT/CEP4/PDGFRA* e *KDR* sondas *in house* e Vysis LSI 13 *RB1*/Vysis LSI 13q34.

Resultados:

Cerca de metade dos pacientes (53%) eram do sexo masculino e a maioria tinha mais de 40 anos (94%). O principal sinal clínico observado ao diagnóstico

foi distúrbio focal (57%) e a maioria dos tumores foi diagnosticada como GBM de novo (93%). Em 60% dos pacientes, o tumor estava localizado no hemisfério cerebral direito e as regiões frontal (31%) e temporal (20%) foram as mais afetadas. Na maioria dos casos o tumor estava localizado em um único local (64%) e foi submetido a ressecção parcial (71%). Quatorze pacientes (14%) apresentaram complicações após a cirurgia. A mediana do tempo de internação foi de 20 dias e a sobrevida média foi de 175 dias. Um caso foi identificado como positivo para rearranjo para *NTRK1* e outro para *ROS1* (0,9% cada). *PDGFRA* estava amplificado em aproximadamente 20% dos casos e co-amplificado com *KDR* em mais de 90% dos casos e com *KIT* em mais de 60% dos casos. *RB1* estava deletado em 16% dos casos. Não houve associação entre as anormalidades citogenéticas investigadas e a sobrevida dos pacientes. No entanto, idade, complicações após a cirurgia e lado do tumor foram variáveis independentes associadas à sobrevida do paciente.

Conclusão:

Este estudo contribui com informações sobre o perfil molecular dos GBMs na América Latina e para identificar possíveis novos candidatos para novas terapias, mostrando que as alterações observadas pela técnica de FISH são relevantes.

1. Introdução

O perfil demográfico mundial vem sofrendo constantes mudanças. No Brasil, isto não é diferente e é consequência, entre outros fatores, do processo de urbanização, de industrialização e dos avanços da ciência e da tecnologia. A essas novas características da sociedade, unem-se os novos estilos de vida e a exposição, ainda mais intensa, a fatores de risco próprios do mundo contemporâneo. Esse processo de mudança demográfica, denominado de “envelhecimento” da população, associado à transformação nas relações entre as pessoas e seu ambiente trouxeram uma alteração importante no perfil de morbimortalidade, colocando algumas doenças como novo centro de atenção, como o câncer. Segundo dados disponibilizados pelo *IARC (International Agency for Research on Cancer)*, há a estimativa de que no ano de 2020 o Brasil tenha mais de 550 mil novos casos de câncer (excluindo câncer de pele não-melanoma), sendo este responsável por mais de 288 mil óbitos para o mesmo ano (IARC, 2018).

Dentre os tumores observados na população em geral, os do sistema nervoso central (SNC) são muito temidos, não somente pelo seu prognóstico pobre, mas também por possuírem uma repercussão direta na qualidade de vida e na função cognitiva. Estes tumores apresentam uma ampla gama de características clínicas, biológicas e histológicas. Estimou-se, em 2016, que nos Estados Unidos da América (EUA) haveria 23.770 novos casos de tumores de SNC e que os mesmos seriam responsáveis por 16.050 mortes (Siegel e cols., 2016).

Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), no Brasil, para o ano de 2018, estima-se a ocorrência de 5.810 casos novos de câncer do SNC em homens e 5.510 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 5,62 casos novos a cada 100 mil homens e 5,17 a cada 100 mil mulheres.

Os Estados da Região Sul eram os que apresentavam uma maior incidência de tumores do SNC, e que o Rio Grande do Sul demonstrou as taxas ajustadas de 9,14 casos para cada 100.000 homens e 6,73 casos para cada 100.000 mulheres (Figuras 1 e 2) (INCA, 2018).

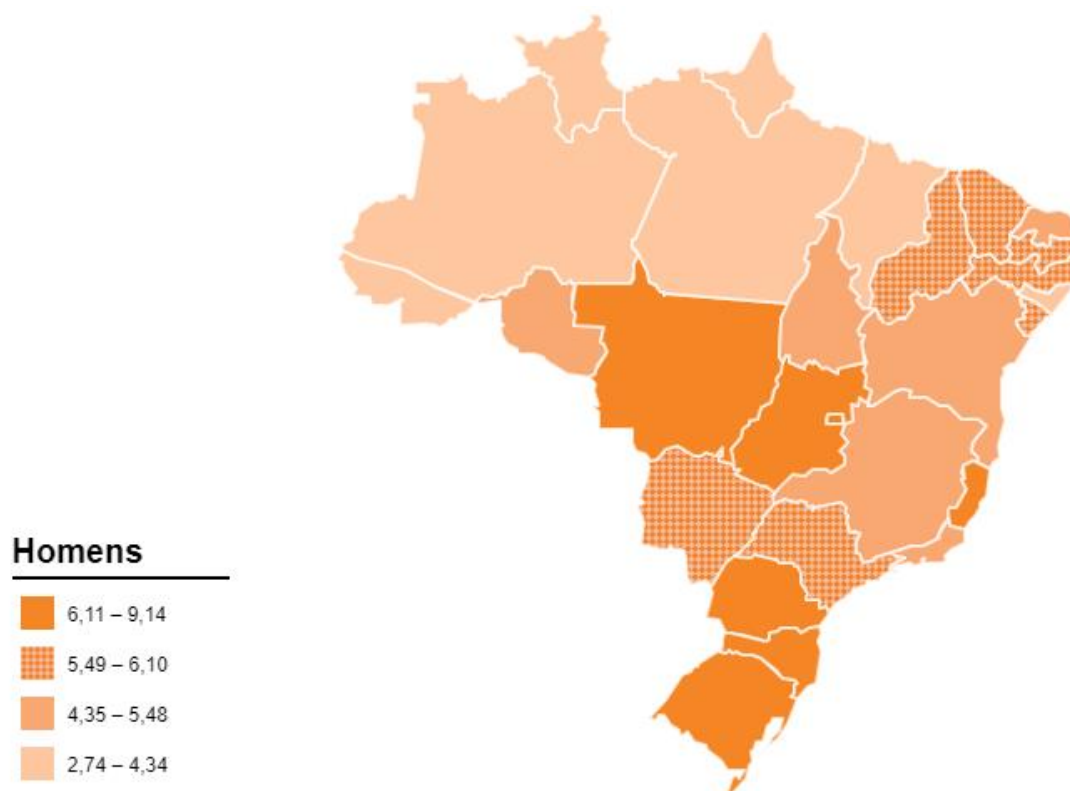


Figura 1. Representação espacial das taxas ajustadas^a de incidência por 100 mil homens, estimadas para o ano de 2018, segundo Unidade da Federação para neoplasia maligna do SNC. ^aPopulação padrão mundial (1960). (Fonte: INCA).

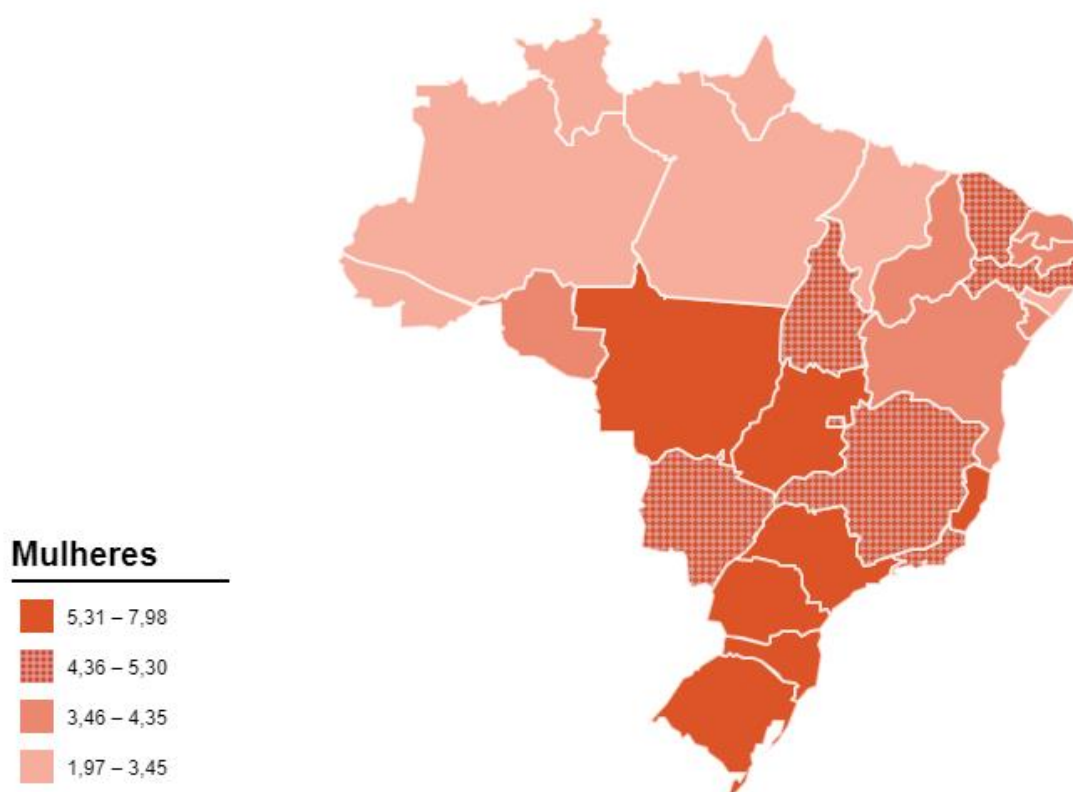


Figura 2. Representação espacial das taxas ajustadas^a de incidência por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2018, segundo Unidade da Federação para neoplasia maligna do SNC. ^a População padrão mundial (1960). (Fonte: INCA).

Gliomas são tumores oriundos das células da glia no SNC. Segundo a nova classificação realizada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), os gliomas difusos são assim chamados, pois são consideradas duas características principais: o tipo celular (ex.: astrocitoma, oligodendroglioma, ou oligoastrocitoma) e o grau de malignidade (ex.: grau II até IV). Essa abordagem separa de forma mais nítida os gliomas difusos dos astrocitomas que possuem uma maior limitação nas margens de crescimento, sem alteração no gene *IDH*, mas com determinadas mutações no gene *BRAF* (ex.: astrocitoma pilocítico, xantoastrocitoma pleomórfico e astrocitoma subependimário de células gigantes) (Louis e cols., 2016d).

De acordo com a última classificação da OMS, estabelecida em 2016, os gliomas são classificados de acordo com as suas características histológicas em diferentes graus, que variam de I a IV. Os gliomas de grau I são aqueles tumores que apresentam um baixo potencial proliferativo e uma possibilidade de cura após intervenção cirúrgica. Os tumores classificados como grau II são usualmente infiltrativos e muitas vezes recorrentes, mesmo tendo um baixo índice de proliferação. Alguns deles, contudo, tendem a progredir para tumores com maior grau de malignidade. Os tumores grau III são aqueles em que claramente se identifica o seu grau de malignidade, havendo atipia nuclear e atividade mitótica. As lesões classificadas como grau IV são aquelas em que se observa grande atividade mitótica, proliferação vascular e necrose. Um exemplo é o glioblastoma (GBM), anteriormente chamado de glioblastoma multiforme (Louis e cols., 2016d).

1.1. Glioblastoma

Os GBMs são os tumores primários do cérebro mais malignos e também os mais frequentes dentre os gliomas difusos, afetando, principalmente, indivíduos adultos. Eles estão geralmente localizados, nos hemisférios cerebrais, mas também podem ser encontrados em outros locais do cérebro e da medula espinhal (Kleihues e cols., 2007). Caracterizam-se pela proliferação vascular e pela necrose, podendo ser refratários a diferentes tratamentos, como a radioterapia e a quimioterapia (Altieri e cols., 2014).

1.1.1 Histórico

A primeira descrição que se tem registro do GBM foi realizada em 1863 pelo patologista alemão Rudolf Virchow que, utilizando técnicas macroscópicas e microscópicas, caracterizou-o como um tumor originário das células gliais. Em meados de 1920, após o episódio protagonizado pelo neurocirurgião Walter Dandy, o qual ficou conhecido por sua tentativa de remover todo um hemisfério cerebral de dois pacientes com GBM que estavam em coma, evidenciou-se o caráter extremamente invasivo deste tumor, uma vez que estes pacientes evoluíram rapidamente para o óbito. No ano de 1926, os neurocirurgiões Harvey Cushing e Percival Bailey criaram o termo “glioblastoma”. A partir deste momento, eles observaram que os gliomas não possuíam características microscópicas similares e que a evolução clínica era diferente entre os pacientes. Dessa maneira, realizou-se a classificação dos mesmos em mais de 13 tipos distintos (Agnihotri e cols., 2013). O neuropatologista alemão Joachim Scherer, na década de 40, além de realizar a descrição das diversas características observadas entre os gliomas, reportou os conceitos que foram base para dividir os GBM em primários e secundários, seguindo suas características histológicas e clínicas (Scherer, 1940). A partir desse momento, diversas descobertas, tanto clínicas como laboratoriais, permitiram a discussão de novas formas de classificar esse tumor, ajudando no diagnóstico e no tratamento dos pacientes. Hoje, a classificação atual dos tumores do SNC é a de 2016, que foi descrita pela OMS (Louis e cols., 2016a).

1.1.2. Epidemiologia, achados clínicos, diagnóstico e fatores de risco

No período de 2009 a 2013, os estudos realizados pelo *CBTRUS* (*Central Brain Tumor Registry of the United States*) demonstraram que o GBM era o terceiro tumor primário mais frequente do cérebro (14,9%) (Figura 3) e a neoplasia cerebral maligna mais frequente (46,6%) nos EUA (Figura 4). Além disso, dentre os gliomas, o GBM correspondia a mais da metade dos diagnósticos (55,4%), com uma incidência de 3,2 casos para cada 100.000 indivíduos (Figura 5) (Ostrom e cols., 2016).

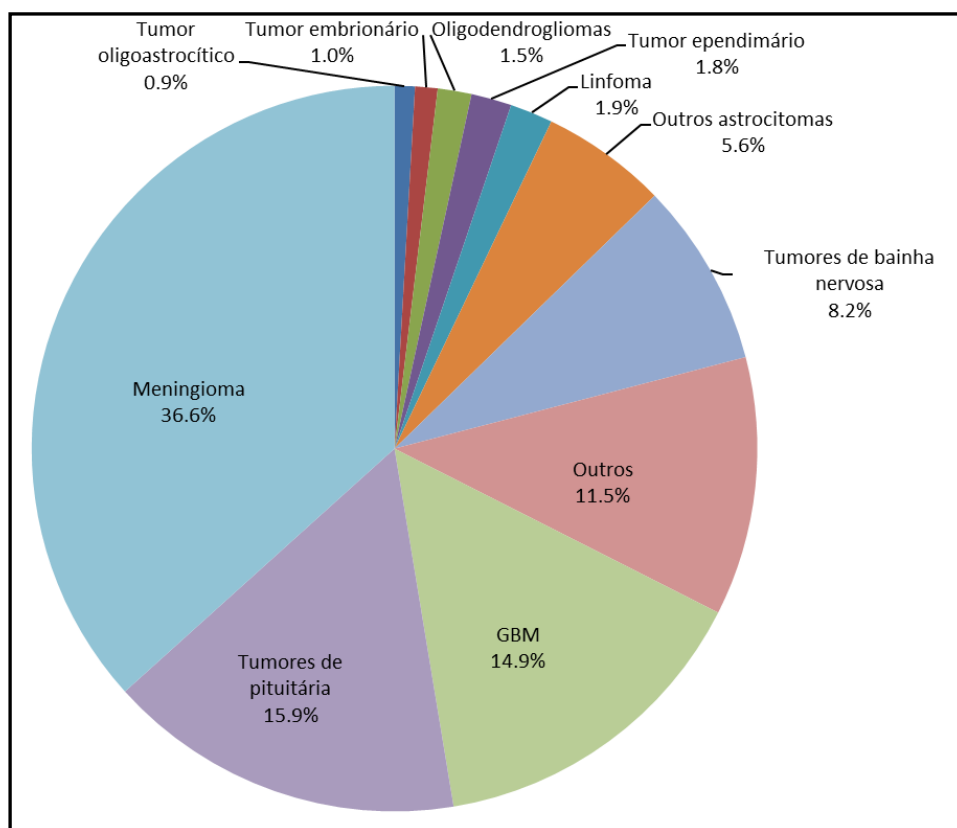


Figura 3. Distribuição de todos os tumores cerebrais primários e de outras neoplasias do SNC agrupados de acordo com a sua histologia (*CBTRUS* 2009-2013) (adaptado de Ostrom e cols., 2016).

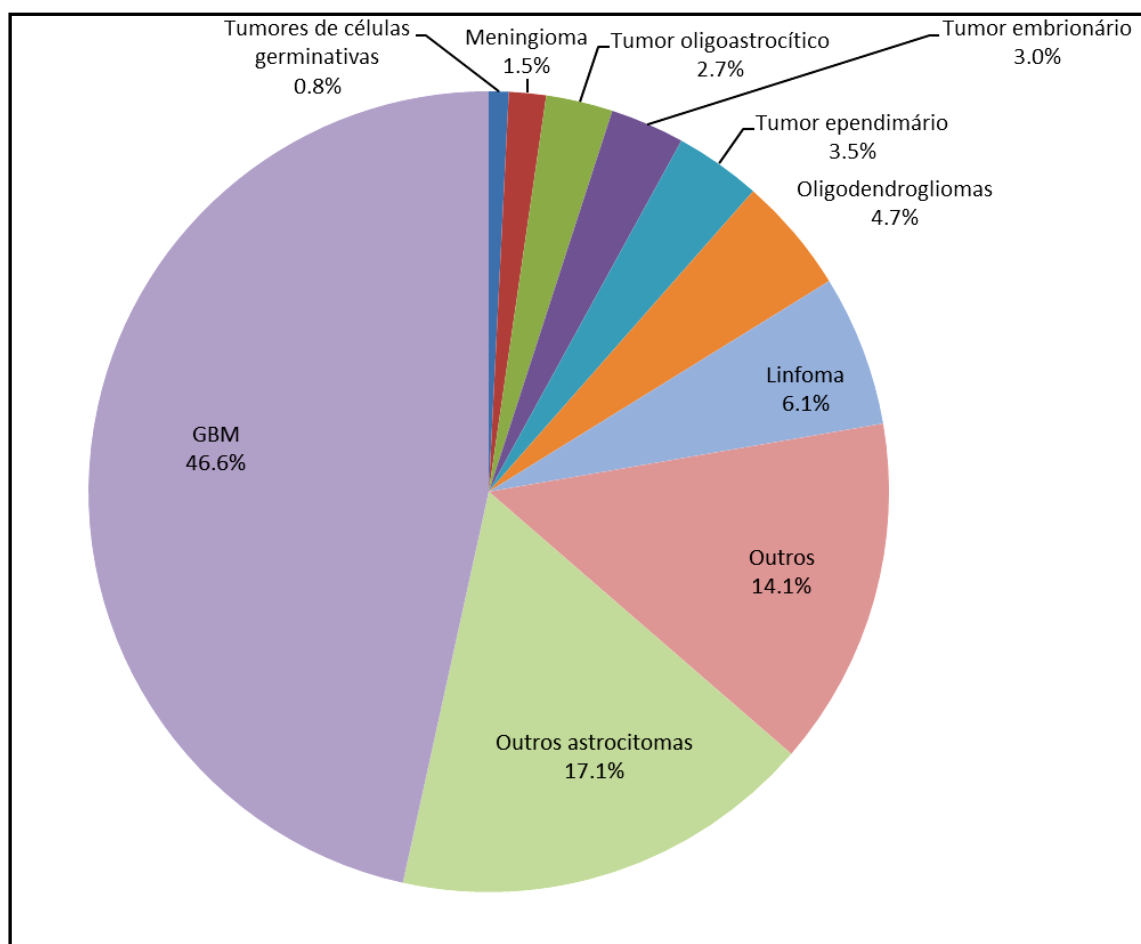


Figura 4. Distribuição dos tumores malignos cerebrais primários e de outras neoplasias do SNC agrupados de acordo com a sua histologia (CBTRUS 2009-2013) (adaptado de Ostrom e cols., 2016).

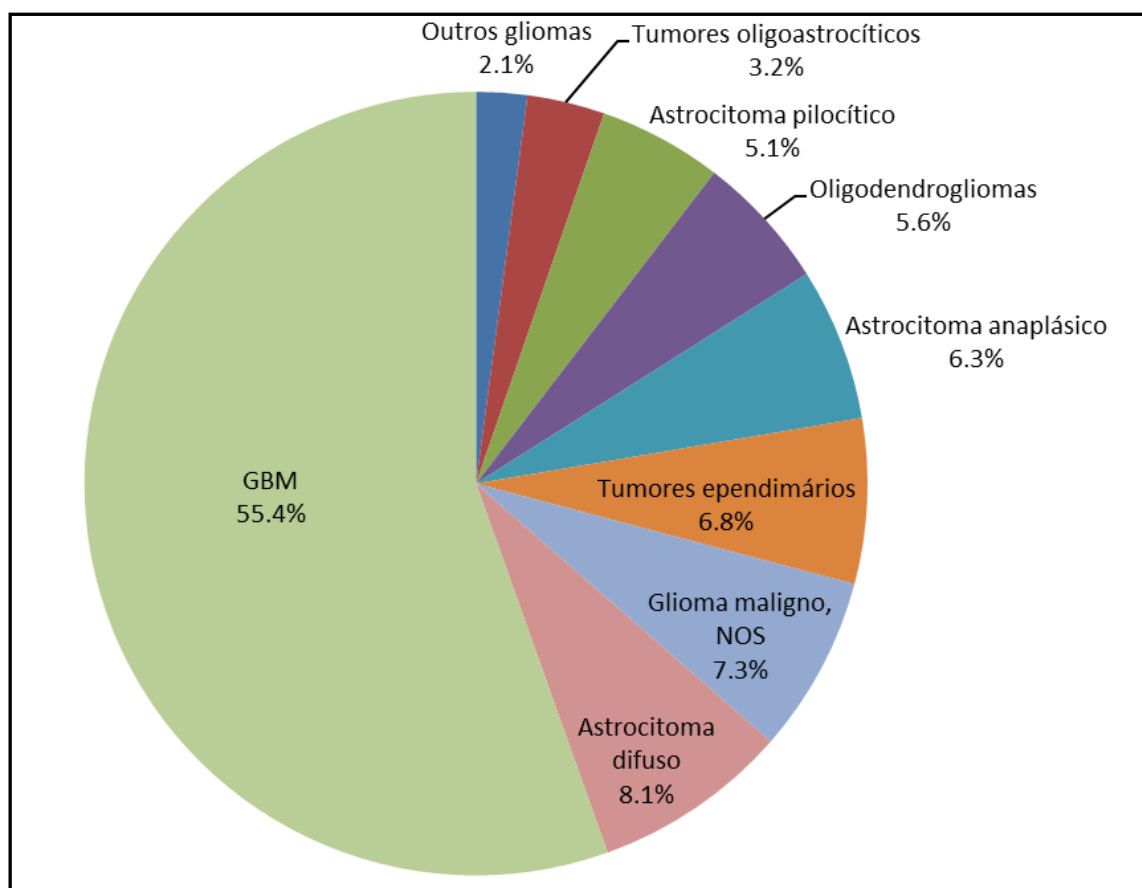


Figura 5. Distribuição dos gliomas agrupados de acordo com os seus subtipos histológicos (CBTRUS 2009-2013) (adaptado de Ostrom e cols., 2016).

A sobrevida de pacientes com GBM é extremamente pobre, apesar dos avanços no que diz respeito ao diagnóstico e ao tratamento (cirurgia, radioterapia e quimioterapia). Os estudos vêm demonstrando uma sobrevida média que varia de 8,8 a 17 meses (Korshunov e cols., 2005; Omuro e DeAngelis, 2013; Altieri e cols., 2014; Mariniello e cols., 2014; Toledo e cols., 2015; Fekete e cols., 2016) e taxas de sobrevida após 1 ano que oscilam de 28 a 68% e após 5 anos de 2,9 a 14% (Ohgaki e cols., 2004; Korshunov e cols., 2005; Omuro e DeAngelis 2013; Toledo e cols., 2015). A maioria dos estudos clínicos descreve que pacientes mais jovens são os que apresentam o melhor prognóstico (Ohgaki e cols., 2004; Ostrom e cols., 2014).

O GBM afeta principalmente adultos, especialmente entre 55 e 85 anos. Quando se avalia a distribuição quanto ao sexo, observa-se que ele é 1,6 vezes mais frequente em indivíduos do sexo masculino (Mohile, 2016; Louis e cols., 2016c).

Os GBMs desenvolvem-se rapidamente, e os sintomas dependem, principalmente, da localização e do volume tumoral, podendo se manifestar como déficit neurológico focal (ex.: hemiparesia e afasia) associados ou não a um aumento da pressão intracraniana (com cefaleia, náusea e vômitos) (Louis e cols., 2016c). Incontinência e distúrbios de equilíbrio também podem estar presentes e usualmente estão associados com tumores de grande volume. Por outro lado, sinais focais, tais como hemiparesia, perda do sensório e perda de campo visual, estão geralmente associados à localização do tumor. A cefaleia é um dos sintomas clínicos mais frequentes e está presente em aproximadamente 50% dos pacientes no momento do diagnóstico. Ela usualmente se apresenta com um padrão não específico de dor. Desta maneira, o início deste sintoma, previamente inexistente, em pacientes com idade acima dos 50 anos de idade, deveria ser considerado um sinal de alerta, que apontaria para a necessidade de maiores investigações e exclusão da existência de um possível tumor cerebral. Além disso, dificuldade cognitiva e mudança de personalidade podem estar presentes, e serem confundidas com doenças psiquiátricas, especialmente devido à faixa etária (que comumente é de idosos) (Omuro e DeAngelis, 2013), o que pode levar a um diagnóstico mais tardio. Crises convulsivas são descritas em 20 a 76% dos pacientes, apesar da maioria dos estudos relatar esse sintoma em aproximadamente 50% dos casos. O paciente também pode ter sinais e sintomas agudos que podem ser confundidos com

aqueles de um acidente vascular cerebral (AVC) (Omuro e DeAngelis, 2013; Toledo e cols., 2015).

O GBM localiza-se, geralmente, na substância branca subcortical dos hemisférios cerebrais. As regiões mais afetadas são os lobos temporal (31%), parietal (24%), frontal (23%) e occipital (16%), sendo a combinação fronto-temporal bem típica (Louis e cols., 2016c).

A ressonância nuclear magnética (RNM) de encéfalo com ou sem contraste é o exame comumente utilizado na suspeita de um tumor cerebral. A utilização de contraste, como o gadolínio, facilita o diagnóstico, tornando possível diferenciar as áreas periféricas hipercelulares das centrais do tumor, que são necróticas (Figura 6) (Omuro e DeAngelis, 2013).

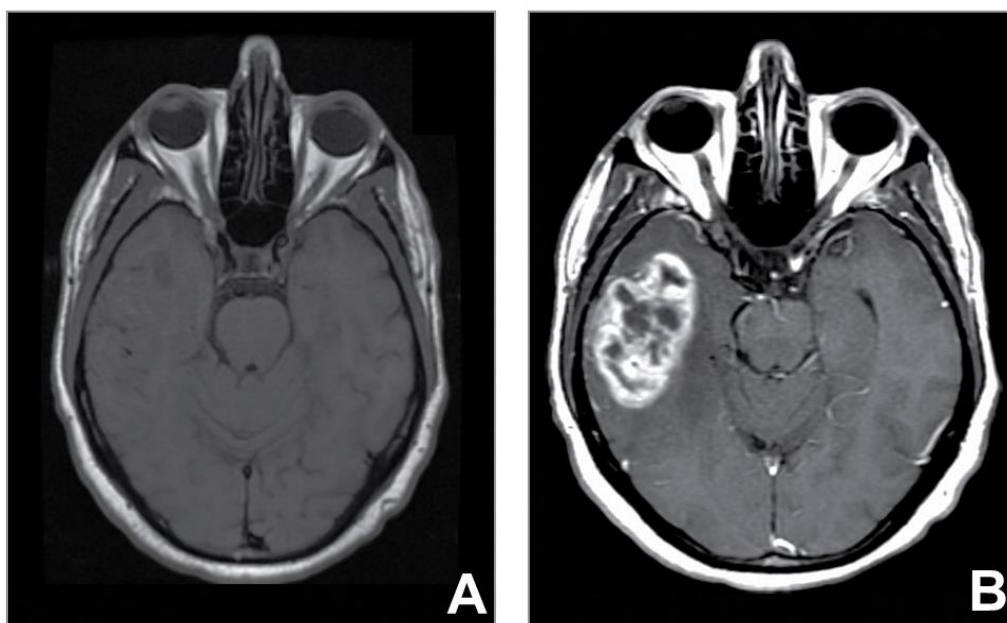


Figura 6. Ressonância nuclear magnética de encéfalo de um paciente com GBM: (A) sem contraste, com delimitação pobre da lesão, e (B) com contraste, onde se pode evidenciar a heterogeneidade do tumor, com a lesão necrótica estando bem marcada (Retirado de Omuro e DeAngelis, 2013).

A confirmação do diagnóstico pela imagem é realizada posteriormente através da imunohistoquímica, com a detecção da presença da proteína glial fibrilar ácida (GFAP). Esta se caracteriza por ser um filamento proteico encontrado em astrócitos maduros e é considerado o marcador mais específico dos astrócitos, tanto em condições normais como de doença. O aumento da malignidade de tumores de origem astrocítica está associado à perda da expressão da GFAP; porém, ela não define a progressão e o desenvolvimento tumoral (Urbańska e cols., 2014).

Apesar de não haver um consenso sobre os fatores de risco para o desenvolvimento dos tumores cerebrais, alguns estudos tentaram mostrar a associação deles com certas causas. Aproximadamente 5% dos pacientes com tumor cerebral, especialmente gliomas, podem apresentar uma história familiar da mesma neoplasia. Nesses casos, o desenvolvimento do tumor pode ser atribuído a algumas síndromes, tais como síndrome de Turcot, a síndrome de Li-Fraumeni, a síndrome de Cowden, as neurofibromatoses do tipo 1 e 2, a esclerose tuberosa, a schwannomatose familiar, o retinoblastoma e a encondromatose múltipla. Estudos sugerem que exista uma origem genética para estes casos familiares, já que a recorrência se dá, principalmente, em parentes de primeiro grau (Malmer e cols., 2003; Fisher e cols., 2007; Bondy e cols., 2008; Omuro e DeAngelis, 2013).

A radiação ionizante é considerada um fator de risco ambiental para o desenvolvimento dos gliomas. Essa associação foi demonstrada em estudos com crianças que receberam radiação no crânio para o tratamento de câncer, ou *Tinea capitis*, e em indivíduos expostos a bombas atômicas e em testes de armas nucleares (Omuro e DeAngelis, 2013). Por outro lado, a relação entre a

exposição a campos eletromagnéticos emitidos por telefones celulares e o desenvolvimento de tumores cerebrais, especialmente gliomas, ainda é contraditória. Alguns estudos demonstram a associação entre a exposição e o desenvolvimento do tumor (Hardell e cols., 2013; Hardell e Carlberg, 2015), enquanto outros mostram uma diminuição da sobrevida em pacientes com GBM que fazem uso em longo prazo de telefones celulares (Carlberg e Hardell, 2014). No entanto, alguns estudos concluíram que não existe um aumento do risco de desenvolvimento de tumores cerebrais em indivíduos que fazem uso de telefones celulares (Bondy e cols., 2008). Sendo assim, os autores sugerem que mais estudos envolvendo estas variáveis são ainda necessários para que se possa avaliar o risco do uso prolongado de telefones celulares, uma vez que esse tipo de tecnologia vem sofrendo mudanças, e seu uso é cada vez mais comum.

