

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

Carla Graziadio

**Avaliação clínica e citogenética
molecular de uma amostra de
glioblastomas em adultos: aneuploidia
dos cromossomos 7 e 10, amplificação
do gene *EGFR* e deleção do gene *PTEN***

Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

Porto Alegre
2014

Carla Graziadio

**Avaliação clínica e citogenética
molecular de uma amostra de
glioblastomas em adultos: aneuploidia
dos cromossomos 7 e 10, amplificação
do gene *EGFR* e deleção do gene *PTEN***

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. Giorgio A. Paskulin
Co-orientador: Dr. Rafael Fabiano Machado Rosa

**Porto Alegre
2014**

Catálogo na Publicação

Graziadio, Carla

Avaliação clínica e citogenética molecular de uma amostra de glioblastomas em adultos: aneuploidia dos cromossomos 7 e 10, amplificação do gene EGFR e deleção do gene PTEN / Carla Graziadio. -- 2014.

132 p. : 30 cm.

Tese (doutorado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Patologia, 2014.

Orientador(a): Giorgio Adriano Paskulin ;
coorientador(a): Rafael Fabiano Machado Rosa.

1. Glioblastoma. 2. FISH. 3. Gene EGFR. 4. Gene PTEN.
I. Título.

Agradecimentos

Desejo, com grande carinho e admiração, expressar o meu agradecimento a todos aqueles que, com sua contribuição e empenho, tornaram possível a realização do presente trabalho:

- aos pacientes e suas famílias, pela eterna contribuição, permitindo sempre que a ciência continue o seu caminho;
- ao meu orientador, Prof. Giorgio Paskulin, por ter me ensinado tudo o que eu aprendi de genética clínica nos últimos 26 anos; por ter me acolhido, mais uma vez, como meu orientador neste trabalho; pela sua incansável paciência e dedicação; por ter acreditado que eu podia terminar o doutorado quando nem eu mesma acreditava; por ser, sempre, o melhor orientador do mundo;
- à minha colega, Patrícia Trevisan, por ter realizado comigo todas as hibridizações *in situ*; por ter sido minha parceira em todo o aprendizado e a cada nova descoberta; por ter me ensinado que a competência, no laboratório, pode caminhar ao lado da alegria, da tranquilidade e da segurança; pelo amor e carinho;
- à minha colega, Dayane Koshiyama, pela ajuda nas hibridizações *in situ* e pelo grande apoio;
- ao meu co-orientador, Prof. Rafael Rosa, por todos os anos de ajuda fiel e incansável, por ser sempre um exemplo de inteligência, honestidade e perseverança;
- ao meu colega, Prof. Paulo Zen, por ter sido o meu grande incentivador na realização do doutorado, e por ter me auxiliado na realização deste trabalho;

- ao meu querido ex-aluno (e atualmente médico neurocirurgião), Fabiano Soares, por ter cuidado dos pacientes que participaram deste trabalho, e por ter nos auxiliado tanto, coletando as amostras e providenciando os dados clínicos;
- ao meu ex-aluno, colega, amigo e “filho-adoptivo”, Dr. Rachid Karam, por ter me apoiado sempre, por ser um orgulho na minha vida, e por ter me ajudado tanto na tradução do artigo científico;
- às minhas queridas colegas e funcionárias da UFCSPA, Rosalva Meurer e Teresinha, anjos colocados no meu caminho, que me auxiliaram realizando os blocos de parafina e as lâminas para hibridização *in situ*;
- às queridas médicas patologistas, Valentina Provenzic e Rita de Cássia Alves, que revisaram os diagnósticos patológicos e marcaram as lâminas para hibridização *in situ*, fazendo isso sempre com carinho e atenção;
- ao médico residente em genética médica da UFCSPA, Vinícius Mattos, pela amizade e por ter me auxiliado no atendimento dos pacientes da genética, enquanto eu realizava este trabalho;
- à secretária do curso de Pós-Graduação em Patologia, Maristela, pelo carinho e dedicação eternos, cuidando de nós, alunos, sempre como se fôssemos da família;
- às minhas colegas do laboratório, Vera Andrade e Juliane Nascimento, pelo apoio técnico e, sobretudo, pelo apoio emocional e pela amizade;
- e à coordenação do curso de Pós-Graduação em Patologia, por todas as chances disponibilizadas a mim, e pela oportunidade de ter me permitido concluir este trabalho.

Sumário

1. Introdução	8
1.1. Epidemiologia e características clínicas dos glioblastomas	9
1.2. Características anatomopatológicas dos glioblastomas.....	13
1.3. Histopatogênese dos glioblastomas	16
1.4. Biomarcadores genéticos dos glioblastomas	18
1.5. Padrões de sinalização envolvidos na patogênese dos glioblastomas	22
1.5.1. Padrão <i>RTK/RAS/PI3KA/PTEN</i>	23
1.5.2. Padrão <i>TP53/MDM2/p14ARF</i>	24
1.5.3. Padrão <i>p16^{INK4a}/CDK4/RB1</i>	25
1.6. Classificação molecular dos glioblastomas	25
1.7. As alterações genéticas dos glioblastomas primários e secundários.	29
1.8. A técnica de hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH) como ferramenta para estudar as alterações do cromossomo 7 (gene <i>EGFR</i>) e do cromossomo 10 (gene <i>PTEN</i>) nos glioblastomas	31
1.9. Referências bibliográficas	37
2. Objetivos	42
3. Artigo científico redigido em inglês	43
4. Considerações finais	61
5. Anexos	63
Anexo A. Material e Métodos (dados completos)	63
Anexo B. Resultados (dados completos)	74
Anexo C. Discussão (dados completos)	111
Anexo D. Protocolo Clínico	127
Anexo E. Termo de consentimento informado	129
Anexo F. Ficha de análise ao microscópio	130
Anexo G. Parecer do Comitê de Ética	131

Lista de abreviaturas utilizadas

BCPC: células de propagação dos tumores cerebrais

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

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

EGFR: receptor do fator de crescimento epidérmico

FAK: cinase de adesão focal

FISH: hibridização *in situ* fluorescente

GBM: glioblastoma multiforme

HIF: fator de indução à hipóxia

IDH: isocitrato desidrogenase

LOH: perda da heterozigosidade

mTOR: proteína alvo da rapamicina em mamíferos

PI3K: fosfatidilinositol-3-cinase

PIP2: fosfatidilinositol 4,5-bifosfato

RB: retinoblastoma

RNM: ressonância nuclear magnética

RTK: receptor tirosina cinase

SNP: polimorfismo de nucleotídeo único

TICs: células de iniciação tumoral

VEGF: fator de crescimento vascular endotelial

WHO: *World Health Organization*

Resumo da Tese

Introdução: os glioblastomas são os tumores malignos mais frequentes do sistema nervoso central e apresentam mau prognóstico. Os estudos das alterações genéticas destes tumores têm auxiliado na compreensão da fisiopatologia do glioblastoma e dos fatores prognósticos dos pacientes afetados por estes tumores.

Objetivos: identificar, através da técnica de FISH, as frequências da aneuploidia do cromossomo 7, amplificação do gene *EGFR*, monossomia do cromossomo 10, deleção do gene *PTEN* e deleção do braço longo do cromossomo 10 em uma amostra de glioblastomas e correlacionar as anormalidades citogenéticas moleculares com o prognóstico dos pacientes afetados.

Material e métodos: 21 pacientes, operados cirurgicamente por serem afetados por glioblastoma, foram avaliados através de um protocolo clínico e laboratorial. As amostras tumorais destes pacientes foram analisadas, através da técnica de FISH, utilizando-se 2 sondas de DNA: LSI *EGFR/CEP 7* e LSI *PTEN/CEP 10*. Os resultados das hibridizações foram comparados aos dados clínicos dos pacientes.

Conclusão: a maioria dos pacientes da amostra foi do sexo masculino com idades variando entre 41 a 83 anos. Observou-se que os pacientes mais jovens foram os que apresentaram melhor prognóstico. As características clínicas e as frequências de polissomia do cromossomo 7, amplificação do gene *EGFR*, monossomia do cromossomo 10 e deleção do braço longo do cromossomo 10 não diferiram daquelas observadas na literatura. A amplificação do gene *EGFR*, associada a perdas do cromossomo 10, foi observada em 38,09% dos casos analisados e é provável que este grupo pertença ao subtipo molecular denominado como “clássico”. A deleção do gene *PTEN* demonstrou ser um fator de mau prognóstico para os

pacientes da amostra, o que pode ser explicado pela perda da função do gene como supressor tumoral. Os dados deste trabalho mostram que o estudo das alterações genéticas dos glioblastomas, pela técnica de FISH, é relevante e que há necessidade de ampliar as análises já realizadas.

1. Introdução

Os glioblastomas (anteriormente chamados de glioblastomas multiformes) são tumores cerebrais malignos que se originam das células gliais, mais especificamente dos astrócitos (Kleihues e cols., 2007).

Os glioblastomas são os tumores primários do cérebro mais malignos e também os mais frequentes nesta categoria. Eles afetam principalmente os adultos e estão localizados, preferencialmente, nos hemisférios cerebrais, embora também possam ser encontrados em outros locais do cérebro e da medula espinhal (Kleihues e cols., 2007).

De acordo com a última classificação da Organização Mundial de Saúde, estabelecida em 2007, os glioblastomas estão localizados no grupo dos tumores neuroepiteliais e são classificados como “tumores astrocitários”. Os tumores astrocitários são graduados de acordo com o comportamento de malignidade e características histológicas em 4 subtipos: tumores grau I que são biologicamente benignos e podem curar após a remoção cirúrgica (astrocitoma subependimário de células gigantes e astrocitoma pilocítico); tumores de grau II que são tumores de baixa malignidade e que se caracterizam por longa ocorrência clínica, embora apresentem infiltração difusa nas estruturas cerebrais adjacentes, o que os faz difíceis de serem totalmente ressecados cirurgicamente (astrocitoma pilomixóide, astrocitoma difuso e xantoastrocitoma pleomórfico); tumores grau III que exibem comportamento agressivo com aumento de anaplasia e mitoses em relação aos tumores de grau II (astrocitoma anaplásico); e tumores grau IV que exibem características mais avançadas de malignidade, incluindo proliferação vascular e

necrose, e que frequentemente são refratários a cirurgia e radioterapia (glioblastoma, glioblastoma de células gigantes e gliosarcoma) (Kleihues e cols., 2007; Altieri e cols., 2014).

1.1. Epidemiologia e características clínicas dos glioblastomas

De acordo com as análises realizadas pelo CBTRUS (*Central Brain Tumor Registry of the United States*), no período de 2007 a 2011, o glioblastoma foi o segundo tumor primário cerebral mais frequente e o tumor cerebral maligno mais frequente nos Estados Unidos da América. Ele contribuiu para 15,4% de todos os tumores primários do cérebro e 45,6% dos tumores malignos do cérebro (Figura 1), com uma incidência de 3,19 para cada 100.000 indivíduos (Ostrom e cols., 2014).

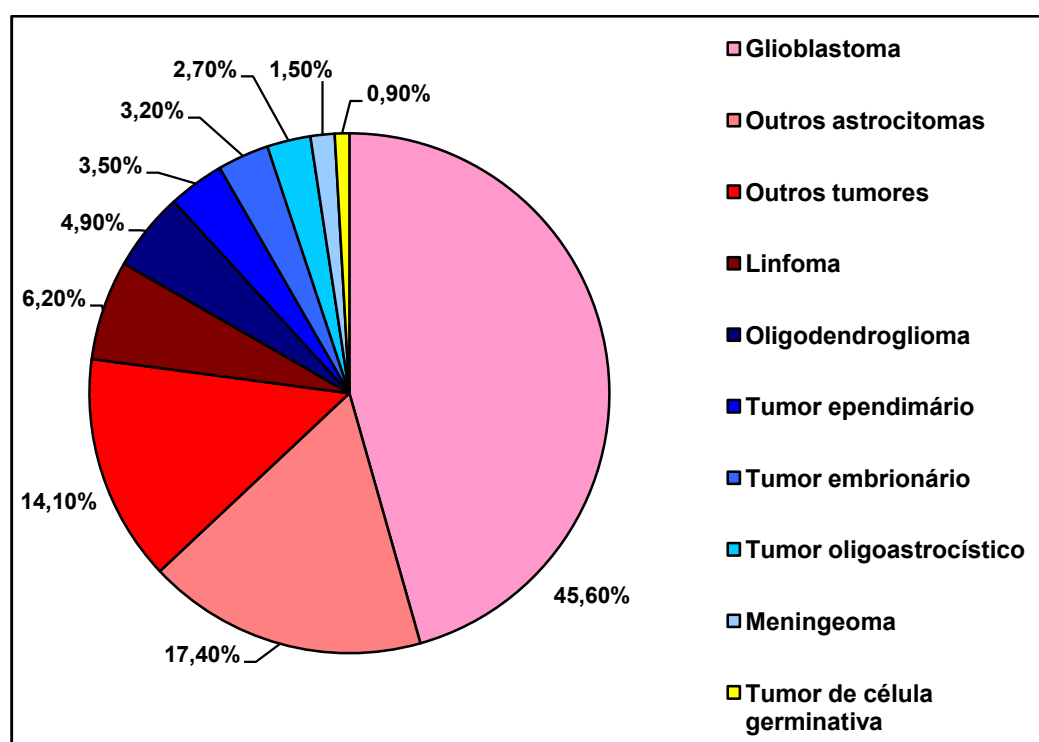


Figura 1. Distribuição dos tumores primários malignos do cérebro de acordo com os tipos histológicos (CBTRUS, 2007 a 2011) (adaptado de Ostrom e cols., 2014).

O glioblastoma pode se manifestar em qualquer idade, mas afeta preferencialmente adultos, com um pico de incidência entre 45 e 75 anos de idade (Kleihues e cols., 2007). No estudo recente do CBTRUS, a incidência do glioblastoma aumentou com a idade, sendo que os maiores índices aconteceram entre 75 a 84 anos. O glioblastoma é mais frequente nos homens e o estudo do CBTRUS demonstrou que ele foi 1,6 vezes mais frequente no sexo masculino (Ostrom e cols., 2014).

Apesar dos progressos da cirurgia, radioterapia e quimioterapia, a expectativa de sobrevida dos pacientes com glioblastoma permanece extremamente pobre. Alguns ensaios clínicos mostraram uma sobrevivência média de 14,6 meses (Altieri e cols., 2014). Ainda assim, as melhorias das condições de diagnóstico e tratamento parecem ter prolongado a sobrevida dos pacientes nos últimos anos. No estudo de Ohgaki e cols. (2004), 17,7% dos pacientes sobreviveram mais do que 1 ano e apenas 1,2% sobreviveram mais do que 3 anos. O estudo do CBTRUS (2007 a 2011) mostrou que 36,5% dos pacientes sobreviveram mais do que 1 ano e que 8,7% sobreviveram mais do que 3 anos (Ostrom e cols., 2014). Praticamente todos os estudos clínicos mostram que os pacientes mais jovens são os que apresentam o melhor prognóstico (Ohgaki e cols., 2004; Ostrom e cols., 2014).

Geralmente, os glioblastomas ocorrem como tumores isolados e esporádicos. No entanto, 5% dos glioblastomas são familiares. Os glioblastomas podem fazer parte de uma síndrome de câncer hereditário como a síndrome de Turcot, síndrome de Li-Fraumeni, neurofibromatose tipo 1 e encondromatose múltipla. Nestes casos, eles estão associados com outras anomalias e apresentam padrão de herança autossômico dominante. Mesmo quando isolados, os glioblastomas podem ter recorrência familiar. Malmer e cols. (2003) demonstraram que a recorrência se dá,

principalmente, em parentes de primeiro grau, sugerindo que exista uma origem genética para estes casos familiares (Malmer e cols., 2003; Fisher e cols., 2007).