Os GBMs podem ser ainda classificados em primários e secundários tomando como base as características clínicas do paciente. Os GBMs primários são aqueles que ocorrem *de novo* (ou seja, sem uma lesão pré-existente) e são os mais frequentes (>90% dos tumores). Este subtipo se desenvolve rapidamente (menos de 3 meses) e afeta geralmente pacientes mais idosos (com mais de 60 anos de idade). Por outro lado, os GBMs secundários ocorrem a partir da evolução de um glioma de menor grau, como um astrocitoma difuso ou um astrocitoma anaplásico, sendo mais raros (<10% dos casos). Eles se desenvolvem principalmente em pacientes mais jovens (média de 45 anos). Esses subtipos constituem entidades distintas e se desenvolvem a partir de diferentes padrões genéticos (Ohgaki e Kleihues, 2013).

A partir de 2016, uma nova nomenclatura e classificação foram propostas pela OMS. Nessa nova classificação, parâmetros moleculares são utilizados para realizar a distinção dos diversos tumores do SNC, dentre eles o GBM. A nova classificação é realizada dividindo os GBMs em *IDH-selvagem* (aproximadamente 90% dos casos), que correspondem mais frequentemente aos casos clinicamente classificados como primários; *IDH-mutante* (cerca de 10% dos casos), que consistem nos GBMs secundários; e NOS, que são os tumores em que a avaliação genética não foi possível de ser realizada, ou foi inconclusiva (Quadro 1) (Louis e cols., 2016a,b).

Quadro 1. Características dos glioblastomas *IDH-selvagem* e *IDH-mutante* (Adaptado de Ohgaki e cols., 2016).

	GBM <i>IDH-selvagem</i>	GBM <i>IDH-mutante</i>
Sinônimo	GBM primário	GBM secundário
Lesão precursora	Não identificável, desenvolve-se <i>de novo</i>	Astrocitoma difuso Astrocitoma anaplásico
Proporção dos GBM	~90%	~10%
Idade média ao diagnóstico	~62 anos	~44 anos
História clínica média	4 meses	15 meses
Razão sexo masculino:feminino	1,42:1	1,05:1
Sobrevida média		
Cirurgia + radioterapia	9,9 meses	24 meses
Cirurgia + radioterapia + quimioterapia	15 meses	31 meses
Necrose	Extensa	Limitada

1.1.3. Características anatomopatológicas e origem dos glioblastomas

Do ponto de vista macroscópico, os GBMs são pouco delineados. Eles apresentam uma massa periférica acinzentada e áreas centrais amareladas, características da necrose. A área necrótica central pode ocupar até 80% do

tumor. Hemorragias tumorais extensas podem ocorrer e levar a sintomas de um AVC, que podem ser o primeiro sinal clínico do GBM. Cistos macroscópicos, quando presentes, contêm um líquido turvo e representam o tecido tumoral necrótico e liquefeito (Kleihues e cols., 2007).

Os GBMs podem invadir estruturas adjacentes do cérebro, mas dificilmente o espaço subaracnóide, ou mesmo metastatizar através do líquido cefalorraquidiano. Distribuição hematogênica para tecidos extraneurais é rara em pacientes sem história de intervenção cirúrgica (Kleihues e cols., 2007).

Como o próprio sinônimo “glioblastoma multiforme” sugere, a histopatologia deste tumor é extremamente variável. O diagnóstico do GBM baseia-se no padrão tecidual, com a evidência de células gliais anaplásicas, de atividade mitótica e de proliferação vascular e/ou necrose (Kleihues e cols., 2007).

Algumas lesões podem demonstrar um alto nível de polimorfismo celular e nuclear com muitas células gigantes multinucleadas. A natureza astrocítica nem sempre pode ser evidenciada nesse tumor, uma vez que alguns possuem células pouco diferenciadas. Outro fator importante é que o GBM apresenta heterogeneidade intratumoral, dificultando o diagnóstico a partir de amostras obtidas por biópsia estereotáxica (Louis e cols., 2016c).

O GBM é um tipo tumoral muito vascularizado e este achado pode ocorrer por meio de diferentes mecanismos, tais como adoção de vasos pré-existentes pela migração das células tumorais, angiogênese e vasculogênese pela migração das células da medula óssea do sangue periférico para o espaço perivascular (Louis e cols., 2016c).

A hipóxia é considerada o principal fator para indução da angiogênese e leva ao acúmulo de HIF1. Isto leva à ativação de genes que codificam proteínas que regulam a angiogênese (ex.: fator de crescimento vascular endotelial-VEGF, eritropoetina e IL8) (Louis e cols., 2016c).

A necrose é a principal característica do GBM e sua presença é um fator preditor do comportamento agressivo dentre os tumores astrocíticos. A visualização de grandes áreas de necrose pela RNM pode estar associada a um prognóstico pobre. Ao microscópio, as células necróticas dos gliomas aparecem de forma clara e pouco definida. Além disso, a necrose pode se apresentar no padrão “pseudopaliçada”: focos de necrose irregulares, rodeados por células fusiformes orientadas radialmente (Figura 7). Este último padrão é característico dos GBMs (Louis e cols., 2016c).

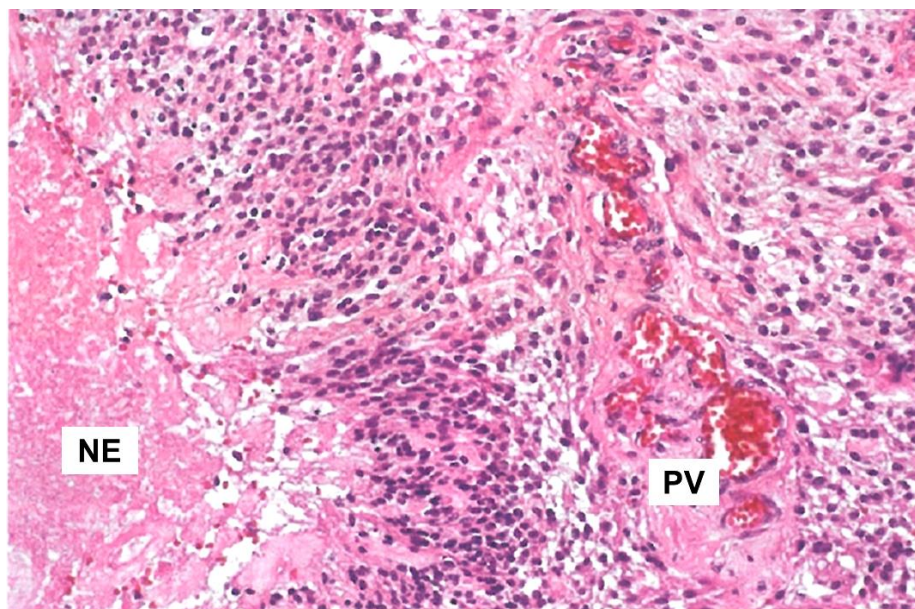


Figura 7. Imagem histológica de um GBM mostrando um foco de necrose isquêmica (NE) rodeado por células tumorais paliçadas e a proliferação vascular (PV) (Adaptado de Louis e cols., 2016c).

A origem celular dos GBMs ainda é desconhecida e controversa. Por muito tempo, acreditou-se que eles eram originários de células astrocíticas que sofriam desdiferenciação após a transformação tumoral. A ideia de que os tumores se originam de um precursor bipotencial ou de uma célula primordial, como uma célula tronco neural é recente. Esse fato se mantém uma vez que estas células estão localizadas em regiões onde geralmente os GBMs se desenvolvem. As “células de propagação dos tumores cerebrais” (*brain cancer-propagating cells*), ou *BCPCs*, representam uma pequena parcela das células tumorais, mas possuem a capacidade de auto-renovação e podem ser responsáveis pela regulação e pelo crescimento tumoral (Figura 8) (Van Meir e cols., 2010; Louis e cols., 2016c).

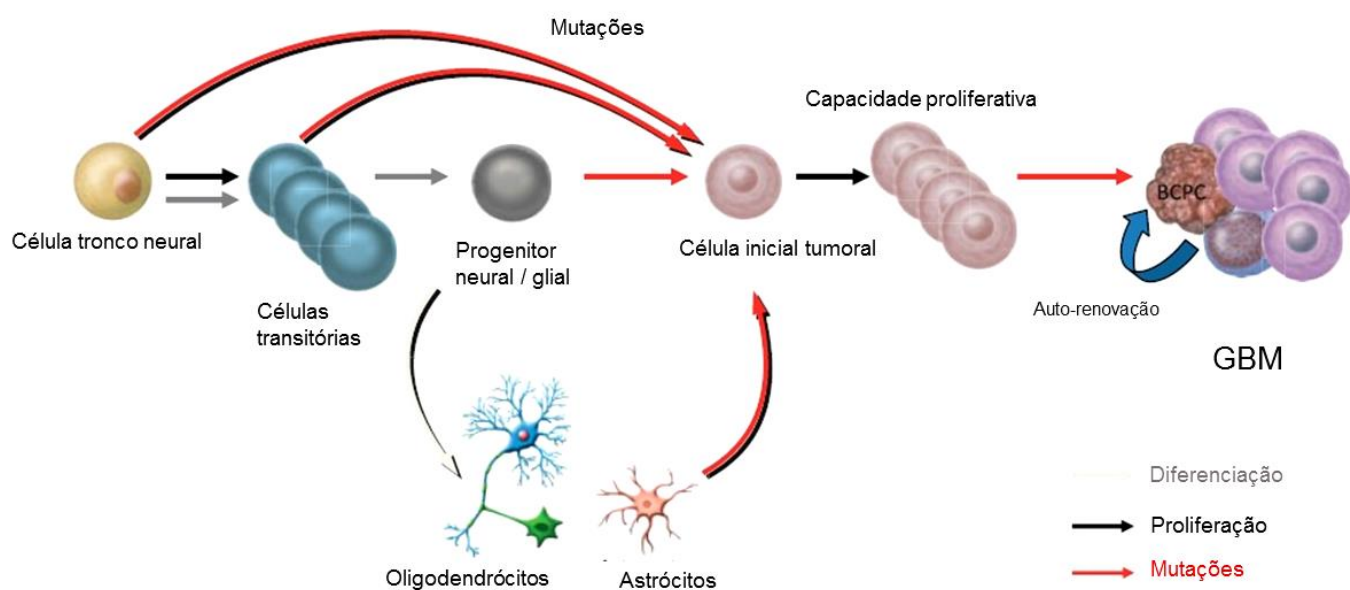


Figura 8. Possível relação entre as *BCPCs* e a formação do glioblastoma. Durante a diferenciação normal do SNC, as células tronco neurais irão se diferenciar em células progenitoras neurais ou gliais (oligodendrócitos e/ou os astrócitos), mas não ambas. As

mutações que geram o GBM podem ocorrer em todos os níveis desta linhagem e podem produzir as células iniciadoras tumorais (Adaptado de Van Meir e cols., 2010).

As *BCPCs* possuem as mesmas características que as células tronco neurais, assim como a expressão de marcadores das células tronco neurais (Nestina e CD133), de auto-renovação, proliferação e diferenciação em neurônios, astrócitos e oligodendrócitos. A confirmação dessas características se deu pelo fato de que estas células, retiradas dos GBMs humanos, são capazes de reproduzir os tumores em animais, após isolamento e transplante (Van Meir e cols., 2010).

1.1.4. Marcadores genéticos e classificação molecular dos glioblastomas

1.1.4.1. Marcadores genéticos

Os mecanismos do desenvolvimento dos tumores ainda não foram totalmente elucidados. O câncer é considerado um conjunto de doenças envolvendo rearranjos gênicos, amplificações, mutações e deleções em diversos genes envolvidos direta ou indiretamente na proliferação celular (Jovčevska e cols., 2013). Tumores em geral são originados por instabilidade genética e alterações heterogêneas, fazendo com que as células tenham a sua capacidade proliferativa aumentada e desordenada. Novos clones surgem e aqueles que melhor se adaptarem ao ambiente apresentarão maior capacidade proliferativa, ocorrendo de forma competitiva. Com isso, as células perdem a sua capacidade de diferenciação, essa perda e regressão de estágio são também conhecidas como anaplasia. Após isso, a progressão do tumor leva a

novas alterações e, a partir disso, este poderá ser classificado nos mais variados estágios da doença (Schiffer, 2006).

O GBM é um tumor caracterizado por ser muito heterogêneo. Esta heterogeneidade tumoral pode ser observada nos seus padrões histológicos, nas suas alterações genéticas e na sua expressão gênica (Appin e cols., 2013). As anormalidades genéticas mais conhecidas e que são potenciais marcadores de predição e de diagnóstico são: mutações no gene *MGMT*; perda da heterozigotidade (LOH) de 1p, de 19q e de 10q; mutações no *IDH*, no *EGFR*, no *VEGF*, no *p53*, no *PTEN*, no *p16^{INK4a}*, no citocromo c oxidase e na telomerase humana (McNamara e cols., 2013).

O gene *MGMT* codifica a enzima O(6)-metilguanina-DNA-metiltransferase, a qual é responsável pelo reparo do DNA removendo o grupo alquila da posição O6 da guanina (usualmente produzido por agentes alquilantes). As células tumorais com maior atividade do *MGMT* tornam-se resistentes a tratamentos com agentes quimioterápicos alquilantes, uma vez que a enzima é responsável por reverter o efeito da droga. Sabe-se que o silenciamento epigenético realizado pela metilação do promotor deste gene, compromete o reparo do DNA. Dessa maneira, observou-se uma associação de melhor resposta à quimioterapia com agentes alquilantes e uma maior sobrevida dos pacientes em variados estudos realizados com a metilação deste gene (Appin e cols., 2013; McNamara e cols., 2013). A metilação do promotor do *MGMT* pode estar presente em 32 a 68% dos GBMs e em, aproximadamente 75% daqueles do tipo secundário. Sendo assim, a realização de PCR (reação em cadeia da polimerase) metilação-específica pode ter uma

grande importância na definição de prognóstico e no tratamento de pacientes com GBM (Appin e cols., 2013).

Apesar das deleções envolvendo 1p e 19q serem pouco frequentes nos GBMs em geral (<10%), elas parecem ser comuns naqueles com componente oligodendrogial, os quais correspondem a aproximadamente 15% de todos os GBMs. Contudo, a identificação dessas alterações é ainda muita controversa com relação ao seu valor prognóstico (McNamara e cols., 2013).

Deleções envolvendo parte ou todo o braço longo do cromossomo 10 (10q) têm sido descritas como alterações frequentes nos GBMs, demonstrando que a perda de um ou mais genes supressores tumorais localizados em 10q podem ter um papel importante na formação e na progressão do GBM. Um desses genes é o *PTEN* (fosfatase homóloga à tensina), localizado em 10q23, que pode ser encontrado alterado em diversos tipos tumorais (McNamara e cols., 2013). A LOH de 10q vem sendo descrita associada à diminuição da sobrevivência de pacientes com GBM, tendo, dessa forma, implicações diagnósticas (McNamara e cols., 2013). O gene *PTEN* caracteriza-se por ser um supressor tumoral que regula negativamente a via PI3KA/Akt e tem demonstrado ter uma função importante na regulação da apoptose, da proliferação celular e da invasão tumoral. Nos GBMs, a deleção de *PTEN* devido à LOH do cromossomo 10q pode ocorrer em 50 a 70% dos tumores primários e 54 a 63% dos secundários. Por outro lado, a mutação neste gene é descrita como mais rara (14 a 47% dos GBMs primários).

A enzima isocitrato desidrogenase (IDH) cataliza a conversão do isocitrato em α -cetoglutarato dentro do ciclo do ácido cítrico. A IDH1 (localizada no cromossomo 2) e IDH2 (localizada no cromossomo 15) podem estar

envolvidas em diferentes processos metabólicos, como a síntese lipídica, o estresse oxidativo, a transdução de sinal e a respiração oxidativa. Estudos demonstram que mutações envolvendo os genes que codificam essas proteínas podem estar relacionadas a um aumento da sobrevida (McNamara e cols., 2013). Mutações em *IDH1* estão presentes em quase todos os GBMs que evoluíram de um astrocitoma de baixo grau. Dessa maneira, esta alteração pode ser uma característica muito importante na designação dos GBMs secundários (Louis e cols., 2016c).

O *EGFR* (receptor do fator de crescimento epidérmico), localizado no cromossomo 7, é o gene mais frequentemente encontrado de forma amplificada nos GBMs, o que pode estar associada com a superexpressão deste gene (70 a 90% dos GBMs com superexpressão da proteína apresentam amplificação deste gene). A amplificação do gene *EGFR* pode ser observada em aproximadamente 40% dos GBMs primários, mas raramente naqueles secundários, e vem sendo alvo de vários estudos para o desenvolvimento de drogas utilizadas no tratamento deste tumor (Kalman e cols., 2013; McNamara e cols., 2013; Bastien e cols., 2015; Louis e cols., 2016c).

A angiogênese e o seu maior regulador, o fator de crescimento vascular endotelial (*VEGF*), representam importantes alvos terapêuticos no tratamento do GBM. A neovascularização é uma característica importante nos GBMs e os fatores angiogênicos têm uma função importante na progressão do tumor. O *VEGF* é um fator muito importante na angiogênese. Mutações no mesmo são identificadas em até 64% dos GBMs. Estudos descrevem uma forte correlação entre a expressão do *VEGF* e a sobrevida dos pacientes, indicando que o mesmo é um fator prognóstico importante (Altieri e cols., 2014).

O *TP53*, localizado no braço curto do cromossomo 17, é o gene que codifica o supressor tumoral p53. Alguns estudos já descreveram diversas mutações envolvendo o mesmo nos diversos subtipos de GBM. Até o momento, o p53 não parece ser um fator preditivo de prognóstico, mas a observação de diferentes alterações pode ajudar a diferenciar os vários graus tumorais (McNamara e cols., 2013).

A $p16^{INK4a}$ (localizada no cromossomo 9) liga-se à cinase ciclina-dependente 4 e inibe o complexo 4-ciclina cinase ciclina-dependente D1. Este complexo fosforila a proteína retinoblastoma (Rb), codificada pelo gene supressor tumoral *RB*, deixando-a inativa (Figura 9). Deleções ou mutações no gene *RB* são descritas em até 40% dos casos de GBM secundário. A perda da expressão da proteína p16 ocorre em 20 a 57% dos GBMs (McNamara e cols., 2013).

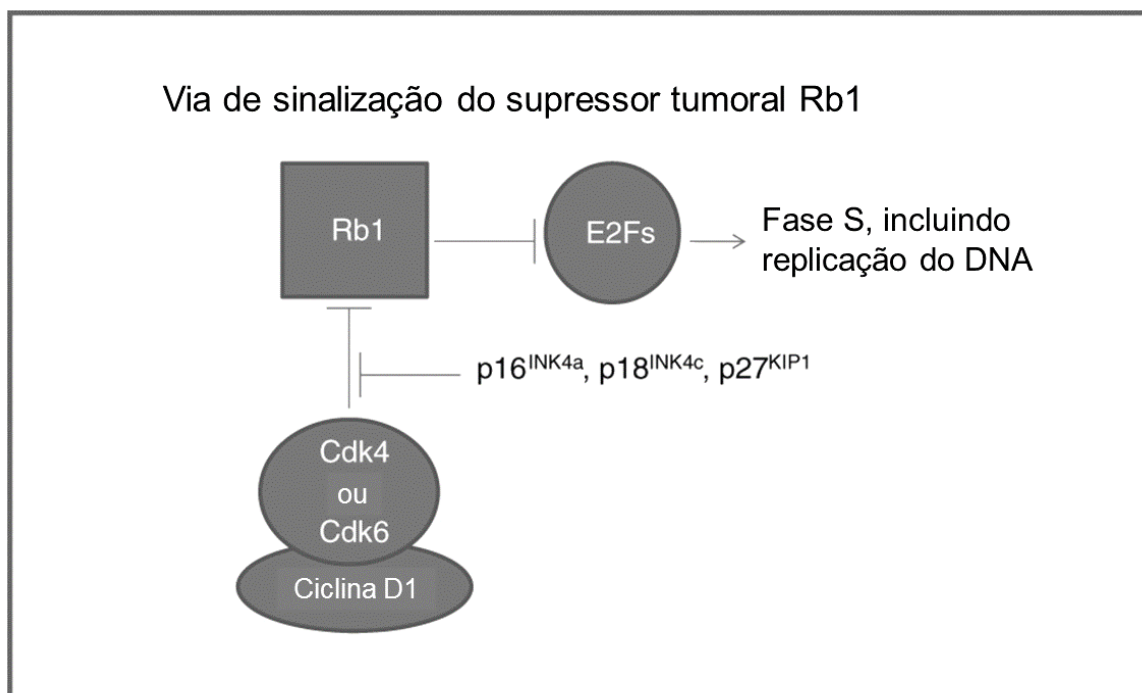


Figura 9. Esquema mostrando a via de sinalização de *Rb1*. Na ausência de sinal para indução de crescimento celular, a proteína Rb1 evita que a célula entre em fase S, pela inibição do fator de transcrição E2F. Se Rb1 é fosforilada pelas cinases ciclina-dependente, E2F passa a ativar os fatores de crescimento celular (Adaptado de Tang e cols., 2012).

A citocromo c oxidase (CcO) é uma enzima da cadeia respiratória mitocondrial. Ela é responsável por catalisar a transferência de elétrons do citocromo c para o oxigênio. Estudos vêm demonstrando que uma atividade aumentada da citocromo c oxidase é um fator preditivo de mau prognóstico em pacientes com GBM (McNamara e cols., 2013).

Sabe-se que a telomerase humana é responsável pela manutenção do DNA telomérico dos cromossomos e possui um importante papel na oncogênese. Estudos demonstram que uma alta atividade da telomerase e altos

níveis de mRNA da telomerase transcriptase reversa humana (hTERT) são fatores de mau prognóstico em pacientes com GBM (McNamara e cols., 2013).

Além desses marcadores genéticos descritos acima, existem estudos que demonstram a importância da identificação de novos marcadores moleculares nos GBMs. Mutações envolvendo o gene *BRAF* ativam a via de sinalização MAP, estimulando o crescimento celular. A $BRAF^{V600E}$ [mutação por substituição de um aminoácido na posição 600, no caso uma valina (V) por um ácido glutâmico (E)] pode estar presente em até 5% dos GBMs. Além disso, o gene do receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas alfa (*PDGFRA*) pode estar amplificado em diversos tipos de glioma, incluindo o GBM, e estar relacionado ou não à agressividade do tumor (Aldape e cols., 2015).

1.1.4.2. Classificação molecular

O diagnóstico dos tumores cerebrais baseia-se, principalmente, nos achados clínico-patológicos. No entanto, diversos estudos que buscam uma caracterização genética dos tumores vêm tendo muito destaque, uma vez que esses achados podem ajudar a os dividir em subgrupos que podem apresentar diferentes comportamentos, evolução e resposta a tratamentos específicos (Van Meir e cols., 2010). A partir dessa visão, novas formas de classificação dos GBMs vêm sendo sugeridas, sendo que a descrita por Verhaak e cols. (2010) é discutida ainda até hoje. Essa classificação molecular dos GBMs baseia-se em 4 subtipos: clássico, mesenquimal, proneural e neural (Figura 10).

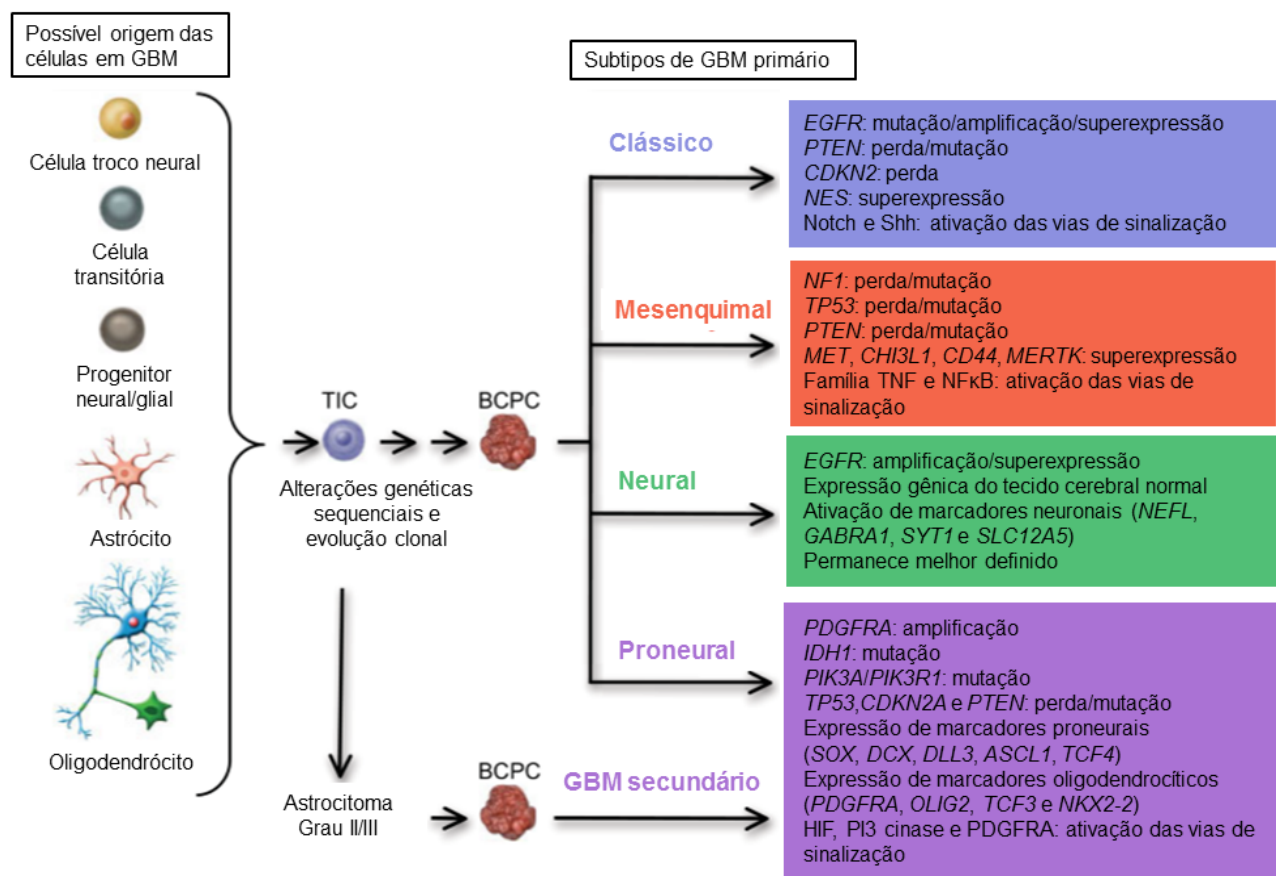


Figura 10. Sequência de modificações genéticas envolvidas na patogênese dos diferentes tipos de GBM. Algumas células no cérebro normal sofrem alterações genéticas que levam a uma população de iniciação tumoral (TICs). Logo depois, estas células acumulam modificações genéticas e epigenéticas e se transformam em células cerebrais propagadoras de câncer (BCPC) (Adaptado de Van Meir e cols., 2010).

A versão clássica caracteriza-se pelo ganho no cromossomo 7 juntamente com a perda do cromossomo 10. Além disso, a amplificação do gene *EGFR* pode ser observada em até 97% dos GBMs dentro dessa classificação, além da perda do *PTEN* e do *CDKN2A*. Alterações nos genes *TP53*, *NF1*, *PDGFRA* ou *IDH1* são menos observadas. O GBM clássico responde bem à radioterapia e à quimioterapia, o que provavelmente pode ser

explicado porque a maioria ainda apresenta atividade do *p53* contra o dano ao DNA (Verhaak e cols., 2010).

O subtipo mesenquimal apresenta deleção em hemizigose na região 17q11.2, a qual contém o gene *NF1*. Ele apresenta superexpressão dos genes *CHI3L1* e *MET* e frequentemente inativação dos genes *NF1* (37%), *TP53* (32%) e *PTEN* (32%). Este subgrupo de GBMs responde à quimioterapia e à radioterapias mais agressivas, além de ter resposta aos inibidores da Ras, da PI3K e da angiogênese (Verhaak e cols., 2010).

O terceiro subtipo, chamado de “proneural”, é o mais associado com a idade dos pacientes, representando o grupo dos pacientes mais jovens. Com relação às alterações, pode-se observar um alto nível de expressão de genes do desenvolvimento oligodendrocítico (*PDGFRA*, *OLIG2*, *TCF3* e *NKX2-2*) e do desenvolvimento proneural (*SOX*, *DCX*, *DLL3*, *ASCL1* e *TCF4*). Pacientes deste subgrupo parecem apresentar maior sobrevida quando comparado com os outros grupos. Porém, estes tumores apresentam menor resposta aos tratamentos agressivos clássicos (Verhaak e cols., 2010).

O subtipo neural tem perfil de expressão gênica similar ao do tecido cerebral normal, com ativação de marcadores neuronais como o *NEFL*, o *GABRA1*, o *SYT1* e o *SLC12A5* (Verhaak e cols., 2010).

No que se refere à classificação atual, definida pela OMS em 2016, observa-se que o grupo dos GBMs classificados como “proneural” pode apresentar, ou não mutações no gene *IDH1*, enquanto os subtipos clássico, mesenquimal e neural não apresentam alterações no mesmo (Figura 11) (Oghaki e cols., 2016).