Do ponto de vista clínico, os glioblastomas se dividem em primários e secundários. Os glioblastomas primários são aqueles que acontecem *de novo*, sem lesão pré-existente, enquanto os glioblastomas secundários ocorrem a partir da progressão de um astrocitoma difuso ou astrocitoma anaplásico. Os glioblastomas primários são os mais frequentes (mais de 90% dos tumores) e se desenvolvem em curtos períodos de tempo (geralmente menos de 3 meses). Eles geralmente afetam pacientes mais velhos, com média de 62 anos de idade. Os glioblastomas secundários são mais raros (menos de 10% dos casos) e se desenvolvem em pacientes mais jovens (média de 45 anos). O tempo de progressão de um astrocitoma difuso para o glioblastoma varia muito, de menos de 1 ano até mais de 10 anos. A sobrevida dos pacientes com glioblastoma secundário é significativamente mais longa, embora ela possa ser influenciada pelo fato dos pacientes afetados serem mais jovens. Os glioblastomas primários e secundários são entidades diferentes e parecem ter padrões genéticos distintos (Ohgaki e Kleihues, 2013).

O glioblastoma ocorre, mais frequentemente, na substância branca dos hemisférios cerebrais. No estudo baseado em populações realizado por Ohgaki e cols. (2004), as regiões do cérebro mais afetadas foram o lobo temporal (31%), o lobo parietal (24%), o lobo frontal (23%) e os lobos occipitais (16%). A combinação da localização fronto-temporal é típica. É comum que o tumor se infiltre para as estruturas adjacentes e que ele atravesse para o hemisfério contralateral através do corpo caloso.

O glioblastoma evolui rapidamente e logo os sinais e sintomas clínicos aparecem nos pacientes. A cefaleia é o sintoma clínico mais frequente e está presente em 50% dos pacientes no momento do diagnóstico. Em um paciente de mais de 50 anos, o início de uma cefaleia (previamente inexistente) com severidade progressiva e unilateral deve ser um sinal de alarme para a possibilidade de um tumor cerebral. Dificuldade cognitiva e mudança de personalidade também podem ocorrer e, algumas vezes, são confundidas com demência psiquiátrica, principalmente nos pacientes mais idosos. Os distúrbios do equilíbrio podem acontecer e geralmente estão associados com tumores grandes. Sinais focais como hemiparesia, perda sensorial e perda de campo visual são comuns e geralmente estão associados à localização anatômica do tumor. As crises convulsivas são observadas em 20 a 40% dos pacientes. Em casos mais raros, o paciente pode ter sinais e sintomas agudos que se confundem com uma história de acidente vascular cerebral (Omuro e DeAngelis, 2013).

O exame “padrão ouro” para o diagnóstico de um tumor cerebral é a ressonância nuclear magnética (RNM), sendo que a RNM com contraste facilita a visualização do tumor. O glioblastoma, na presença do gadolínio, realça de uma forma heterogênea, sendo que é possível diferenciar as áreas hipercelulares (periféricas) das áreas císticas/necróticas que ocorrem mais na região central (Figura 2). As regiões subjacentes ao tumor podem evidenciar hipersinal devido ao edema peritumoral (Omuro e DeAngelis, 2013).

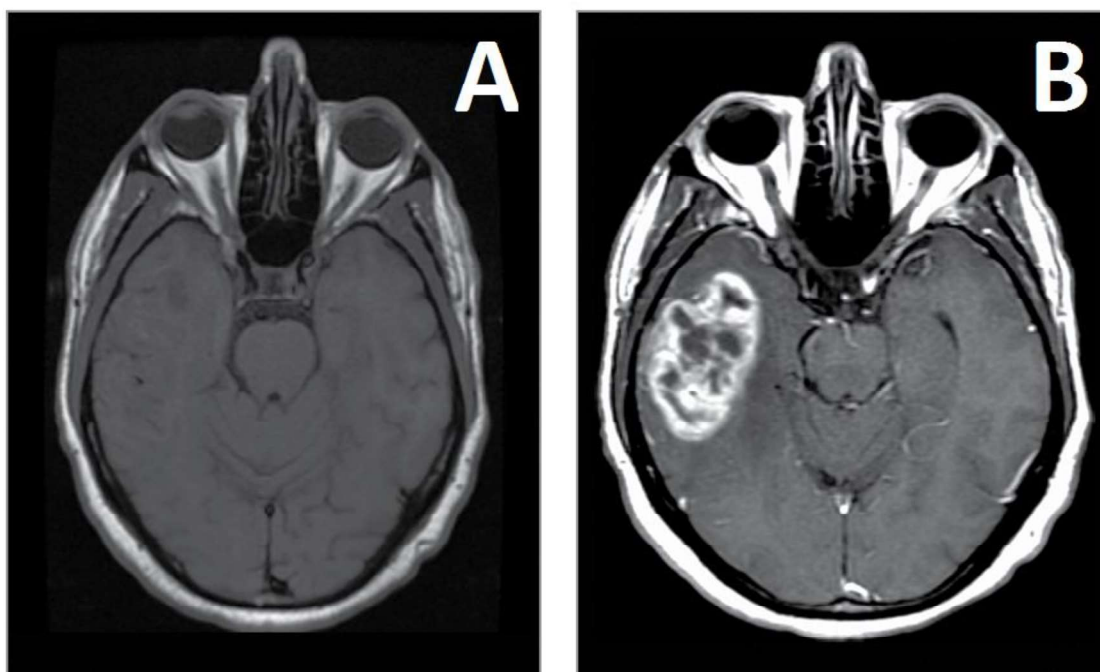


Figura 2. Ressonância nuclear magnética do cérebro de pacientes com glioblastoma (A) sem contraste e (B) com contraste (Omuro e DeAngelis, 2013).

1.2. Características anatomopatológicas dos glioblastomas

Macroscopicamente, os glioblastomas são pouco delineados. Eles apresentam superfícies de cores variáveis, geralmente com uma massa periférica acinzentada e áreas centrais amareladas devido à necrose. A área necrótica pode ocupar 80% da massa tumoral. As hemorragias (recentes e antigas) costumam deixar áreas de coloração avermelhada ou amarronzada dentro do tumor. Cistos macroscópicos são frequentes e representam o tecido tumoral liquefeito que acaba formando um líquido turvo (Kleihues e cols., 2007).

Os glioblastomas rapidamente invadem as estruturas adjacentes do cérebro, mas dificilmente invadem o espaço subaracnóide ou metastatizam através do líquido cerebrospinal (Kleihues e cols., 2007).

Histopatologicamente, o glioblastoma é um tumor anaplásico, composto por células tumorais astrocíticas pleomórficas, pobremente diferenciadas, com marcada atipia nuclear e atividade mitótica abundante. A proliferação vascular e a necrose são comuns. O diagnóstico do glioblastoma é muito mais baseado no padrão tecidual do que na identificação de células específicas. Para a confirmação do diagnóstico é necessário visualizar células gliais anaplásicas, atividade mitótica e proliferação vascular e/ou necrose. A distribuição destes elementos dentro do tumor é variável, mas geralmente há necrose na região central e proliferação celular na periferia. A proliferação vascular pode ser vista ao longo de todo o tumor (Kleihues e cols., 2007).

A migração do tumor em direção às estruturas adjacentes do cérebro acaba levando à formação das “estruturas secundárias”: as células se alinham e se acumulam na zona subapical do córtex, na região subependimária e em torno dos vasos. Algumas vezes, os glioblastomas apresentam estruturas epiteliais glandulares em forma de fita. Estes elementos têm núcleo oval grande, nucléolo proeminente e citoplasma redondo e bem definido (Kleihues e cols., 2007).

Poucas neoplasias humanas são tão heterogêneas, na sua composição, como os glioblastomas. É possível observar-se células pleomórficas, arredondadas ou fusiformes, pobremente diferenciadas, ao mesmo tempo em que se observam células pequenas e granulares ou células gigantes multinucleadas. A heterogeneidade regional (intratumoral) pode tornar o diagnóstico muito difícil, principalmente se for estabelecido a partir de biópsia cerebral por agulha (Kleihues e cols., 2007).

Os glioblastomas estão entre os tumores mais vascularizados dos seres humanos. A vascularização ocorre através de vários mecanismos como cooptação

de vasos (p.e. adoção de vasos pré-existentes pela migração das células tumorais), angiogênese clássica (p.e. nascimento de novos capilares a partir de vasos pré-existentes, pela migração de células endoteliais) e vasculogênese (p.e. migração das células da medula óssea do sangue periférico para o espaço perivascular) (Louis, 2006).

A hipóxia é considerada a principal força indutora da angiogênese nos glioblastomas. A hipóxia leva ao acúmulo do fator de indução de hipóxia 1- α (HIF-1 α). Este, por sua vez, leva à ativação transcricional de mais de 100 genes reguladores que controlam a angiogênese (VEGF, angioproteína), metabolismo celular (anidrase carbônica, lactato desidrogenase), sobrevivência/apoptose (BNIP) e migração (c-met, CXCR4). O fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) é produzido pelas células perinecroticas em consequência à hipóxia celular e parece ser o mediador mais importante das disfunções vasculares associadas aos gliomas (Louis, 2006).

A necrose tumoral é uma característica fundamental dos glioblastomas e a sua presença é um dos maiores fatores preditivos de agressividade dos astrocitomas difusos. Microscopicamente, as células necróticas dos gliomas aparecem de forma esmaecida, bem como os vasos necróticos dilatados. Outra forma de necrose é o padrão em “pseudopaliçada”: focos de necrose irregulares, de forma serpentina, cercados por células gliais fusiformes, densamente empacotadas e orientadas radialmente (Figura 3). O padrão de pseudopaliçada é uma característica frequente e marcante dos glioblastomas (Kleihues e cols., 2007).

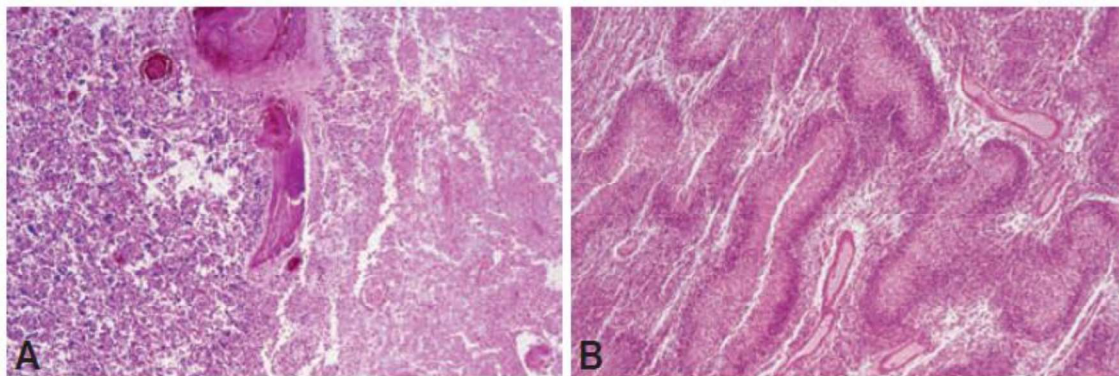


Figura 3. Histologia dos glioblastomas. (A) área de necrose (à direita) com alguns vasos tumorais apresentando trombose. (B) múltiplas áreas de necrose com pseudopaliçada (Kleihues e cols., 2007).

1.3. Histopatogênese dos glioblastomas

A origem celular do glioblastoma ainda é um tópico de considerável investigação e controvérsia. Durante muitos anos acreditou-se que os glioblastomas originavam-se de células astrocitárias que sofriam desdiferenciação após a transformação tumoral. Recentemente surgiu a ideia de que os tumores nascem da transformação maligna de uma célula precursora bipotencial, ou de uma célula ainda mais primordial, a célula tronco neural. Esta ideia se sustenta pelo fato destas células serem encontradas na zona subventricular do cérebro (onde comumente se desenvolvem os glioblastomas) e pelo fato destas células terem sido isoladas nestes tumores. Estas células, chamadas “células de propagação dos tumores cerebrais” (BCPC), representam uma pequena fração das células tumorais dos glioblastomas, mas têm capacidade de auto-renovação e podem ser as responsáveis pelo crescimento tumoral (Figura 4) (Kleihues e cols., 2007; Van Meir e cols., 2010).

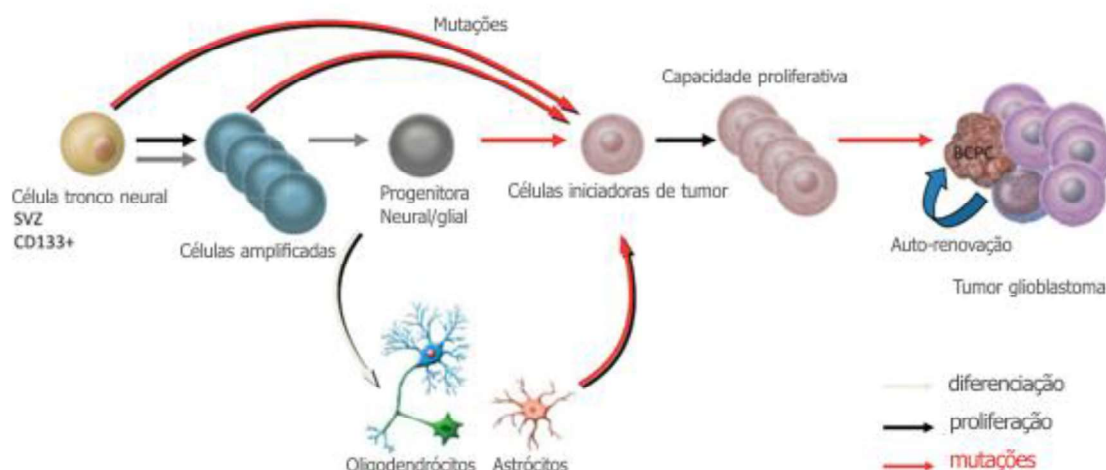


Figura 4. Possíveis relações para a ontogenia e produção das “*brain cancer propagating cells*” (BCPCs) e a geração do glioblastoma. Durante a diferenciação normal do sistema nervoso central, as células tronco neurais irão se diferenciar em células progenitoras neurais/gliais. Estas células têm a capacidade de produzir progenitoras neurais ou gliais (oligodendrócitos e/ou os astrócitos), mas não ambas. As mutações que geram glioblastomas podem ocorrer em todos os níveis dentro desta linhagem e produzir células iniciadoras de tumor (TICs) (adaptado de Van Meir e cols., 2010).

As BCPCs compartilham algumas características com as células tronco neurais normais, incluindo a expressão de marcadores das células tronco neurais (p.ex. nestina e CD133), a capacidade de auto-renovação e proliferação a longo termo, e a habilidade de se diferenciar em neurônios, astrócitos e oligodendrócitos. Acredita-se que as BCPCs se originem das células tronco neurais transformadas ou de células progenitoras do cérebro. As BCPCs podem ser encontradas nos mesmos locais do cérebro onde as células tronco neurais são observadas, incluindo as zonas em torno dos ventrículos (zona subventricular ou zona subependimária, a linha dos ventrículos laterais e a zona ventricular cerebelar), o giro dentado, o hipocampo e a substância branca subcortical. A comprovação da capacidade de auto-renovação das BCPCs e da sua capacidade de propagação tumoral reside no fato de que estas

células, retiradas de glioblastomas humanos, foram isoladas e transplantadas em animais, sendo capazes de reproduzir os tumores nos mesmos (Van Meir e cols., 2010).

1.4. Biomarcadores genéticos dos glioblastomas

O glioblastoma é uma doença fatal extremamente heterogênea. A heterogeneidade tumoral se traduz nos padrões histológicos, nas alterações genéticas e nos perfis de expressão gênica. O tratamento atual do glioblastoma reside na maior ressecção cirúrgica possível, seguida de radioterapia com tratamento adjuvante da temozolamida. Ainda assim, a mortalidade dos pacientes é extremamente alta. Recentemente, estudos genéticos moleculares têm contribuído para entender melhor a fisiopatologia do tumor no sentido de tentar estabelecer uma classificação que auxilie a entender o prognóstico do tumor e na elaboração de novas abordagens terapêuticas (Appin e cols., 2013).

As alterações moleculares no glioblastoma são extremamente complexas. Numerosos genes supressores tumorais e oncogenes são inativados e ativados, respectivamente. Os biomarcadores com valor diagnóstico e preditivo mais conhecidos até o momento são: gene *MGMT*, perda da heterozigotidade (LOH) dos cromossomos 1p e 19q, LOH 10q, mutações *IDH*, alterações dos genes *EGFR*, *VEGF*, *p53*, *PTEN*, *p16^{INK4a}*, citocromo c oxidase e telomerase humana (McNamara e cols., 2013).

O gene *MGMT* está localizado no cromossomo 10q26 e codifica uma proteína de reparo do DNA que remove o grupo alquila da posição O6 da guanina (comumente produzido por agentes alquilantes). Como este mecanismo de reparo

do DNA reverte o efeito dos agentes quimioterápicos alquilantes, as células tumorais com altos níveis de atividade do *MGMT* tornam-se resistentes. Esta metilação demonstrou estar associada com melhora da resposta à quimioterapia e à maior sobrevida de alguns pacientes. A metilação do promotor do *MGMT* está presente em 32 a 68% dos glioblastomas e é particularmente alta nos glioblastomas secundários (75%). Desta forma, a realização de PCR metilação-específica pode ter valor prognóstico nos pacientes afetados por glioblastomas (Appin e cols., 2013).

A LOH dos cromossomos 1p e 19q é a alteração genética mais comum dos oligodendrogliomas e está associada com resposta favorável à quimioterapia, radioterapia e sobrevivência dos pacientes afetados. Embora a LOH dos cromossomos 1p e 19q seja identificada em <10% dos glioblastomas, ela parece ser comum nos glioblastomas que têm componente oligodendroglial (e que representam em torno de 15% dos glioblastomas). Ainda não existe comprovação sobre o valor prognóstico da detecção de LOH dos cromossomos 1p e 19q nos pacientes com glioblastoma (McNamara e cols., 2013).

Deleções alélicas envolvendo todo ou parte do braço longo do cromossomo 10 têm sido descritas como alterações genéticas frequentes nos glioblastomas primários e secundários. Estas evidências indicam que a perda de um ou mais genes supressores tumorais localizados em 10q desempenha uma função importante na formação do glioblastoma. Um destes genes é o *PTEN*, que está localizado na região 10q23. As deleções 10q são frequentes nos astrocitomas anaplásicos, indicando que a perda da heterozigosidade do cromossomo 10q é um evento genético terminal na formação dos glioblastomas. A LOH 10q tem sido associada à diminuição da sobrevida dos pacientes com glioblastoma e parece ter implicações diagnósticas (McNamara e cols., 2013).

A isocitrato desidrogenase (IDH) é uma enzima que cataliza a conversão do isocitrato em α -cetoglutarato dentro do ciclo do ácido cítrico. A IDH1 e a IDH2 estão envolvidas em vários processos metabólicos, como transdução de sinal, síntese lipídica, estresse oxidativo e respiração oxidativa. Mutações nos genes *IDH1* e *IDH2* reduzem a afinidade da enzima para o isocitrato e aumentam a afinidade para o α -cetoglutarato como substrato, levando à produção e acúmulo do oncometabólito 2-hidroxioglutarato. Aproximadamente 70 a 80% dos glioblastomas secundários apresentam mutação em *IDH1* e os pacientes com esta mutação têm maior sobrevida. A técnica de imunohistoquímica para detecção da proteína mutante tem sido utilizada como recurso de avaliação do prognóstico, visto que ela é capaz de detectar as mutações do gene *IDH1* nos glioblastomas (Appin e cols., 2013).

O gene *EGFR* (receptor do fator de crescimento epidérmico) está localizado no cromossomo 7 e codifica uma proteína de 170 kDa que é um receptor transmembrana responsável por perceber os seus ligantes extracelulares (como EGF e TGF- α) e pela transdução deste sinal de proliferação. O *EGFR* é o gene mais frequentemente amplificado no glioblastoma e esta amplificação costuma se apresentar como elementos extracromossômicos “*double minutes*” (ou segmentos minutos duplicados). A amplificação está associada com a superexpressão: todos os glioblastomas com amplificação do *EGFR* apresentam superexpressão do *EGFR* e 70 a 90% dos glioblastomas com superexpressão do *EGFR* apresentam amplificação do gene. A amplificação ocorre em aproximadamente 40% dos glioblastomas primários mas é rara nos glioblastomas secundários. A amplificação do gene *EGFR* está frequentemente associada a alterações estruturais e variantes truncadas, como a EGFRvIII (também chamada de2-7EGFR). A EGFRvIII está presente em 20-50% dos glioblastomas com amplificação e é resultante de uma

deleção *in-frame* de 801-bp dos exons 2-7 do gene *EGFR*. Ela é ativada constitutivamente de uma forma ligante-independente levando à proliferação celular via padrão PI3-cinase/RAS. Mutações de ponto no gene *EGFR* são raras nos glioblastomas (3 a 5%) (Kalman e cols., 2013).

A neovascularização é uma marca importante nos glioblastomas e os fatores angiogênicos têm uma função importante na progressão do tumor. O fator de crescimento vascular endotelial (*VEGF*) é um fator motriz da angiogênese e é identificado em 64% dos glioblastomas. Existe uma forte correlação entre a expressão do *VEGF* e a sobrevida dos pacientes, indicando que o *VEGF* é um fator prognóstico importante (Altieri e cols., 2014).

TP53 é o gene que codifica a proteína supressora tumoral p53. Mutações do *TP53* são encontradas em mais de 50% dos glioblastomas e frequentemente estão associadas com mutações *IDH1* ou *IDH2*. Até o momento, a p53 não mostrou ter valor prognóstico, mas tem uma função importante na determinação do diagnóstico, visto que as mutações são muito comuns em astrocitomas de alto grau (Appin e cols., 2013).

PTEN é um gene supressor de tumor que regula negativamente o padrão PI3KA/Akt e tem uma função importante na regulação da proliferação celular, apoptose e invasão tumoral. A deleção do *PTEN* devido à LOH do cromossomo 10q ocorre em 50-70% dos glioblastomas primários e 54-63% dos glioblastomas secundários, enquanto que a mutação do gene *PTEN* é bem mais rara (14-47% dos glioblastomas primários). O gene *PTEN* parece ter valor prognóstico, uma vez que a perda da função do gene está associada à diminuição da sobrevida dos pacientes (McNamara e cols., 2013).

O gene *RB* codifica uma proteína supressora tumoral, a retinoblastoma (Rb), proteína central responsável pelo sinal antiproliferativo. A Rb, por sua vez, é fosforilada pelo complexo 4-ciclina cinase ciclina-dependente D1. O gene *p16^{INK4a}* se liga à cinase ciclina-dependente 4 e inibe este complexo. Deleções ou mutações do gene *RB* ocorrem em 40% dos glioblastomas secundários. A perda da expressão da proteína p16 ocorre em 20-57% dos glioblastomas. Existe uma associação significativa entre a amplificação do gene *EGFR* e deleção do gene *p16^{INK4a}* (McNamara e cols., 2013).

A citocromo c oxidase é a enzima terminal da cadeia respiratória mitocondrial que catalisa a transferência de elétrons do citocromo c para o oxigênio. A grande atividade da citocromo c oxidase é um fator preditivo de mau prognóstico nos pacientes com glioblastoma (McNamara e cols., 2013).

A telomerase humana é uma ribonucleoproteína estruturalmente complexa que é responsável pela manutenção do DNA telomérico no final dos cromossomos e tem um papel importante na imortalização das células e na oncogênese. Alguns estudos mostram que a alta atividade da telomerase e níveis altos de hTERT mRNA são fatores preditivos de mau prognóstico nos pacientes com glioblastomas (McNamara e cols., 2013).

1.5. Padrões de sinalização envolvidos na patogênese dos glioblastomas

Os padrões de sinalização mais comumente alterados nos glioblastomas são: *RTK/RAS/PI3K/PTEN*; o padrão p53 (*TP53, p14ARF, MDM2, MDM4*) e o padrão RB (*CDKN2A-CDKN2B, CDK4-CDK6, RB1*) (Figura 5).

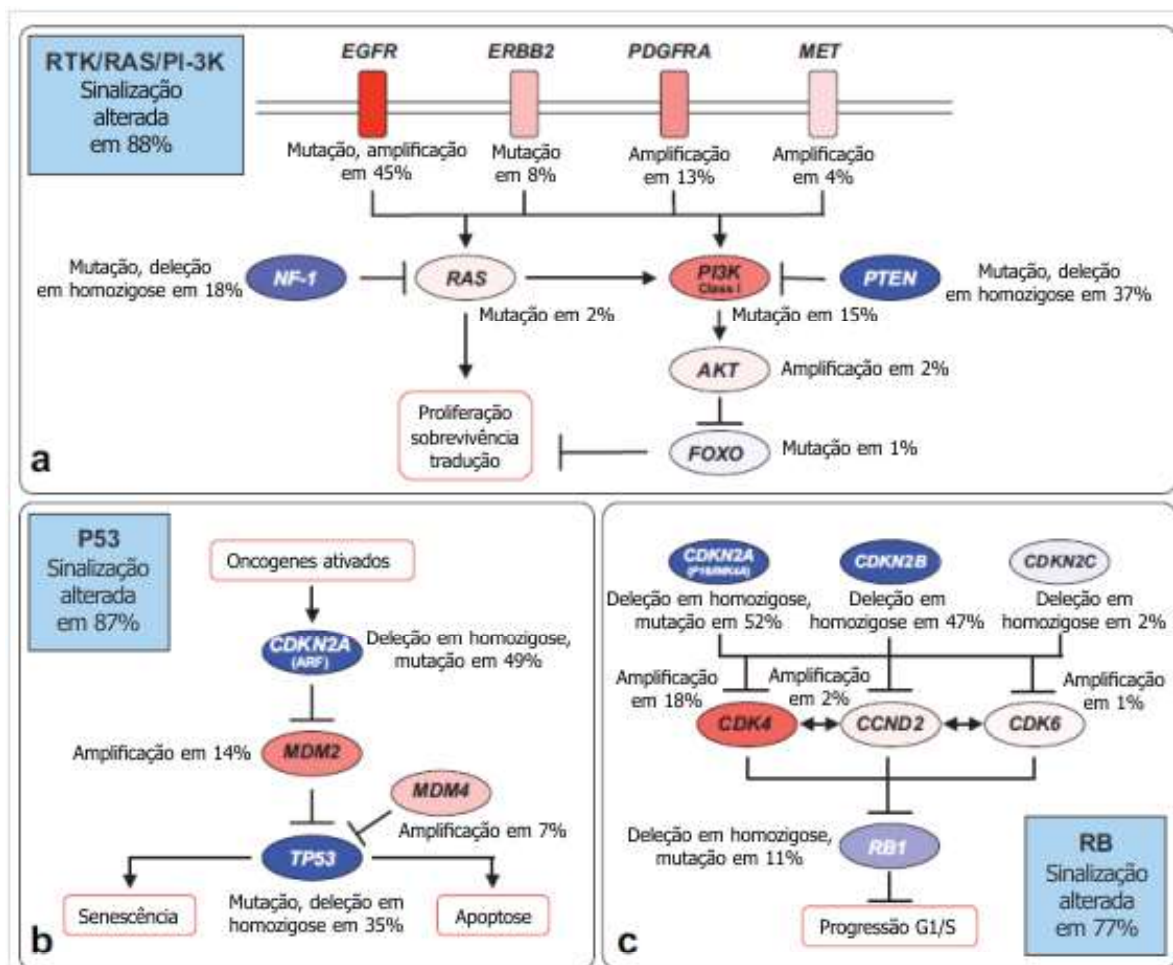


Figura 5. As alterações genéticas nos glioblastomas ocorrem, frequentemente, em 3 padrões de sinalização. Alterações do DNA e mudanças no número de cópias nos padrões de sinalização estão indicados em (a) receptor tirosina cinase (*RTK*), *RAS* e fosfatidilinositol 3-cinase (*PI3K*); (b) supressor tumoral *TP53*; e (c) supressor tumoral retinoblastoma (*RB*). Alterações de ativação genética estão representadas em vermelho. Alterações que levam à perda de função estão indicadas em azul. Em cada padrão estão mostrados os componentes alterados e a percentagem de tumor carregando cada alteração. As caixas azuis contêm a percentagem total de glioblastomas com alteração de pelo menos um dos genes do padrão (adaptado de Van Meir e cols., 2010).

1.5.1. Padrão *RTK/RAS/PI3KA/PTEN*

O *EGFR*, ou outro receptor de fator de crescimento, se torna ativado quando se liga aos fatores de crescimento (EGF, TGF- α) e recruta o *PI3K* (fosfatidilinositol-3-

cinase) para a membrana da célula. O *PI3K* converte o fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) em PIP3. O PIP3 ativa moléculas efetoras *downstream* como AKT e mTOR (proteína alvo da rapamicina em mamíferos) que resulta na proliferação e sobrevivência da célula. O gene *PTEN* codifica uma proteína com um domínio central homólogo à região catalítica das proteínas tirosina fosfatases, que é importante na função da proteína fosfatase e na atividade da 3'fosfoinositol fosfatase. O *PTEN* inibe o sinal PIP3 inibindo, também, a proliferação celular. O domínio amino-terminal do PTEN é homólogo à tensina e à auxilina e é importante na regulação da migração da célula e invasão pela difosforilação da cinase de adesão focal (FAK) (Figura 5) (McDowell e cols, 2011). As alterações dos genes envolvidos neste processo de sinalização afetam o padrão normal de proliferação e sobrevivência das células tumorais.

1.5.2. Padrão *TP53/MDM2/p14ARF*

O gene *TP53* codifica uma proteína que desempenha função numa série de processos celulares incluindo ciclo celular, resposta das células ao dano do DNA, morte celular, diferenciação celular e neovascularização. Após dano no DNA, o *TP53* é ativado e induz a transcrição de genes como o *p21Waf1/Cip1*. O gene *MDM2* codifica uma proteína de 54 kDa que se liga às formas mutante e selvagem da proteína p53, inibindo a habilidade da p53 selvagem de ativar a transcrição de sequências promotoras mínimas. Por outro lado, a transcrição do gene *MDM2* é induzida pela p53 selvagem. Nas células normais, este ciclo de retroalimentação autoregulatório regula a atividade da p53 e a expressão do *MDM2*. Além disso, o *MDM2* promove a degradação da p53. O gene *p14ARF* (uma parte do complexo *CDKN2A* no cromossomo 9p21) codifica uma proteína que se liga diretamente a

MDM2 e inibe o silenciamento da degradação e transativação da p53 mediada pelo *MDM2*. Por outro lado, a expressão do *p14ARF* é negativamente regulada pela p53. Assim, a perda da função normal da p53 pode resultar na expressão anormal dos genes *TP53*, *MDM2* e *p14ARF* (Figura 5) (Kleihues e cols., 2007).