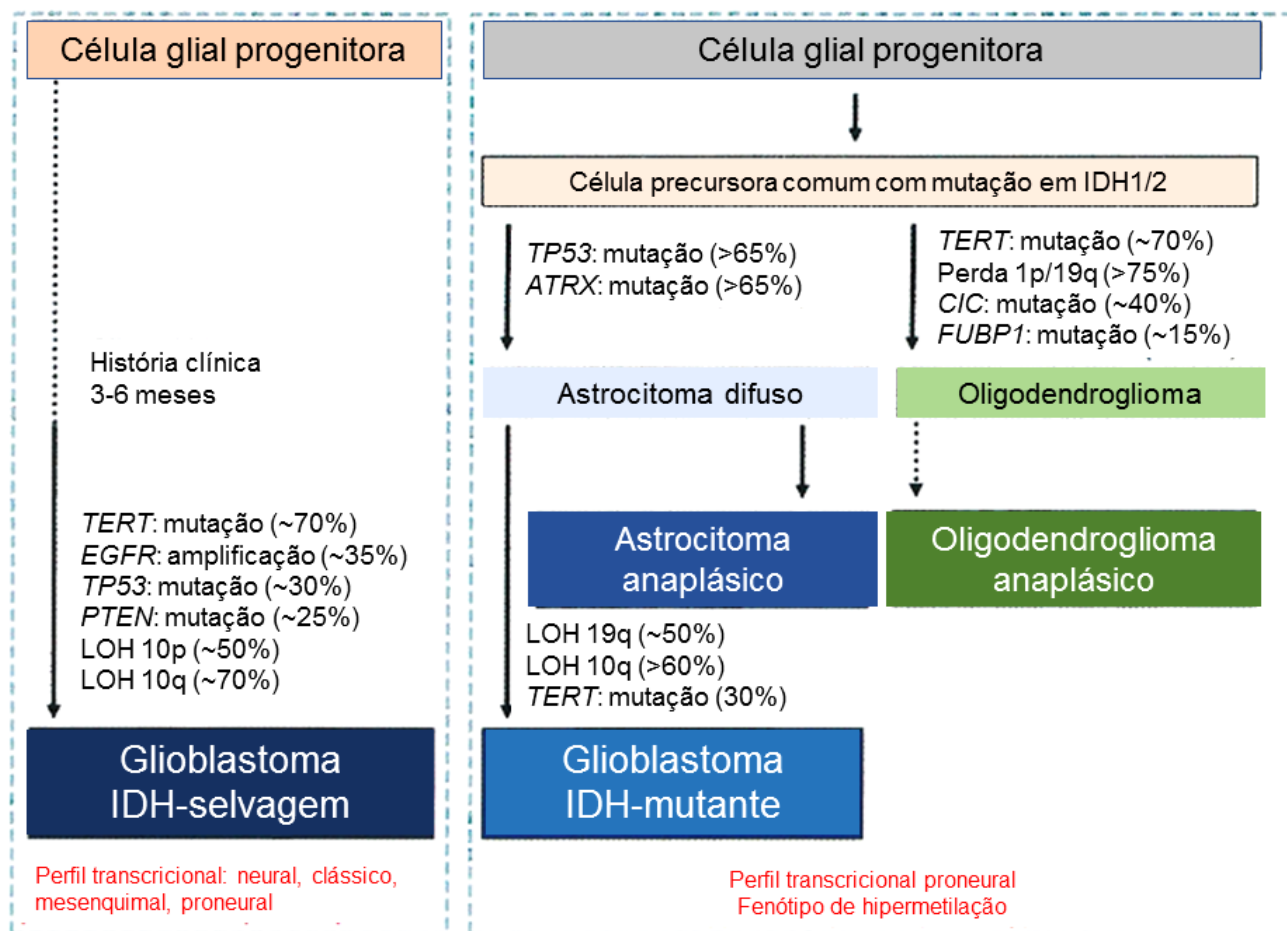


Figura 11. Vias genéticas dos glioblastoma *IDH-selvagem* e *IDH-mutante*, e as possíveis classificações moleculares (Adaptado de Oghaki e cols., 2016).

1.1.5. Padrões de sinalização na patogênese dos glioblastomas

As anormalidades identificadas nas diferentes vias de sinalização celular têm sido identificadas nos diversos tipos tumorais e são alvos do desenvolvimento de diferentes drogas alvo. Os padrões de sinalização usualmente alterados e mais descritos nos GBMs são: *RTK/RAS/PI3K/PTEN*, *TP53/p14^{ARF}/MDM2/MDM4* e *p16^{INK4a}/CDK4/RB1*.

1.1.5.1. *RTK/RAS/PI3K/PTEN*

Os receptores de crescimento são ativados após a ligação com seus respectivos ligantes. Subsequente a essa ativação, a *PI3K* (fosfatidilinositol-3-cinase) é recrutada para a membrana celular. A *PI3K* converte o fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) em PIP3. A PIP3 ativa moléculas efetoras *downstream*, como a AKT, e a proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), resultando na proliferação e na sobrevivência celular. A proteína codificada pelo gene *PTEN* inibe o sinal da PIP3 e consequentemente a proliferação celular (Figura 12) (Kleihues e cols., 2007; Bastien e cols., 2015).

Mutações e amplificações de *PI3K* não são frequentes no GBM (<10%). Por outro lado, mutações envolvendo o gene *PTEN* podem ser observadas em 15 a 40% dos GBMs, quase exclusivamente naqueles classificados como primários (Louis e cols., 2016c).

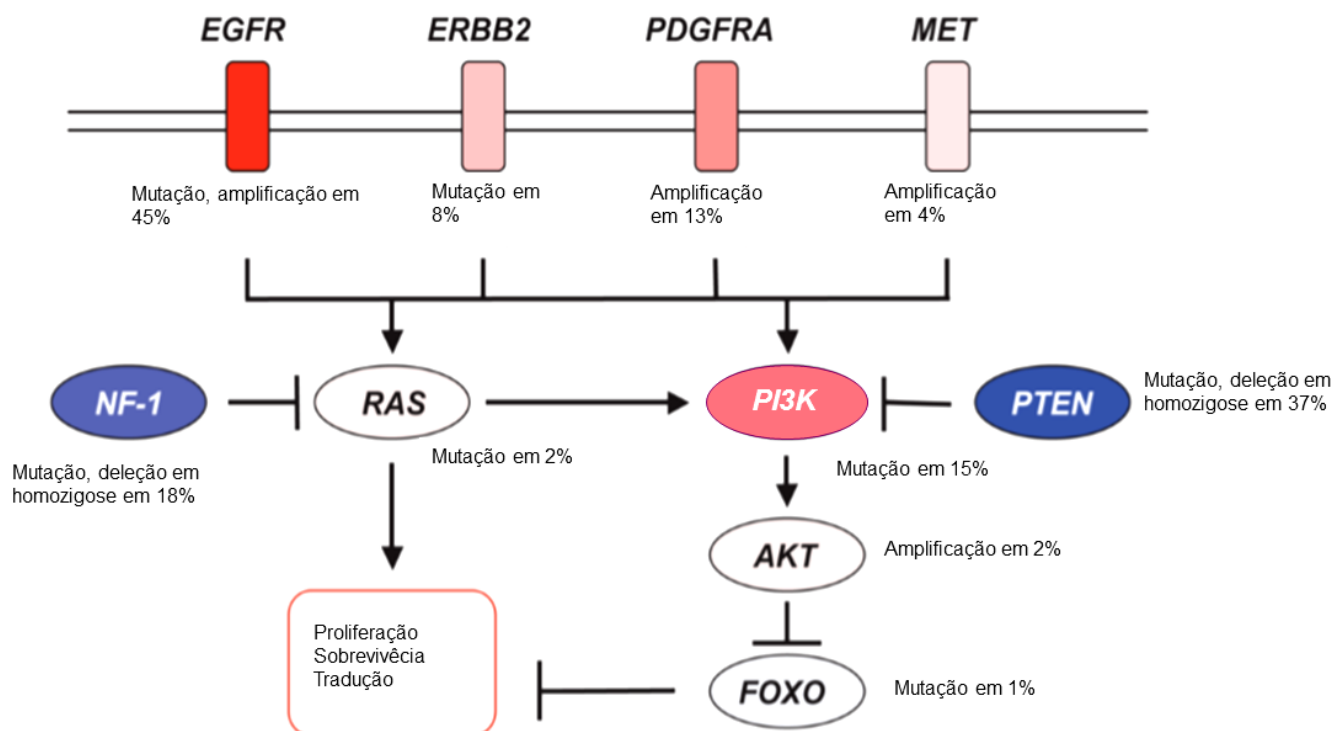


Figura 12. A via de sinalização *RTK/RAS/PI3K/PTEN* pode estar alterada em 80% dos GBMs. As alterações de ativação genética estão representadas em vermelho, sendo os genes mais frequentemente alterados representados em tons mais escuros. As alterações que levam à perda de função estão identificadas em azul, sendo o azul escuro o representante das anormalidades mais comuns (Adaptado de Van Meir e cols., 2010).

1.1.5.2. *TP53/p14^{ARF}/MDM2/MDM4*

O gene *TP53* (localizado em 17p13.1) codifica uma proteína que está associada ao ciclo celular, à resposta ao dano celular, à morte celular, à diferenciação celular e à neovascularização. O gene *MDM2* (localizado em 12q14.3-q15) codifica uma proteína de 54kDa, a qual se liga tanto à proteína

p53 mutante quanto à selvagem, inibindo a capacidade da p53 selvagem de ativar a transcrição de sequências promotoras mínimas. Porém, a transcrição do gene *MDM2* é induzida pela p53 selvagem. Nas células normais, este ciclo de retroalimentação é capaz de regular a atividade da p53 e a expressão do *MDM2*, fazendo com que este promova a degradação da p53. O gene *p14^{ARF}* (parte do complexo *CDKN2A*, localizado em 9p21) codifica uma proteína que se liga à *MDM2* e inibe a degradação da p53 mediada pelo *MDM2*. Além disso, a expressão do *p14^{ARF}* é regulada negativamente pela p53. Sendo assim, a perda da função normal da p53 pode resultar na expressão anormal dos genes *TP53*, *MDM2* e *p14^{ARF}* (Figura 13) (Kleihues e cols., 2007).

A amplificação do *MDM2* ou o aumento da expressão da sua proteína são mecanismos alternativos para escapar do controle da proliferação celular regulado pela p53. A amplificação do *MDM2* pode ser observada em <10% dos GBMs sem a mutação em *TP53*. Já o aumento da expressão do *MDM2* é descrita em >50% dos GBMs primários, mas só em 11% dos secundários (Louis e cols., 2016c)

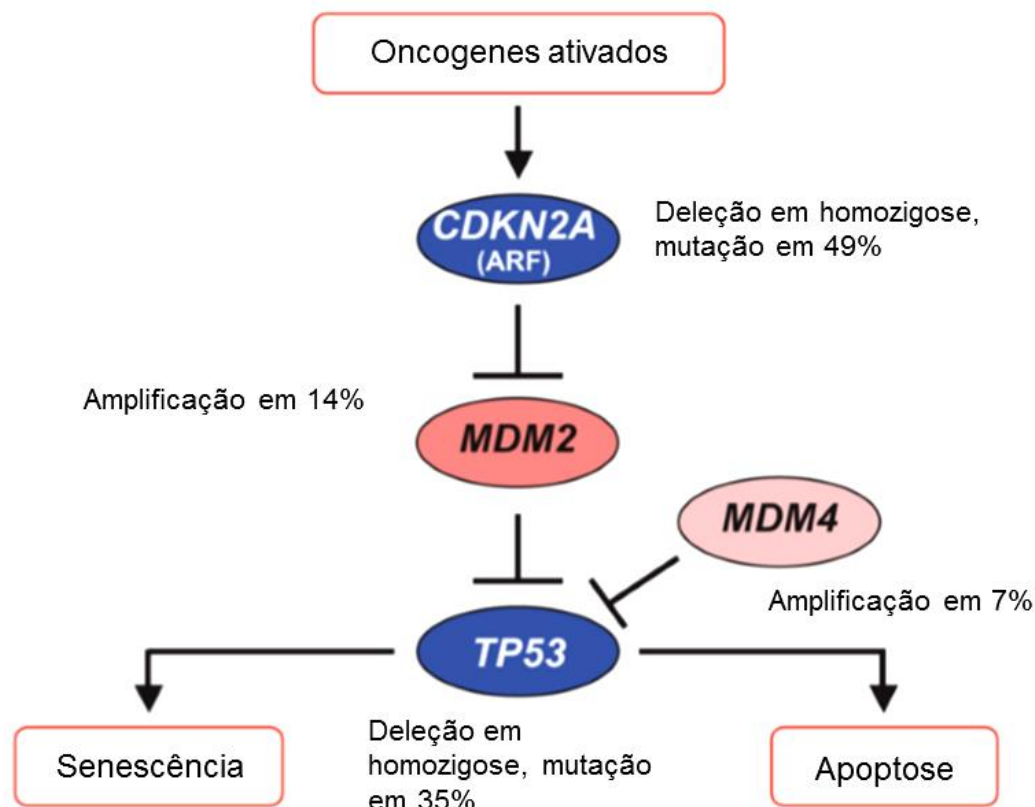


Figura 13. O padrão de sinalização *TP53/p14^{ARF}/MDM2/MDM4* pode estar alterado em até 87% dos GBMs. As alterações de ativação genética estão representadas em vermelho, sendo os genes mais frequentemente alterados representados em tons mais escuros. As anormalidades que levam à perda de função estão identificadas em azul, sendo que o azul escuro representa as alterações mais comuns (Adaptado de Van Meir e cols., 2010).

1.1.5.3. *p16^{INK4a}/CDK4/RB1*

Essa via de sinalização é importante para o controle de progressão da fase G1 para a fase S do ciclo celular. O gene *RB* codifica a proteína supressora tumoral do retinoblastoma. O complexo CDK4 ou CDK6/ciclina D1 fosforila a proteína Rb, deixando-a inativa e liberando o fator de transcrição

EF2, o qual ativa os genes envolvidos na progressão da fase G1 para a fase S do ciclo celular (Figura 9) (Tang e cols., 2012). O gene *p16^{INK4a}* (conhecida por fazer parte do complexo *CDKN2A*) codifica uma proteína que se liga à CDK4 e que inibe a ação do complexo CDK4 ou CDK6/ciclina D1 sobre a Rb, fazendo com que este último iniba a ação da proteína EF2 e bloqueando a transição G1 para S. A expressão alterada de qualquer um dos genes dessa via, como a perda da expressão do *p16^{INK4a}*, amplificação e superexpressão do *CDK1*, ou perda da função do *RB*, pode levar à perda do controle do ciclo celular. No GBM, a deleção do *p16^{INK4a}* e a alteração do *RB* parecem ser mutuamente exclusivas (Figura 14) (Kleihues e cols., 2007).

Além disso, estudos recentes demonstraram o papel que a Rb associada a outras proteínas exercem na organização da cromatina na progressão da mitose. Há evidências de associação de instabilidade cromossômica e de erros na divisão celular com inativação da proteína Rb (Uchida, 2016).

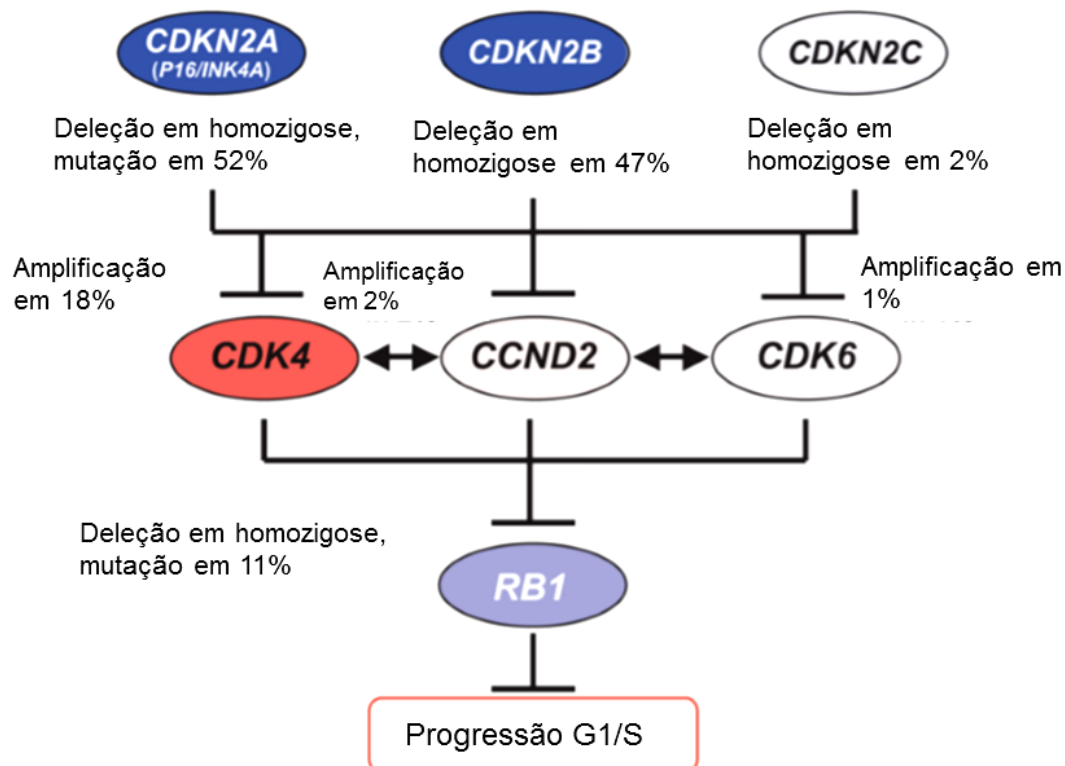


Figura 14. A via de sinalização $p16^{INK4a}/CDK4/RB1$ pode estar alterada em 77% dos GBMs. As alterações de ativação genética estão representadas em vermelho, estando os genes mais frequentemente alterados representados em tons mais escuros. As anormalidades que levam à perda de função estão identificadas em azul, sendo que os genes marcados em azul escuro são os mais envolvidos (Adaptado de Van Meir e cols., 2010).

1.1.6. Tratamento

O tratamento padrão para pacientes que desenvolvem GBM se dá por uma abordagem múltipla, que consiste de resecção cirúrgica e de radioterapia. A quimioterapia com temozolamida (TMZ) pode ser utilizada também em conjunto (Khosla, 2016). A TMZ é um agente alquilante de baixo peso

molecular, facilmente absorvido por via oral, que destrói as células cancerosas pela formação do O⁶-metilguanina no DNA. Este metabólito faz com que a timidina se pareie de forma errônea no DNA nas divisões subsequentes, havendo a formação de quebras deste, o que leva à apoptose da célula. Em modelos animais, mostrou-se que a TMZ pode atravessar a barreira hematoencefálica e atingir concentrações intratumorais maiores do que outros agentes citotóxicos (Jovčevska e cols., 2013).

A combinação do uso de um inibidor da angiogênese (ex.: o bevacizumab) e de um agente citotóxico pode apresentar melhores resultados, já que os seus efeitos podem ser complementares, fazendo com que haja diminuição da proliferação celular e redução das regiões de inflamação relacionadas ao tumor (Jovčevska e cols., 2013). Além disso, Stupp e cols. (2017), em um estudo multicêntrico, apresentaram um bom resultado para o uso de um novo tratamento para pacientes com GBM, utilizando um dispositivo que transmite ondas elétricas (TTFs) que atingem células tumorais em divisão. O estudo avaliou pacientes que foram submetidos à radio e quimioterapia adicionadas ou não do uso desse dispositivo. Foi observado uma diferença significativa entre a mediana de sobrevida global daqueles pacientes que utilizaram o dispositivo (20,9 meses) comparado com aqueles que não utilizaram o mesmo (16,0 meses) (HR, 0.63; 95% IC, 0.53-0.76; P < .001).

Apesar de tudo isso, o objetivo de muitas investigações para novas terapias é observar possíveis vias alvo e identificar características moleculares que podem prever resposta a tratamentos, facilitando assim a estratificação dos pacientes para receber determinado tipo de tratamento. Os principais mecanismos de ação dessas novas drogas estão relacionados especialmente à

sobrevida, à proliferação, à apoptose, à invasão e à angiogênese tumoral (Agnihotri e cols., 2013). Os estudos clínicos em desenvolvimento envolvendo o GBM podem ser consultados no *website* do *National Institutes of Health (NIH)*: <http://www.clinicaltrials.gov>. No momento, existem 1175 estudos clínicos, que se encontram em diferentes fases (*U.S. National Library of Medicine*, 2018).

1.1.7. Alterações envolvendo os genes *NTRK1*, *ROS1*, *KIT*, *PDGFRA*, *KDR* e *RB1*

Os receptores de tirosina quinases (RTKs) pertencem a uma família de receptores de superfície celular para fatores de crescimento, hormônios, citocinas, fatores neutróficos e outras moléculas de sinalização extracelular. Os RTKs são mediadores chave nas principais vias de sinalização que estão envolvidas na proliferação, na diferenciação, na sobrevivência e na migração celular.

A família RTK compreende vários genes que incluem, entre outros, o receptor para o fator neurotrófico 1 (*NTRK1*), o receptor do proto-oncogene 1 (*ROS1*), o receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas α (*PDGFRA*), o receptor do fator de crescimento endotelial vascular (*KDR* ou *VEGFR2*) e o receptor do proto-oncogene tirosina quinase (*KIT*).

Os monômeros de RTK são organizados em um domínio extracelular (N-terminal), transmembranar e quinase citoplasmática. Após a ligação de uma molécula em um receptor, ocorre a auto-fosforilação da porção citoplasmática e a ativação de diversas vias que irão resultar na proliferação, na diferenciação, na sobrevivência e na migração celular (Regad, 2015) (Figura 15).

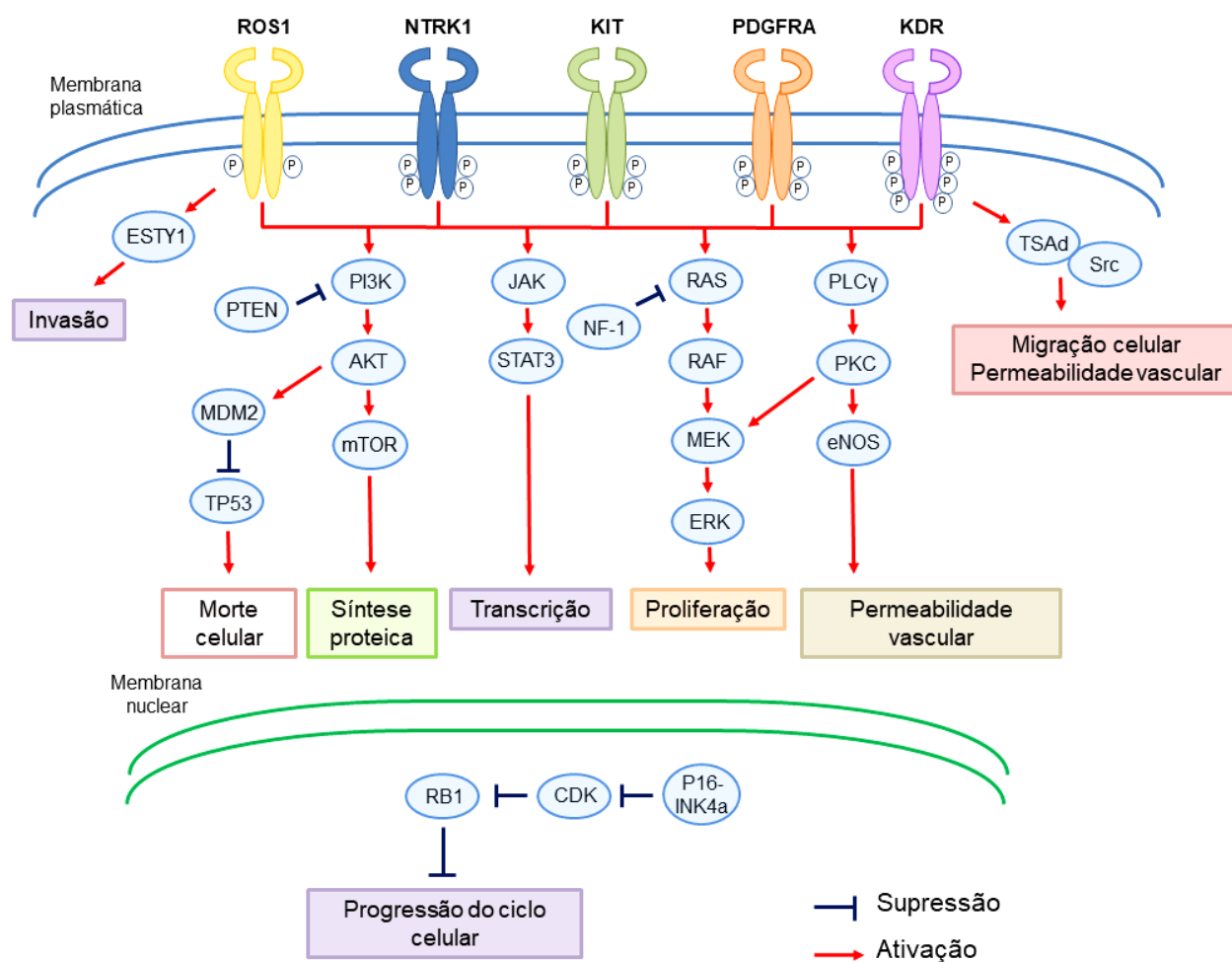


Figura 15. Esquema dos receptores tirosina quinase (RTKs) ROS1, NTRK1, KIT, PDGFRA e KDR, as principais vias de ativação, e as consequências para a viabilidade celular. Além disso, a imagem ilustra a via de sinalização da RB1 dentro do núcleo celular (elaborada pelo autor).

O gene receptor para o fator neurotrófico 1 (*NTRK1*) está localizado no cromossomo 1q23.1 e mutações no mesmo foram descritas em pacientes afetados pela insensibilidade à dor congênita com anidrose (*CIPA*). Alterações

menos comuns já descritas no gene *NTRK1* consistem de deleção *in-frame* na leucemia mieloide aguda e *de splicing* alternativo no neuroblastoma. Rearranjos intra ou inter-cromossomos levam a fusões gênicas envolvendo a região 3' do gene *NTRK1* e a região 5' de genes parceiros, fazendo com que ocorra uma maior ação da função RTK deste gene (Amatu e cols., 2016). A descrição dos principais parceiros e tumores com as diferentes fusões gênicas estão resumidas no Quadro 2.

Quadro 2. Fusões gênicas descritas do gene *NTRK1* e os tumores envolvidos

(Adaptado de Amatu e cols., 2016).

Fusão gênica	Tumor
<i>LMNA-NTRK1</i>	Colorretal
	Sarcoma de tecidos moles
	Melanomas spitzoide
	Sarcoma AYA (<i>Adolescent and young adult</i>)
	Fibrosarcoma congênito infantil
<i>TPM3-NTRK1</i>	Colorretal
	Carcinoma papilar da tireoide
	Glioblastoma
<i>SQSTM1-NTRK1</i>	Câncer de Pulmão de Não Pequenas Células
<i>NTRK1-SQSTM1</i>	Câncer de Pulmão de Não Pequenas Células
<i>NFASC-NTRK1</i>	Glioblastoma
<i>BCAN-NTRK1</i>	Glioblastoma
<i>PPL-NTRK1</i>	Carcinoma de tireoide
<i>RFWD2-NTRK1</i>	Tumor neuroendócrino de grande células (pulmão)
<i>CD74-NTRK1</i>	Adenocarcinomas de pulmão
<i>MPRIP-NTRK1</i>	Adenocarcinomas de pulmão

<i>RABGAP1L-NTRK1</i>	Colangiocarcinoma intra-hepático
<i>TFG-NTRK1</i>	Carcinomas de tireoide
<i>TP53-NTRK1</i>	Melanomas spitzoide

Fusões gênicas ocorrem em aproximadamente 30 a 40% dos pacientes com GBM (Shah e cols., 2013). Em 2013, Frattini e cols. analisaram 185 GBMs e encontraram duas fusões *in-frame* envolvendo *NTRK1* (*BCAN-NTRK1* e *NFASC-NTRK1*). No mesmo ano, Shah e cols. (2013) confirmaram essas duas fusões como recorrentes em uma amostra de 24 GBMs. Em um estudo baseado em um triagem de amostras em parafina, Zheng e cols. (2014) descreveram uma fusão *in-frame* envolvendo o éxon 21 do gene *ARHGEF2* (que codifica Rho/Rac e fatores de troca de nucleotídeo de guanina 2) e o éxon 10 do *NTRK1*, além de outras duas fusões *in-frame* envolvendo o éxon 5 do gene *CHTOP* e o éxon 10 do *NTRK1*, em 115 amostras de tumores cerebrais.

Em uma busca no website do *National Institutes of Health* (NIH): <http://www.clinicaltrials.gov>, pode-se observar 53 estudos clínicos em diferentes fases de desenvolvimento para diferentes drogas possivelmente associadas ao *NTRK1*. Quando utilizados os termos “Glioblastoma” e “*NTRK1*” podem-se observar 4 estudos com diferentes drogas e em diferentes fases de desenvolvimento: *BIBF 1120* (fase 2, completo), *Sorafenib* (fase 1, completo), *LOXO-101* (fase 2, recrutando pacientes) e *LOXO-195* (fases 1 e 2, recrutando pacientes) (U.S. National Library of Medicine, 2018).

O gene ROS proto-oncogene 1 (*ROS1*) está localizado no cromossomo 6q22.1 e pertence à subfamília dos genes *RTKs* receptores de insulina. Um possível rearranjo gênico para o gene *ROS1* foi primeiramente descrito em 1987 em uma linhagem celular de GBM (Birchmeier e cols., 1987). Depois disso,

novos estudos utilizando diferentes técnicas começaram a descrever as diferentes fusões e os tipos tumorais onde foram encontradas. Pelo menos 26 genes já foram descritos fusionados ao gene *ROS1*, estando associados ao desenvolvimento de diferentes tipos de tumores (Uguen e De Braekeleer, 2016). (Quadro 3).

Quadro 3. Fusões gênicas descritas envolvendo o gene *ROS1* e os tumores já encontrados (Baseado em Uguen e De Braekeleer, 2016).

Fusão gênica	Tumor
<i>GOPC-ROS1</i>	GBM Colangiocarcinoma Adenocarcinoma de pulmão Gástrico
<i>SLC34A2-ROS1</i>	Cólon Adenocarcinoma de pulmão
<i>CD74-ROS1</i>	Adenocarcinoma de pulmão
<i>NFkB2-ROS1</i>	Linfoma Anaplásico de Grandes Células
<i>NCOR2-ROS1</i>	Linfoma Anaplásico de Grandes Células
<i>KDEL2-ROS1</i>	Adenocarcinoma de pulmão
<i>SDC4-ROS1</i>	Adenocarcinoma de pulmão
<i>CCDC6-ROS1</i>	Adenocarcinoma de pulmão
<i>EZR-ROS1</i>	Adenocarcinoma de pulmão
<i>MSN-ROS1</i>	Adenocarcinoma de pulmão
<i>CEP85L-ROS1</i>	Angiosarcoma GBM
<i>TMEM106B-ROS1</i>	Adenocarcinoma de pulmão
<i>CLTC-ROS1</i>	Adenocarcinoma de pulmão
<i>LIMA1-ROS1</i>	Adenocarcinoma de pulmão
<i>HLA-A-ROS1</i>	Nevo de Spitz (lesão na pele)
<i>MYO5A-ROS1</i>	Nevo pigmentado de células fusiformes
<i>PPFIBP1-ROS1</i>	Nevo de Spitz (lesão na pele)
<i>ERC1-ROS1</i>	Nevo de Spitz (lesão na pele)
<i>PWWP2A-ROS1</i>	Tumor Spitz atípico
<i>CLIP1-ROS1</i>	Nevo pigmentado de células fusiformes
<i>ZCCHC8-ROS1</i>	Nevo de Spitz (lesão na pele) GBM
<i>SHTN1-ROS1</i>	Nevo de Spitz (lesão na pele)
<i>TPM3-ROS1</i>	Adenocarcinoma de pulmão Nevo de Spitz (lesão na pele)
<i>LRIG3-ROS1</i>	Adenocarcinoma de pulmão
<i>TFG-ROS1</i>	Tumor miofibroblástico inflamatório
<i>YWHAE-ROS1</i>	Tumor miofibroblástico inflamatório

A primeira fusão descrita em GBM envolvia o gene *ROS1* e o *GOPC* (*FIG*), a qual era formada por uma deleção de aproximadamente 240kb (Charest e cols., 2003). Em 2013, Shah e cols. descreveram um caso com a fusão *CEP85L-ROS1* em uma amostra de GBM. Coccé e cols. (2016) identificaram a fusão *ZCCHC8-ROS1* em um caso de GBM congênito, resultado de uma translocação envolvendo os cromossomos 6 e 12: t(6;12)(q21;q24.3). Apesar de não haver registro de estudos clínicos envolvendo o GBM e alterações do gene *ROS1*, 46 estudos em outros tipos tumorais estão em diferentes fases de desenvolvimento, principalmente avaliando tumores de pulmão (U.S. National Library of Medicine, 2018).