1.5.3. Padrão *p16^{INK4a}/CDK4/RB1*

O padrão *p16^{INK4a}/CDK4/RB1* de sinalização é importante no controle da progressão da fase G1 para a fase S do ciclo celular. Conforme já mencionado anteriormente, o gene *RB* codifica a proteína supressora tumoral de 107 kDa do retinoblastoma. O complexo CDK4/ciclinaD1 fosforila a proteína Rb induzindo a liberação do fator de transcrição EF2 que ativa os genes envolvidos na transição G1→S. O gene *p16^{INK4a}* (parte do complexo *CDKN2A*) codifica uma proteína que se liga à CDK4 e inibe o complexo CDK4/ciclina, regulando negativamente a transição G1→S. A perda do controle do ciclo celular pode resultar da expressão alterada de qualquer um destes genes, p.ex. perda da expressão do *p16^{INK4a}*, amplificação e superexpressão do *CDK1* ou perda da função do *RB*. No glioblastoma, deleção do *p16^{INK4a}* e alteração do *RB* parecem ser mutuamente exclusivas. A inativação de genes deste padrão é comum tanto no glioblastoma primário como secundário (Figura 5) (Kleihues e cols., 2007).

1.6. Classificação molecular dos glioblastomas

Até o momento, o diagnóstico dos tumores cerebrais tem se baseado numa abordagem clínico-patológica. No entanto, os estudos mostram, cada vez mais, que cada tumor é único na sua biologia e perfil de expressão, sugerindo que a medicina

necessita de um comportamento mais personalizado. Os estudos mais recentes revelam que é possível agrupar os glioblastomas em subtipos moleculares a partir de combinações de genes que estão super ou subexpressos em cada grupo. A expectativa é que pacientes de um determinado subgrupo exibam respostas mais homogêneas a terapias específicas e que estas terapias sejam desenhadas especificamente para o comportamento biológico dos tumores daquele grupo (Van Meir e cols., 2010).

A partir disso, Verhaak e cols. (2010) estabeleceram uma classificação molecular para os glioblastomas baseada em 4 subtipos: clássico, mesenquimal, proneural e neural (Figura 6).

O primeiro subtipo tem um perfil característico de células altamente proliferativas e foi denominado como “clássico”. Os tumores deste grupo demonstram ganhos no cromossomo 7 acompanhados de perdas no cromossomo 10 (93%) e, frequentemente, perdas focais no cromossomo 9p21.3 (95%). Estes eventos cromossômicos levam à amplificação do gene *EGFR* (em 50% dos casos, com rearranjo do gene) e perda do *PTEN* e do locus *CDKN2A*. Alterações nos genes *TP53*, *NF1*, *PDGFRA* ou *IDH1* são quase ausentes. O glioblastoma clássico é responsivo à radioterapia e quimioterapia, provavelmente porque a resposta do p53 ao dano no DNA está intacta nestes pacientes. Estes tumores também podem ser responsivos aos inibidores da Mdm2, a reguladora negativa da p53. No nível da expressão gênica, o subtipo clássico apresenta expressão elevada do precursor neural e marcador de células tronco *NES*, e dos padrões de sinalização Notch (*NOTCH3*, *JAG1* e *LFNG*) e Sonic hedgehog (*SMO*, *GAS1* e *GLI2*) (Verhaak e cols., 2010).

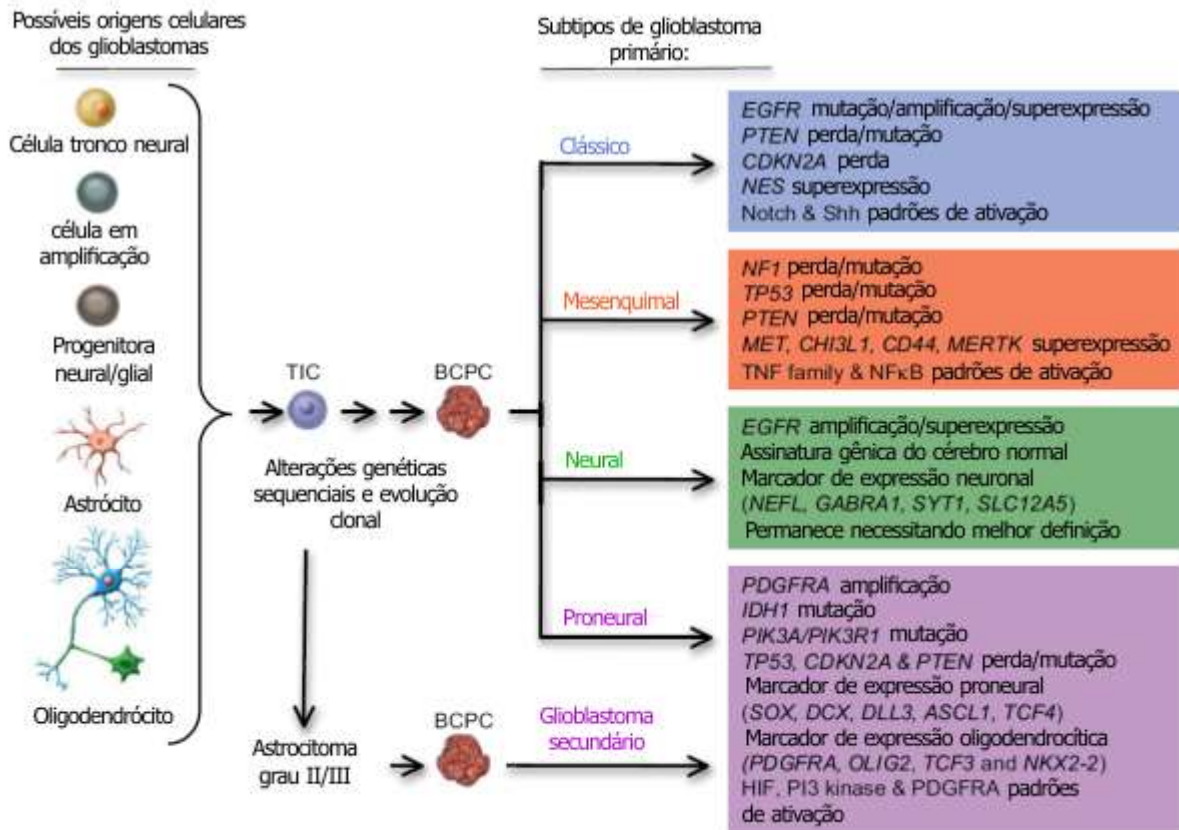


Figura 6. Sequência de modificações genéticas na patogênese dos diferentes tipos de glioblastoma. Algumas células no cérebro normal sofrem alterações genéticas que levam a uma população de células de iniciação tumoral (TICs). Posteriormente, estas células acumulam modificações genéticas e epigenéticas e se transformam em células cerebrais propagadoras de câncer (BCPC). Estas células são responsáveis pela formação dos glioblastomas (modificado de Van Meir e cols., 2010).

O segundo subtipo, chamado “mesenquimal”, é definido por um perfil de expressão associado com mesênquima e angiogênese, e superexpressão do *CHI3L1/YKL40* e genes *MET*, da mesma forma que está associado com os marcadores astrocíticos *CD44* e *MERTK* e genes da superfamília *TNF* e padrão *NFKB*. Este grupo tem frequente inativação dos genes *NF1* (37%), *TP53* (32%) e *PTEN* (32%). Estes tumores respondem a quimioterapias e radioterapias agressivas

e podem ser responsivos aos inibidores da Ras, da PI3K e da angiogênese (Verhaak e cols., 2010).

O terceiro subtipo, denominado “proneural” tem um perfil de expressão remanescente da ativação gênica no desenvolvimento neuronal. Ele inclui 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*). Neste grupo, os pacientes são mais jovens e algumas alterações genéticas são marcantes: superexpressão ou amplificação/mutação do gene *PDGFRA* e mutações no gene *IDH1* (30% dos casos). Outras alterações como mutações nos genes *TP53* (54%) e *PIK3CA/PIK3R1* (19%) também são observadas. A amplificação do cromossomo 7 e as perdas no cromossomo 10 também podem ocorrer, mas são menos frequentes do que no grupo clássico. Os achados de mutações nos genes *IDH1/2* em astrocitomas de graus mais baixos sugerem que os glioblastomas secundários podem pertencer a este grupo. Este subtipo parece ser muito responsivo aos inibidores dos padrões do fator de indução à hipóxia (HIF), do PI3K e do *PDGFRA*. A sobrevivência dos pacientes deste grupo demonstra ser um pouco melhor do que nos outros 3 subtipos. Estes tumores foram os que menos responderam aos tratamentos agressivos clássicos (Verhaak e cols., 2010).

O quarto tipo, chamado “neural”, é menos definido e tem perfil de expressão gênica similar àquela vista no tecido cerebral normal, com ativação de marcadores neuronais como *NEFL*, *GABRA1*, *SYT1* e *SLC12A5* (Verhaak e cols., 2010).

Embora esta classificação em subtipos possa ser útil na definição de alvos moleculares dentro de cada grupo, é importante perceber que todos os subgrupos apresentam inativação dos padrões de sinalização do p53 e do retinoblastoma, bem como ativação do padrão de sinalização tirosina-cinase. Ainda é necessário realizar

mais estudos para que se possa compreender melhor o perfil molecular de cada um dos subtipos tumorais e tornar mais efetivo o diagnóstico e abordagem terapêutica para cada tumor (Wilson e cols., 2014).

1.7. As alterações genéticas dos glioblastomas primários e secundários

A grande maioria dos glioblastomas se desenvolve *de novo*, em pacientes mais velhos, e sem evidência clínica ou histológica de um tumor precursor de menor malignidade. Estes tumores são chamados de glioblastomas primários e ocupam em torno de 90% dos casos dos glioblastomas. Por outro lado, os glioblastomas secundários se desenvolvem a partir de um tumor de grau mais baixo (astrocitoma difuso ou astrocitoma anaplásico). Eles ocorrem em pacientes mais jovens, têm um grau menor de necrose e estão localizados preferencialmente no lobo frontal. Os glioblastomas secundários têm um prognóstico consideravelmente melhor (Ohgaki e Kleihues, 2013).

Histologicamente, os glioblastomas primários e secundários são indistinguíveis, no entanto eles diferem nos seus perfis genéticos e epigenéticos. Mutações no gene *TP53* são incomuns nos glioblastomas primários, mas acontecem com grande frequência nos secundários. Já a amplificação do gene *EGFR* é comum nos tumores primários mas rara nos secundários. As alterações do gene *EGFR* e do *TP53* parecem ser eventos mutuamente exclusivos levando a crer que estes dois tumores evoluem de padrões genéticos diferentes (Ohgaki e Kleihues, 2013).

Até poucos anos atrás, as alterações genéticas mais típicas reconhecidas nos glioblastomas primários eram a amplificação do *EGFR*, a mutação do gene *PTEN* e a perda completa do cromossomo 10. Nos tumores secundários, as alterações

genéticas mais comuns eram as mutações do gene *TP53* e a perda 19q. No entanto, o reconhecimento destas alterações não permitia a separação inequívoca destes 2 tipos de tumores. A partir do ano de 2008, as mutações do gene *IDH1* começaram a ser descritas nos glioblastomas secundários e, com o passar do tempo, foi-se revelando que estas mutações são muito frequentes nos tumores secundários (>80%) e muito raras nos glioblastomas primários (<5%). De fato, alguns estudos descrevem casos de glioblastoma primário com mutação no gene *IDH1* que apresentam um perfil clínico e genético muito parecido com o dos glioblastomas secundários. É provável que estes casos sejam, na verdade, pacientes com glioblastoma secundário que evoluíram muito rapidamente a partir de um astrocitoma de menor grau, não havendo tempo de diagnosticar o tumor enquanto este ainda não era um glioblastoma. Desta forma, é possível que alguns pacientes com diagnóstico de glioblastoma primário e mutação no gene *IDH1* sejam pacientes que foram erroneamente diagnosticados (Ohgaki e Kleihues, 2013).

A maioria dos glioblastomas com mutação do gene *IDH1* apresenta um padrão de expressão proneural. Já os glioblastomas com ausência de mutação *IDH1* podem ser classificados como clássicos, mesenquimais, neurais ou proneurais. Esta observação sugere que os glioblastomas secundários são um grupo homogêneo de tumores caracterizados por um padrão de expressão proneural, enquanto que os glioblastomas primários são heterogêneos, com vários padrões de expressão diferentes. Astrocitomas difusos, oligodendrogliomas, e oligoastrocitomas também apresentam um padrão proneural típico, sugerindo que estas neoplasias, juntamente com os glioblastomas secundários, compartilham células progenitoras neurais em comum (Ohgaki e Kleihues, 2013).

1.8. A técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) como ferramenta para estudar as alterações do cromossomo 7 (gene *EGFR*) e do cromossomo 10 (gene *PTEN*) nos glioblastomas

Em virtude dos benefícios que o reconhecimento das alterações genéticas tumorais pode trazer ao prognóstico e tratamento dos pacientes com glioblastoma, inúmeras técnicas de exames citogenéticos e moleculares têm sido incorporadas ao estudo anatomopatológico dos tumores. Os laboratórios estão preocupados em realizar não somente estudos que abordem mutações gênicas específicas, como também aqueles que permitam estudar um painel mais amplo de alterações como as amplificações, deleções cromossômicas e alterações do número de cópias.

As técnicas rotineiramente utilizadas para identificar alterações moleculares nos gliomas incluem a hibridização *in situ* fluorescente (FISH), a perda da heterozigosidade (LOH) e a hibridização genômica comparativa (Appin e cols., 2013).

A técnica de FISH, desenvolvida por Pinkel e cols., em 1986, emprega sondas de DNA fluorescentes para a detecção de anormalidades cromossômicas numéricas e estruturais através da combinação da citogenética com a biologia molecular (Pinkel e cols., 1986). Resumidamente, a sonda de DNA é montada pela incorporação de nucleotídeos marcados com fluoróforo. A sonda de DNA marcada e o DNA alvo são desnaturados e hibridizados juntos em uma lâmina a uma temperatura apropriada. Sequências complementares de DNA se unem e as sondas de FISH mapeiam regiões alvo em cromossomos metafásicos ou em núcleos interfásicos. Após a hibridização, sequências não especificamente ligadas são removidas por uma lavagem com substância adstringente, seguida pela aplicação de

um contra-corante. Os sinais são visualizados em um microscópio de epifluorescência, equipado com filtros específicos (Stumm e cols., 1999).

A técnica de FISH tem demonstrado ser uma ferramenta eficiente para detectar aneuploidias, microdeleções, microduplicações, deleções subteloméricas e outras anormalidades estruturais dos cromossomos. Esta técnica é especialmente importante nos estudos de tumores sólidos uma vez que ela pode ser utilizada em materiais previamente fixados em formalina e embebidos em blocos de parafina. A técnica permite a análise do material tumoral ao mesmo tempo em que mantém a arquitetura tecidual e, conseqüentemente, permite a revelação da heterogeneidade célula a célula, a detecção de pequenos clones e a visualização de células geneticamente distintas que estão convivendo numa mesma região tumoral (Varella-Garcia, 2003).

A hibridização *in situ* fluorescente demonstra ter várias vantagens quando se refere à detecção de alterações do número de cópias únicas ou de pequeno número, como ocorre nos glioblastomas. Na técnica de FISH, as modificações do número de cópias são identificadas visualmente dentro do núcleo da célula tumoral, o que não ocorre nas outras técnicas. Uma das conseqüências deste fato é que a microdissecção se torna desnecessária uma vez que o examinador reconhece o tecido tumoral que está analisando e não corre o risco de avaliar tecidos normais em detrimento dos tecidos tumorais. Outra vantagem é o fato de que, com a técnica de FISH, é possível detectar células normais (não neoplásicas) dentro da amostra tumoral que servirão como controles positivos, muitas vezes dispensando o uso de amostras-controle. Outra vantagem da técnica é que as alterações citogenéticas moleculares podem ser identificadas em um pequeno percentual de células neoplásicas (Appin e cols., 2013).

De fato, na revisão da literatura dos últimos 15 anos, observa-se que a aneuploidia do cromossomo 7 e a amplificação do gene *EGFR* foram bastante estudadas através da técnica de FISH (Tabela 1 e Tabela 2).

Tabela 1. Trabalhos da literatura que analisaram a amplificação do gene *EGFR* em amostras de glioblastomas de pacientes adultos através da técnica de FISH.

	N	Amp. <i>EGFR</i>	Frequência (%)
Kouwenhoven, 2009	233	51	21,88
Nagasaka, 2007	20	5	25,00
Kleinschmidt-DeMasters, 2005	20	5	25,00
Layfield, 2006	34	9	26,47
Kleinschmidt-DeMasters, 2006	25	7	28,00
Gaiser, 2009	93	28	30,10
Burger, 2001	79	25	31,64
Korshunov, 2005	189	60	31,74
Jha, 2010	38	12	32,00
Rodriguez, 2008	27	9	33,33
Quan, 2005	107	36	33,64
Appin, 2013	187	65	34,75
Mott, 2008	129	45	34,88
Toth, 2009	20	7	35,00
Korshunov, 2004	114	46	40,35
Smith, 2001	111	46	41,44
Faulkner, 2014	51	22	43,13
Hobbs, 2012	532	231	43,42
Little, 2012	240	106	44,00
Kakkar, 2011	22	10	45,45
Joensuu, 2005	47	22	46,80
Coulibaly, 2010	99	47	47,47
Ruano, 2009	147	75	51,02
Das, 2011	7	4	57,14
Kim, 2010	84	48	57,14
Lopez-Gines, 2010	35	22	62,85
Okada, 2003	14	9	64,28
Hinkle, 2011	40	26	65,00

N: número total de pacientes estudados; Amp. *EGFR*: número de pacientes que apresentaram amplificação do gene *EGFR*; Frequência: frequência de casos com amplificação no total da amostra.

Tabela 2. Trabalhos da literatura que analisaram a polissomia do cromossomo 7 em amostras de glioblastomas de pacientes adultos através da técnica de FISH.

	N	Polissomia 7	Frequência (%)
Coulibaly, 2010	99	18	18,18
Kakkar, 2011	22	5	22,73
Kouwenhoven, 2009	230	68	29,56
Rodriguez, 2008	48	16	33,33
Smith, 2001	111	43	38,73
Korshunov, 2004	114	67	58,77
Kleinschmidt-DeMasters, 2005	20	14	70,00
Kleinschmidt-DeMasters, 2006	25	20	80,00
Amalfitano, 2000	64	52	81,25
Benito, 2010	40	34	85,00
Korshunov, 2005	189	171	90,47
Lopez-Gines, 2010	35	32	91,42
Klink, 2011	23	22	95,65

N: número total de pacientes estudados; Polissomia 7: número de pacientes que apresentaram polissomia do cromossomo 7; Frequência: frequência de casos com polissomia do cromossomo 7 no total da amostra.

A revisão dos trabalhos da literatura mostra que houve uma grande variação da frequência de amplificação do gene *EGFR*, detectada pela técnica de FISH, entre as diferentes amostras (21,88 a 95%). Esta variabilidade pode estar relacionada à heterogeneidade dos glioblastomas, sendo que a frequência de amplificação pode ter sido diferente dependendo do subtipo dos tumores que foram analisados em cada amostra e do tecido tumoral que foi enviado para a análise.

Ainda assim, quando as amostras da literatura são consideradas em conjunto (N= 2744), observa-se que a média de amplificação do gene *EGFR*, detectada pela técnica de FISH, é de 39,28%, e esta é a frequência de amplificação observada pela maioria dos autores da literatura (40%) (Kleihues e cols., 2007).

A frequência de polissomia do cromossomo 7 detectada pela técnica de FISH, na literatura, variou de 18,8 a 95,65%, sendo que a média de polissomia observada no total de pacientes estudados (N= 1020) foi de 55,09%.

Em relação às perdas do braço longo do cromossomo 10, envolvendo a região do gene *PTEN*, os dados da literatura se revelam de forma diferente. Observa-se que um pequeno número de autores escolheu a técnica de FISH para estudar a perda da heterozigidade do cromossomo 10q (Tabela 3). É provável que a técnica de FISH não tenha sido a preferida para este tipo de análise uma vez que ela não é capaz de detectar alguns tipos de LOH 10q que são comuns nos glioblastomas, como a perda da heterozigidade sem alteração do número de cópias. Outras técnicas como a análise de microssatélites e SNP *array* representam uma vantagem neste sentido (Kuga e cols., 2008).

Tabela 3. Trabalhos da literatura que analisaram a perda da heterozigidade do cromossomo 10q em amostras de glioblastomas através da técnica de FISH.

	N	LOH 10q	Frequência (%)
Suri, 2009*	18	1	5,55
Rodriguez, 2008	22	7	31,81
Srividya, 2011	73	31	42,46
Smith, 2001	107	48	44,85
Korshunov, 2004	114	61	53,50
Korshunov, 2005	189	111	58,73
Korshunov ^b , 2005*	44	27	61,36

*Amostras constituídas por crianças e adultos jovens; N: número total de pacientes estudados; LOH 10q: número de pacientes que apresentaram perda da heterozigidade do cromossomo 10q; Frequência: frequência de casos com perda da heterozigidade do cromossomo 10q no total da amostra.

A técnica de FISH também foi pouco usada, na literatura, para analisar a monossomia do cromossomo 10 (Tabela 4). A frequência de monossomia do 10 variou de 16,38 a 82,60%, com uma média de 34,56%.

Tabela 4. Trabalhos da literatura que analisaram a monossomia do cromossomo 10 em amostras de glioblastomas de pacientes adultos através da técnica de FISH.

	N	Monossomia 10	Frequência (%)
Kouwenhoven, 2009	238	39	16,38
Rodriguez, 2008	54	17	31,48
Korshunov, 2004	114	36	31,57
Korshunov, 2005	189	60	31,74
Wessels, 2003	10	6	60,00
Benito, 2010	37	26	70,27
Amalfitano, 2000	64	49	76,56
Klink, 2011	23	19	82,60

N: número total de pacientes estudados; Monossomia 10: número de pacientes que apresentaram monossomia do cromossomo 10; Frequência: frequência de casos com monossomia do cromossomo 10 no total da amostra.

1.9 Referências bibliográficas

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 Sep;10:29-37.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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.

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

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

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

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

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

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

Kouwenhoven MC, Gorlia T, Kros JM, Ibdaih A, Brandes AA, Bromberg JE, et al. Molecular analysis of anaplastic oligodendroglial tumors in a prospective randomized study: A report from EORTC study 26951 *Neuro Oncol*. 2009 Dec;11(6):737-46.

Kuga D, Mizoguchi M, Guan Y, Hata N, Yoshimoto K, Shono T, et al. Prevalence of copy-number neutral LOH in glioblastomas revealed by genomewide analysis of laser-microdissected tissues. *Neuro Oncol*. 2008 Dec;10(6):995-1003.

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

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

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

Louis DN. Molecular pathology of malignant gliomas. *Annu Rev Pathol*. 2006;1:97-117.

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

McDowell KA, Riggins GJ, Gallia GL. Targeting the AKT pathway in glioblastoma. *Curr Pharm Des*. 2011;17(23):2411-20.

McNamara MG, Sahebjam S, Mason WP. Emerging biomarkers in glioblastoma. *Cancers*. 2013;5(3):1103-19.

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

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

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 Oct 1;64(19):6892-9.

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

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

Omuro A, DeAngelis LM. Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review. *Jama.* 2013 Nov 6;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 Oct;16 Suppl 4:iv1-iv63.

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.

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

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

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

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

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

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

Suri V, Das P, Pathak P, Jain A, Sharma MC, Borkar SA, et al. Pediatric glioblastomas: a histopathological and molecular genetic study. *Neuro Oncol.* 2009 Jun;11(3):274-80.

Toth J, Egervari K, Klekner A, Bognar L, Szanto J, Nemes Z, et al. Analysis of EGFR gene amplification, protein over-expression and tyrosine kinase domain mutation in recurrent glioblastoma. *Pathol Oncol Res.* 2009 Jun;15(2):225-9.

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 May-Jun;60(3):166-93.

Varella-Garcia M. Molecular cytogenetics in solid tumors: laboratorial tool for diagnosis, prognosis, and therapy. *The 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 Jan 19;17(1):98-110.

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

Wilson TA, Karajannis MA, Harter DH. Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics. *Surg Neurol Int.* 2014;5:64.

2. Objetivos

A análise das alterações genéticas dos glioblastomas tem contribuído, cada vez mais, para o conhecimento da natureza heterogênea destes tumores. Embora exista, na literatura, vários estudos que analisaram as alterações dos cromossomos 7 e 10 nos glioblastomas, ainda há muita divergência nos resultados e se observa a necessidade de mais informações sobre o assunto. Da mesma forma, 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 cromossomos 7 e 10 (genes *EGFR* e *PTEN*) nos glioblastomas de pacientes brasileiros.

Objetivo geral: identificar, através da técnica de FISH, alterações citogenéticas moleculares de valor prognóstico em amostras tumorais de pacientes com glioblastomas.

Objetivos específicos:

1. verificar a frequência da aneuploidia do cromossomo 7, amplificação do gene *EGFR*, monossomia do cromossomo 10, deleção do gene *PTEN* e deleção do braço longo do cromossomo 10 em uma amostra de glioblastomas;
2. 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 aneuploidy of chromosomes 7 and 10, *EGFR* amplification, and *PTEN* deletions”

Carla Graziadio, Patrícia Trevisan, Rafael Fabiano Machado Rosa, Paulo Ricardo Gazola Zen, Dayane Bohn Koshiyama, Fabiano Pasqualotto Soares, Nelson Pereira Filho, Valentina Oliveira Provenzi, Rita de Cássia Sant’Anna Alves, Rachid Karam, Giorgio Adriano Paskulin

Enviado para publicação na Revista “*Cancer Genetics*”

Title: Molecular cytogenetic analysis of adult onset glioblastomas: clinical relevance of aneuploidy of chromosomes 7 and 10, *EGFR* amplification, and *PTEN* deletions

Author names and affiliations: Carla Graziadio^{a*}, Patrícia Trevisan^a, Rafael Fabiano Machado Rosa^{ab}, Paulo Ricardo Gazola Zen^{ab}, Dayane Bohn Koshiyama^a, Fabiano Pasqualotto Soares^c, Nelson Pereira Filho^c, Valentina Oliveira Provenzi^d, Rita de Cássia Sant'Anna Alves^e, Rachid Karam^f, Giorgio Adriano Paskulin^{ab}

^a Clinical Genetics, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil;

^b Graduate Program in Pathology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil.

^c Neurosurgery, Hospital Beneficência Portuguesa, Porto Alegre, RS, Brasil;

^d Pathology, Grupo Hospitalar Conceição, Porto Alegre, RS, Brasil;

^e Pathology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil.

^f Ambry Genetics, Cancer Genomics, Aliso Viejo, CA, USA.

***Corresponding author:** Carla Graziadio. Rua Sarmento Leite, 245, Porto Alegre, RS, Brasil. CEP 90050-170. E-mail: graziadio@ufcspa.edu.br

Abstract

Glioblastoma is the most frequent and aggressive brain tumor with poor survival, despite the advances in diagnosis and therapy. Here we investigate the clinical and molecular cytogenetic findings of 21 glioblastomas, and found the frequency of *EGFR* amplification, polysomy for chromosome 7, *PTEN* deletions, and monosomy of chromosome 10 in a cohort of 21 patients. When comparing these molecular abnormalities with patient's survival we observed a correlation between deletion of the long arm of chromosome 10 and a shorter survival. Altogether, results highlight the clinical significance of FISH analysis to identify *EGFR* amplification, and specially 10q23/*PTEN* deletions, as important determinants of the molecular pathway that governs tumor phenotypes, and demonstrates its potential prognostic/predictive value for adult onset glioblastoma patients.

Keywords: Glioblastoma, *EGFR* gene, *PTEN* gene, molecular cytogenetics, FISH

Introduction

Glioblastoma is the most frequent and most malignant neoplasm of the human nervous system that, despite current therapies, usually causes the patient's death within 1 year following diagnosis. Primary glioblastoma, which comprises more than 90% of biopsied or resected cases, represents a subgroup that develops rapidly after a short clinical history and without any clinical or histological evidence of a less malignant precursor lesion¹.

Glioblastoma is characterized by intratumoral heterogeneity with regard to both histomorphology and genetic changes. Genetic studies have shown a

remarkable genomic heterogeneity among glioblastomas and the existence of molecular subclasses within them that may, when fully defined, allow stratification of the treatment². At the molecular level, these tumors are subject of intense investigation². The epidermal growth factor receptor (*EGFR*), a member of the tyrosine kinase growth factor receptor family, is frequently amplified/overexpressed in primary glioblastoma. This oncogenetic pathway, observed in 40–60% of the cases, is heavily involved in this variant of glioblastoma. Pathways, such as *PTEN/Akt/mTOR*, are related to the deregulation of *EGFR* and have been considered to be involved in the development of glioblastoma³.

We present the clinical and molecular cytogenetic findings of 21 glioblastomas. The frequencies of *EGFR* amplification, polysomy for chromosome 7, *PTEN* deletions and monosomy for chromosome 10 were evaluated. A second aim of this study was to investigate the relationship between such genetic variations and the prognostic/predictive value.

Material and methods

Patient Population and Pathological Analysis

A total of 21 glioblastomas were received in the genetics laboratory at our University over a period of 2 years and 6 months between January 2012 and July 2014. Tumor tissue was obtained at the time of surgery, fixed in formalin and paraffin-embedded for histopathological examination. Hematoxylin and eosin stained sections were reviewed by a pathologist and diagnoses were made according to the recent WHO Classification (2007). Demographic profile of the 21 patients was noted.

Fluorescence *In Situ* Hybridization

Dual-probe fluorescence *in situ* hybridization (FISH) assay was performed on paraffin-embedded sections of all cases, using a locus-specific probe for *EGFR* and a reference centromeric probe for chromosome 7 (CEP7) (Vysis, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) and a locus-specific probe for *PTEN* and a reference centromeric probe for chromosome 10 (CEP10) (Vysis, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Briefly, sections were deparaffinized and then dehydrated in 100% ethanol. This was followed by target retrieval in citrate buffer for 30 min and proteinase K digestion (0.6 mg/mL) for 30 min. Each probe was mixed with tDenHyb-2 solution (Denaturation and Hybridization, Insitus Biotechnologies) (1:1 v/v). The solution (4 μ L) was applied on the sections which were subjected to simultaneous probe/specimen denaturation at 80°C for 15 min and overnight incubation at 37°C in wet hybridization chamber. Following this, the sections were washed and counterstained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (0.3 μ g/mL in Vectashield Mounting Medium, Vector Laboratories) and visualized under a fluorescence microscope equipped with a set of the appropriate filters. Samples showing sufficient FISH efficiency (>90% nuclei with signals) were evaluated. Signals were counted in a minimum of 200 nonoverlapping, intact nuclei per slide. *EGFR* amplification was considered as present when more than 10% of tumor cells showed *EGFR*:CEP7 ratio >2. Polysomy for chromosome 7 was defined as >20% nuclei showing three or more signals for CEP7. Hemizygous deletions were defined as >50% nuclei containing either one signal of locus-targeted probe and \geq 2 signals of reference probe (absolute deletions) or two signals of locus-targeted probe and \geq 4 signals of reference probe (relative deletions). Homozygous deletions were identified by the simultaneous lack of both signals of locus-targeted probe and the presence of signals reference probe

in more than 30% of cells. Monosomy for chromosome 10 was defined by the presence of one CEP10 signal per cell in >50% nuclei. Images were captured by using a high-resolution microscopy camera (Olympus BX51).