A região do cromossomo 4q12 codifica três importantes genes *RTKs* que são potenciais alvos terapêuticos: o *KIT* (receptor proto-oncogene tirosina quinase), o *PDGFRA* (receptor tipo alfa para fator de crescimento derivado de plaquetas) e o *KDR* ou *VEGFR2* (quinase do receptor do domínio de inserção ou receptor do fator de crescimento do endotélio vascular). O principal mecanismo de ativação desses *RTKs* se dá pela amplificação gênica dos mesmos (Nobusawa e cols., 2011; Little e cols., 2012; Phillips e cols., 2013).

A frequência de amplificação desses genes em GBMs é variável e pode ser observada na Tabela 1.

Tabela 1. Estudos com a frequência de amplificação dos genes *KIT*, *PDGFRA* e *KDR* em GBM, junto com a metodologia utilizada para detecção.

Autor	Metodologia	Amplificação em GBM (%)		
		<i>KIT</i>	<i>PDGFRA</i>	<i>KDR</i>
Joensuu e cols. (2005)	FISH	53	36	36
Nobusawa e cols. (2010)	Array CGH	21	21	
Verhaak e cols. (2010)	Microarray e expressão gênica		17	
Nobusawa e cols. (2011)	PCR diferencial	8,5	4,4	3,3
Little e cols. (2012)	FISH		21	
Szerlip e cols. (2012)	Array CGH e FISH		16	
Brennan e cols. (2013)	Microarray e expressão gênica		13,1	
Burford e cols. (2013)	FISH	21,6	25,5	14,9
Phillips e cols. (2013)	FISH		22,5	

A amplificação dos genes *KIT*, *PDGFRA* e *KDR* é frequente nos GBMs e parece ser oriunda da evolução de um gene ancestral comum localizado em 4q12, o que sugere a possível co-amplificação dos mesmos (Joensuu e cols., 2005).

A co-expressão do *PDGF* e do seu receptor em GBMs sugere um mecanismo autócrino de estímulo de crescimento celular. Além disso, a mutação por deleção dos éxons 8 e 9 do *PDGFRA* já foi descrita, sugerindo que estas podem estar envolvidas na patogênese do GBM (Joensuu e cols., 2005; Carrasco-García e cols., 2014). O *PDGFRA* é expresso em células progenitoras de oligodendrócitos e possui três isoformas de ligantes com alta afinidade: PDGF-AA, PDGF-BB e PDGF-AB. Além disso, esse receptor tem um importante papel na regulação da proliferação, da quimiotaxia e da migração celular

(Nobusawa e cols., 2011). Pode-se observar que existem 54 estudos clínicos em diferentes fases de desenvolvimento para diferentes drogas e tumores envolvendo o gene *PDGFRA*. Quando utilizados os termos “Glioblastoma” e “*PDGFRA*” podem-se observar 3 estudos com diferentes drogas: crenolanib (fase 2, recrutando pacientes), olaratumab e ramucirumab (fase 2, completo), e MEDI-575 (fase 2, completo) (*U.S. National Library of Medicine*, 2018).

Joensuu e cols., (2005) encontraram expressão mínima de KIT em células normais do cérebro; porém, altas taxas em tumores astrocíticos de alto grau. A função do *KIT* nos GBMs ainda é pouco conhecida, mas acredita-se que o tumor pode conter células primitivas que adquirem sensibilidade para o fator de célula tronco (*stem cell factor*, *SCF*), o ligante do *KIT* (Joensuu e cols., 2005). Esse receptor é expresso em células progenitoras da medula óssea e da glia de roedores (Nobusawa e cols., 2011). Tumores com amplificação do *KIT* e com altos níveis de receptores KIT podem ser alvos de inibidores de tirosina quinase (Joensuu e cols., 2005). Estes estudos vêm sendo realizados e no momento existem cerca de 174 trabalhos clínicos relacionados a esse gene, em diversas fases do desenvolvimento, e em diferentes tumores. Ao utilizar os termos “Glioblastoma” e “*stem cell factor receptor*” podem-se observar 2 estudos com a droga dasatinib associada à radioterapia e à quimioterapia com temozolomida: os dois estudos pertencem ao mesmo grupo de estudo; contudo, eles não progrediram para a fase 2, pois o agente financiador retirou o apoio (*U.S. National Library of Medicine*, 2018).

O KDR (ou VEGFR2) é um receptor de ligantes de ação angiogênica (VEGF-A e VEGF-E, e as formas processadas VEGF-C e VEGF-D). Os GBMs são tipicamente muito vascularizados e com maior atividade de KDR (pela

fosforilação) na vasculatura tumoral. Porém, isso também pode ocorrer nas células tumorais propriamente ditas (Joensuu e cols., 2005). Sendo assim, a busca por tratamentos com a combinação de drogas com atividade anti-angiogênica vem sendo alvo de vários estudos (Zorzan e cols., 2015).

Cerca de 305 estudos clínicos estão sendo realizados avaliando o efeito de diversas drogas em tumores com alteração no gene *KDR*. Utilizando os termos “Glioblastoma” e “*KDR*” podem-se observar 7 estudos com diferentes drogas e em diferentes fases do desenvolvimento: vacina de DNA VXM01 (fase 1, recrutando pacientes), AEE788 (fases 1 e 2, completo), XL184 (fase 2, completo), cilengitide e sunitinib (fase 1, concluído), XL184 combinada com radioterapia e quimioterapia com temozolomida (fase 1, completo), bevacizumab e erlotinib (fase 2, completo) e o estudo do efeito microcirculatório do bevacizumab utilizando capilaroscopia (ativo, mas não recrutando) (U.S. National Library of Medicine, 2018).

Além do envolvimento dos *RTKs*, outro gene que vem sendo estudado nos GBMs é o *RB1*. Este gene está localizado em 13q14.2 e a proteína codificada por ele (a pRB) é uma reguladora negativa do ciclo celular. Ele foi o primeiro gene supressor tumoral descrito. A proteína também é responsável por manter a estrutura da heterocromatina constitutiva estável. A sua forma ativa, hipofosforilada, impede a ação do fator de transcrição E2F1. Mutações no *RB1* podem levar ao desenvolvimento do retinoblastoma em crianças, além do câncer de bexiga e do osteossarcoma (Dyson, 2016). Diversos estudos demonstram que a pRB é funcionalmente comprometida em diversos tumores como resultado de mutações em *RB1*, ou por mutações que aumentam a fosforilação do pRB através da expressão de uma oncoproteína viral que se liga

à pRB. A inativação da pRB compromete a habilidade da célula de sair do ciclo celular, aumentando a suscetibilidade do desenvolvimento de tumor (Dyson, 2016).

Alguns estudos vêm sendo desenvolvidos em GBMs. Brennan e cols. (2013) descreveram a perda da função da pRB em 7,6% das amostras avaliadas. Outros autores avaliaram a perda do gene *RB1* em GBMs. As frequências encontradas variaram de 25 a 34%, porém não foi encontrada uma associação com a sobrevida dos pacientes (Rodriguez e cols., 2008; Goldhoff e cols., 2012). Bäcklund e cols. (2003) também não encontraram relação entre a deleção do *RB1* e a sobrevida dos pacientes com GBM. Entretanto, quando agrupadas todas as alterações envolvidas em outros genes da via (no caso o *CDKN2A*, o *CDKN2B*, o *RB1*, e o *CDK4*) do *RB1*, observou-se que esses pacientes sobreviveram menos do que aqueles com a via contendo os genes normais.

Novas terapias tendo como alvo a via do *RB1* vêm sendo estudadas, mas ainda com resultados controversos para a estratificação dos pacientes com GBM (Michaud e cols., 2010; Schröder e McDonald, 2015). Quando utilizado os termos “Glioblastoma” e “*RB1*” podem-se observar 3 estudos com diferentes drogas e em diferentes fases de desenvolvimento: 2 estudos com iodo radioativo I 131 e anticorpo monoclonal 3F8 (um deles em fase 1 e completo, e o outro em fase 2, ativo, mas não recrutando); e Seneca Valley virus (agente biológico) (ativo, mas não recrutando) (U.S. National Library of Medicine, 2018).

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

A técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) foi descrita inicialmente por Pinkel e cols. em 1986. Inicialmente, a marcação das sondas de DNA era realizada utilizando material radioativo. No entanto, esta possuía muitos problemas e era de difícil execução, sendo posteriormente substituído pela marcação fluorescente (Smeets, 2004). A técnica de FISH permite a detecção de anormalidades cromossômicas menores (0,5kb), quando comparada a técnicas de bandamento cromossômico convencional, como a banda G (2000-3000kb) (McNeil e Ried, 2000).

A técnica de FISH foi desenvolvida para detecção de sequências específicas de DNA ou RNA em células metafásicas, em cortes histológicos de tecidos sólidos e em preparações celulares. Esta permite a observação de anormalidades cromossômicas, como aneuploidias, amplificações, deleções e rearranjos, tanto em células em divisão como naquelas que não estão (Varella-Garcia, 2003). O protocolo básico para a técnica de FISH consiste em utilizar uma sequência de DNA de interesse marcada com sinal fluorescente, também conhecida como sonda, para marcar uma sequência complementar em uma amostra colocada em uma lâmina previamente preparada, contendo núcleos interfásicos e/ou metáfases (Figura 16) (Jehan e cols., 2012).

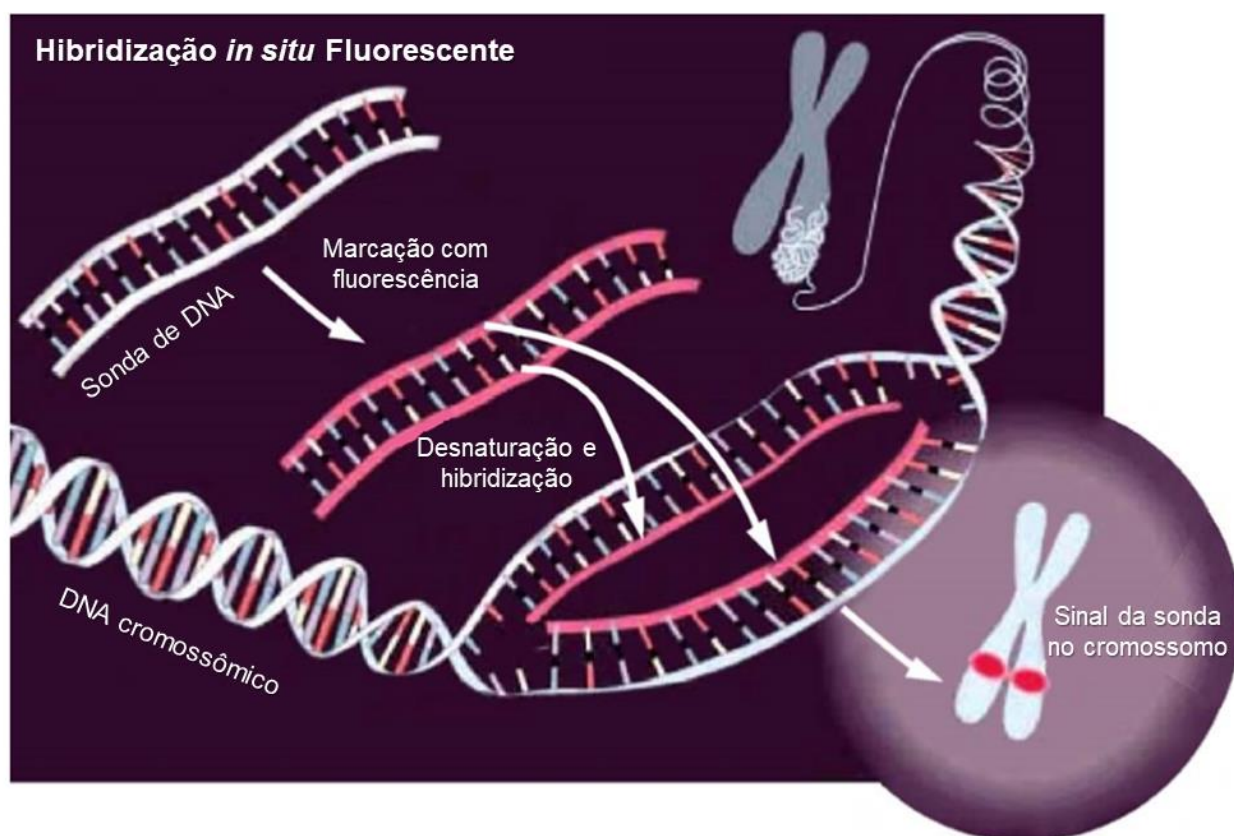


Figura 16. Esquema representando a técnica de FISH. A sonda de DNA é previamente marcada com material fluorescente. Esta e o DNA alvo são co-desnaturados, fazendo com que a sonda possa hibridizar com a região alvo. O sinal da marcação pode ser detectado através de um microscópio de fluorescência (Adaptado de Smeets, 2004).

A lâmina contendo a amostra é tratada com uma protease (ex.: a proteinase K e a pepsina) para que ocorra a digestão do material extracelular do tecido sólido e para que o material genético da amostra fique exposto para a sonda. Posteriormente, a lâmina é desidratada em soluções com concentração crescente de etanol. Logo após, a sonda e a amostra são co-desnaturadas utilizando o calor, possibilitando a hibridização das sequências complementares. Depois disso, a sonda remanescente na lâmina é retirada por meio de uma lavagem. A presença da hibridização entre a sonda e o material genético da

amostra pode ser observada utilizando um microscópio fluorescente (Jehan e cols., 2012; Kwasny e cols., 2012).

Usualmente as sondas de DNA são adquiridas já prontas para o uso, mas também, em situações específicas, podem ser desenvolvidas *in house*. Este desenvolvimento, se dá basicamente pela obtenção da sequência de DNA de interesse, utilizando vetores comerciais de cromossomos artificiais bacterianos (BACs), e de extração do material genético após cultivo. Depois da obtenção deste DNA, ele deve ser amplificado e marcado com fluorocromos utilizando kits específicos (Jehan e cols., 2012). Após essa marcação, o DNA é precipitado e diluído em solução tampão. A partir de então, a sonda pode ser utilizada.

A importância da detecção das anormalidades citogenéticas presentes em neoplasias, em especial as hematológicas, é muito bem reconhecida desde os anos 1980. Estas alterações têm um significado muito importante no diagnóstico, na definição da terapia a ser empregada e no prognóstico, servindo inclusive como fatores preditores de resposta ao tratamento.

Para os tumores sólidos as investigações das alterações genéticas envolvidas e como elas afetam o prognóstico, bem como a resposta do paciente ao tratamento, ainda precisam ser elucidadas. Muitos estudos estão sendo conduzidos com o objetivo de esclarecer aspectos relevantes associados à patogênese e aos fatores prognósticos dos GBMs. Contudo, há ainda muitos fatores a serem estudados.

A avaliação das diferentes alterações genéticas verificadas nos glioblastomas é alvo de diferentes estudos, uma vez que possibilita um maior conhecimento da natureza heterogênea destes tumores e a possível descoberta

de novos alvos terapêuticos. Apesar de existirem vários estudos avaliando as diferentes alterações genéticas em glioblastomas, após revisão nos portais de pesquisa internacionais (MEDLINE/PubMed) e nacionais (LILACS e SciELO), não encontramos nenhum estudo que tenha aplicado a técnica de FISH para analisar as alterações dos genes *NTRK1*, *ROS1*, *KIT*, *PDGFRA*, *KDR* e *RB1* em glioblastomas de pacientes brasileiros adultos.

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

1.3. Referências Bibliográficas

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 (Warsz)*. 2013;61(1):25-41.

Aldape K, Zadeh G, Mansouri S, Reifenberger G, von Deimling A. Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol*. 2015;129(6):829-48.

Altieri R, Agnoletti A, Quattrucci F, Garbossa D, Calamo Specchia FM, Bozzaro M, et al. Molecular biology of gliomas: present and future challenges. *Transl Med UniSa*. 2014;10:29-37.

Amatu A, Sartore-Bianchi A, Siena S. NTRK gene fusions as novel targets of cancer therapy across multiple tumour types. *ESMO Open*. 2016;1(2):e000023.

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;23(4):454-61.

Bäcklund LM, Nilsson BR, Goike HM, Schmidt EE, Liu L, Ichimura K, et al. Short postoperative survival for glioblastoma patients with a dysfunctional Rb1 pathway in combination with no wild-type PTEN. *Clin Cancer Res*. 2003;9(11):4151-8.

Bastien JI, McNeill KA, Fine HA. Molecular characterizations of glioblastoma, targeted therapy, and clinical results to date. *Cancer*. 2015;121(4):502-16.

Birchmeier C, Sharma S, Wigler M. Expression and rearrangement of the ROS1 gene in human glioblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(24):9270-4.

Bondy ML, Scheurer ME, Malmer B, Barnholtz-Sloan JS, Davis FG, Il'yasova D, et al. Brain tumor epidemiology: consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium. *Cancer*. 2008;113(7 Suppl):1953-68.

Brennan CW, Verhaak RG, McKenna A, Campos B, Nounshmehr H, Salama SR, et al. The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell*. 2013;155(2):462-77.

Burford A, Little SE, Jury A, Popov S, Laxton R, Doey L, et al. Distinct phenotypic differences associated with differential amplification of receptor tyrosine kinase genes at 4q12 in glioblastoma. *PLoS One*. 2013;8(8):e71777.

Carlberg M, Hardell L. 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.

Carrasco-García E, Saceda M, Martínez-Lacaci I. Role of receptor tyrosine kinases and their ligands in glioblastoma. *Cells*. 2014;3(2):199-235.

Charest A, Lane K, McMahon K, Park J, Preisinger E, Conroy H, et al. Fusion of FIG to the receptor tyrosine kinase ROS in a glioblastoma with an interstitial del(6)(q21q21). *Genes Chromosomes Cancer*. 2003;37(1):58-71.

Coccé MC, Mardin BR, Bens S, Stütz AM, Lubieniecki F, Vater I, et al. Identification of ZCCHC8 as Fusion Partner of ROS1 in a case of Congenital Glioblastoma Multiforme with a t(6;12)(q21;q24.3). *Genes Chromosomes Cancer*. 2016, 55:677-87.

Dyson NJ. RB1: a prototype tumor suppressor and an enigma. *Genes Dev*. 2016;30(13):1492-502.

Fekete B, Werlenius K, Örndal C, Rydenhag B. Prognostic factors for glioblastoma patients--a clinical population-based study. *Acta Neurol Scand*. 2016;133(6):434-41.

Fisher JL, Schwartzbaum JA, Wrensch M, Wiemels JL. Epidemiology of brain tumors. *Neurol Clin*. 2007;25(4):867-90, vii.

Frattoni V, Trifonov V, Chan JM, Castano A, Lia M, Abate F, et al. The integrated landscape of driver genomic alterations in glioblastoma. *Nat Genet*. 2013;45(10):1141-9.

Goldhoff P, Clarke J, Smirnov I, Berger MS, Prados MD, James CD, et al. Clinical stratification of glioblastoma based on alterations in retinoblastoma tumor suppressor protein (RB1) and association with the proneural subtype. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2012;71(1):83-9.

Hardell L, Carlberg M, Hansson Mild K. Use of mobile phones and cordless phones is associated with increased risk for glioma and acoustic neuroma. *Pathophysiology*. 2013;20(2):85-110.

Hardell L, Carlberg M. Mobile phone and cordless phone use and the risk for glioma - Analysis of pooled case-control studies in Sweden, 1997-2003 and 2007-2009. *Pathophysiology*. 2015;22(1):1-13.

Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/>. Acessado em: 07 de fevereiro de 2018.

International Agency for Research on Cancer (IARC). Online Analysis. Disponível em: http://globocan.iarc.fr/Pages/burden_sel.aspx. Acessado em: 03 de fevereiro de 2018.

Jehan Z, Uddin S, Al-Kuraya KS. In-situ hybridization as a molecular tool in cancer diagnosis and treatment. *Curr Med Chem*. 2012;19(22):3730-8.

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;207(2):224-31.

Jovčevska I, Kočevan N, Komel R. Glioma and glioblastoma - how much do we (not) know? *Mol Clin Oncol.* 2013;1(6):935-41.

Kalman B, Szep E, Garzuly F, Post DE. Epidermal growth factor receptor as a therapeutic target in glioblastoma. *Neuromolecular Med.* 2013;15(2):420-34.

Khosla D. Concurrent therapy to enhance radiotherapeutic outcomes in glioblastoma. *Ann Transl Med.* 2016;4(3):54.

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

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

Kwasny D, Vedarethinam I, Shah P, Dimaki M, Silaharoglu A, Tumer Z, et al. Advanced microtechnologies for detection of chromosome abnormalities by fluorescent in situ hybridization. *Biomed Microdevices.* 2012;14(3):453-60.

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;72(7):1614-20.

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, editors. World Health Organization Histological Classification of Tumours of the Central Nervous System. Revised 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2016.

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;131(6):803-20.

Louis DN, Suvá ML, Burger PC, Perry A, Kleihues P, Aldape KD, et al. Glioblastoma, IDH-wildtype. IN: Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, editors. World Health Organization Histological Classification of Tumours of the Central Nervous System. Revised 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2016. p. 28-51.

Louis DN, von Deimling A, Cavenee WK. Diffuse astrocytic and oligodendroglial tumors, Introduction. IN: Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, editors. World Health Organization Histological Classification of Tumours of the

Central Nervous System. Revised 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2016. p.16-17.

Malmer B, 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;106(2):260-3.

Mariniello G, Peca C, De Caro MeB, Giamundo A, Donzelli R, Maiuri F. Glioblastoma in the elderly: the impact of advanced age on treatment and survival. *J Neurol Surg A Cent Eur Neurosurg*. 2014;75(4):276-81.

McNamara MG, Sahebjam S, Mason WP. Emerging biomarkers in glioblastoma. *Cancers (Basel)*. 2013;5(3):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.

Michaud K, Solomon DA, Oermann E, Kim JS, Zhong WZ, Prados MD, et al. Pharmacologic inhibition of cyclin-dependent kinases 4 and 6 arrests the growth of glioblastoma multiforme intracranial xenografts. *Cancer Res*. 2010;70(8):3228-38.

Mohile NA. How I treat glioblastoma in older patients. *J Geriatr Oncol*. 2016;7(1):1-6.

Nobusawa S, Lachuer J, Wierinckx A, Kim YH, Huang J, Legras C, et al. Intratumoral patterns of genomic imbalance in glioblastomas. *Brain Pathol*. 2010;20(5):936-44.

Nobusawa S, Stawski R, Kim YH, Nakazato Y, Ohgaki H. Amplification of the PDGFRA, KIT and KDR genes in glioblastoma: a population-based study. *Neuropathology*. 2011;31(6):583-8.

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, Kleihues P, von Deimlig A, Louis DN, Reifenberger G, Yan H, Weller M. Glioblastoma, IDH-mutant. IN: Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, editors. *World Health Organization Histological Classification of Tumours of the Central Nervous System*. Revised 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2016. p. 52-56.

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

Omuro A, DeAngelis LM. Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review. *JAMA*. 2013;310(17):1842-50.

Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, Rouse C, Chen Y, Dowling J, et al. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007-2011. *Neuro Oncol.* 2014;16 Suppl 4:iv1-63.

Ostrom QT, Gittleman H, Xu J, Kromer C, Wolinsky Y, Kruchko C, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2009-2013. *Neuro Oncol.* 2016;18(suppl_5):v1-v75.

Phillips JJ, Aranda D, Ellison DW, Judkins AR, Croul SE, Brat DJ, et al. PDGFRA amplification is common in pediatric and adult high-grade astrocytomas and identifies a poor prognostic group in IDH1 mutant glioblastoma. *Brain Pathol.* 2013;23(5):565-73.

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.

Regad T. Targeting RTK Signaling Pathways in Cancer. *Cancers (Basel).* 2015;7(3):1758-84.

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;113(10):2779-89.

Scherer HJ. A CRITICAL REVIEW: THE PATHOLOGY OF CEREBRAL GLIOMAS. *J Neurol Psychiatry.* 1940;3(2):147-77.

Schiffer D. *Brain Tumor Pathology: Current Diagnostic Hotspots and Pitfalls.* Dordrecht: Springer; 2006.

Schröder LB, McDonald KL. CDK4/6 Inhibitor PD0332991 in Glioblastoma Treatment: Does It Have a Future? *Front Oncol.* 2015;5:259.

Shah N, Lankerovich M, Lee H, Yoon JG, Schroeder B, Foltz G. Exploration of the gene fusion landscape of glioblastoma using transcriptome sequencing and copy number data. *BMC Genomics.* 2013;14:818.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin.* 2016;66(1):7-30.

Smeets DF. Historical prospective of human cytogenetics: from microscope to microarray. *Clin Biochem.* 2004;37(6):439-46.

Stupp R, Taillibert S, Kanner A, Read W, Steinberg DM, Lhermitte B, et al. Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA.* 2017;318(23):2306-16.

Szerlip NJ, Pedraza A, Chakravarty D, Azim M, McGuire J, Fang Y, et al. Intratumoral heterogeneity of receptor tyrosine kinases EGFR and PDGFRA amplification in glioblastoma defines subpopulations with distinct growth factor response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(8):3041-6.

Tang LH, Contractor T, Clausen R, Klimstra DS, Du YC, Allen PJ, et al. Attenuation of the retinoblastoma pathway in pancreatic neuroendocrine tumors due to increased cdk4/cdk6. *Clin Cancer Res*. 2012;18(17):4612-20.

Toledo M, Sarria-Estrada S, Quintana M, Maldonado X, Martinez-Ricarte F, Rodon J, et al. Prognostic implications of epilepsy in glioblastomas. *Clin Neurol Neurosurg*. 2015;139:166-71.

U.S. National Library of Medicine, *ClinicalTrials.gov*. Disponível em: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/home>. Acesso em: 05 de janeiro de 2018.

Uchida C. Roles of pRB in the Regulation of Nucleosome and Chromatin Structures. *Biomed Res Int*. 2016;2016:5959721.

Uguen A, De Braekeleer M. ROS1 fusions in cancer: a review. *Future Oncol*. 2016.

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

Van Meir 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.

Zheng Z, Liebers M, Zhelyazkova B, Cao Y, Panditi D, Lynch KD, et al. Anchored multiplex PCR for targeted next-generation sequencing. *Nat Med*. 2014;20(12):1479-84.

Zorzan M, Giordan E, Redaelli M, Caretta A, Mucignat-Caretta C. Molecular targets in glioblastoma. *Future Oncol*. 2015;11(9):1407-20.

2. Objetivos

Objetivo geral:

Identificar, através da técnica de FISH, alterações citogenéticas moleculares de valor prognóstico em amostras tumorais de pacientes com glioblastomas.

Objetivos específicos:

- a. verificar a frequência de rearranjos envolvendo os genes *NTRK1* e *ROS1*, amplificação nos genes *KIT*, *PDGFRA*, *KDR* e deleção do gene *RB1* em uma amostra de glioblastomas de pacientes adultos;
- b. correlacionar as anormalidades citogenéticas moleculares com o prognóstico dos pacientes afetados por glioblastoma.

3. Artigo científico redigido em inglês

Molecular cytogenetic analysis of adult onset glioblastomas: clinical relevance of rearrangements involving NTRK1 and ROS1, amplification of KIT, PDGFRA and KDR, and deletion of RB1

Patrícia Trevisan, Carla Graziadio, Dayane Bohn Koshiyama, Rafael Fabiano Machado Rosa, Fabiano Pasqualotto Soares, Valentina Oliveira Provenzi, Ceres Andréia Vieira de Oliveira, Giorgio Adriano Paskulin, Marileila Varella-Garcia, Paulo Ricardo Gazzola Zen

Enviado para publicação na Revista "Acta Neuropathologica"

Title Page

Patrícia Trevisan^a, Carla Graziadio^b, Dayane Bohn Koshiyama^a, Rafael Fabiano Machado Rosa^{ab}, Fabiano Pasqualotto Soares^c, Valentina Oliveira Provenzi^d, Ceres Andréia Vieira de Oliveira^c, Giorgio Adriano Paskulin^a, Marileila Varella-Garcia^f, Paulo Ricardo Gazzola Zen^{ab*}

Molecular cytogenetic analysis of adult onset glioblastomas: clinical relevance of rearrangements involving *NTRK1* and *ROS1*, amplification of *KIT*, *PDGFRA* and *KDR*, and deletion of *RB1*

^aGraduate Program in Pathology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

^bClinical Genetics, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

^cNeurosurgery, Hospital Beneficência Portuguesa, Porto Alegre, RS, Brazil

^dPathology, Grupo Hospitalar Conceição, Porto Alegre, RS, Brazil

^eInstituto de Educação e Pesquisa do Hospital Moinhos de Vento, Porto Alegre, RS, Brazil

^fDepartment of Medicine, Division of Medical Oncology, University of Colorado, Aurora, CO, USA

***Corresponding author**

Paulo Ricardo Gazzola Zen MD, PhD

E-mail: paulozen@ufcspa.edu.br

Telephone: 51 3303-8774 Fax: 51 3303-8810

Abstract

Glioblastoma (GBM) is the most frequent and aggressive brain tumor, with poor survival despite the advances in diagnosis and therapy. At molecular level, these tumors have been subject to intense investigation, especially aiming to find clues for development of new treatments. We investigated 113 adult Brazilian patients with GBMs for clinical data and tumor molecular cytogenetic characteristics through fluorescence *in situ* hybridization, namely frequency of *NTRK1* and *ROS1* gene rearrangements, *KIT*, *PDGFRA* and *KDR* amplification, and *RBI* deletion. About half of patients (53%) were male and most of them were over 40 years (94%). The main clinical sign observed at diagnosis was focal disturbance (57%) and the majority of tumors was first diagnosed as *de novo* GBM (93%). In 60% of patients the tumor was located on the right cerebral hemisphere, and the frontal (31%) and temporal (20%) regions were the most affected. Most patients had just one tumor site (64%) and underwent partial resection (71%), 14 (14%) presented complications after surgery. The median hospitalization time was 20 days and the median survival was 175 days. One case was identified as positive for rearrangement in *NTRK1* and another in *ROS1* (0.9% each). *PDGFRA* was amplified in approximately 20% of all cases, and co-amplified with *KDR* in more than 90% and with *KIT* in more than 60% of positive cases. *RBI* was deleted in 16% of patients. There was no association between the investigated molecular abnormalities and patients' survival. However, in multivariate analyses, age, complications after surgery and tumor side were independent variables associated with patient survival. This study contributes with information on the molecular profile of GBMs in Latin America highlighting possible new target candidates for therapy.

Keywords

Glioblastoma, fluorescence *in situ* hybridization, *PDGFRA*, *KDR*, *NTRK1*, *ROS1*

Introduction

Malignant brain tumors are among the most feared human cancers, mainly because patients have a very poor prognosis and the disease impacts directly the quality of life and cognitive function. In Brazil, the estimated incidence for central nervous system (CNS) tumors in 2016 was 5,440 male and 4,830 female cases [29]. Glioblastoma (GBM) is a high-grade glioma with predominantly astrocytic differentiation with nuclear atypia, cellular pleomorphism, mitotic activity, microvascular proliferation and necrosis [43]. GBM is the most frequent primary brain tumor, with an annual incidence of 3.2 per 100,000 in the United States [53]. Moreover, GBM is the most malignant CNS neoplasm and despite current therapies it usually causes patient's death within one year after the diagnosis [50].

Heterogeneity, regarding to both histomorphology and genetic abnormalities, is an outstanding feature of GBM and allows stratification of the diagnosis, prognosis, and response to treatment [28, 76]. Current treatment for GBM combine surgery, radiation therapy and chemotherapy with temozolomide (TMZ), but these interventions provide a moderate survival benefit [63]. Recently, patients who underwent chemo-radiation followed by maintenance treatment with temozolomide and a device that transmits tumor-treating fields presented significantly longer overall survival [70]. However, molecular investigation has been the focus of intense investigation in GBMs [76], especially aiming to identify oncogenic pathways to be potentially inhibited by new therapies. Genomic alterations activating oncogenes (mainly tyrosine kinase receptors, TKR) and inactivating tumor suppressor genes have been reported in GBMs [31]. TKRs are activated by point mutations [11, 25], gene

amplifications [3, 11, 25] and gene fusions that are reported in almost 50% of GBM [67]. Among the clinically relevant oncogenic pathways in GBM are the ones involving the genes *NTRK1* and *ROS1*, for which many specific inhibitors are already approved or under development [5, 21, 62, 75]. Several molecular fusions involving these genes have been found in GBM, such as *BCAN-NTRK1*, *NFASC-NTRK* [25, 32, 67], *ARHGEF2-NTRK1*, *CHTOP-NTRK1* [80], *GOPC-ROS1* [17] and *CEP85L-ROS1* [67]. Amplifications involving *KIT*, *PDGFRA* and *KDR* genes have also been reported [12] and there are drugs in development for brain tumors with such molecular profile [55, 64, 79, 81]. Loss of tumor suppressor genes may also be therapeutically targeted and there are studies evaluating the response of an antitumor drug that acts on the *RBI* pathway [27, 51, 78]. Thus, stratification of patient tumors based on *RBI* suppressor gene status may be important for GBM [26, 45].

This study aimed to verify the frequency and the clinical significance of rearrangements in *ROS1* and *NTRK1*, amplification of *KIT*, *PDGFRA*, and *KDR*, and deletion of *RBI* in a Brazilian cohort of adult patients with GBM using fluorescence *in situ* hybridization (FISH).

Material and Methods

Sample

A total of 113 patients diagnosed with GBM in two Brazilian hospitals (Grupo Hospitalar Conceição and Hospital Beneficência Portuguesa in Porto Alegre, RS, Brazil) during the period between January 2009 and May 2015 were included in the study after approval by the Institutions' Research Review Boards. Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tumor blocks were received, hematoxylin and eosin stained sections were centrally revised by a pathologist (VOP), and GBM diagnosis was confirmed according to WHO Classification (2007) [33]. Demographic profile of patients was noted, including data about clinical profile, tumor characteristics, and overall survival. For better evaluation of survival, patients were divided based on age distribution according to Simpson et al. (1993) [69]: <40 years, 40-59 years and >60 years old. For clinical signs and symptoms, groups were created and divided in focal disturbance (aphasias and motor deficit), increase intracranial pressure (ICP) (headache, vomit and nausea), behavioral change (mental confusion and disorientation), seizure and decreased consciousness (sensory changes and somnolence) based on Brat et al. (2015) and Preusser et al. (2011) [10, 59]. The anatomical site of tumor was defined as frontal, temporal, parietal and "other" according to Simpson et al. (1993) and Lamborn et al. (2004) [38, 69]. Tumors located in corpus callosum, occipital regions, or in more than one single site were included in the category "other". Complications after surgery were noted until the hospital discharge. The median follow up of the study was 175 days (minimum of 3 days, maximum of 7 years).

Fluorescence *In Situ* Hybridization assay (FISH)

FISH assays were performed on 4µm FFPE sections using commercial or laboratory developed DNA probes diluted in tDenHyb-2 hybridization buffer (Insitus Biotechnologies, Albuquerque, NM). The sets of fluorochrome-labeled probes applied for individual assays are described as follow, the last value always representing the volume of the hybridization buffer. The *NTRK1* break-apart FISH assay was performed using the Vysis LSI *NTRK1* (Cen) SpectrumGreen (Cat # 08N43-030) and the Vysis LSI *NTRK1* (Tel) SpectrumRed (Cat # 08N43-020) (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL), mixed as 1:1:13 v/v. The *ROS1* break apart assay used the probe set *ROS1-GOPC*(FIG) Distal (6q22.1, Red) and *ROS1-GOPC*(FIG) Proximal (6q22.1, Green) (Cytocell

Ltd, Technopark Newmarket Road, Cambridge, UK, Cat# LPS 511-A and # LPS 510-A, respectively) mixed as 1.5:1.5:1 v/v. The *KIT/PDGFR α /KDR* enumeration FISH assay used two commercial reagents, Vysis LSI *KIT* SpectrumRed and Vysis CEP 4 SpectrumAqua (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, Cat # 05J15-011 and # 06J54-014, respectively) and two laboratory developed reagents, *PDGFR α* and *KDR* probes. These later probes were developed with the RP11-58C6 and RP11-21A18 BAC clones, encompassing respectively DNA sequences for *PDGFR α* and *KDR*, and labeled in SpectrumGreen and Spectrum Gold, all according protocols previously described [8]. The mix probe used was 5:5:1:0.65:2.5 v/v for *PDGFR α* , *KDR*, *KIT*, CEP4, and tDenHyb-2 buffer, respectively. The *RBI* enumeration assay used Vysis LSI 13 *RBI* (13q14) SpectrumOrange and Vysis LSI 13q34 SpectrumGreen probes (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, Cat # 05J15-011 and # 05J80-011, respectively), mixed as 1:1:14 v/v. All FISH assays were performed with the codenaturation protocol based on the pepsin/sodium thiocyanate pretreatment for paraffin embedded tissues from Kreatech Biotechnology (Kreatech Biotechnology - Kreatech Diagnostics, Amsterdam, NL). The final volume of the probe mix to be used in each specimen was determined according to the size of the hybridization area.

In the FISH break-apart assays, the criteria for classifying a specimen as positive for *NTRK1* and *ROS1* rearrangement was defined as $\geq 15\%$ of tumor cells showing single 3' or single 5' gene signal, or a separation of 5' and 3' gene signals greater than one signal diameter [2, 74, 80]. In the FISH enumeration assays, we used different criteria (C) based on literature. Gene amplification was evaluated by five criteria: C1: Presence of tight gene clusters and a ratio of gene:control ≥ 2 , or ≥ 15 copies of gene in $\geq 10\%$ of tumor cells [15]; C2: Ratio of gene:control > 2 [61]; C3: At least one cell with ≥ 10 gene copies, or with 5 to 9 gene copies with a gene:control ratio > 2 [41]; C4: At least one cell with ≥ 10 gene copies and the ratio gene:control of ≥ 5 [12]; and C5: $> 10\%$ of tumor cells showing gene:CEP 4 ratio > 2 or innumerable tight clusters of signals of the locus probe [60]. In the *RBI* FISH assay, deletion was considered based on two criteria: C1: ratio gene:control *RBI*:13q34 lower than 0.8 [61], and C2: only one gene signal in $> 50\%$ of tumor nuclei [26].

Statistical analysis

The quantitative variables were described as mean (standard deviation) or median (interquartile range). Absolute and relative frequencies were used for categorical variables, as well as Chi-square test with Yates correction and Fisher's exact test for this kind of data. To evaluate survival, Kaplan-Meier method was applied and the curves were compared using the log-rank test. The confounding factors were controlled by multivariate Cox proportional hazards model when the variables presented $p < 0.25$ in the univariate analysis. 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 the analyses were performed in the SPSS program version 21.0.

Results

Detailed clinical findings of the 113 patients are presented in Table 1. About half of them (53.1%) were male, and age ranged from 18 to 83 years (mean of 56.9 years, standard deviation of 12.3 years; 93.8% were over 40 years). The main clinical sign at diagnosis was focal disturbance (57.1%). Seizure was described in 16.1% of patients. The majority of tumors was first diagnosed as *de novo* GBM (93.1%). The mean age for *de novo* GBM was 58.2 years (SD 11.1 years) and for the cases with previous tumor was 43 years (SD 10.6 years) ($P = 0.001$). In cases with a previous tumor, these were classified as astrocytoma grade II ($n=4$), astrocytoma grade III ($n=1$),

anaplastic ependymoma (n=1) and anaplastic astrocytoma grade III (n=1). Frontal (31%) and temporal (20.4%) regions were the most affected regions, and the tumor was mainly located on the right cerebral hemisphere (59.5%). Most patients had a single region affected (63.7%) and underwent partial tumor resection (70.6%). Fourteen patients (13.7%) presented complications after surgery (Online Resource 1) that included hematoma, hemorrhage, shock, fever, meningitis, infection of the respiratory tract, muteness, visual loss, aphasia, and hemiplegia. The median hospitalization time was 20 days (IQR: 13.5; 28) and the median survival time was 175 days (95% CI: 126.1–223.9). At the end of the study, only four patients (3.5%) were still alive, and the follow up for these patients was between 21 and 60 months. The observed survival rates of GBM patients were 23% at 1 year and 3.4% at 5 years.

In the multivariate analyses, the independent variables associated with patient survival were age ($P=0.009$), tumor side ($P=0.022$) and complications after surgery ($P=0.003$) (Table 2). Patients older than 60 years presented a risk 3.38 times higher for death when compared with those younger than 40 years. Patients with tumor located on the left side presented a chance of death less than 42%, when compared with those with tumor on the right side. Clinical complications after surgery were significantly associated with decreased survival ($P=0.003$), with a risk 2.69 times higher for death in those patients compared with those with no complications.

The cytogenetic results are summarized in Tables 3 and 4 and presented in detail for each patient in the Online Resource 2. In summary, the molecular fusions were rare: case 61 was positive for *NTRK1* rearrangement (Figure 1A) with a single 5' *NTRK1* signal pattern and case 31 was positive for *ROS1* gene rearrangement (Figure 1B) with a pattern of single 3' *ROS1* signal pattern. Attempts to identify the fusion partners in these rearrangements were unsuccessful due to inadequate DNA quality. None of these two patients had remarkable clinical features.

The gene amplification analyses detected similar results across the different criteria: *PDGFRA* was the most commonly amplified gene (18.6-21.2% of cases), followed by *KDR* (17.7-20.4%) and *KIT* (11.5-14.2% cases). C3 and C4, the less stringent criteria, generated slightly higher frequency of positives as expected. Most often the 3 genes were co-amplified as specified in Table 4. Using C1 for further analyses, 19.5% of the cases harbored gene amplification in the 4q12 locus, of which 63.6% had co-amplification of the 3 genes, 27.3% had co-amplification of *PDGFRA* and *KDR* and 9.1% had only *PDGFRA* amplification. A positive case for all 3 genes is illustrated in Figure 2, and examples of co-amplification of *PDGFRA* and *KDR* and amplification of *PDGFRA* alone are shown in Figures 3 and 4, respectively. In the univariate analyses, we observed an association between *KIT* amplification using C3 ($P=0.046$) and C4 criteria ($P=0.046$) and patients' survival. However, this difference did not persist in the multivariate analyses, even for the other variables that presented $p<0.25$ in the univariate analysis (Table 5).

In the *RBI* deletion analyses, a similar proportion of affected cases was observed by the two criteria (11.5% and 12.4%), however only nine patients were detected as harboring *RBI* deletion by both criteria. Four samples were considered deleted only by C1, comprising cases with gene deletion followed by chromosome duplication (Figure 5A). Five samples were classified as deleted only based on C2, comprising cases carrying loss of gene and loss of control likely due to monosomy of chromosome 13 (Figure 5B). Since both criteria would qualify as gene loss, the actual frequency of GBM patients with *RBI* deletion in this cohort would be 18 cases (15.9%) and this phenotype had no association with survival ($P=0.167$) (Table 5).

Discussion

There are only few molecular cytogenetic publications on adult onset glioblastomas in Latin America correlating the results with clinical findings as survival [37, 56, 58], observation that highlights the importance of this study. The majority of the patients in this cohort were male (male:female ratio =1.13:1), what is in accordance with the literature for the United States and Switzerland [43]. GBM preferentially affects older adults with a higher incidence in ages between 55 and 85 [43]. Our study was intentionally designed to target adult population (median age 56.9 years; SD 12.3 years) and showed that an older age seems to be associated with a poor prognosis, in agreement with the literature [19, 34, 36, 39, 42, 49, 69, 71]. Usually, elderly patients have more co-morbidities and less resistance to medical procedures and treatment, which explain their worse prognosis compared to younger patients [18, 49]. Moreover, it is also possible that in the elderly the diagnosis of the disease is delayed, which would lead to a poorer prognosis. To reach a better outcome, in these patient a multidisciplinary team management has been proposed with individual assessment of operability and post-operative treatment based on multiple indexes [7].

GBMs develop rapidly and the symptoms depend specially on the tumor location and size. Common symptoms include focal neurological signs (aphasia, paresthesia, hemiparesis, and visual disturbances), seizures, mood and personality changes, or symptoms of increased ICP, such as nausea, vomiting and headache [59]. The majority of patients in this cohort presented one type of focal disturbance (57.1%) and increased ICP (51.8%) (Table 1). Considering the focal disturbance, 51.8% of all patients had motor deficit and 17.9% showed aphasia. Headaches were reported in 51.8% of patients, also in agreement with a previous report [52]. Some authors described the occurrence of seizures in 20% to 40% of patients [52, 71] and we observed this symptom in 16.1%. Seizures can correlate with a better survival, since may be linked to reduced tumor aggressiveness and its occurrence could be a factor for an earlier diagnosis [71].

The majority of GBMs (>90%) occurs *de novo* and typically develop in older patients (mean of 62 years). Secondary GBMs developed through progression from low grade astrocytomas are less frequent (<10% of all GBMs) and are more common in younger patients (mean of 45 years) [33]. The cohort currently analyzed had similar proportion of patients in each of these classifications.

Few studies have evaluated the impact of the side in which the tumor develops. Connon et al. (2016) observed more right-side tumors, in agreement with our study (59.5%), while others verified more cases with left-side tumors [18, 23, 44]. To the best of our knowledge, there was no previous report of tumor-side association with survival, whereas in our study the patients with left-side tumors presented a lower risk of death, compared with patients with right-side tumors. This observation maybe due to the location on the left side of the Wernicke and Broca's areas, responsible for speech, comprehension or understanding of written and spoken language, which will generate symptoms that may lead to an earlier diagnosis [42]. The majority of cases that presented one type of aphasia (73.7%) had the tumor located on the left side.

The majority of tumors in our sample were located on frontal and temporal lobes and no association was found with survival. However, there are reports that tumors in these regions are typically associated with less symptoms or vague effects (behavioral changes and hearing or speech difficulties), which could be easily confused with typical aging changes, reflecting in late diagnosis and consequently worse prognosis [16, 18].

The extent of the brain tumors resection is highly dependent on the location, size and difficulty to access. The present study has not included cases that underwent biopsy, mainly because we needed more tissue to perform

the molecular analysis. Moreover, an important characteristic of GBM is the presence of necrotic areas unsuitable for analysis. The majority of our cases underwent partial resection (70.6%), in agreement with other studies [40, 42, 69]. Korshunov et al. (2004) described no association between resection (gross total vs partial) and survival in high grade gliomas, similarly this study [35]. Nevertheless, gross total resection has been associated with better survival when compared with partial resection [40, 44]. Furthermore, patients who underwent gross total or partial resection have presented a longer survival compared with those that just underwent biopsy [23, 42, 69]. In the present study, the occurrence of clinical complications was significantly associated with decreased survival in agreement with a German investigation [22] and there was no statistically significant difference in the median time of hospitalization between patients with (21 days, CI: 16-45.5) and without complications (19 days, CI: 13-26) ($p=0.070$).

The median survival for the Brazilian GBM patients in our study was 175 days (5.8 months), which is somewhat similar with patients from other regions, such as the study developed in Australia by Connon et al. (2016) with a median survival of 4.7 months in patients over 80 years old [18]. Ohgaki et al. (2004) observed 4.9 months survival after surgical intervention in different ages with patients from Switzerland [49]. Some other European cohorts (Belgium, Germany and Spain and Russia) had higher median survival (9.5 to 12.4 months) [22, 36, 40, 71]. The survival rates were lower for 1-year survival and similar for 5-year survival in our cohort compared to cohorts from other regions (28-68% and 2.9-14%, respectively) [36, 49, 52, 71]. It is noteworthy that Brazilian investigators have associated low socio-economic level with poor prognosis for tumors such as breast and uterine cancers, as consequence of late diagnosis in public health services [1, 14, 46, 65]. Similar rationale could explain why the GBM patients in our sample had a poorer prognosis when compared with the majority of published studies.

Receptor tyrosine kinase (RTKs) genes are related to cell growth and their alterations have been associated with several tumor types and targeted in novel therapies. RTKs are mainly activated by mutations, as gene amplification or fusion, and chromosomal deletions, translocations and inversions. Gene fusions occur in approximately 30–50% of GBM [67]. Most common fusions involve *EGFR* and *FGFR3* [25, 67], other fusions occur more rarely, for instance activating *NTRK1* and *ROS1* [32, 67].

The neurotrophic tropomyosin receptor kinase type 1 (*NTRK1*) is a membrane-bound receptor that upon neurotrophin binding phosphorylates itself and members of the MAPK pathway. Rearrangements involving this gene are recurrent in many tumors, including papillary thyroid [24], lung [74] and colon [54] cancers. The fusions reported seem to contribute to the initiation and maintenance of malignancy [32] thus being good targets for new drugs in cancer therapy [4]. In 2013, Frattini et al. described two in-frame fusions involving *NTRK1* (*BCAN-NTRK1* and *NFASC-NTRK1*) in 185 GBM tested [25]. These genomic events were found as recurrent in GBM [32, 67]. Zheng et al. (2014) reported one in-frame fusion involving the exon 21 of *ARHGEF2* (encoding Rho/Rac guanine nucleotide exchange factor 2) and the exon 10 of *NTRK1*, and two in-frame fusions involving the exon 5 of *CHTOP* (encoding the chromatin target of PRMT1) and the exon 10 of *NTRK1* on a brain tumor set of 115 samples [80].

The ROS proto-oncogene 1 (*ROS1*) belongs to a subfamily of insulin RTK genes and is activated by fusion in a variety of tumors, with at least 26 different partners [72]. The first fusion protein discovered in GBM involved *ROS1* and *GOPC* (alias *FIG*), in which an intra-chromosomal deletion of 240 kb led to a constitutively active kinase, suggesting an oncogenic activity [9, 17, 20]. Shah et al. (2013) described a case with *CEP85L-*

ROS1 fusion in The Cancer Genome Atlas (TCGA) [67]. In lung cancer, *ROS1* rearrangements define a unique molecular subclass that respond to the tyrosine kinase inhibitor crizotinib [68]. In our sample there was one positive case for each of the *NTRK1* and *ROS1* rearrangements, and this low frequency is in accordance with the literature [25, 32, 67, 80].

The 4q12 chromosome region harbors three genes encoding potentially drug targeted RTKs: *KIT* (proto-oncogene receptor tyrosine kinase), *PDGFRA* (platelet derived growth factor receptor alpha), and *KDR* (kinase insert domain receptor). The main mechanism of activation for these RTKs is amplification [41, 48, 57]. The frequency of amplification of the *KIT*, *PDGFRA* and *KDR* genes varies among different GBM studies from 4.4 to 21.6%, 8.5 to 36% and 3.3 to 36%, respectively [11, 12, 30, 41, 47, 48, 57, 77]. In our study, frequencies detected by different criteria were similar to each other and within the ranges described in literature. We observed an association between *KIT* amplification and patients' survival in the univariate analyses using C3 and C4 criteria, but these results were not sustained in the multivariate analyses. For the other genes, *PDGFRA* and *KDR*, no significant correlation between the amplification and survival of patients was found. This is consistent with the results from Joensuu et al. (2005) and Nobusawa et al. (2011) who used FISH and differential PCR, respectively, to evaluate amplification of these genes [30, 48]. However, Burford et al. (2013) found that amplification of these genes were individually associated with poor clinical outcome of the patients with GBM [12].

The gene RB transcriptional corepressor 1 (*RBI*) encodes the retinoblastoma protein (Rb1), a component of regulatory pathway that controls the G1 to S transition of the cell cycle [13]. This protein also stabilizes the constitutive heterochromatin to maintain the overall chromatin structure. Brennan et al. (2013) reported Rb function loss in 7.6% of GBM samples by direct *RBI* deletion/mutation, lower than the frequency of this marker in our study [11]. On the other hand, Rodriguez et al. (2008) found *RBI* deletion/chromosome 13 monosomy in 25% of GBM samples, and no association between this alteration and survival was detected [61]. Other authors have demonstrated higher proportions of *RBI* deletion in GBM (34%), but they have not identified any association between *RBI* status and survival [26]. Bäcklund et al. (2003) also found no association between *RBI* deletion and survival [6]. However, when grouping the alterations in numerous genes on the Rb1 pathway (*CDKN2A*, *CDKN2B*, *RBI*, and *CDK4*), they found a significantly shorter median survival when compared with the normal Rb1 pathway group.

Novel therapeutic agents targeting these oncogenic pathways are in progress. A search on the website clinicaltrials.gov on January 5th, 2018 identified studies as follows [73]. For *NTRK1*, there were four clinical trials in phase 1 and 2 with different drugs and tumors, including GBM. There were no studies with GBM and *ROS1* specifically, but there were 53 studies evaluating this gene in other tumors in different phases, especially in lung cancer. In relation to studies involving *KIT*, *PDGFRA* and *KDR* genes, there were respectively two, three and seven trials in different phases and using distinct drugs, including patients with GBM. Agents targeting Rb1 pathway are in development, however their success will likely depend on a robust patient stratification into molecular subgroups [45, 66], which does not seem to be achieved yet. There were three clinical trials in phase 1 and 2 targeting *RBI* on GBM specifically.

In summary, *NTRK1* and *ROS1* gene fusions seems to be rare in GBM and may not be correlated with clinical or demographic characteristics. Amplification of the *KIT*, *PDGFRA*, and *KDR* genes and deletion of *RBI* were more frequent events and, although they did not appear to impact patient's survival, they may provide a target for new therapeutic regimens. Importantly, the molecular profile of GBM in patients from Brazil resembled

that from other geographical areas. However, it cannot be ruled out that the sample size may have influenced the relation of these cytogenetic markers with clinical characteristics, such as survival. For example, an increase in sample size perhaps might show an association between *KIT* amplification and patients' survival in the multivariate analyses using C3 and C4 criteria. Despite the similarities observed with studies performed in other geographical areas, it was noteworthy that age, complications after surgery and tumor side were associated with patient survival and these variables may be related to the characteristics and conditions of health systems of developing countries, including late cancer diagnosis.

Acknowledgments

We acknowledge the technical support from the Molecular Pathology Shared Resource of the University of Colorado Cancer Center (NCI- grant CCSG P30 CA046934) and the scholarship provided by the Brazilian Agency Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) to PT.

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflicts of interest.

Ethical approval: All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional research committee.

Reference

1. Abreu E, Koifman S (2002) Fatores prognóstico no cancer de mama feminino. *Revista Brasileira de Cancerologia* 48:113-131
2. Aisner DL, Nguyen TT, Paskulin DD, Le AT, Haney J, Schulte N, Chionh F, Hardingham J, Mariadason J, Tebbutt N, Doebele RC, Weickhardt AJ, Varella-Garcia M (2014) ROS1 and ALK fusions in colorectal cancer, with evidence of intratumoral heterogeneity for molecular drivers. *Mol Cancer Res* 12:111-118. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-13-0479-T
3. Aldape K, Zadeh G, Mansouri S, Reifenberger G, von Deimling A (2015) Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol* 129(6):829-48. doi: 10.1007/s00401-015-1432-1
4. Amatu A, Sartore-Bianchi A, Siena S (2016) NTRK gene fusions as novel targets of cancer therapy across multiple tumour types. *ESMO Open* 1:e000023. doi: 10.1136/esmoopen-2015-000023
5. Ardini E, Menichincheri M, Banfi P, Bosotti R, De Ponti C, Pulci R, Ballinari D, Ciomei M, Texido G, Degrassi A et al. (2016) Entrectinib, a Pan-TRK, ROS1, and ALK Inhibitor with Activity in Multiple Molecularly Defined Cancer Indications. *Mol Cancer Ther* 15(4):628-39. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-15-0758
6. Bäcklund LM, Nilsson BR, Goike HM, Schmidt EE, Liu L, Ichimura K, Collins VP (2003) Short postoperative survival for glioblastoma patients with a dysfunctional Rb1 pathway in combination with no wild-type PTEN. *Clin Cancer Res* 9:4151-4158
7. Bauchet L, Zouaoui S, Darlix A, Menjot de Champfleury N, Ferreira E, Fabbro M, Kerr C, Taillandier L (2014) Assessment and treatment relevance in elderly glioblastoma patients. *Neuro Oncol* 16:1459-1468. doi: 10.1093/neuonc/nou063
8. Becker AP, Scapulatempo-Neto C, Carloni AC, Paulino A, Sheren J, Aisner DL, Musselwhite E, Clara C, Machado HR, Oliveira RS, Neder L, Varella-Garcia M, Reis RM (2015) KIAA1549: BRAF Gene Fusion and

- FGFR1 Hotspot Mutations Are Prognostic Factors in Pilocytic Astrocytomas. *J Neuropathol Exp Neurol*. 74(7):743-54. doi: 10.1097/NEN.0000000000000213
9. Bergethon K, Shaw AT, Ou SH, Katayama R, Lovly CM, McDonald NT, Massion PP, Siwak-Tapp C, Gonzalez A, Fang R, Mark EJ, Batten JM, Chen H, Wilner KD, Kwak EL, Clark JW, Carbone DP, Ji H, Engelman JA, Mino-Kenudson M, Pao W, Iafrate AJ (2012) ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *J Clin Oncol* 30:863-870. doi: 10.1200/JCO.2011.35.6345
 10. Brat DJ, Verhaak RG, Aldape KD et al (2015) Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas. *N Engl J Med* 372:2481-2498. doi: 10.1056/NEJMoa1402121
 11. Brennan CW, Verhaak RG, McKenna A et al (2013) The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* 155(2):462-477. doi: 10.1016/j.cell.2013.09.034
 12. Burford A, Little SE, Jury A, Popov S, Laxton R, Doey L, Al-Sarraj S, Jürgensmeier JM, Jones C (2013) Distinct phenotypic differences associated with differential amplification of receptor tyrosine kinase genes at 4q12 in glioblastoma. *PLoS One* 8(8):e71777. doi: 10.1371/journal.pone.0071777
 13. Burns KL, Ueki K, Jhung SL, Koh J, Louis DN (1998) Molecular genetic correlates of p16, cdk4, and pRb immunohistochemistry in glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol*. 57(2):122-30.
 14. Caetano R, Vianna CMM, Thuler LCS, Girianelli VR (2006) Custo-efetividade no diagnóstico precoce do cancer do colo uterino no Brasil. *Revista Saúde Coletiva* 16(1):99-118
 15. Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E, Bartolini S, Ceresoli GL, Bemis L, Haney J, Witta S, Danenberg K, Domenichini I, Ludovini V, Magrini E, Gregorc V, Doglioni C, Sidoni A, Tonato M, Franklin WA, Crino L, Bunn PA, Varella-Garcia M (2005) Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 97:643-655. doi: 10.1093/jnci/dji112
 16. Chaichana KL, Chaichana KK, Olivi A, Weingart JD, Bennett R, Brem H, Quiñones-Hinojosa A (2011) Surgical outcomes for older patients with glioblastoma multiforme: preoperative factors associated with decreased survival. *Clinical article. J Neurosurg* 114:587-594. doi: 10.3171/2010.8.JNS1081
 17. Charest A, Lane K, McMahon K, Park J, Preisinger E, Conroy H, Housman D (2003) Fusion of FIG to the receptor tyrosine kinase ROS in a glioblastoma with an interstitial del(6)(q21q21). *Genes Chromosomes Cancer* 37:58-71. doi: 10.1002/gcc.10207
 18. Cannon FV, Rosenthal MA, Drummond K (2016) Glioblastoma multiforme in the very elderly. *Neurosurg Rev* 39:55-61. doi: 10.1007/s10143-015-0652-0
 19. D'Alessio A, Proietti G, Lama G, Biamonte F, Lauriola L, Moscato U, Vescovi A, Mangiola A, Angelucci C, Sica G (2016) Analysis of angiogenesis related factors in glioblastoma, peritumoral tissue and their derived cancer stem cells. *Oncotarget* 7:78541-78556. doi: 10.18632/oncotarget
 20. Davies KD, Le AT, Theodoro MF, Skokan MC, Aisner DL, Berge EM, Terracciano LM, Cappuzzo F, Incarbone M, Roncalli M, Allosio M, Santoro A, Camidge DR, Varella-Garcia M, Doebele RC (2012) Identifying and targeting ROS1 gene fusions in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 18:4570-4579. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0550
 21. Doebele RC, Davis LE, Vaishnavi A, Le AT, Estrada-Bernal A, Keysar S, Jimeno A, Varella-Garcia M, Aisner DL, Li Y, Stephens PJ, Morosini D, Tuch BB, Fernandes M, Nanda N, Low JA (2015) An Oncogenic NTRK Fusion in a Patient with Soft-Tissue Sarcoma with Response to the Tropomyosin-Related Kinase Inhibitor LOXO-101. *Cancer Discov* 5:1049-1057. doi: 10.1158/2159-8290