Statistical Analyses

The clinical data and molecular findings were analyzed using the statistical software BioEstat 5.0. Variables were tested for normal distribution and nonparametric tests were chosen. Chi-Square and Fisher tests were used to analyze qualitative variables while Mann-Whitney and Spearman Correlation tests were used to analyze quantitative variables. Survival analyses from the date of operation were estimated with the Kaplan–Meier method. The comparisons among various patient subgroups were performed by the log-rank test. Probability (p) values <0.05 were considered significant.

Results

The average age of our cohort of 21 patients was 57.9 years (range 41-83 yr), with males comprising 76.19% of all cases. Eleven individuals had family history of cancer, two patients (9.52%) had a first-degree relative with brain cancer (Table 1).

In ten cases (47.61%) the first clinical sign was headache, followed by convulsions in 19.04% and motor deficit in 14.28% of patients. The tumor was primary in 18 patients (85.71%). In two cases the tumor was classified as secondary, since these patients had previous surgery for other brain tumors, such as astrocytoma and oligoastrocytoma (Table 1).

In most cases the tumor affected the right cerebral hemisphere (61.90%). In regards to localization, most tumors were located in the temporal and frontal region,

in 33.33% and 28.57% of the cases, respectively. In regards to tumor evolution, there were five recurrences (23.80%) requiring surgical re-intervention. Patient survival averaged 9.7 months, with a range from 25 to 980 days (n=18). By the end of this study six patients from our cohort were still alive (Table 1).

Interestingly, we observed a statistically significant correlation (as evaluated by the Spearman coefficient, $p=0.0494$) between young age and longer survival (Figure 1).

Molecularly, the most frequent alterations were chromosome 7 polysomy (52.30%) and monosomy of chromosome 10 (47.61% of cases). In 23.80% of the sample both alterations were found. *EGFR* amplification was observed in 38,09% of cases, the majority also presented polysomy of chromosome 7 (75%). We also observed that all cases with *EGFR* amplification have abnormalities on chromosome 10: one case with a homozygous *PTEN* deletion, six cases with monosomy of chromosome 10, and three cases with deletion of the long arm of chromosome 10. Of note, the patients with secondary glioblastoma did not have *EGFR* amplification.

Homozygous deletion of the *PTEN* gene was observed in only one case from our cohort. This case was also positive for *EGFR* amplification, monosomy of chromosome 10, and deletion of chromosome's 10 long arm. *PTEN* deletion was not found in heterozygous state in any of the case of our cohort. Chromosome 10 long arm deletion was found in eight patients, with half presenting other molecular abnormalities.

Comparing specific molecular alterations with survival data, we found that there was no correlation between survival of patients with any of the single molecular alterations we tested (*EGFR* amplification, monosomy of chromosome 10, or polysomy of chromosome 7) when compared to cases without the respective

alteration (Figure 2). The exception was deletion of chromosome 10 long arm, which presented with a shorter survival (3.6 months) when compared to the group without this abnormality.

Discussion

Glioblastomas can arise at any age, but in most cases it affects adults with a higher incidence in ages 45 to 75. In a population study done by Ohgaki et al. (2004), the median age of glioblastoma patients was 61.3 years⁴. Although our study was intentionally designed to target adult population, the median age of our cohort was 57.9 years, therefore in the expected range.

The majority of the patients in our cohort were males, also in accordance with the literature (male:female index = 1.26 to 1.28)⁵. Although the majority of glioblastomas are sporadic, it is estimated that 5% of cases are hereditary⁶. In the same way, although the majority of tumors are isolated cases, some tumors occur in the context of a hereditary cancer syndrome⁶. Malmer et al. (2003) demonstrated that first degree relatives were most affected in families with re-occurrence of these tumors, indicating that there is a genetic predisposition for these tumors⁷. We found re-occurrence in first-degree relatives in 9.52% of the cases.

Headache is the major symptom that leads to diagnosis, and it is found in approximately 50% of the glioblastoma cases. In our cohort, in ten cases (47.61%) the first clinical sign was headache, followed by convulsions in 19.04% and motor deficit in 14.28% of patients. In the literature we found that convulsions are observed in 20 to 40% of the cases⁸.

The majority of glioblastomas occurs *de novo* and are called primary glioblastomas⁵. In our cases, the tumor was primary in 18 patients (85.71%). In two

cases the tumor was classified as secondary, since these patients had previous surgery for other brain tumors, such as astrocytoma and oligoastrocytoma (Table 1).

In a large series of 987 glioblastomas from the University of Zurich Hospital, the temporal region of the brain was the most affected area (31%), followed by the parietal (24%) and the frontal regions (23%)⁴. In our cohort, most tumors were located in the temporal and frontal regions, in 33.33% and 28.57% of the cases, respectively.

The signs of intracranial hypertension, such as hydrocephaly and papilledema, are more rarely observed, since neuroimaging can anticipate the diagnosis before the development of the advanced intracranial hypertension symptoms⁸. In fact, none of the patients of our series was diagnosed with these symptoms.

Ohgaki et al. (2004) studied a series of patients from 1980 to 1994, and observed that the median survival of patients subjected to surgical intervention was 7.9 ± 5 months⁴. Patient survival in our study averaged 9.7 months, demonstrating improvement in survival obtained by current diagnostic and therapeutic techniques. In accordance with the literature, in our study younger patients presented better survival^{5,9,10}.

EGFR amplification and polysomy of chromosome 7 are the most frequent alterations found in glioblastomas, although the literature shows discrepancies in the frequency of these events when measured by FISH. It is possible that this variability is due to the high heterogeneity observed in the morphology of glioblastomas, leading to the finding of areas with and without amplification in the same tumor sample^{11,12}. Although the standard practice is to analyze several quadrants of the same hybridized slide, this does not rule out the possibility of loss of regions that are not present in the tested slides.

Of note, polysomy of chromosome 7 is frequently found in association with *EGFR* amplification. This association was observed in our cohort in 75% of the cases with *EGFR* amplification. In our sample, neither *EGFR* amplification, nor polysomy of chromosome 7 were observed in patients with secondary glioblastoma. This also is in accordance with the literature, with common reports of gain of chromosome 7 DNA in primary glioblastomas but not in secondary^{1,13}.

Losses of chromosome 10 DNA are the genetic alterations most commonly found in glioblastomas, occurring in 60 to 80% of the cases. Many glioblastomas present loss of the entire chromosome 10, but studies evaluating loss of heterozygosity (LOH) identified at least three regions frequently deleted: 10p14-p15, 10q23-24 e 10q25-qter. Among those, LOH of the region containing the *PTEN* gene (10q23) was observed in 75% to 95% of tested glioblastomas⁵. In our cohort, loss of chromosome 10 material was also found to be frequent, occurring in 76.19% of cases. Monosomy of chromosome 10 was found in 47.61% of cases, while deletion of the long arm and homozygous deletion of the *PTEN* region were found in 38.09% and 4.76% of cases respectively.

According to published literature, there is huge variability in the percentage of cases with monosomy of chromosome 10, at least when analyzed by FISH (16.38 to 82.60%). Maybe this is due to the fact that there are only a few published studies analyzing *PTEN*'s region LOH by FISH. There are other techniques, such as microsatellite and SNP array, that have been used more frequently, probably because these techniques allow the detection of other types of alterations, e.g., LOH without copy number alterations¹⁴.

Interestingly, our analysis of *PTEN* in homozygosis or heterozygosis by FISH was discordant with the literature findings. Srividya et al. (2011) is the only study

describing homozygous deletion, occurring in 42.46% of cases¹⁵. In our cohort, we found this alteration in only one patient. Hemizygous deletion, which was observed in three studies in the literature^{16,17,18}, was not detected in our cases. Again, this discrepancy may be due to the small number of cases analyzed in ours and other studies. Using as criteria the total index of *PTEN*/CEP10 sign in each tumor sample analyzed by FISH, studies in the literature found deletion of chromosome 10 long arm in 31% to 44% of cases^{19,20}. The frequencies observed in our study are within this range.

In our cohort, all cases with *EGFR* amplification also presented LOH of chromosome 10. According to the molecular classification proposed by Verhaak et al. (2010), these cases should belong to the “classic” subtype of glioblastomas with amplification of *EGFR* associated to loss of chromosome 10 being found in 100% of cases²¹. Even in these cases, analyses of other molecular markers, such as *TP53*, 1p19q and *CDKN2A*, should help with the classification of this particular subtype. This classification of glioblastomas into subtypes may help us better understand the clinical behavior of these heterogeneous tumors, and also contribute for developing target therapy choices specific for each subtype.

One of the major uses of genetic studies in the pathology of tumors is to provide possible correlations between genetic alterations and prognosis¹⁰. In our series of cases, patients with deletion of the long arm of chromosome 10 (including the *PTEN* region) have a worse prognosis, with reduced survival when compared to the group without this alteration. We also observed that this correlation is independent of the age at diagnosis. This finding is in accordance with the literature^{17,19}. We believe that this association may be due to the loss of function of the tumor suppressor gene *PTEN*.

There was no correlation between alterations on chromosome 7 (*EGFR* amplification or polysomy) and patients' prognosis. Although these alterations have been reported to correlate with a worse prognosis^{16,17,22,23,24}, several other studies were unable to reproduce this association^{13,20,25,26,27,28,29}. Some studies actually observed better survival in patients with these abnormalities^{19,30}. It is possible that these discrepancies are due to our partial understanding of these tumors. Also, in our case, the small size of our cohort may have had a negative impact in our ability to detect the association of some of these genetic alterations with prognosis.

In conclusion, the results of the present study highlight the clinical utility of FISH technique in identifying *EGFR* amplification and 10q23/*PTEN* deletions as important determinants of the molecular pathway that governs tumor phenotypes and demonstrates its potential prognostic/predictive value for glioblastoma patients. FISH analysis of *EGFR* and 10q23 status should be recommended by other studies as an ancillary laboratory method that may aid in identifying patients with specific tumor phenotype who might benefit from individualized therapeutic protocols.

References

1. Ohgaki H, Kleihues P. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res*. 2013 Feb 15;19(4):764-72.
2. 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 May-Jun;60(3):166-93.
3. McDowell KA, Riggins GJ, Gallia GL. Targeting the AKT pathway in glioblastoma. *Curr Pharm Des*. 2011;17(23):2411-20.
4. 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 Oct 1;64(19):6892-9.
5. 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.
6. Fisher JL, Schwartzbaum JA, Wrensch M, Wiemels JL. Epidemiology of brain tumors. *Neurol Clin*. 2007 Nov;25(4):867-90, vii.
7. Malmer B, Henriksson R, Gronberg H. Familial brain tumours-genetics or environment? A nationwide cohort study of cancer risk in spouses and first-degree relatives of brain tumour patients. *Int J Cancer*. 2003 Aug 20;106(2):260-3.
8. Omuro A, DeAngelis LM. Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review. *Jama*. 2013 Nov 6;310(17):1842-50.
9. Das P, Puri T, Jha P, Pathak P, Joshi N, Suri V, et al. A clinicopathological and molecular analysis of glioblastoma multiforme with long-term survival. *J Clin Neurosci*. 2011 Jan;18(1):66-70.
10. Appin CL, Gao J, Chisolm C, Torian M, Alexis D, Vincentelli C, et al. Glioblastoma with oligodendroglioma component (GBM-O): molecular genetic and clinical characteristics. *Brain Pathol*. 2013 Jul;23(4):454-61.
11. Klink B, Schlingelhof B, Klink M, Stout-Weider K, Patt S, Schrock E. Glioblastomas with oligodendroglial component-common origin of the different histological parts and genetic subclassification. *Cell Oncol (Dordr)*. 2011 Jun;34(3):261-75.

12. Little SE, Popov S, Jury A, Bax DA, Doey L, Al-Sarraj S, et al. Receptor tyrosine kinase genes amplified in glioblastoma exhibit a mutual exclusivity in variable proportions reflective of individual tumor heterogeneity. *Cancer Res.* 2012 Apr 1;72(7):1614-20.
13. Joensuu H, Puputti M, Sihto H, Tynninen O, Nupponen NN. Amplification of genes encoding KIT, PDGFRalpha and VEGFR2 receptor tyrosine kinases is frequent in glioblastoma multiforme. *J Pathol.* 2005 Oct;207(2):224-31.
14. Kuga D, Mizoguchi M, Guan Y, Hata N, Yoshimoto K, Shono T, et al. Prevalence of copy-number neutral LOH in glioblastomas revealed by genomewide analysis of laser-microdissected tissues. *Neuro Oncol.* 2008 Dec;10(6):995-1003.
15. Srividya MR, Thota B, Shailaja BC, Arivazhagan A, Thennarasu K, Chandramouli BA, et al. Homozygous 10q23/PTEN deletion and its impact on outcome in glioblastoma: a prospective translational study on a uniformly treated cohort of adult patients. *Neuropathology.* 2011 Aug;31(4):376-83.
16. Korshunov A, Sycheva R, Golanov A. Molecular stratification of diagnostically challenging high-grade gliomas composed of small cells: the utility of fluorescence in situ hybridization. *Clin Cancer Res.* 2004 Dec 1;10(23):7820-6.
17. Korshunov A, Sycheva R, Golanov A. The prognostic relevance of molecular alterations in glioblastomas for patients age < 50 years. *Cancer.* 2005 Aug 15;104(4):825-32.
18. Korshunov^b A, Sycheva R, Gorelyshev S, Golanov A. Clinical utility of fluorescence in situ hybridization (FISH) in nonbrainstem glioblastomas of childhood. *Mod Pathol.* 2005 Sep;18(9):1258-63.
19. Smith JS, Tachibana I, Passe SM, Huntley BK, Borell TJ, Iturria N, et al. PTEN mutation, EGFR amplification, and outcome in patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme. *J Natl Cancer Inst.* 2001 Aug 15;93(16):1246-56.
20. Rodriguez FJ, Scheithauer BW, Giannini C, Bryant SC, Jenkins RB. Epithelial and pseudoepithelial differentiation in glioblastoma and gliosarcoma: a comparative morphologic and molecular genetic study. *Cancer.* 2008 Nov 15;113(10):2779-89.
21. 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 Jan 19;17(1):98-110.
22. Coulibaly B, Nanni I, Quilichini B, Gaudart J, Metellus P, Fina F, et al. Epidermal growth factor receptor in glioblastomas: correlation between gene copy number and protein expression. *Hum Pathol*. 2010 Jun;41(6):815-23.
 23. Kim B, Myung JK, Seo JH, Park CK, Paek SH, Kim DG, et al. The clinicopathologic values of the molecules associated with the main pathogenesis of the glioblastoma. *J Neurol Sci*. 2010 Jul 15;294(1-2):112-8.
 24. McNamara MG, Sahebjam S, Mason WP. Emerging biomarkers in glioblastoma. *Cancers*. 2013;5(3):1103-19.
 25. Quan AL, Barnett GH, Lee SY, Vogelbaum MA, Toms SA, Staugaitis SM, et al. Epidermal growth factor receptor amplification does not have prognostic significance in patients with glioblastoma multiforme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2005 Nov 1;63(3):695-703.
 26. Layfield LJ, Willmore C, Tripp S, Jones C, Jensen RL. Epidermal growth factor receptor gene amplification and protein expression in glioblastoma multiforme: prognostic significance and relationship to other prognostic factors. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2006 Mar;14(1):91-6.
 27. Lopez-Gines C, Gil-Benso R, Ferrer-Luna R, Benito R, Serna E, Gonzalez-Darder J, et al. New pattern of EGFR amplification in glioblastoma and the relationship of gene copy number with gene expression profile. *Mod Pathol*. 2010 Jun;23(6):856-65.
 28. Hobbs J, Nikiforova MN, Fardo DW, Bortoluzzi S, Cieply K, Hamilton RL, et al. Paradoxical relationship between the degree of EGFR amplification and outcome in glioblastomas. *Am J Surg Pathol*. 2012 Aug;36(8):1186-93.
 29. Faulkner C, Palmer A, Williams H, Wragg C, Haynes HR, White P, et al. EGFR and EGFRvIII analysis in glioblastoma as therapeutic biomarkers. *Br J Neurosurg*. 2014 Aug 20:1-7.
 30. Kleinschmidt-DeMasters BK, Meltesen L, McGavran L, Lillehei KO. Characterization of glioblastomas in young adults. *Brain Pathol*. 2006 Oct;16(4):273-86.