22. Ening G, Osterheld F, Capper D, Schmieder K, Brenke C (2015) Risk factors for glioblastoma therapy associated complications. *Clin Neurol Neurosurg* 134:55-59. doi: 10.1016/j.clineuro.2015.01.006
23. Fekete B, Werlenius K, Örndal C, Rydenhag B (2016) Prognostic factors for glioblastoma patients--a clinical population-based study. *Acta Neurol Scand* 133:434-441. doi: 10.1111/ane.12481
24. Frattini M, Ferrario C, Bressan P, Balestra D, De Cecco L, Mondellini P, Bongarzone I, Collini P, Gariboldi M, Pilotti S, Pierotti MA, Greco A (2004) Alternative mutations of BRAF, RET and NTRK1 are associated with similar but distinct gene expression patterns in papillary thyroid cancer. *Oncogene* 23:7436-7440. doi: 10.1038/sj.onc.1207980
25. Frattini V, Trifonov V, Chan JM, Castano A, Lia M, Abate F, Keir ST, Ji AX, Zoppoli P, Niola F, Danussi C, Dolgalev I, Porrati P, Pellegatta S, Heguy A, Gupta G, Pisapia DJ, Canoll P, Bruce JN, McLendon RE, Yan H, Aldape K, Finocchiaro G, Mikkelsen T, Privé GG, Bigner DD, Lasorella A, Rabadan R, Iavarone A (2013) The integrated landscape of driver genomic alterations in glioblastoma. *Nat Genet* 45:1141-1149. doi: 10.1038/ng.2734
26. Goldhoff P, Clarke J, Smirnov I, Berger MS, Prados MD, James CD, Perry A, Phillips JJ (2012) Clinical stratification of glioblastoma based on alterations in retinoblastoma tumor suppressor protein (RB1) and association with the proneural subtype. *J Neuropathol Exp Neurol* 71:83-89. doi: 10.1097/NEN.0b013e31823fe8f1
27. Hashizume R, Zhang A, Mueller S, Prados MD, Lulla RR, Goldman S, Saratsis AM, Mazar AP, Stegh AH, Cheng SY et al. (2016) Inhibition of DNA damage repair by the CDK4/6 inhibitor palbociclib delays irradiated intracranial atypical teratoid rhabdoid tumor and glioblastoma xenograft regrowth. *Neuro Oncol* 18(11):1519-1528. doi: 10.1093/neuonc/now106.
28. 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* 166:46-55. doi: 10.1016/j.cancergencyto.2005.08.021
29. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Estimativa 2016: Incidência de câncer no Brasil. <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016>. Accessed on May 14th 2017.
30. Joensuu H, Puputti M, Sihto H, Tynnenen O, Nupponen NN (2005) Amplification of genes encoding KIT, PDGFRalpha and VEGFR2 receptor tyrosine kinases is frequent in glioblastoma multiforme. *J Pathol* 207:224-231. doi: 10.1002/path.1823
31. Katoh M, Nakagama H (2014) FGF receptors: cancer biology and therapeutics. *Med Res Rev* 34:280-300. doi: 10.1002/med.21288
32. Kim J, Lee Y, Cho HJ, Lee YE, An J, Cho GH, Ko YH, Joo KM, Nam DH (2014) NTRK1 fusion in glioblastoma multiforme. *PLoS One* 9:e91940. doi: 10.1371/journal.pone.0091940
33. Kleihues P, Burger PC, Aldape KD, Brat DJ, Biernat W, Bigner DD, et al (2007) Glioblastoma. In: Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, (ed) WHO Classification of tumours of the central nervous system. 4th edn. International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, p. 33-49
34. 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)* 34:261-275. doi: 10.1007/s13402-011-0034-8
35. 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* 10:7820-7826. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0710
36. Korshunov A, Sycheva R, Golanov A (2005) The prognostic relevance of molecular alterations in glioblastomas for patients age < 50 years. *Cancer* 104:825-832. doi: 10.1002/cncr.21221
 37. Koshiyama DB, Trevisan P, Graziadio C, Rosa RFM, Cunegatto B, Scholl J, Provenzi VO, de Sá AP, Soares FP, Velho MC, de A P Filho N, Oliveira CA, Zen PRG (2017) Frequency and clinical significance of chromosome 7 and 10 aneuploidies, amplification of the EGFR gene, deletion of PTEN and TP53 genes, and 1p/19q deficiency in a sample of adult patients diagnosed with glioblastoma from Southern Brazil. *J Neurooncol*. 135(3):465-472. doi: 10.1007/s11060-017-2606-6.
 38. Lamborn KR, Chang SM, Prados MD (2004) Prognostic factors for survival of patients with glioblastoma: recursive partitioning analysis. *Neuro Oncol* 6:227-235. doi: 10.1215/S1152851703000620
 39. Layfield LJ, Willmore C, Tripp S, Jones C, Jensen RL (2006) Epidermal growth factor receptor gene amplification and protein expression in glioblastoma multiforme: prognostic significance and relationship to other prognostic factors. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 14:91-96. doi: 10.1097/01.pai.0000159772.73775.2e
 40. Le Mercier M, Hastir D, Moles Lopez X, De Nève N, Maris C, Trepant AL, Rorive S, Decaestecker C, Salmon I (2012) A simplified approach for the molecular classification of glioblastomas. *PLoS One* 7:e45475. doi: 10.1371/journal.pone.0045475
 41. 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* 72:1614-1620. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-4069
 42. Liu TT, Achrol AS, Mitchell LA, Du WA, Loya JJ, Rodriguez SA, Feroze A, Westbroek EM, Yeom KW, Stuart JM, Chang SD, Harsh GR, Rubin DL (2016) Computational Identification of Tumor Anatomic Location Associated with Survival in 2 Large Cohorts of Human Primary Glioblastomas. *AJNR Am J Neuroradiol* 37:621-628. doi: 10.3174/ajnr.A4631
 43. Louis DN, Brat DJ, Ohgaki H (2016) Glioblastoma, IDH wildtype. In: Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK (ed) *World Health Organization Histological Classification of Tumours of the Central Nervous System, Revised 4th edn*. International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, pp 28-51
 44. Mariniello G, Peca C, De Caro MeB, Giamundo A, Donzelli R, Maiuri F (2014) Glioblastoma in the elderly: the impact of advanced age on treatment and survival. *J Neurol Surg A Cent Eur Neurosurg* 75:276-281. doi: 10.1055/s-0033-1349713
 45. Michaud K, Solomon DA, Oermann E, Kim JS, Zhong WZ, Prados MD, Ozawa T, James CD, Waldman T (2010) Pharmacologic inhibition of cyclin-dependent kinases 4 and 6 arrests the growth of glioblastoma multiforme intracranial xenografts. *Cancer Res* 70:3228-3238. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-4559
 46. Moraes AB, Zanini RR, Turchiello MS, Riboldi J, Medeiros LR (2006) Estudo da sobrevida de pacientes com câncer de mama atendidas no hospital da Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. *Caderno Saúde Pública* 22(10):2219-2228. doi: 10.1590/S0102-311X2006001000028
 47. Nobusawa S, Lachuer J, Wierinckx A, Kim YH, Huang J, Legras C, Kleihues P, Ohgaki H (2010) Intratumoral patterns of genomic imbalance in glioblastomas. *Brain Pathol* 20:936-944. doi: 10.1111/j.1750-3639.2010.00395.x

48. Nobusawa S, Stawski R, Kim YH, Nakazato Y, Ohgaki H (2011) Amplification of the PDGFRA, KIT and KDR genes in glioblastoma: a population-based study. *Neuropathology* 31:583-588. doi: 10.1111/j.1440-1789.2011.01204.x
49. Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, Burkhard C, Schüler D, Probst-Hensch NM, Maiorka PC, Baeza N, Pisani P, Yonekawa Y, Yasargil MG, Lütolf UM, Kleihues P (2004) Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res* 64:6892-6899. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1337
50. Ohgaki H, Kleihues P (2013) The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res* 19(4):764-772. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3002
51. Olmez I, Brenneman B, Xiao A, Serbulea V, Benamar M, Zhang Y, Manigat L, Abbas T, Lee J, Nakano I et al. (2017) Combined CDK4/6 and mTOR inhibition is synergistic against glioblastoma via multiple mechanisms. *Clin Cancer Res*. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-0803.
52. Omuro A, DeAngelis LM (2013) Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review. *JAMA* 310:1842-1850. doi: 10.1001/jama.2013.280319
53. Ostrom QT, Gittleman H, Xu J, Kromer C, Wolinsky Y, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS (2016) CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2009-2013. *Neuro Oncol* 18:v1-v75. doi: 10.1093/neuonc/now207
54. Park DY, Choi C, Shin E, Lee JH, Kwon CH, Jo HJ, Kim HR, Kim HS, Oh N, Lee JS, Park OK, Park E, Park J, Shin JY, Kim JI, Seo JS, Park HD (2016) NTRK1 fusions for the therapeutic intervention of Korean patients with colon cancer. *Oncotarget* 7:8399-8412. doi: 10.18632/oncotarget.6724
55. Peng S, Dhruv H, Armstrong B, Salhia B, Legendre C, Kiefer J, Parks J, Virk S, Sloan AE, Ostrom QT et al. (2017) Integrated genomic analysis of survival outliers in glioblastoma. *Neuro Oncol* 19(6):833-844. doi: 10.1093/neuonc/now269.
56. Pereira EL, Lima PD, Khayat AS, Bahia MO, Bezerra FS, Andrade-Neto M, Montenegro RC, Pessoa C, Costa-Lotufo LV, Moraes MO, Yoshioka FK, Pinto GR, Burbano RR. (2011) Inhibitory effect of pisosterol on human glioblastoma cell lines with C-MYC amplification. *J Appl Toxicol*. 31(6):554-60. doi: 10.1002/jat.1596.
57. Phillips JJ, Aranda D, Ellison DW, Judkins AR, Croul SE, Brat DJ, Ligon KL, Horbinski C, Venneti S, Zadeh G, Santi M, Zhou S, Appin CL, Sioletic S, Sullivan LM, Martinez-Lage M, Robinson AE, Yong WH, Cloughesy T, Lai A, Phillips HS, Marshall R, Mueller S, Haas-Kogan DA, Molinaro AM, Perry A (2013) PDGFRA amplification is common in pediatric and adult high-grade astrocytomas and identifies a poor prognostic group in IDH1 mutant glioblastoma. *Brain Pathol* 23:565-573. doi: 10.1111/bpa.12043
58. 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. doi: 10.1007/s00428-007-0562-9.
59. Preusser M, de Ribaupierre S, Wöhrer A, Erridge SC, Hegi M, Weller M, Stupp R (2011) Current concepts and management of glioblastoma. *Ann Neurol* 70:9-21. doi: 10.1002/ana.22425
60. Purkait S, Mallick S, Sharma V, Kumar A, Pathak P, Jha P, Biswas A, Julka PK, Gupta D, Suri A, Upadhyay AD, Suri V, Sharma MC, Sarkar C (2016) A simplified approach for molecular classification of glioblastomas (GBMs): experience from a tertiary care center in India. *Brain Tumor Pathol* 33:183-190. doi:

10.1007/s10014-016-0251-y

61. 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* 113:2779-2789. doi: 10.1002/cncr.23899
62. Rolfo C, Ruiz R, Giovannetti E, Gil-Bazo I, Russo A, Passiglia F, Giallombardo M, Peeters M, Racz L. (2015) Entrectinib: a potent new TRK, ROS1, and ALK inhibitor. *Expert Opin Investig Drugs* 24(11):1493-500. doi: 10.1517/13543784.2015.1096344
63. Sanchez LM (2016) Glioblastoma: Multidisciplinary treatment approaches. *Appl Rad Oncol.* 5(1):17-25
64. Schäfer N, Gielen GH, Kebir S, Wieland A, Till A, Mack F, Schaub C, Tzaridis T, Reinartz R, Niessen M et al. (2016) Phase I trial of dovitinib (TKI258) in recurrent glioblastoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 142(7):1581-9. doi: 10.1007/s00432-016-2161-0
65. Schneider IJC, d'Orsi E (2009) Sobrevida em cinco anos e fatores prognósticos em mulheres com cancer de mama em Santa Catarina, Brasil. *Caderno Saúde Pública* 25(6):1285-1296. doi: 10.1590/S0102-311X2009000600011
66. Schröder LB, McDonald KL (2015) CDK4/6 Inhibitor PD0332991 in Glioblastoma Treatment: Does It Have a Future? *Front Oncol* 5:259. doi: 10.3389/fonc.2015.00259
67. Shah N, Lankarovich M, Lee H, Yoon JG, Schroeder B, Foltz G (2013) Exploration of the gene fusion landscape of glioblastoma using transcriptome sequencing and copy number data. *BMC Genomics* 14:818. doi: 10.1186/1471-2164-14-818
68. Shaw AT, Ou SH, Bang YJ, Camidge DR, Solomon BJ, Salgia R, Riely GJ, Varella-Garcia M, Shapiro GI, Costa DB, Doebele RC, Le LP, Zheng Z, Tan W, Stephenson P, Shreeve SM, Tye LM, Christensen JG, Wilner KD, Clark JW, & Iafrate AJ (2014) Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 371:1963-1971. doi: 10.1056/NEJMoa1406766
69. Simpson JR, Horton J, Scott C, Curran WJ, Rubin P, Fischbach J, Isaacson S, Rotman M, Asbell SO, Nelson JS (1993) 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* 26:239-244
70. Stupp R, Taillibert S, Kanner A, et al. (2017) Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* 318(23):2306-2316. doi: 10.1001/jama.2017.18718
71. 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* 139:166-171. doi: 10.1016/j.clineuro.2015.10.002
72. Uguen A, De Braekeleer M (2016) ROS1 fusions in cancer: a review. *Future Oncol* 12(16):1911-1928. doi: 10.2217/fon-2016-0050
73. US National Library of Medicine: ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/>. Accessed on January 5th 2018
74. Vaishnavi A, Capelletti M, Le AT, Kako S, Butaney M, Ercan D, Mahale S, Davies KD, Aisner DL, Pilling AB, Berge EM, Kim J, Sasaki H, Park SI, Kryukov G, Garraway LA, Hammerman PS, Haas J, Andrews SW, Lipson D, Stephens PJ, Miller VA, Varella-Garcia M, Jänne PA, Doebele RC (2013) Oncogenic and drug-sensitive NTRK1 rearrangements in lung cancer. *Nat Med* 19:1469-1472. doi: 10.1038/nm.3352

75. Vaishnavi A, Le AT, Doebele RC (2015) TRKking down an old oncogene in a new era of targeted therapy. *Cancer Discov* 5(1):25-34. doi: 10.1158/2159-8290.CD-14-0765
76. Van Meir EG, Hadjipanayis CG, Norden AD, Shu HK, Wen PY, Olson JJ (2010) Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. *CA Cancer J Clin* 60:166-193. doi: 10.3322/caac.20069
77. Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E et al (2010) Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 17:98-110. doi: 10.1016/j.ccr.2009.12.020
78. Whittaker S, Madani D, Joshi S, Chung SA, Johns T, Day B, Khasraw M, McDonald KL (2017) Combination of palbociclib and radiotherapy for glioblastoma. *Cell Death Discov* 3:17033. doi: 10.1038/cddiscovery.2017.33
79. Wu HB, Yang S, Weng HY, Chen Q, Zhao XL, Fu WJ, Niu Q, Ping YF, Wang JM, Zhang X et al. (2017) Autophagy-induced KDR/VEGFR-2 activation promotes the formation of vasculogenic mimicry by glioma stem cells. *Autophagy*:1-15. doi: 10.1080/15548627.2017.1336277
80. Zheng Z, Liebers M, Zhelyazkova B, Cao Y, Panditi D, Lynch KD, Chen J, Robinson HE, Shim HS, Chmielecki J, Pao W, Engelman JA, Iafrate AJ, Le LP (2014) Anchored multiplex PCR for targeted next-generation sequencing. *Nat Med* 20:1479-1484. doi: 10.1038/nm.3729
81. Zorzan M, Giordan E, Redaelli M, Caretta A, Mucignat-Caretta C (2015) Molecular targets in glioblastoma. *Future Oncol*. 11(9):1407-20. doi: 10.2217/fon.15.22

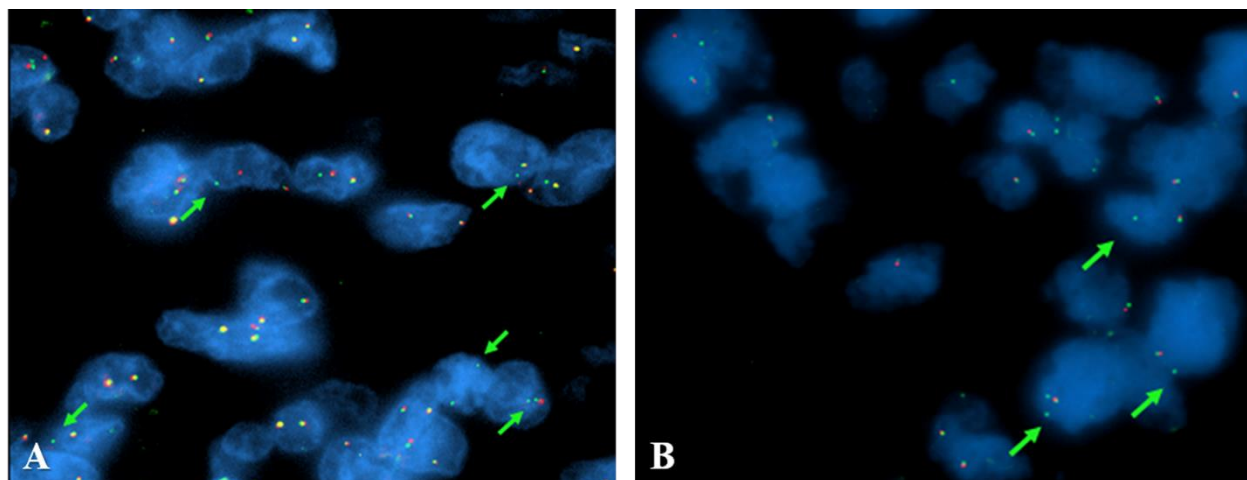
Figures Legends

Figure 1. Microscope fields of tumors showing positive patterns for *NTRK1* (A) in case 61 and *ROS1* rearrangements (B) in case 31, identified by the presence of single green signals (see arrows).

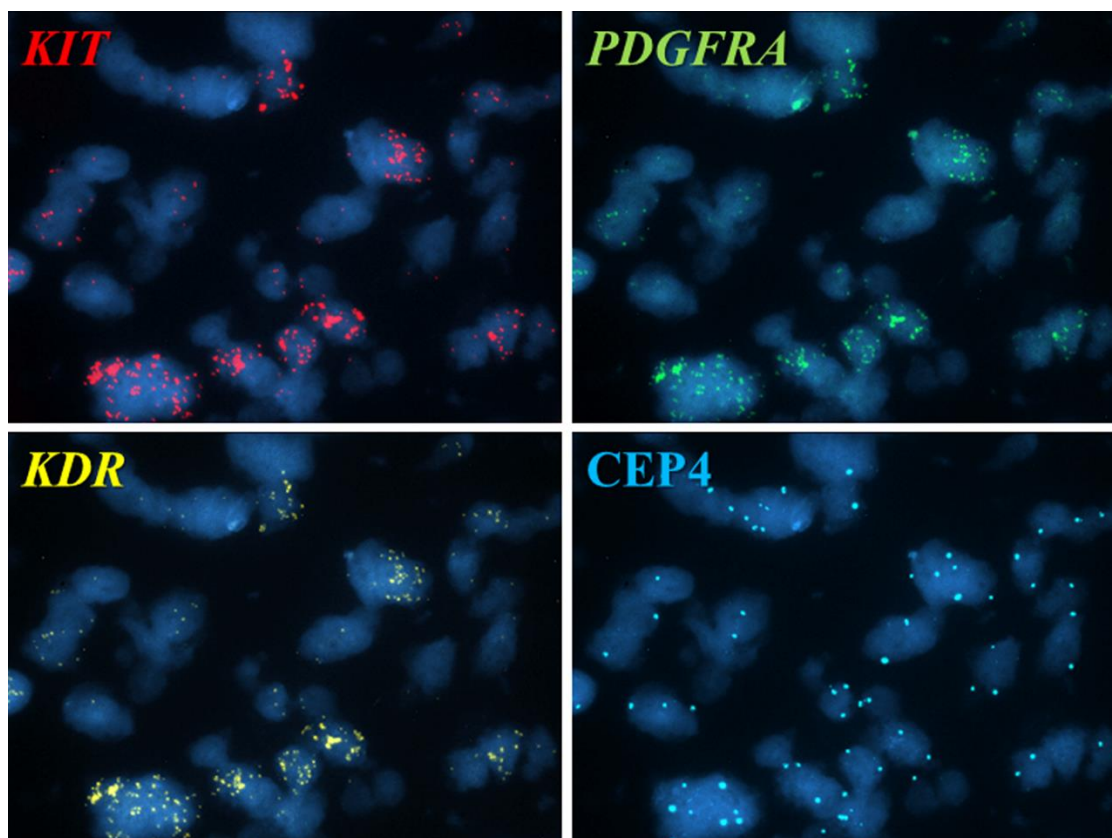


Figure 2. Segmented images of a microscope field showing co-amplification of the *KIT* (red signal), *PDGFRA* (green signal) and *KDR* (yellow signal) genes in case 70. *CEP4* (aqua signal) corresponded to a control probe recognizing the centromere of chromosome 4.

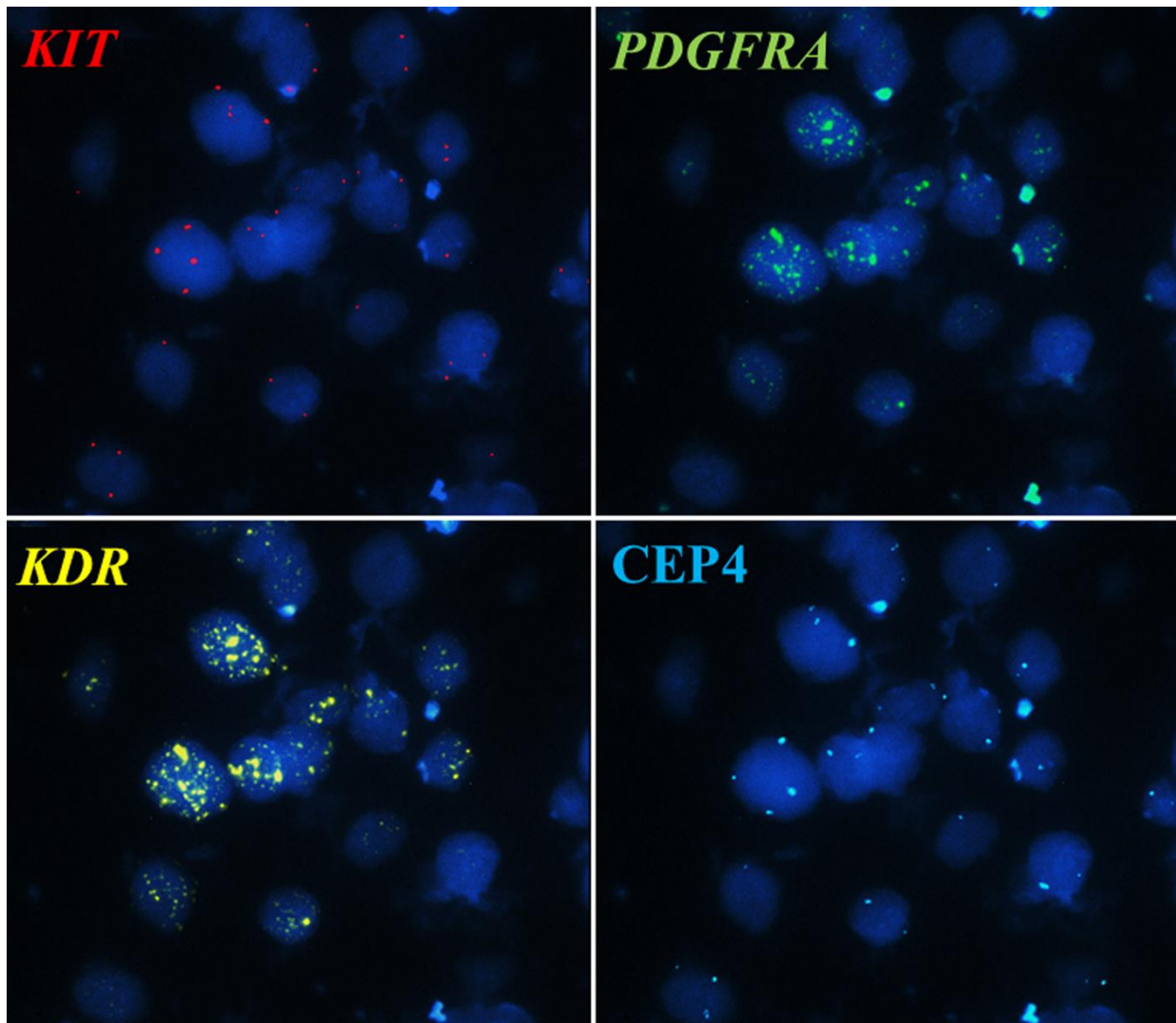


Figure 3. Segmented images of a microscope field showing co-amplification of the *PDGFRA* (green signal) and *KDR* (yellow signal) genes in case 69. In this tumor specimen, *KIT* (red signal) had similar copy number as the control CEP4 (aqua signal).

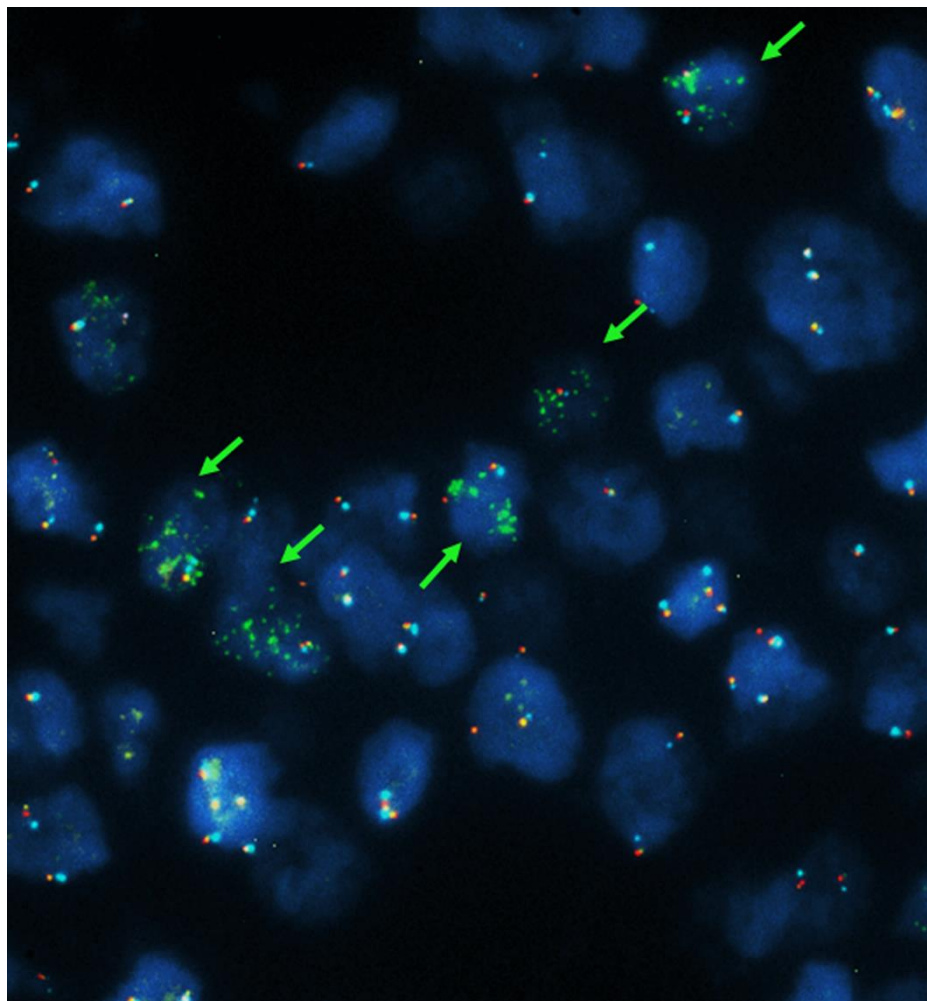


Figure 4. Microscope field illustrating amplification only for the *PDGFRA* gene (green signals) in case 85 (green arrows).

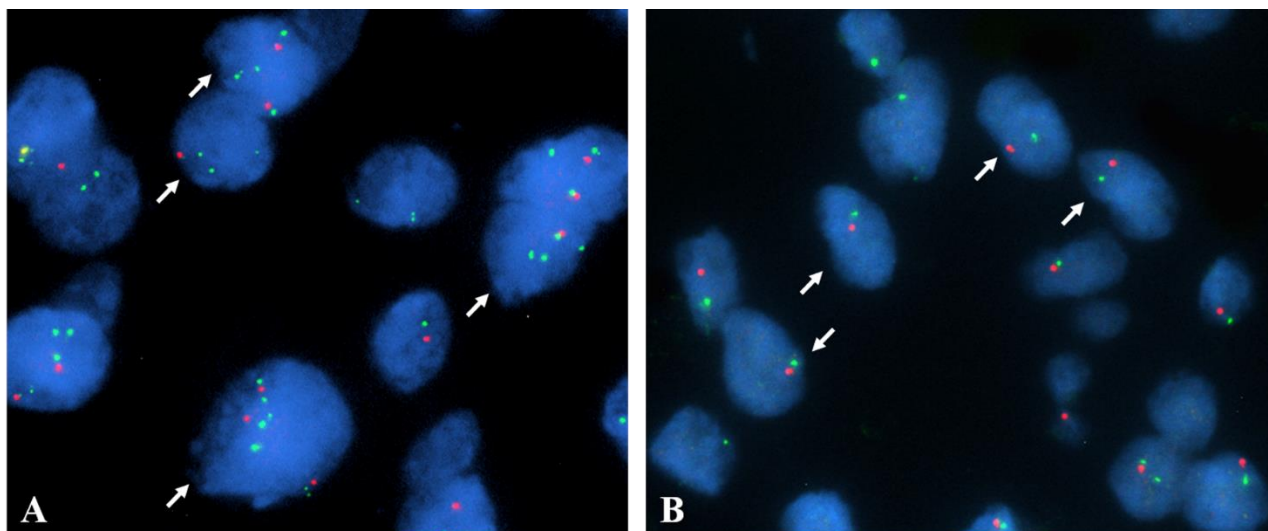


Figure 5. Microscope fields showing tumor cells with loss of the *RB1* gene. A. Case 41 with unbalanced loss of *RB1* (red signal) in comparison with the control probe 13q34 (green signal). B. Case 96 with a pattern suggestive of monosomy 13. Representative nuclei are indicated by white arrows.

Table 1. Clinical characteristics of the patients (total= 113).

Variable	N (%)
Sex (n=113)	
Male	60 (53.1)
Female	53 (46.9)
Age (n=113)	mean 56.9 y; SD 12.3 y
<40 years	7 (6.2)
40-59 years	54 (47.8)
≥60 years	52 (46.0)
Clinical feature groups (n=112)	
Focal disturbance	64 (57.1)
Increase ICP	58 (51.8)
Behavioral change	27 (24.1)
Seizure	18 (16.1)
Decreased consciousness	14 (12.5)
Tumor location (n=113)	
Frontal	35 (31.0)
Temporal	23 (20.4)
Parietal	11 (9.7)
Other	44 (38.9)
Tumor side (n= 111)	
Right	66 (59.5)
Left	43 (38.7)
Bilateral	2 (1.8)
Number of involved regions in brain (n=113)	
One region	72 (63.7)
Two or more regions	41 (36.3)
Prior CNS tumor (n=102)	
No	95 (93.1)
Yes	7 (6.9)
Resection (n=109)	
Partial	77 (70.6)
Gross total	32 (29.4)
Complications after surgery (n= 102)	
No	88 (86.3)
Yes	14 (13.7)

N: number of patients; %: percentage; ICP: Intracranial pressure;
CNS: Central Nervous System.

Table 2. Multivariate analysis (Cox Regression) of variables associated with survival.

Variable	Number of patients	Median survival days (95% CI)	1-year survival	5-year survival	HR (95% CI)*	P value
Age						
<40 years	7	619 (0-1422)	57.1%	14.3%	1.00	-
40-59 years	54	220 (123-317)	27.8%	4.6%	1.74 (0.72 – 4.21)	0.223
≥60 years	52	123 (75.9-170)	13.5%	0	3.38 (1.35–8.84)	0.009
Tumor side						
Right	66	164 (130-197)	21.2%	0	1.00	-
Left	43	220 (111-329)	25.6%	7%	0.58 (0.37–0.92)	0.022
Complications after surgery						
No	88	216 (160-271)	26.1%	3.4%	1.00	-
Yes	14	77 (0-161)	0	0	2.69 (1.40–5.18)	0.003

HR: Hazard Ratio; %: percentage; CI: Confidence Interval; *: adjusted by age, increase ICP (intracranial pressure), frontal location, tumor side, number of involved regions, resection, complication, Little et al. (2012) and Burford et al. (2013) criteria for *KIT* amplification.

Table 3. Molecular cytogenetic analyses in 113 GBM cases according to the different criteria selected for interpretation.

Assays and Criteria for Interpretation		N (%)	
Gene Fusions		No	Yes
<i>NTRK1</i> rearrangement			
1) $\geq 15\%$ of tumor cells showing single 3' or single 5' gene signal, or a separation of 5' and 3' gene signals greater than one signal diameter (Vaishnavi et al., 2013; Aisner et al., 2014; Zheng et al., 2014)		112 (99.1)	1 (0.9)
<i>ROS1</i> rearrangement			
1) $\geq 15\%$ of tumor cells showing single 3' or single 5' gene signal, or a separation of 5' and 3' gene signals greater than one signal diameter (Vaishnavi et al., 2013; Aisner et al., 2014; Zheng et al., 2014)		112 (99.1)	1 (0.9)
Gene Amplification		No	Yes
<i>KIT</i>			
1) Cappuzzo et al., 2005		99 (87.6)	14 (12.4)
2) Rodriguez et al., 2008		99 (87.6)	14 (12.4)
3) Little et al., 2012		97 (85.8)	16 (14.2)
4) Burford et al., 2013		97 (85.8)	16 (14.2)
5) Purkait et al., 2016		100 (88.5)	13 (11.5)
<i>PDGFRA</i>			
1) Cappuzzo et al., 2005		91 (80.5)	22 (19.5)
2) Rodriguez et al., 2008		92 (81.4)	21 (18.6)
3) Little et al., 2012		89 (78.8)	24 (21.2)
4) Burford et al., 2013		89 (78.8)	24 (21.2)
5) Purkait et al., 2016		91 (80.5)	22 (19.5)
<i>KDR</i>			
1) Cappuzzo et al., 2005		93 (82.3)	20 (17.7)
2) Rodriguez et al., 2008		93 (82.3)	20 (17.7)
3) Little et al., 2012		90 (79.6)	23 (20.4)
4) Burford et al., 2013		90 (79.6)	23 (20.4)
5) Purkait et al., 2016		93 (82.3)	20 (17.7)
Gene Loss		No	Yes
<i>RBI</i> deletion			
1) Rodriguez et al., 2008		100 (88.5)	13 (11.5)
2) Goldhoff et al., 2012		99 (87.6)	14 (12.4)
3) Rodriguez et al., 2008 and /or Goldhoff et al., 2012		95 (84.1)	18 (15.9)

%: percentage, ratio: gene/control

Table 4. Distribution of positive cases for gene amplification in the 113 GBM cases based on different cytogenetic criteria.

Gene Amplification Status	Criteria N (%)				
	C1	C2	C3	C4	C5
Negative for all 3 genes, <i>KIT</i> , <i>PDGFRA</i> and <i>KDR</i>	91 (80.5)	92 (81.4)	89 (78.8)	89 (78.8)	91 (80.5)
Positive for all 3 genes, <i>KIT</i> , <i>PDGFRA</i> and <i>KDR</i>	14 (12.4)	14 (12.4)	16 (14.1)	16 (14.1)	13 (11.5)
Positive for 2 genes, <i>PDGFRA</i> and <i>KDR</i>	6 (5.3)	6 (5.3)	7 (6.2)	7 (6.2)	7 (6.2)
Positive for only <i>PDGFRA</i>	2 (1.8)	1 (0.9)	1 (0.9)	1 (0.9)	2 (1.8)

Criteria: C1: Cappuzzo et al., 2005; C2: Rodriguez et al., 2008; C3: Little et al., 2012; C4: Burford et al., 2013; C5: Purkait et al., 2016.

Table 5. Univariate and multivariate analysis (Cox Regression) of molecular cytogenetic markers and survival.

Gene / Criteria	Number of patients	1-year survival	5-year survival	HR (95% CI)*	P value*	HR (95% CI)**	P value**
<i>KIT</i> / C1							
No	99	25.3%	3.9%	1.00	-	1.00	-
Yes	14	7.1%	0	1.53 (0.86-2.72)	0.150	1.25 (0.65-2.40)	0.511
<i>KIT</i> / C3							
No	97	25.8%	4%	1.00	-	1.00	-
Yes	16	6.3%	0	1.75 (1.01-3.04)	0.046	1.47 (0.79-2.74)	0.228
<i>KIT</i> / C4							
No	97	25.8%	4%	1.00	-	1.00	-
Yes	16	6.3%	0	1.75 (1.01-3.04)	0.046	1.47 (0.79-2.74)	0.228
<i>RBI</i> both criteria							
No	95	23.2%	3.2%	1.00	-	1.00	-
Yes	18	22.2%	5.6%	0.72 (0.43-1.21)	0.217	0.64 (0.33-1.21)	0.167

HR: Hazard Ratio; %: percentage; CI: Confidence Interval; *: adjusted by age; **: adjusted by age, increase ICP (intracranial pressure), frontal location, tumor side, number of involved regions, resection, complication. Criteria: C1: Cappuzzo et al., 2005; C3: Little et al., 2012; C4: Burford et al., 2013.

Online Resource 1. Clinical data for all 113 patients.

Cases	Sex	Age at diagnosis	Clinical feature groups	Tumor location	Tumor side	N° of involved regions in brain	Prior CNS tumor	Resection	Complications after surgery	Survival (day)
1	M	72	BC	T	R	1	NA	PA	hematoma	24
2	F	63	FD	O	L	2	NA	PA	NA	346
3	M	55	FD, IICP, BC	O	L	2	NA	GTR	NA	189
4	M	68	FD, IICP	O	L	2	NA	GTR	NA	689
5	M	42	FD, IICP	F	L	1	NA	GTR	NA	2670
6	F	64	FD	P	R	1	NA	GTR	NA	302
7	M	30	FD	F	R	1	NA	PA	hematoma	105
8	F	28	FD, DC, IICP	F	L	1	NA	GTR	NA	861
9	M	23	FD, IICP	T	R	1	NA	PA	NA	646
10	F	28	FD, IICP, BC, S	F	R	1	astrocytoma II	PA	NA	306
11	F	78	FD, BC, S	O	R	2	NA	PA	NA	206
12	M	46	IICP, BC	F	R	1	NA	PA	NA	216
13	M	52	IICP, BC	T	L	1	NA	PA	NA	32
14	F	51	ND	O	L	2	NA	PA	hemorrhage	3
15	F	75	FD, IICP	O	R	2	NA	PA	NA	175
16	F	52	FD	O	R	2	NA	PA	NA	289
17	F	61	FD, S	F	R	1	NA	PA	NA	61
18	F	48	FD, IICP	F	R	1	NA	PA	NA	352
19	M	57	IICP	P	L	1	NA	PA	NA	524
20	F	51	FD	O	L	2	NA	PA	NA	231
21	M	68	IICP, BC	F	L	1	NA	PA	NA	206
22	M	69	FD	P	R	1	NA	GTR	NA	135
23	M	55	FD	P	L	1	NA	PA	NA	118
24	F	57	FD, BC	F	R	1	NA	PA	afasia and hemiplegia	141
25	M	52	DC	O	R	3	NA	GTR	NA	297
26	F	27	DC, IICP, BC	O	R	2	NA	GTR	NA	619
27	F	33	FD, IICP	O	R	2	astrocytoma II	PA	NA	164
28	F	71	FD, IICP	O	R	2	NA	PA	infection of the respiratory tract	145

29	M	52	FD	O	R	2	NA	PA	NA	159
30	F	51	IICP, BC	O	R	2	astrocytoma II	PA	NA	179
31	M	64	FD, S	P	R	1	NA	PA	NA	90
32	F	57	FD, IICP, BC	O	L	2	NA	PA	NA	83
33	F	70	FD	O	L	2	NA	PA	NA	355
34	F	41	IICP	O	L	2	astrocytoma III	PA	meningitis	330
35	F	42	IICP, BC	O	R	2	NA	PA	NA	62
36	F	64	FD, DC, IICP, S	F	R	1	NA	PA	NA	101
37	F	71	FD, DC	P	L	1	NA	PA	pneumonia	77
38	M	68	DC	O	L	3	NA	PA	NA	92
39	M	18	IICP, S	F	L	1	NA	PA	NA	2008
40	F	64	FD, IICP	F	L	1	NA	PA	muteness	233
41	F	55	IICP, BC	O	L	2	NA	PA	NA	280
42	F	46	FD, IICP, BC	P	L	1	NA	PA	NA	423
43	F	56	FD	F	R	1	NA	PA	NA	538
44	M	52	FD, DC	O	R	2	NA	PA	NA	260
45	M	48	FD, IICP	T	R	1	anaplastic ependymoma	PA	NA	137
46	M	65	S	P	R	1	NA	PA	meningitis	123
47	M	59	IICP	P	R	1	anaplastic astrocytoma III	PA	NA	326
48	M	62	BC	T	L	1	NA	PA	NA	239
49	F	52	FD, DC	F	R	1	NA	PA	NA	33
50	M	63	DC, IICP, BC	T	R	1	NA	PA	NA	256
51	M	69	FD	T	L	1	NA	PA	NA	122
52	F	59	FD, S	F	L	1	NA	PA	NA	119
53	F	70	FD, IICP	F	R	1	NA	GTR	NA	228
54	M	61	FD, DC, BC	T	L	1	NA	PA	NA	739
55	F	59	BC	T	R	1	NA	PA	NA	294
56	M	65	FD	O	L	2	NA	GTR	NA	65
57	M	52	FD	T	R	1	NA	PA	NA	139
58	F	48	FD	T	R	1	NA	PA	NA	700
59	M	41	FD, DC, BC	T	R	1	NA	PA	NA	235
60	F	61	FD	O	R	1	NA	GTR	NA	31
61	M	63	FD	T	R	1	NA	PA	NA	141

62	F	64	FD, DC	F	L	1	NA	PA	NA	76
63	M	52	FD	O	L	2	NA	PA	NA	394
64	F	61	FD, BC	F	R	1	NA	PA	NA	51
65	M	44	IICP	F	L	1	NA	PA	NA	220
66	F	68	BC	O	ND	1	NA	PA	NA	51
67	F	42	IICP	F	R	1	NA	PA	NA	838
68	F	47	IICP, S	F	L	1	NA	PA	NA	398
69	M	41	IICP	T	R	1	astrocytoma II	PA	NA	59
70	F	59	IICP	P	R	1	NA	GTR	NA	139
71	F	64	FD	O	L	2	NA	PA	NA	263
72	M	77	FD, S	T	L	1	NA	GTR	NA	85
73	M	52	FD, S	F	R	1	NA	PA	NA	525
74	M	47	FD	O	L	2	NA	PA	NA	351
75	M	74	FD	O	R	2	NA	PA	NA	184
76	F	56	FD, IICP	F	B	1	NA	PA	NA	116
77	M	78	BC	F	B	1	NA	PA	NA	39
78	M	65	IICP, S	O	R	3	NA	PA	NA	72
79	F	58	IICP, BC	F	R	1	NA	GTR	NA	597
80	M	62	FD, DC	T	R	1	NA	PA	NA	81
81	F	54	IICP, BC, S	F	R	1	NA	PA	NA	174
82	M	65	DC	O	L	2	NA	PA	NA	110
83	M	69	FD, BC	F	R	1	NA	PA	NA	541
84	F	58	FD, IICP, BC	F	R	1	NA	PA	NA	851
85	M	64	FD, IICP	O	R	3	NA	GTR	NA	296
86	F	76	FD, IICP	F	L	1	NA	GTR	NA	129
87	F	65	FD	O	L	2	NA	PA	hemorrhage	35
88	M	72	FD, IICP, BC	O	R	1	NA	NI	NA	147
89	F	71	FD	O	R	2	NA	GTR	NA	467
90	M	47	IICP	O	R	2	NA	GTR	visual loss	57
91	F	61	IICP	O	R	2	NA	GTR	NA	657
92	F	62	FD	O	L	2	NA	GTR	Shock and fever	4
93	F	62	IICP	O	R	2	NA	PA	NA	79
94	M	42	S	F	L	1	NA	NI	NA	1792

95	M	55	IICP	F	R	1	NA	GTR	NA	1038
96	M	53	S	P	R	1	NA	GTR	NA	1127
97	M	60	IICP, S	T	L	1	NA	GTR	NA	524
98	M	56	IICP	F	R	1	NA	GTR	NA	177
99	F	53	IICP	T	R	1	NA	GTR	NA	28
100	M	65	S	F	L	1	NA	GTR	NA	67
101	F	61	FD	T	ND	1	NA	GTR	NA	554
102	M	69	IICP	T	R	1	NA	PA	NA	80
103	M	52	IICP	O	R	2	NA	PA	NA	33
104	M	55	IICP	O	R	2	NA	PA	infection	103
105	M	44	IICP	O	R	2	NA	PA	NA	159
106	M	71	FD	F	R	1	NA	GTR	NA	25
107	F	83	IICP	F	R	1	NA	GTR	infection	25
108	F	41	IICP	T	L	1	NA	PA	NA	313
109	M	58	FD	O	R	2	NA	GTR	NA	35
110	M	60	IICP	O	L	2	NA	GTR	NA	148
111	M	49	IICP	O	R	2	NA	NI	NA	592
112	M	54	IICP	T	L	1	NA	GTR	NA	145
113	M	73	FD, IICP, S	T	L	1	NA	NI	NA	14

M: male; F: female; BC: behavioral change; FD: focal disturbance; IICP: increased intracranial pressure; S: seizure; DC: decreased consciousness; F: frontal; T: temporal; P: parietal; O: other; R: right; L: left; B: bilateral; N°: number; CNS: Central Nervous System; GTR: gross total resection; PA: partial; ND not described; NA: not applicable

Online Resource 2. Molecular cytogenetic data for all 113 patients.

[illegible]

97																			
98																			
99			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
100																			
101																		+	+
102																			
103																			
104																			
105			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
106			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
107																			
108																			
109																			
110																			
111																			
112																		+	
113																			

Fusion:

≥15% of tumor cells showing single 3' or single 5' gene signal, or a separation of 5' and 3' gene signals greater than one signal diameter

Amplification:

C1: presence of tight gene clusters and a ratio of gene:control ≥2, or ≥15 copies of gene in ≥10% of tumor cells;

C2: ratio of gene:control >2;

C3: at least one cell with ≥10 gene copies, or with 5 to 9 gene copies with a gene:control ratio >2;

C4: at least one cell with ≥10 gene copies and the ratio gene:control of ≥5;

C5: >10% of tumor cells showing gene:CEP 4 ratio >2 or innumerable tight clusters of signals of the locus probe.

Deletion:

C1: ratio gene:control *RBI*:13q34 lower than 0.8;

C2: only one gene signal in >50% of tumor nuclei.

4. Considerações finais

O presente trabalho é derivado do projeto maior intitulado “Estudo citogenético, molecular e imunohistoquímico de neoplasias sólidas e sua aplicação na identificação de marcadores com influência sobre a resposta terapêutica e o prognóstico”, aprovado pelos Comitê de Ética em Pesquisa da UFCSPA (Parecer Nº 881/09 de 18/06/2009) e do Grupo Hospitalar Conceição (GHC) (Parecer Nº 11-254 de 30/05/2012).

Os Serviços de Neurocirurgia do Hospital Beneficência Portuguesa e do Grupo Hospitalar Conceição (GHC) são centros de referência no tratamento de pacientes com tumor cerebral e outras patologias reacionadas. A parceria com os pesquisadores pertencentes ao Grupo de Pesquisa de Citogenética da UFCSPA e os médicos dos serviços referidos teve início em 2012. Desde então diferentes trabalhos vêm sendo desenvolvidos, possibilitando um maior engajamento entre as diferentes áreas de atuação e de todos os profissionais envolvidos.

A busca por uma melhor compreensão sobre as alterações genéticas e os mecanismos do desenvolvimento dos glioblastomas pode ser um ponto chave para o aprimoramento dos tratamentos para essa patologia. Por se tratar de uma doença de prognóstico pobre e sobrevida curta, faz com que muitas vezes seja difícil o desenvolvimento de estudos com esses pacientes. Sendo assim, novos estudos são necessários para que consigamos conhecer melhor aquilo que iremos tratar, pois dessa maneira poderemos contribuir para um melhor manejo dos pacientes acometidos por esse tumor.

5. Anexos

5.1 Material e Métodos

5.1.1 A amostra

A amostra foi constituída, por 113 pacientes consecutivos diagnosticados com glioblastoma, atendidos e submetidos à intervenção cirúrgica pelos Serviços de Neurocirurgia do Hospital Beneficência Portuguesa de Porto Alegre e do Grupo Hospitalar Coinceição (GHC) no período de janeiro de 2009 a maio de 2015 (6 anos e 4 meses). Foram incluídos na amostra todos os pacientes que obtiveram diagnóstico de glioblastoma após a análise anatomopatológica dos tecidos tumorais excisados.

5.1.2 Protocolo clínico

Para cada paciente foi preenchido um protocolo clínico de pesquisa onde constam dados referentes à identificação, à história clínica e familiar, ao tratamento cirúrgico e ao acompanhamento pós-operatório dos pacientes.

5.1.3 Procedimentos laboratoriais

Amostras provenientes do Hospital Beneficência Portuguesa foram acondicionadas em frascos contendo formol 10% tamponado e encaminhados ao Laboratório de Pesquisa em Patologia da UFCSPA onde foram emblocados em parafina. As amostras vindas do GHC já estavam previamente emblocadas em parafina, dessa maneira foi necessário fazer a busca no banco de

armazenamento dessas amostras de todos os diagnósticos de GBM realizados no período acima citado. O limite do período de inclusão dessas amostras se deu pelo fato de que foi no ano de 2009 que este hospital passou a utilizar o formol 10% tamponado. Este é o formol adequado para armazenamento de tecidos em blocos de parafina para posterior realização de hibridização *in situ*.

Para cada bloco de parafina foram realizados cortes de 4µm de espessura. Uma destas lâminas foi corada pela técnica de hematoxilina e eosina (HE) com o objetivo de ser analisada pelo médico patologista para a confirmação do diagnóstico, baseado na classificação da Organização Mundial da Saúde de 2007. Essa segunda análise, feita por uma médica patologista que fez parte do grupo de pesquisadores, era para a confirmação e para que fosse demarcada a melhor área tumoral a ser analisada pela técnica de FISH: área sem necrose tumoral e sem artefatos da técnica.

5.1.4 Análise pela técnica de FISH

Todos os procedimentos laboratoriais de análise pela técnica de FISH foram desenvolvidos no laboratório de Citogenética no *Department of Medicine, Division of Medical Oncology, University of Colorado, Aurora, CO, EUA*, em colaboração com Dra Marileila Varella-Garcia.

5.1.4.1 Sondas de DNA utilizadas na técnica de FISH

Uma sonda *break-apart* foi utilizada para visualização de rearranjos envolvendo o gene *NTRK1*. As sondas utilizadas foram: Vysis LSI *NTRK1* (Cen) SpectrumGreen (Cat # 08N43-030) (verde) e Vysis LSI *NTRK1* (Tel)

SpectrumRed (Cat # 08N43-020) (vermelho) (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) (Figura 1).

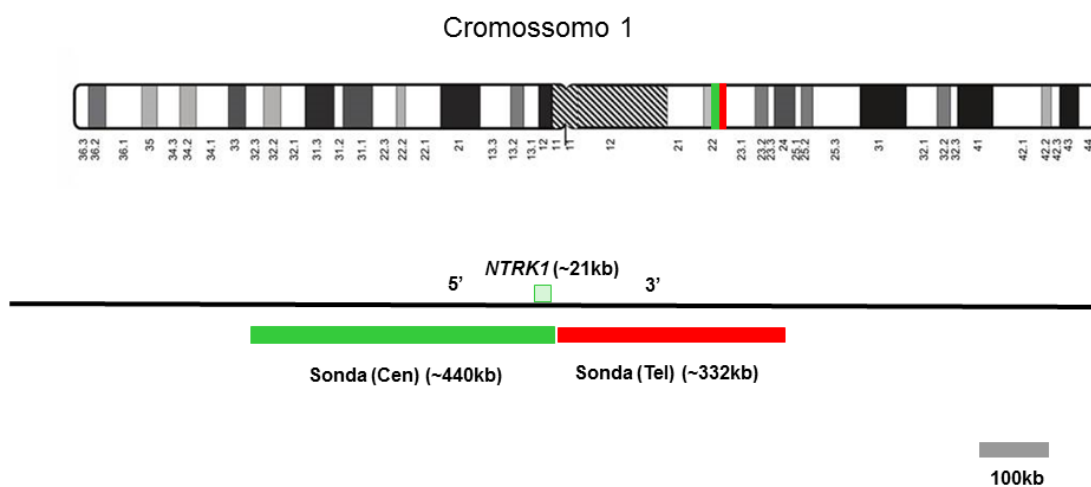


Figura 1. Representação do sítio de hibridização das sondas no cromossomo 1, tamanho do gene *NTRK1* e das sondas utilizadas.

Para os rearranjos envolvendo o gene *ROS1* uma sonda *break-apart* foi utilizada: *ROS1-GOPC*(FIG) Distal (6q22.1, vermelho) e *ROS1-GOPC*(FIG) Proximal (6q22.1, verde) (Cytocell Ltd, Technopark Newmarket Road, Cambridge, UK, Cat# LPS 511-A and # LPS 510-A, respectivamente) (Figura 2).

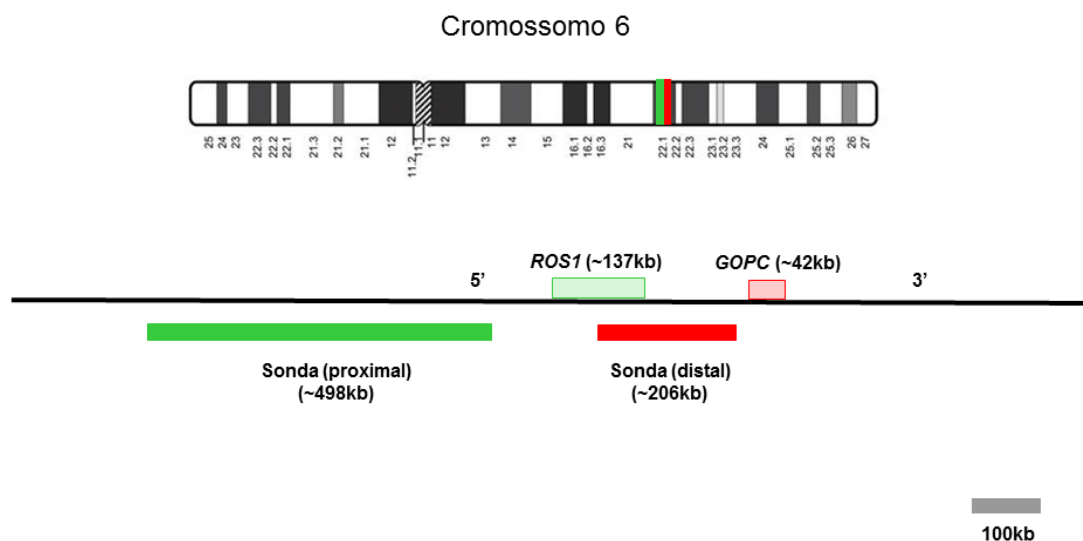


Figura 2. Representação do sítio de hibridização das sondas no cromossomo 6, tamanho dos genes *ROS1* e *GOPC* e das sondas utilizadas.

Para análise de amplificação, foram utilizadas as sondas: Vysis LSI *KIT* SpectrumRed (vermelho) e Vysis CEP 4 SpectrumAqua (azul) (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, Cat # 05J15-011 e # 06J54-014, respectivamente). As sondas para *PDGFRA* e *KDR* foram preparadas *in house* e desenvolvidas a partir de cromossomos artificiais bacterianos (BACs) para *PDGFRA* (RP11-58C6 BAC clone) marcada em verde (SpectrumGreen) e para *KDR* (RP11-21A18 BAC clone) marcada em amarelo (SpectrumGold) (Figura 3).

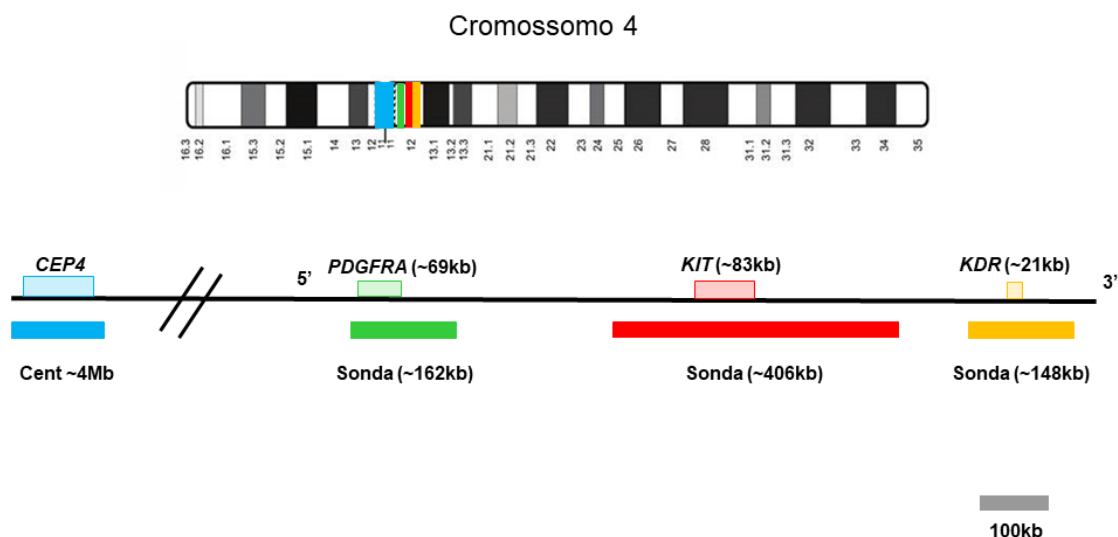


Figura 3. Representação do sítio de hibridização das sondas no cromossomo 4, tamanho dos genes *PDGFRA*, *KIT* e *KDR* e das sondas utilizadas.

Para a análise da deleção do gene *RB1* foram utilizadas as sondas Vysis LSI 13 *RB1* (13q14) SpectrumOrange (laranja) e uma sonda controle Vysis LSI 13q34 SpectrumGreen (verde) (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, Cat # 05J15-011 e # 05J80-011, respectivamente) (Figura 4).

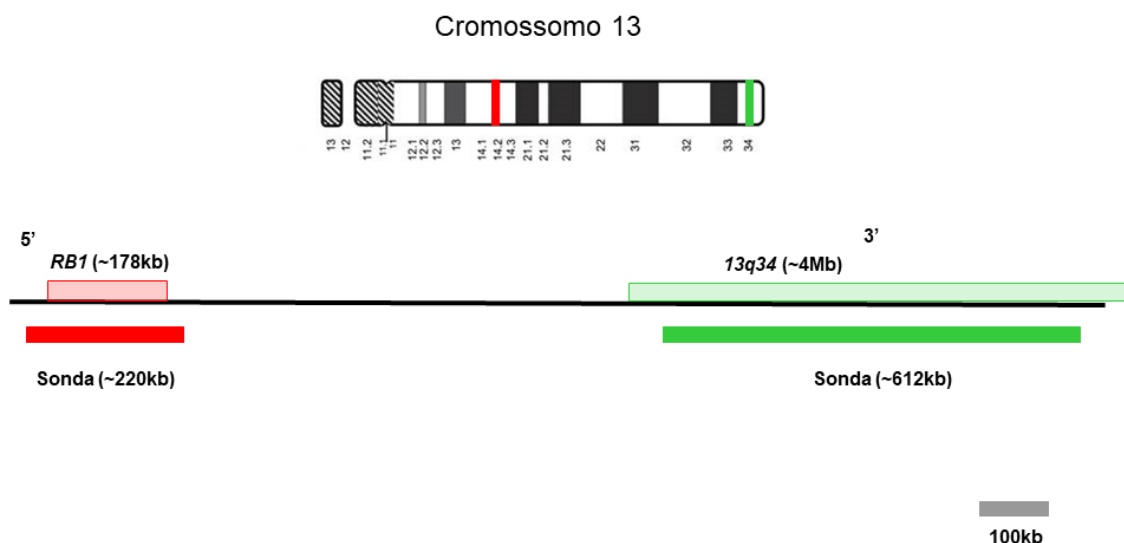


Figura 4. Representação do sítio de hibridização das sondas no cromossomo 13, tamanho do gene *RB1* e das sondas utilizadas.

5.1.4.2 Confeção das sondas *in house* para a técnica de FISH

Os métodos para desenvolvimento de sondas *PDGFRA* e *KDR in house* são descritos resumidamente a seguir:

A) Isolamento de colônias únicas

- 1) Escolha dos vetores comerciais de cromossomos artificiais bacterianos (BACs) utilizando os bancos de dados do Ensembl e UCSC (<http://www.ensembl.org>, <http://genome.ucsc.edu>). Foram levados em consideração o tamanho e posição de cada sequência. Para o gene *PDGFRA* escolheu-se o BAC RP11-58C6 (~162kb) e para o gene *KDR* o BAC RP11-21A18 (~148kb).
- 2) Para iniciar todo o processo, foi necessário a aplicação do antibiótico indicado pelo fornecedor de cada BAC em ágar LB (75-100µL de Cloranfenicol

34mg/mL) e isolamento de colônias únicas, as quais foram obtidas através do plaqueamento da cultura inicial.

3) Após cultivo *overnight*, pelo menos 10 colônias únicas foram selecionadas utilizando a ponta de uma ponteira e aplicadas em uma nova placa de ágar LB, de modo que pudessem crescer isoladamente uma das outras. Realizou-se a correta identificação de cada uma das colônias.

4) Após o período *overnight*, cada colônia foi selecionada e incubada em caldo LB previamente preparado, esterelizado e acrescido de Cloranfenicol em uma concentração final de 12,5µg/mL e levados a incubação a 37°C sob agitação por período *overnight*.

B) Checagem da sequência de interesse por PCR

1) Parte das mesmas culturas foram utilizadas para checagem da presença da sequência de interesse através da técnica de PCR.

2) Adquiriu-se os primers para cada uma das sequências que estavam sendo desenvolvidas. Para o *PDGFRA* as sequências utilizadas foram: *forward*: 5' AAG AGA GAG GAC GAG ACC ATT 3' e *reverse*: 5' CCA AAC TTC ACA CAC CAC TGA 3'. Para o gene *KDR* foram utilizados os seguintes primers de checagem: *forward*: 5' TGA GAC TTG AGC AAT CAC TAG GCT 3' e *reverse*: 5' TAA CCA AGG TAC TTC GCA GGG ATT 3'.