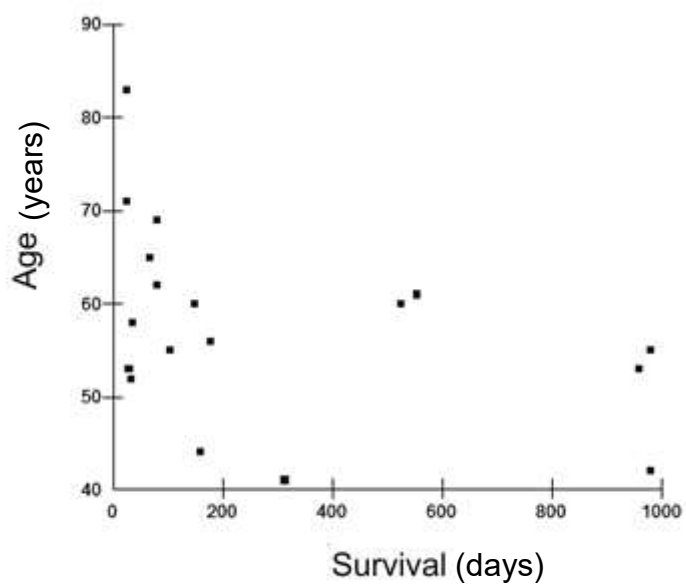
Figures and tables

Figure 1. Correlation between patient age at diagnosis of the tumor and survival after surgery.

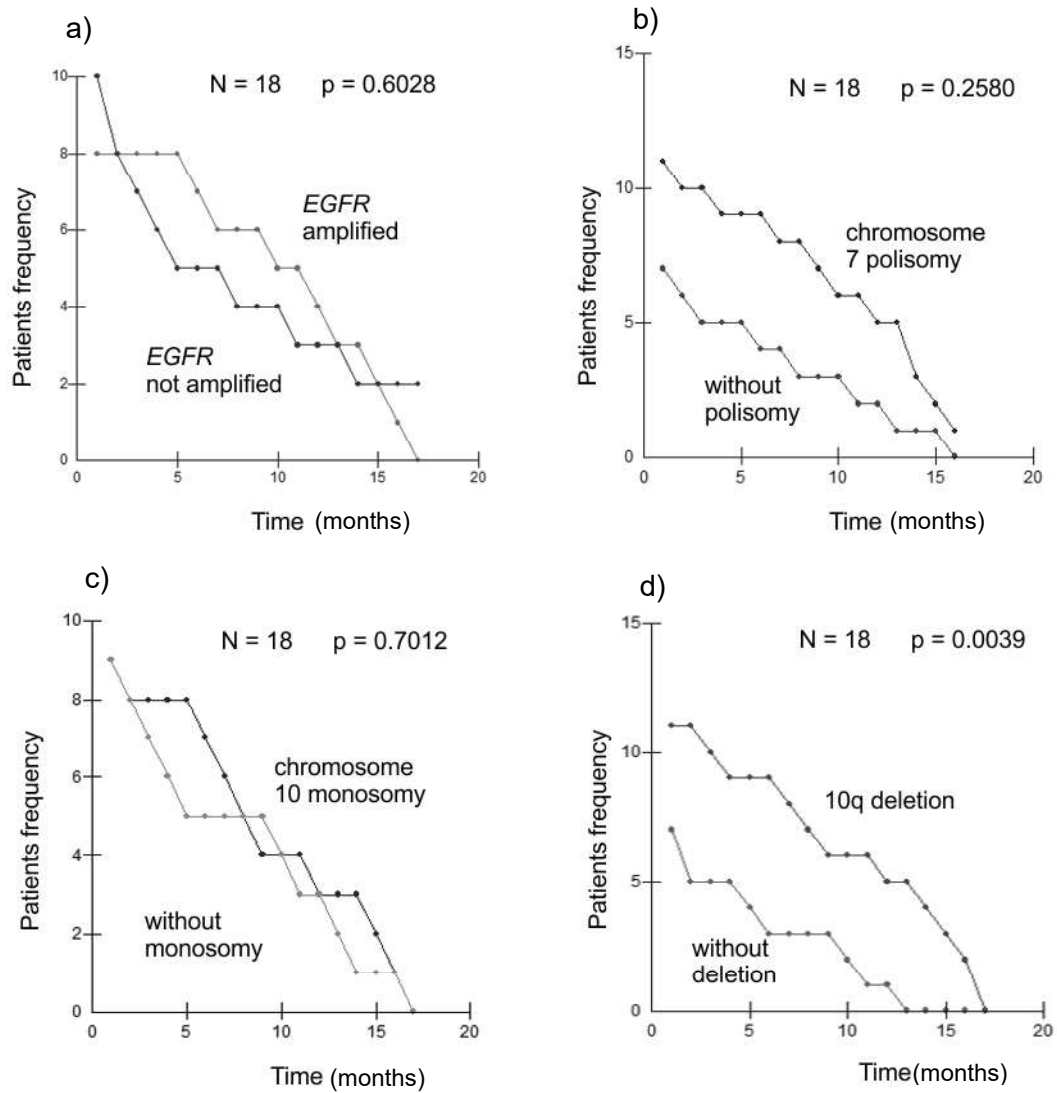


Figure 2. Graphic comparison of survival curves between groups of patients with and without amplification of the *EGFR* gene (a), with and without polysomy of chromosome 7 (b), with and without monosomy of chromosome 10 (c) and with and without deletion 10q (d) using the Log-Rank Test.

Table 1. Clinical and laboratory characteristics of the patients.

Case	Sex	Age (years)	Family history (neoplasia)	Type	EGFR amplification	Polisomy 7	PTEN deletion	Monosomy 10	del10q	Death	Survival (days)
1	F	62	-	Primary	+	+	-	+	-	+	79
2	M	42	-	Primary	-	-	-	-	-	-	980*
3	M	55	-	Primary	-	+	-	+	-	-	980*
4	M	53	-	Primary	+	+	-	+	-	-	959*
5	M	60	+ ¹	Primary	-	+	-	-	-	+	524
6	M	56	+	Primary	+	+	-	+	-	+	177
7	F	53	+	Primary	-	-	-	-	-	+	28
8	M	65	-	Primary	+	-	+	+	+	+	67
9	F	61	-	Primary	+	+	-	+	-	+	554
10	M	69	-	Primary	-	-	-	+	-	+	80
11	M	52	+	Primary	-	+	-	-	-	+	33
12	M	55	-	Primary	+	+	-	+	-	+	103
13	M	44	NI	Primary	-	-	-	-	+	+	159
14	M	71	-	Primary	-	-	-	-	+	+	25
15	F	83	+ ¹	Primary	-	+	-	+	+	+	25
16	F	41	-	Primary	+	-	-	-	+	+	313
17	M	58	-	NI	-	+	-	-	+	+	35
18	M	60	NI	Primary	+	+	-	-	+	+	148
19	M	49	+	Secondary	-	-	-	-	-	-	168*
20	M	54	NI	Secondary	-	-	-	-	+	-	134*
21	M	73	NI	Primary	-	-	-	+	-	-	69*

NI: not informed, ¹ brother with brain tumor, + present, - absent, * living patients

4. Considerações finais

As principais conclusões e perspectivas obtidas a partir deste trabalho foram:

- 1) clinicamente, a nossa amostra não diferiu do que é descrito na literatura; chamou atenção o alto índice de recorrência familiar de câncer no cérebro observado em parentes de primeiro grau dos afetados por glioblastoma (9,52%), salientando a importância da história familiar nesta doença;
- 2) foi observado que os pacientes mais jovens apresentaram um período maior de sobrevida, indicando que a idade é um fator prognóstico na evolução dos pacientes com glioblastomas;
- 3) na literatura, há muita variabilidade em relação à frequência das alterações genéticas detectadas nos glioblastomas através da técnica de FISH. Observa-se também, que os autores utilizam critérios diferentes para caracterizar uma mesma alteração, o que torna ainda mais difícil a unificação dos resultados. Ainda assim, as alterações do cromossomo 7, observadas neste trabalho, mostraram-se frequentes e não diferiram do que é observado na literatura;
- 4) conforme esperado, as alterações no cromossomo 10 foram muito frequentes na amostra (76,19%). Ainda assim, foi difícil comparar as deleções do *PTEN* com os dados da literatura pois há poucos trabalhos realizando esta análise através da técnica de FISH, e os dados existentes são divergentes;
- 5) na nossa amostra, há um grupo grande de pacientes (38,09%) que apresentou amplificação do gene *EGFR* associada a perdas do cromossomo 10. É provável que este grupo pertença ao subtipo molecular denominado como “clássico” por Verhaak e cols. (2010). A caracterização genética destes tumores é importante pois poderá

auxiliar na melhor compreensão da heterogeneidade dos glioblastomas e na escolha de drogas desenhadas especificamente para o seu tratamento;

6) a deleção do cromossomo 10 (envolvendo a região do gene *PTEN*) demonstrou ser um fator de mau prognóstico para os pacientes da amostra, o que pode ser explicado pela perda da função do gene como supressor tumoral;

7) a amplificação do gene *EGFR* e a polissomia do cromossomo 7 não influenciaram o prognóstico dos pacientes. Embora este dado tenha sido observado por outros autores da literatura, a ausência de resposta pode estar relacionada ao pequeno número de pacientes da amostra;

8) os dados deste trabalho mostram que o estudo das alterações genéticas dos glioblastomas, pela técnica de FISH, é relevante e que há necessidade de ampliar as análises já realizadas com o intuito de compreender melhor a evolução destes tumores e os seus fatores prognósticos;

9) a perspectiva, no Serviço de Genética da UFCSPA, é continuar a execução deste trabalho, não só ampliando o número de pacientes da amostra como também realizando análise, através da técnica de FISH, de outros marcadores genéticos, como deleção do *TP53* e perda de 1p19q, que também são frequentes nos glioblastomas.

5. Anexos

Anexo A. Material e Métodos

A.1 A amostra

A amostra foi constituída, prospectivamente, por 21 pacientes consecutivos, afetados por glioblastoma, operados pelo Serviço de Neurocirurgia do Hospital Beneficência Portuguesa no período de janeiro de 2012 a julho de 2014 (2 anos e 6 meses). Foram incluídos na amostra todos os pacientes que obtiveram diagnóstico de glioblastoma após a análise anátomopatológica dos tecidos tumorais excisados.

A.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.

A.3 Procedimentos laboratoriais

Durante o procedimento cirúrgico para o tratamento do glioblastoma (extração do tumor), o neurocirurgião retirou duas amostras tumorais que foram colocadas em 2 frascos contendo, respectivamente, formol 10% tamponado e meio RPMI 1640 (Invitrogen, GIBCO). Estes frascos foram encaminhados ao Laboratório de Citogenética da UFCSPA. Os fragmentos em meio RPMI 1640 foram armazenados

para estudos futuros (cultivo de células, exames cromossômicos e extração de DNA). Os fragmentos em formol 10% tamponado foram levados ao Laboratório de Patologia do PPGP-UFCSPA onde foram emblocados em parafina. Para cada bloco de parafina foram realizadas sete lâminas de 4 µm de espessura. Uma destas lâminas foi corada pela técnica de hematoxilina e eosina (HE) com o objetivo de ser analisada pelo médico patologista. O patologista selecionou, entre os cortes realizados, a melhor área tumoral a ser analisada pela técnica de FISH: área sem necrose tumoral e sem artefatos da técnica. Estas áreas foram marcadas com caneta permanente e serviram de base para marcação das outras lâminas que foram, posteriormente, analisadas pela técnica de FISH.

A.3.1 Análise pela técnica de FISH

A.3.1.1 Sondas de DNA utilizadas na técnica de FISH

As sondas de DNA utilizadas no estudo foram a LSI *EGFR/CEP 7* e a LSI *PTEN/CEP 10* (Vysis, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL).

A sonda LSI *EGFR/CEP 7* é uma mistura de dois reagentes: o LSI *EGFR*, marcado com fluorocromo *SpectrumOrange* (vermelho), que se hibridiza a uma região de aproximadamente 300 kb localizada na região 12 do braço curto do cromossomo 7, onde está localizado o gene *EGFR*; e o CEP 7, marcado com fluorocromo *SpectrumGreen* (verde), que se hibridiza ao DNA satélite alfa localizado na região centromérica do cromossomo 7 (Figura 1).

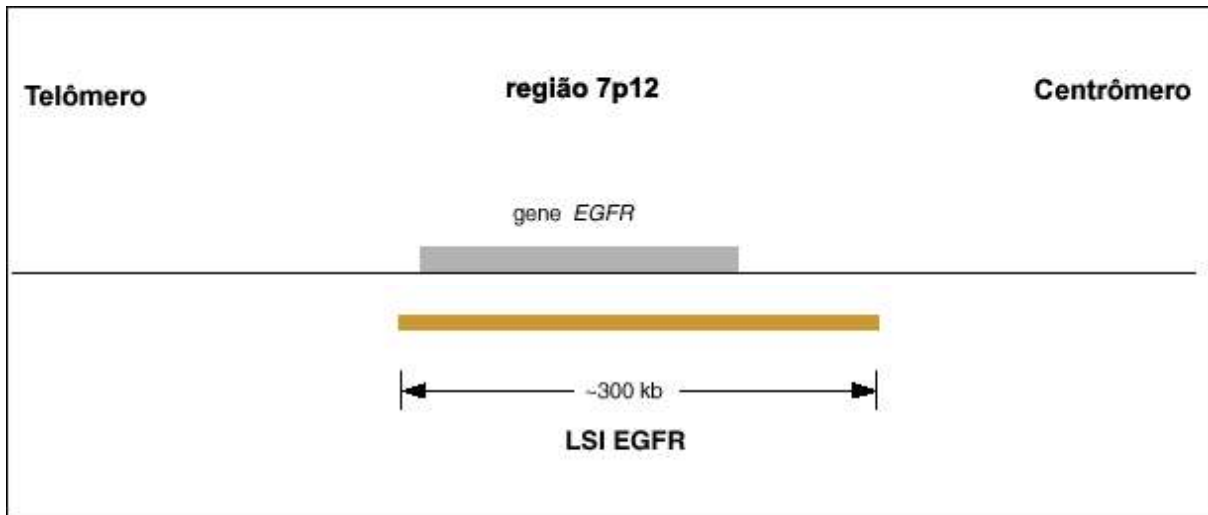


Figura 1. Sítio de hibridização do reagente LSI *EGFR* (de aproximadamente 300 kb) na região 12 do braço curto (p) do cromossomo 7, onde se localiza o gene *EGFR*. Nas extremidades pode se ver a direção onde se encontra, respectivamente, o telômero e o centrômero do cromossomo 7.