3) A técnica de PCR consistiu da utilização do protocolo do kit GoTaq® Green Master Mix (Promega, WI, US), com a adição da solução GoTaq® Green Master Mix, os primers, água e as colônias a serem testadas. Foram utilizados 35 ciclos e a temperatura de anelamento foi baseada na temperatura ótima dos primers em uso.

4) Logo após, cada uma das amostras foi avaliada utilizando-se gel de agarose 1,5% identificando o correto tamanho das sequências em estudo, comparando-as com um marcador de 100pb. As três amostras de cada gene com melhor banda foram escolhidas para os processos seguintes, além de uma alíquota de cada ser armazenada em glicerol 50% a -80°C para estudos futuros.

C) Extração e purificação do DNA

A extração do DNA após o cultivo bacteriano se deu pelo kit QIAamp® DNA mini-kit, seguindo o protocolo indicado pelo fornecedor, em pelo menos três culturas checadas e aprovadas. O protocolo consistiu basicamente em:

- 1) Centrifugou-se cada uma das culturas e retirou-se o sobrenadante (meio de cultura);
- 2) O pellet foi ressuspendido em 300µL de 1xPBS;
- 3) Adicionado 30µL da solução Qiagen Proteinase K;
- 4) Adicionado a solução 300µL do tampão AL e misturado em vortex por 15 segundos;
- 5) Incubou-se em banho-maria a 56°C por no mínimo 1 hora para completa lise celular;
- 6) Foi adicionado 300µL de etanol 100% gelado misturado e centrifugado rapidamente para que o material fosse retirado das paredes do microtubo;
- 7) A mistura foi adicionada a uma coluna QIAamp spin Column e centrifugado por 1 minuto a 8.000rpm e o filtrado foi descartado;
- 8) Nessa mesma coluna foram feitas lavagens com 500µL de dois diferentes tampões (AW1 e AW2) por 1 minuto a 8.000rpm, sendo que o filtrado foi descartado;

- 9) Para eluição do DNA da coluna, foi utilizado 150µL da solução AE. A coluna foi incubada por 5 minutos a temperatura ambiente e logo após centrifugada por 1 minuto a 8.000rpm, sendo que o filtrado foi armazenado. Esse procedimento foi repetido mais duas vezes para que todo o DNA fosse retirado da coluna de extração;
- 10) A essa solução foi adicionado 0,1x o volume total de acetato de sódio 3M e 2-2,5x de etanol 100% gelado;
- 11) Essa solução foi levada a freezer a -85°C por 1 hora e logo após centrifugada a 11.000rpm por 30 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C;
- 12) O sobrenadante foi retirado e adicionado 200µL de etanol 70% gelado para lavar o *pellet*. O sobrenadante foi retirado e o *pellet* ficou em temperatura ambiente até a secagem (no mínimo 15 minutos);
- 13) O *pellet* foi dissolvido em 20µL de água estéril em banho-maria a 37°C por 20 minutos;
- 14) A verificação da concentração de DNA da solução foi realizada utilizando gel de agarose 1% e um marcador de alto peso molecular para comparar.

D) Amplificação do DNA

Após a checagem da concentração de DNA extraído, a amplificação foi realizada utilizando 100ng de DNA com o kit REPLI-g Midi Kit da Qiagen, seguindo o protocolo do fornecedor que consistiu basicamente em:

- 1) Foi pipetado o volume correspondente a 100ng (diluiu-se o DNA para que o volume fosse 2,5µL) de DNA em um microtubo, adicionando 2,5µL do tampão D1 e incubando a temperatura ambiente por 3 minutos;
- 2) Adicionou-se 5µL do tampão N1 e misturou-se em vortex;

- 3) Foi adicionado 40µL do master mix previamente preparado (tampão REPLI-g Midi Reaction, água livre de nuclease e DNA polimerase REPLI-g Midi) seguindo as orientações do fornecedor;
- 4) Os tubos foram colocados em um termociclador utilizando um programa de aproximadamente 16 horas a 30°C e logo após a 65°C por 3 minutos para a inativação da polimerase;
- 5) Foi realizada a checagem da concentração do produto do REPLI-g diluindo a solução final em 1:10;
- 6) Foi utilizado gel de agarose 1% e as bandas do produto foram comparadas com um marcador de alto peso molecular.

E) Marcação direta do DNA

Para a marcação direta do DNA foi utilizado o kit Vysis Nick Translation. Para a sonda do *PDGFRA* foi utilizado o dUTP SpectrumGreen e para o *KDR* o SpectrumGold. O procedimento consistiu basicamente em:

- 1) Foi utilizado 1µg de DNA do REPLI-g junto com os reagentes do kit (tampão, 0,2mM de dUTP, 0,1mM de dTTP, dNTP mix, enzima do Nick Translation e água estéril);
- 2) Depois de todos misturados, a solução foi levada ao termociclador e incubado a 15°C por 14 horas para o *KDR* e 16 horas para o *PDGFRA*. A enzima foi inativada a 70°C por 10 minutos.
- 3) Depois disso o material foi armazenado a -20°C para posterior precipitação.

Para que haja o correto tamanho dos fragmentos da sonda de FISH, o tempo ou a quantidade de enzima pode ser alterada. Para uma boa marcação, é sugerido que os fragmentos fiquem com tamanho de 200-300pb. Sendo

assim, para que conseguíssemos chegar aos tempos de 14 e 16 horas para cada clone, nós realizamos uma curva de leitura com diferentes tempos para cada um dos genes, variando de 12 a 18 horas. Para a realização dessa leitura foi utilizado gel em agarose 1,5% e utilizado um marcador de 100pb para a visualização da “sombra” dos fragmentos do DNA no gel. Dessa maneira, observou-se que em 14 horas para o *KDR* e em 16 horas para o *PDGFRA* foram os melhores tempos para se obter os fragmentos ao redor da marcação de 200-300pb.

F) Precipitação do DNA

A precipitação do DNA (50µL de solução após a marcação com fluorescência) se deu da seguinte maneira, sempre protegida da luz, uma vez que o material fluorescente pode degradar na presença de luz:

- 1) Foi misturado 50µL do DNA marcado, 10µL da solução de Cot-1 DNA (1µg/µL), 5µL da solução de esperma de salmão (10µg/µL), 7µL de acetato de sódio 3M e 180µL de etanol 100% gelado. Todos os reagentes foram misturados e incubados a -85°C por 1 hora;
- 2) A solução foi centrifugada a 11.000rpm por 30 minutos a 4°C e retirado o sobrenadante;
- 3) Foram realizadas 2 lavagens do *pellet* com etanol 70% nas mesmas condições de centrifugações citadas anteriormente;
- 4) Ao final, o sobrenadante foi retirado e o *pellet* foi deixado em temperatura ambiente para que pudesse secar completamente;
- 5) Depois de seco, foi ressuspendido em 10µL de t-DenHyb hybridization buffer e incubado a 37°C por no mínimo 15 minutos para dissolver completamente;

6) A solução foi mantida a -20°C até utilização para hibridização.

G) Teste em células em suspensão e metáfase para checagem da sonda

Logo após a confecção da sonda, a mesma precisa ser testada em células padrão para verificação da posição e da qualidade da mesma. Foram utilizadas as linhagens normais AG09391 (feminino) e GM09948 (masculino) para a verificação das sondas do *PDGFRA* e *KDR*. A técnica de FISH para suspensão celular foi realizada da seguinte maneira, resumidamente:

- 1) As lâminas preparadas foram incubadas em 2xSSC a 37°C por 30 minutos, depois disso foram desidratadas em soluções de concentrações crescentes de etanol (70%, 85% e 100%, respectivamente), por 2 minutos em cada e deixadas secar em temperatura ambiente;
- 2) Foram incubadas em ácido acético 70% por 1 minuto, lavadas 3 vezes em solução 1xPBS e desidratadas em soluções de concentrações crescentes de etanol (70%, 85% e 100%, respectivamente), por 2 minutos em cada e deixadas secar em temperatura ambiente;
- 3) Logo após foram incubadas em solução 0,008% pepsina/0,01M de ácido clorídrico a 37°C por 7 minutos;
- 4) Depois, foram lavadas em 1xPBS por 5 minutos sob agitação e incubadas em 1% formaldeído por 7 minutos em temperatura ambiente;
- 5) As lâminas foram lavadas em 1xPBS por 5 minutos sob agitação e desidratadas em soluções de concentrações crescentes de etanol (70%, 85% e 100%, respectivamente), por 2 minutos em cada e deixadas secar em temperatura ambiente;

- 6) Logo após secagem, foi aplicada 3,5µL do mix de sonda na proporção de 1:2,9:2,9:3,2 (CEP4:*PDGFRA*:*KDR*: t-DenHyb hybridization buffer);
- 7) A região foi coberta com lâminula de 113mm², selada com cimento borracha, incubada a 85°C por 10 minutos e logo após em uma câmara úmida a 37°C por aproximadamente 40 horas;
- 8) Após esse tempo, o cimento borracha e a lamínula foram removidos e a lâmina foi lavada em 2xSSC/0,3% IGEPAL (pH 7-7,5) a 72°C por 2 minutos e agitando manualmente duas vezes;
- 9) Logo após as lâminas foram lavadas em 2xSSC por 2 minutos sob agitação, desidratadas em soluções de concentrações crescentes de etanol (70%, 85% e 100%, respectivamente), por 2 minutos em cada e deixadas secar em temperatura ambiente;
- 10) Após a secagem, foram aplicados 14µl do do contra-corante DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) (0,3 µg/ml em Vectashield Mounting Medium, Vector Laboratories) à lâmina, cobrindo-a com lamínula de 22 x 50 mm;
- 11) A lâmina foi colocada em suporte apropriado, protegida da luz e armazenada na geladeira a 4°C para posterior análise ao microscópio;
- 12) A análise foi realizada com a contagem de pelo menos 100 núcleos interfásicos e 20 metáfases. Durante a análise foram observados os seguintes aspectos: qualidade do sinal, posição correta da sonda (observação do cromossomo e posição em que a marcação se encontrava) e a presença ou não de sinal de fundo que pudesse prejudicar a análise.

Após aprovação, a sonda pôde ser utilizada nas amostras de GBM.

5.1.4.3 Preparação das lâminas para a técnica de FISH das amostras em bloco de parafina

- 1) A lâmina selecionada foi incubada na estufa à temperatura a 56°C durante um período *overnight*. O objetivo desta etapa foi aumentar a aderência do tecido à lâmina e amolecer a parafina;
- 2) Logo a seguir, a lâmina foi imersa em CitriSolv™ Hybrid Solvent and Clearing Agent (Fisherbrand™), três vezes sob agitação, por 30 minutos cada. Ao término, a lâmina secou à temperatura ambiente;
- 3) Na etapa seguinte, a lâmina foi lavada duas vezes em álcool a 100% por 1 minutos cada, realizando agitação durante o processo, deixando-se secar à temperatura ambiente;
- 4) A área a ser hibridizada foi selecionada tendo, como base, a lâmina corada pela técnica de HE. Uma região de 12mm de diâmetro foi marcada no dorso da lâmina com o uso de uma caneta diamante. Além disso, uma representação ilustrativa de cada lâmina e da posição do tecido foi realizada na ficha de acompanhamento do processo;
- 5) Depois de seca, a lâmina foi hidratada em água Mili-Q a temperatura ambiente por 3 minutos.
- 6) A lâmina foi pré-tratada em uma solução de HCl 0,2M por 20 minutos e logo após em uma solução 8% de tiocianato de sódio a 80°C por 30 minutos.
- 7) A lâmina foi lavada em 2XSSC (pH 7,0) por 3 minutos em temperatura ambiente.
- 8) A seguir, procedeu-se à digestão com uma solução de pepsina 0,025% diluída em HCl 0,01M à 37°C com um tempo variando de 35 a 65 minutos, dependendo da coloração e aspecto da amostra na lâmina HE.

9) A lâmina foi, então, lavada em água Mili-Q por 1 minuto a temperatura ambiente e em 2XSSC (pH 7,0), também em temperatura ambiente, por 5 minutos, em agitação.

10) Ao final, a lâmina foi desidratada, através de sucessivas passagens, em concentrações crescentes de etanol (70%, 85% e 100%, respectivamente), durante 2 minutos cada, secando após em temperatura ambiente.

5.1.4.4 Hibridização através da técnica de codesnaturação

1) A sonda de DNA foi retirada do freezer e submetida à temperatura ambiente por cerca de 5 minutos; o mesmo processo foi realizado com a solução tDenHyb-2 (Denaturation and Hybridization, Insitus Biotechnologies);

2) Ambos os tubos (sonda e tDenHyb-2) foram agitados no vórtex e posteriormente centrifugados rapidamente (3 segundos) para que a solução ficasse ao fundo do frasco;

3) Para cada sonda foi realizada a preparação com as diferentes proporções da sonda e de solução tDenHyb-2, sendo que o último valor foi sempre o da solução tDenHyb-2:

a) Vysis LSI *NTRK1* (Cen) e Vysis LSI *NTRK1* (1:1:13 v/v);

b) *ROS1-GOPC* (FIG) Distal e *ROS1-GOPC* (FIG) Proximal (1,5:1,5:1 v/v);

c) sonda *in house PDGFRA*, sonda *in house KDR*, Vysis LSI *KIT* e Vysis CEP 4 (5:5:1:0,65:2,5 v/v);

d) Vysis LSI 13 *RB1* (13q14) e Vysis LSI 13q34 (1:1:14 v/v);

4) 4 µl da solução (sondas DNA/tDenHyb-2) foram aplicados à região alvo marcada na lâmina. A região foi, imediatamente, coberta com uma lamínula de

13mm², evitando a permanência de bolhas de ar entre a superfície da lamínula e da lâmina;

5) A seguir, a lamínula foi selada com cimento borracha e esperou-se cerca de 10 minutos para que a cola secasse. A lâmina, então foi incubada em forno seco, à temperatura de 85°C, por 15 minutos;

6) Após este período, a lâmina foi colocada em uma câmara úmida, protegida da luz, a 37°C, por um período de 16 a 48 horas, para permitir a hibridização *in situ*. O período máximo de 48 horas foi utilizado para o preparo das lâminas que continham as sondas preparadas *in house*.

5.1.4.5 Pós-hibridização

1) Após a hibridização, e sempre em ambiente protegido da luz, a lamínula e o cimento de borracha foram removidos com o uso de uma pinça;

2) A lâmina foi lavada em solução 0,6XSSC/0,3% IGEPAL (pH 7-7,5) a 74°C, por 3 minutos, agitando manualmente 3 vezes durante processo;

3) A seguir, a lâmina foi lavada em 2XSSC, à temperatura ambiente, agitando por 2 minutos;

4) Na próxima etapa, a lâmina foi desidratada, através de sucessivas passagens, em concentrações crescentes de etanol (70%, 85% e 100%, respectivamente), durante 2 minutos cada, secando à temperatura ambiente, posteriormente.

5) Após a secagem, foram aplicados 14µl do do contra-corante DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) (0,3 µg/ml em Vectashield Mounting Medium, Vector Laboratories) à lâmina, cobrindo-a com lamínula de 22 x 50 mm;

6) A lâmina foi colocada em suporte apropriado, protegida da luz e armazenada na geladeira a 4°C para posterior análise ao microscópio.

5.1.4.6 Análise ao microscópio

A análise foi realizada em microscópio com fluorescência (Zeiss AxioImager), utilizando-se das objetivas de alta magnificação (10x, 20x, 40x e 100x) e de filtros específicos, como o DAPI (azul), o Texas Red (vermelho), o FITC (verde), Gold (amarelo) e Aqua (azul). Pelo menos 5 imagens de cada caso foram capturadas utilizando o software CytoVision, Leica Micro-systems (Genetix USA, Boston, MA). Todas as amostras evidenciaram hibridização eficiente (mais de 90% dos núcleos com sinais). Pelo menos 50 núcleos foram analisados em cada lâmina, sendo que os núcleos foram provenientes de no mínimo quatro regiões diferentes da área hibridizada. Para a análise de cada núcleo foram levadas em consideração a integridade da membrana e da cromatina intranuclear e a ausência de sobreposição das células.

Para a contagem dos sinais, diferentes critérios foram utilizados de acordo com o tipo de sonda utilizada. Para as sondas de enumeração os critérios foram os seguintes (Figura 5):

1. Contagem de 1 sinal:

- a. Dois sinais estão fisicamente conectados (estão tocando ou ligados por um filamento);
- b. Dois sinais estão separados por uma distância menor que o diâmetro do maior sinal;
- c. Um *cluster* de até 3 sinais.

2. Contagem de 2 sinais:

- a. Dois sinais estão fisicamente perto, mas separados por pelo menos o diâmetro do maior sinal;
- b. Identificado as células contendo *doublets*, *triplets* ou pequenos clusters (4 ou mais sinais próximos).

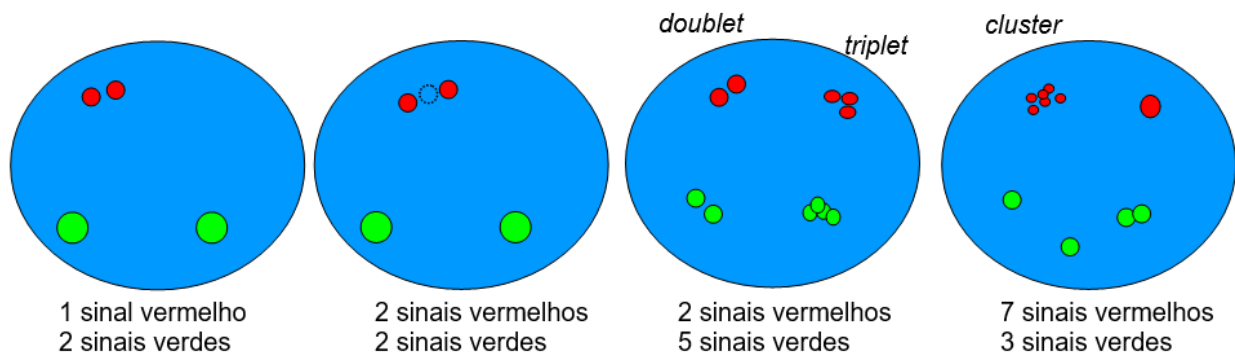


Figura 5. Representação da contagem de sinais para sondas de enumeração.

Para as sondas *break-apart* os critérios foram os seguintes (Figura 6):

1. Contagem de 1 sinal:
 - a. Dois sinais estão fisicamente conectados (estão tocando ou ligados por um filamento);
 - b. Dois sinais estão separados por uma distância menor que o diâmetro do maior sinal;
 - c. Um *cluster* de até 3 sinais.
2. Contagem de 2 sinais:
 - a. Dois sinais estão fisicamente perto, mas separados por pelo menos 2 sinais de diâmetro;
 - b. Identificado as células contendo *doublets*, *triplets* ou pequenos clusters (4 ou mais sinais próximos).

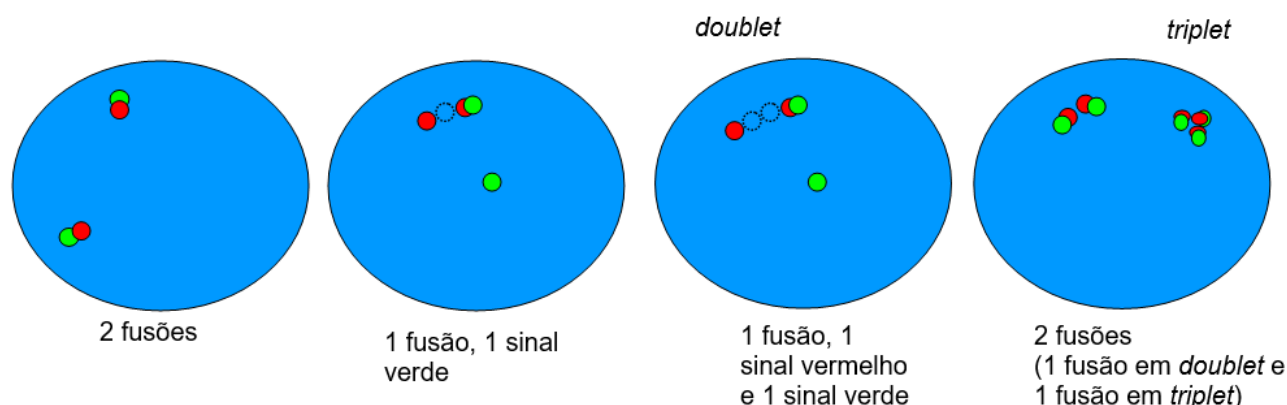


Figura 6. Representação da contagem de sinais para sondas *break-apart*.

5.2 Aspectos éticos

O presente trabalho é derivado do projeto maior intitulado “Estudo citogenético, molecular e imunohistoquímico de neoplasias sólidas e sua aplicação na identificação de marcadores com influência sobre a resposta terapêutica e o prognóstico”, aprovado pelos Comitê de Ética em Pesquisa da UFCSPA (Parecer Nº 881/09 de 18/06/2009) e do Grupo Hospitalar Conceição (GHC) (Parecer Nº 11-254 de 30/05/2012).

Cada um dos pacientes participantes do projeto foi informado sobre a realização do mesmo e teve a concordância registrada através da assinatura de um consentimento informado. Para aqueles casos provenientes do GHC em que não conseguimos contato com os pacientes ou familiares, obtivemos a liberação do uso do consentimento informado. As informações que poderiam identificar os pacientes foram mantidas em sigilo e não serão publicadas.

5.2.1 Parecer do Comitê de Ética 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

Introdução	Adequada
------------	----------

Comentários sobre a Introdução

Objetivos	Adequados
-----------	-----------

Comentários sobre os Objetivos

Pacientes e Métodos	
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

-

5.2.2 Parecer do Comitê de Ética do GHC



HOSPITAL N. S. DA CONCEIÇÃO S.A.
Av. Francisco Trein, 509
CEP 91560-250 - Porto Alegre - RS
Fone: 3357.2000
CNPJ: 02.787.118/0001-20

HOSPITAL DA CRIANÇA CONCEIÇÃO
(Unidade Pediátrica do Hospital Nossa
Senhora da Conceição S.A.)

HOSPITAL CRISTO REDENTOR S.A.
Rua Domingos Prates, 20
CEP 91560-260 - Porto Alegre - RS
Fone: 3357.4100
CNPJ: 02.787.126/0001-76

HOSPITAL FEMINA S.A.
Rua Montezuma, 17
CEP 91550-001 - Porto Alegre - RS
Fone: 3356.5000
CNPJ: 02.603.134/0001-63



Vinculados ao Ministério da Saúde - Decreto nº 99.244/90

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

5.2.3 Termo de consentimento informado

9.2. Termo de Consentimento Informado

O câncer é considerado uma doença genética relativamente comum e grave. Este leva usualmente a um sofrimento pessoal e familiar intenso, além dos altos custos envolvidos com o seu diagnóstico e tratamento. Desta forma, o câncer representa um verdadeiro problema de saúde pública. Hoje se sabe que a identificação de alterações genéticas em tumores tem importância não somente no diagnóstico, mas também na evolução do paciente e na compreensão da forma de surgimento e crescimento do tumor.

Assim, este trabalho tem como objetivo verificar os achados genéticos (alteração nos cromossomos ou nos exames de DNA) de tumores de pacientes atendidos no Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre (CHSCPA).

Após a realização do consentimento informado, você ou seu filho será submetido a uma avaliação, com coleta de dados clínicos (como idade de início dos sintomas e do diagnóstico) e resultados de exames e avaliações realizados.

Você também será perguntado a consentir sobre a coleta de parte do tumor retirado no momento da cirurgia, que será utilizada para a análise dos cromossomos e extração de DNA para o estudo de genes associados ao desenvolvimento do câncer. Os resultados da análise genética do tumor, bem como os dados clínicos serão confidenciais e utilizados exclusivamente para o estudo do câncer. A suspensão de células e o DNA extraído do tumor ficarão armazenados na Instituição, sob a responsabilidade dos pesquisadores, com a possibilidade de ser utilizado em estudos futuros relacionados exclusivamente ao câncer. Nenhum outro teste ou pesquisa será feito sem a sua permissão por escrito, sendo que também não haverá nenhum custo para a realização destes exames. Em situações ocasionais, onde o estudo dos cromossomos não puder ser realizado diretamente através da porção do tumor retirada no momento da cirurgia ou que necessite de estudo adicional do tecido do tumor (análise imunohistoquímica), haverá possibilidade dos pesquisadores obterem parte do restante do material armazenado no hospital.

Existe a possibilidade de que a participação neste estudo possa fazer você, ou o seu filho se sentirem emocionalmente desconfortáveis. A participação de vocês é inteiramente voluntária. *Você tem o direito de não fazer parte, ou mesmo de pedir desistência na participação desta pesquisa sem que isso represente qualquer forma de prejuízo para o seu atendimento ou do seu filho dentro da Instituição onde o projeto está sendo realizado. Não se dará qualquer informação genética sobre você ou seu filho, a outros membros da família, ou a terceiros sem sua permissão por escrito.*

"Pelo presente Consentimento Informado, eu declaro que fui informado de forma clara, detalhada e livre de qualquer constrangimento ou obrigação, dos objetivos, da justificativa e dos procedimentos a que serei submetido, bem como dos desconfortos e benefícios do presente trabalho. Tive também a oportunidade de discutir e fazer perguntas sobre o trabalho. Eu, voluntariamente, concordo em participar deste estudo".

Assinatura do paciente

"Pelo presente Consentimento Informado, eu declaro que fui informado de forma clara, detalhada e livre de qualquer constrangimento ou obrigação, dos objetivos, da justificativa e dos procedimentos a que meu filho será submetido, bem como dos desconfortos e benefícios do presente trabalho. Tive também a oportunidade de discutir e fazer perguntas sobre o trabalho. Eu e meu filho voluntariamente concordamos em participar deste estudo".

Nome do paciente

Nome do responsável/ familiar

Assinatura do responsável

Grau de parentesco e RG do responsável

Nome do pesquisador responsável

Assinatura do pesquisador responsável

* Telefone do Comitê de Ética em Pesquisa da UFCSPA: 3303 8804.

* Telefone do pesquisador responsável Prof. Dr. Giorgio Paskulin: 3303 8774

Porto Alegre, ____/____/____.

18/06/09
CEP/UFCSPA
TCLE
APROVADO

5.2.4 Protocolo Clínico

PROTOCOLO DE TUMORES ENCEFÁLICOS SERVIÇO DE NEUROLOGIA E NEUROCIRURGIA DR MARIO COUTINHO

NOME: _____ REGISTRO: _____ SEXO: _____
 DATA DE NASCIMENTO: ____/____/____ DATA DA CIRURGIA: ____/____/____ CONVÊNIO: _____ IDADE (anos): _____
 INTERNAÇÃO: ____/____/____ ALTA: ____/____/____ PROCEDÊNCIA: _____ FONE: (____) _____

APRESENTAÇÃO CLÍNICA:

- [] HIC () cefaléia () papiledema [] Déficit focal () motor
 () vômitos () ↑ perímetro cefálico () paralisia de nervos cranianos - qual: _____
 () déficit visual lado: _____
 [] Crise convulsiva [] Síndrome cerebelar () ataxia de marcha
 () incoordenação apendicular
 [] Distúrbio hormonal - GH () aumentado () diminuído
 - Prolactina () aumentada () diminuída
 - Cortisol () aumentado () diminuído
 - Gonadotrofinas () aumentadas () diminuídas [] Outra: _____
 - TSH () aumentado () diminuído

COMORBIDADES:

ANTECEDENTES:

- [] Consanguinidade entre os pais do paciente Tipo: _____
 [] História familiar de câncer Familiar: _____ Idade no diagnóstico: _____ Neoplasia: _____
 Familiar: _____ Idade no diagnóstico: _____ Neoplasia: _____
 [] História pessoal de câncer Idade no diagnóstico: _____ Neoplasia: _____

LOCALIZAÇÃO DO TUMOR:

- [] SUPRATENTORIAL [] INFRATENTORIAL
 [] Hemisférico () frontal () fronto-temporal () fronto-parietal [] Hemisfério cerebelar - lado: _____
 lado: _____ () parietal () parieto-occipital () occipital [] Vermis / 4º ventrículo
 [] Selar / Supraselar [] Tronco cerebral () difuso
 [] Intraventricular () 3º ventrículo () bulbo
 () ventrículo lateral () corno frontal () ponte
 lado: _____ () antro () corno occipital () teto do mesencéfalo
 () corno temporal [] Nervos cranianos
 qual: _____
 lado: _____
 [] Região da Pineal
 [] Órbita () intraconal () extraconal lado: _____

HIDROCEFALIA:

- [] NÃO [] SIM () DVE (dias com DVE pré-op: _____; dias com DVE pós-op: _____)
 () DVP pré-op () DVP pós-op (nº de dias pós-op até colocar DVP: _____)

RESULTADO DA RESSECÇÃO: Considerando tto cirúrgico TOTAL, incluindo o resultado após as Reintervenções.

- [] Ressecção total [] Ressecção subtotal _____% retirado [] Biópsia

VIA DE ABORDAGEM:

- # Hemisférico: _____ # Pineal: _____
 Craniotomia _____ [] Supracerebelar - infratentorial
 [] Transcalosa posterior
 [] Suboccipital - transtentorial
 # Região selar supraselar
 [] Transesfenoidal
 [] Subfrontal unilateral - lado: _____ # Intraventricular: _____ # Fossa posterior: _____
 () com retirada do rebordo orbitário [] Transcortical - lado: _____ [] Mediana
 () sem retirada do rebordo orbitário [] Transcalosa [] Paramediana à: _____
 [] Subfrontal bilateral [] Retromastoidéia à: _____
 [] Pterional - lado: _____ # Orbital: _____
 [] Fronto-orbita-zigomática - lado: _____ [] Orbitotomia lateral - lado: _____
 [] Transcalosa [] Intracraniana subfrontal

ANATOMO-PATOLÓGICO:

Tipagem Histológica da OMS para Tumores do SNC: _____

REINTERVENÇÃO NO TUMOR: [] NÃO [] SIM (nº de reintervenções realizadas: _____)

- [] completar ressecção inicial

Complicações Reintervenção: _____

- [] recidiva () local () outra localização - Onde: _____

DATA DA 1ª REINTERVENÇÃO: _____ (_____ meses após a 1ª cirurgia)

COMPLICAÇÕES CIRÚRGICAS: (1ª cirurgia OU reintervenção se foi para completar a ressecção inicial)

- [] Nenhuma
 [] Piora dos sintomas iniciais [] Déficit motor novo - Qual: _____
 [] Disfasia _____
 [] Fístula líquórica
 [] Infecção Agente: _____
 [] Lesão de nervos cranianos () transitória () definitiva Qual: I III IV V VI VII VIII IX X XI XII lado: _____
 [] Lesão do II nervo craniano () amaurose bilateral () amaurose unilateral (lado: _____) () Hemianopsia (tipo: _____)
 [] Diabetes insipidus
 [] Crise convulsiva
 [] Dist. Hormonal - ↓ de: () GH () Prolactina () Cortisol () Gonadotrofinas () TSH

[] Morte (*até 30 dias da cirurgia*)

[] Outra: _____

ALTA HOSPITALAR: _____ TEMPO DE INTERNAÇÃO: _____ dias

TRATAMENTO COMPLEMENTAR:

[] Quimioterapia - *Qual protocolo:* _____

[] Radioterapia - () local () neuroeixo 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: _____