A sonda LSI *PTEN*/CEP 10 é uma mistura de dois reagentes: o LSI *PTEN*, marcado com fluorocromo *SpectrumOrange* (vermelho), que se hibridiza na região que contém as sequências que flanqueiam as extremidades do gene *PTEN*, na região 23 do braço longo do cromossomo 10; e o CEP 10, marcado com fluorocromo *SpectrumGreen* (verde), que se hibridiza às sequências de alfa satélite específicas do cromossomo 10 (Figura 2).

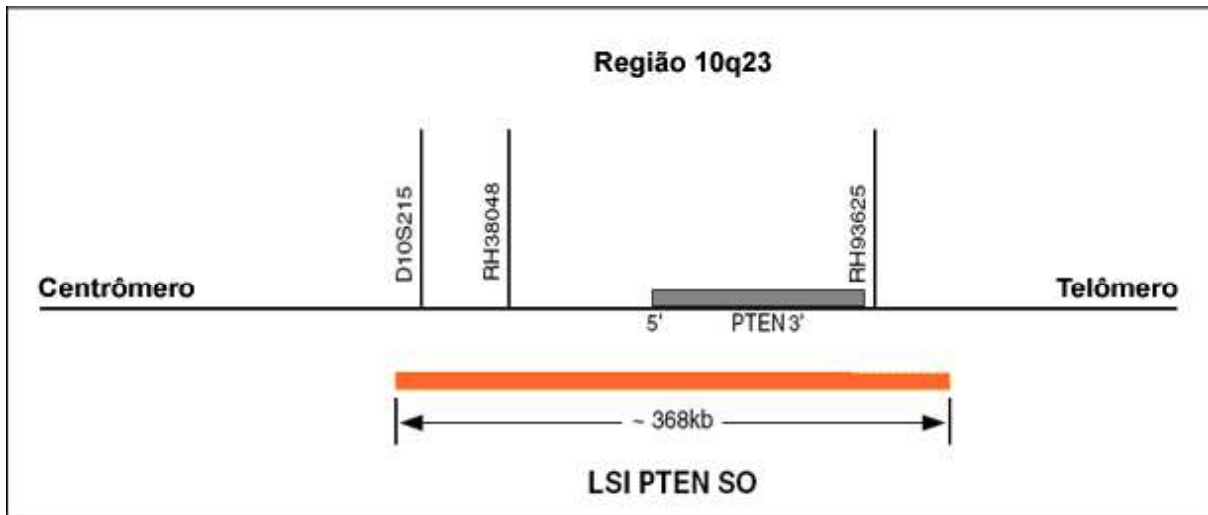


Figura 2. Sítio de hibridização do reagente *LSI PTEN* (de aproximadamente 370 kb) na região 23 do braço longo (q) do cromossomo 10, onde se localiza o gene *PTEN*. Nas extremidades pode-se ver a direção onde se encontra, respectivamente, o centrômero e o telômero do cromossomo 10.

A.3.1.2 Preparação da lâmina para a técnica de FISH

- 1) A área a ser hibridizada foi selecionada tendo, como base, a lâmina corada pela técnica de HE. Uma região de 1,5 cm² foi marcada no dorso da lâmina com o uso de uma caneta diamante;
- 2) após, a lâmina foi incubada na estufa à temperatura a 56°C durante um período de 4 horas a uma noite (este tempo variou de acordo com o tamanho da amostra de tecido). O objetivo desta etapa foi aumentar a aderência do tecido à lâmina e amolecer a parafina;
- 3) logo a seguir, a lâmina foi imersa em xilol, três vezes, por 10 minutos cada. Ao término, a lâmina secou à temperatura ambiente;

- 4) na próxima etapa, a lâmina foi desidratada em álcool a 100%, duas vezes, por 5 minutos cada, realizando agitação durante o processo, deixando-se secar à temperatura ambiente;
- 5) após seca, a lâmina foi incubada em 2XSSC (pH 7,0) a 75°C por um período de 30 minutos;
- 6) a seguir, procedeu-se à digestão com proteinase K na concentração de 0,6 mg/ml (500 µl de proteinase K em 17 ml de 2XSSC) à temperatura de 45°C, durante 30 minutos;
- 7) a lâmina foi, então, lavada em 2XSSC (pH 7,0), à temperatura ambiente, por 5 minutos, em agitação;
- 8) 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 à temperatura ambiente, posteriormente.

A.3.1.3 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 de microcentrífuga (sonda e tDenHyb-2) foram agitados no vórtex;
- 3) em um tubo de microcentrífuga, foram misturados 2 µl de sonda de DNA com 2 µl de solução tDenHyb-2;
- 4) o tubo com a solução sonda DNA/tDenHyb-2 foi levado à estufa (37°C) por 5 minutos, juntamente com a lâmina a ser hibridizada;

- 5) ao ser retirado da estufa, o tubo de microcentrífuga foi levado ao vórtex e foi centrifugado por 3 segundos;
- 6) 4 μ l da solução (sonda DNA/tDenHyb-2) foram aplicados à região alvo marcada na lâmina. A região foi, imediatamente, coberta com uma lamínula de 1,5 cm de comprimento x 1,5 cm de largura, evitando a permanência de bolhas de ar entre a superfície da lamínula e da lâmina;
- 7) a seguir, a lamínula foi selada com cimento borracha e a lâmina foi incubada em forno seco, à temperatura de 80°C, por 15 minutos;
- 8) após este período, a lâmina foi colocada em uma câmara úmida, protegida da luz, a 37°C, por um período de 20 horas, para permitir a hibridização *in situ*.

A.3.1.4 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 2XSSC/Tween 20 (25 μ l de Tween 20 em 50 ml de 2XSSC) a 73°C, por 2 minutos e 30 segundos, agitando por 3 vezes durante processo;
- 3) a seguir, a lâmina foi lavada em outra solução 2XSSC/Tween 20 (25 μ l de Tween 20 em 50 ml de 2XSSC) à temperatura ambiente, por 2 minutos e 30 segundos, agitando por 3 vezes durante processo;
- 4) na última lavagem, a lâmina foi imersa em 2XSSC, à temperatura ambiente, por alguns segundos;

5) 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.

6) após a secagem, foram aplicados 10 µl 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;

7) a lâmina foi enrolada em papel alumínio e armazenada na geladeira a 4°C para posterior análise ao microscópio.

A.3.1.5 Análise ao microscópio

A análise foi realizada em um microscópio Olympus BX51, 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), e o triplo (azul, vermelho e verde). Todas as amostras evidenciaram hibridização eficiente (mais de 90% dos núcleos com sinais). Um total de 200 núcleos foi analisado em cada lâmina, sendo que os núcleos foram provenientes de 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.

Em relação à sonda de DNA LSI *EGFR/CEP 7*, foram observados dois sinais verdes e dois vermelhos em um núcleo interfásico com duas cópias intactas do cromossomo 7 (Figura 3). Cada sinal pode aparecer como um único corpúsculo arredondado, ou como um conjunto de dois corpúsculos menores localizados bem próximos.

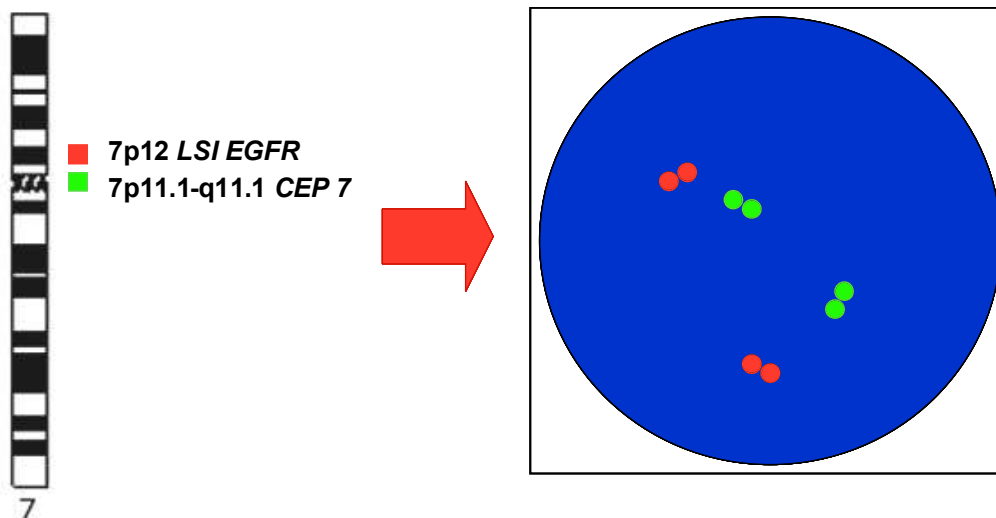


Figura 3. Ideograma mostrando os sítios de ligação dos reagentes LSI *EGFR* (vermelho) e CEP 7 (verde), respectivamente, às regiões p12 e p11.1-q11.1 do cromossomo 7 (à esquerda). À direita, pode-se ver um esquema da visualização dos sinais dos respectivos reagentes em um núcleo interfásico, ao microscópio de epifluorescência, mostrando um padrão normal de hibridização (2 sinais vermelhos e 2 verdes).

Um número anormal de cópias do gene *EGFR* foi indicado pela presença de três ou mais cópias do sinal vermelho. De forma simultânea, o número de cópias do cromossomo 7 pôde ser quantificado pela enumeração de sinais verdes observados dentro de uma mesma célula.

Para a análise dos sinais, foram utilizados os critérios adotados por Korshunov e cols. (2005). A amplificação do gene *EGFR* foi considerada quando mais de 10% das células tumorais apresentaram índice *EGFR/CEP7* maior do que 2. A polissomia do cromossomo 7 foi considerada quando mais de 20% dos núcleos continham 3 ou mais sinais CEP7.

Em relação à sonda de DNA LSI *PTEN*/CEP 10, foram observados dois sinais verdes e dois vermelhos em um núcleo interfásico com duas cópias intactas do cromossomo 10 (Figura 4).

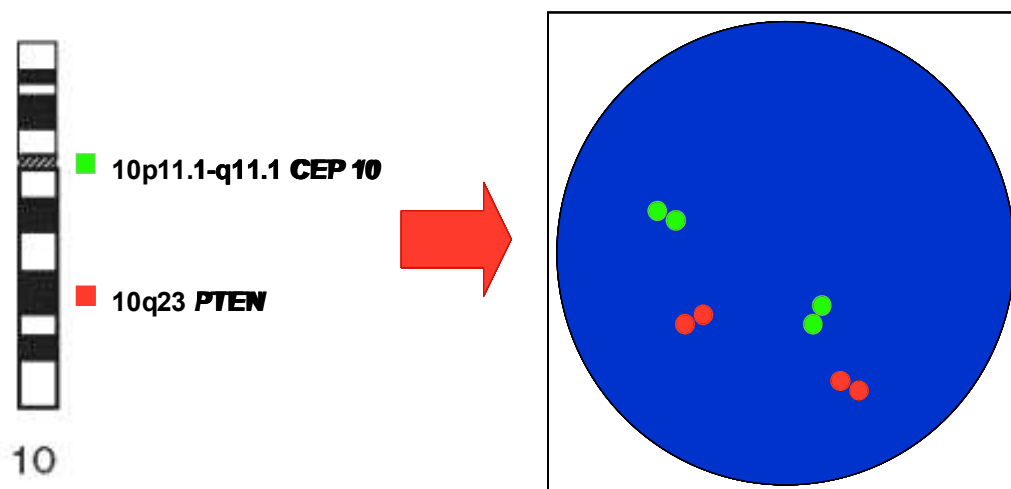


Figura 4. Ideograma mostrando os sítios de ligação dos reagentes LSI *PTEN* (vermelho) e CEP 10 (verde), respectivamente, às regiões q23 e p11.1-q11.1 do cromossomo 10 (à esquerda). À direita, pode-se ver um esquema da visualização dos sinais dos respectivos reagentes em um núcleo interfásico, ao microscópio de epifluorescência, mostrando um padrão normal de hibridização (2 sinais vermelhos e 2 verdes).

Para a análise da deleção do *PTEN* e da monossomia do cromossomo 10, foram utilizados os critérios adotados por Korshunov e cols. (2005). A deleção do *PTEN* em homozigose foi considerada quando houve ausência simultânea dos 2 sinais *PTEN* na vigência de sinal CEP10 em mais de 30% das células tumorais analisadas. A deleção do *PTEN* em hemizigose foi considerada quando, em mais de 50% das células analisadas, foi encontrado: 1 sinal *PTEN* e 2 ou mais sinais CEP10 (deleção absoluta) ou 2 sinais *PTEN* e 4 ou mais sinais CEP10 (deleção relativa). A

monossomia do cromossomo 10 foi considerada quando mais de 50% dos núcleos continham apenas um sinal CEP10.

Para a análise da deleção 10q, foi utilizado o critério adotado por Rodriguez e cols. (2008): índice *PTEN/CEP10* menor do que 0,8.

As imagens dos núcleos interfásicos foram capturadas através de uma câmera digital de alta resolução (DP-72) acoplada ao microscópio. As descrições da análise, com a contagem de sinais fluorescentes por núcleo interfásico, e a identificação das imagens foram realizadas em uma ficha padrão.

A.4 O processamento dos dados e a análise estatística

O processamento dos dados e a análise estatística foram realizados através da criação de um banco de dados em uma planilha do programa Microsoft® Excel 2007 e do programa BioEstat 5.0. Através da análise dos histogramas, observamos que nenhuma das variáveis apresentava distribuição normal, sendo necessário utilizar testes não paramétricos. Foram realizados os testes do Qui-quadrado e Teste Exato de Fisher para analisar as variáveis qualitativas; e os testes de Log Rank, Mann-Whitney e Coeficiente de Correlação de Spearman para testar variáveis quantitativas. Uma probabilidade menor do que 0,05 foi considerada significativa.

A.5 Aspectos éticos

O presente trabalho é derivado do projeto de pesquisa 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”, já aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFCSPA (Parecer Nº 881/09 de 18/06/2009).

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. As informações que poderiam identificar os pacientes foram mantidas em sigilo e não serão publicadas.

Anexo B. Resultados

B.1 Características clínicas dos pacientes da amostra

A amostra foi constituída de 21 pacientes com idades entre 41 e 83 anos (média de 57,9 anos), sendo a maioria do sexo masculino (76,19%). Em 11 casos (52,31%) houve história familiar de neoplasia, sendo que 2 pacientes (9,52%) tiveram um parente de primeiro grau (irmão) com câncer no cérebro (Tabela 1).

Em 10 casos (47,61%), o primeiro sinal clínico da doença foi a cefaleia, seguido de convulsão (19,04%) e déficit motor (14,28%). O glioblastoma foi considerado primário em 18 pacientes (85,71%) que realizaram cirurgia para ressecção do tumor pela primeira vez. Em 2 casos (9,52%), a classificação foi de glioblastoma secundário, pois os pacientes já apresentavam história prévia de cirurgia com diagnóstico de outros tipos tumorais (astrocitoma e oligoastrocitoma) (Tabela 1).

A maioria dos pacientes apresentou tumor no lado direito do cérebro (61,90%) enquanto que, em 7 pacientes (33,33%), o tumor era do lado esquerdo. Em relação à localização, a maioria dos tumores (33,33%) estava na região temporal, seguida da região frontal (28,57%).

Em relação à evolução do tumor, nenhum paciente apresentou hidrocefalia, mas 5 pacientes (23,80%) apresentaram recidiva necessitando de reintervenção cirúrgica. A sobrevida dos pacientes variou entre 25 e 980 dias, sendo que a média foi de 9,7 meses (N=18). Ao término deste estudo, apenas 6 pacientes (28,57%) estavam vivos (Tabela1).

Foi observado que os pacientes mais jovens tiveram uma sobrevida maior (Figura 5). O teste do Coeficiente de Correlação de Spearman mostrou que esta correlação foi significativa ($p=0,0494$).

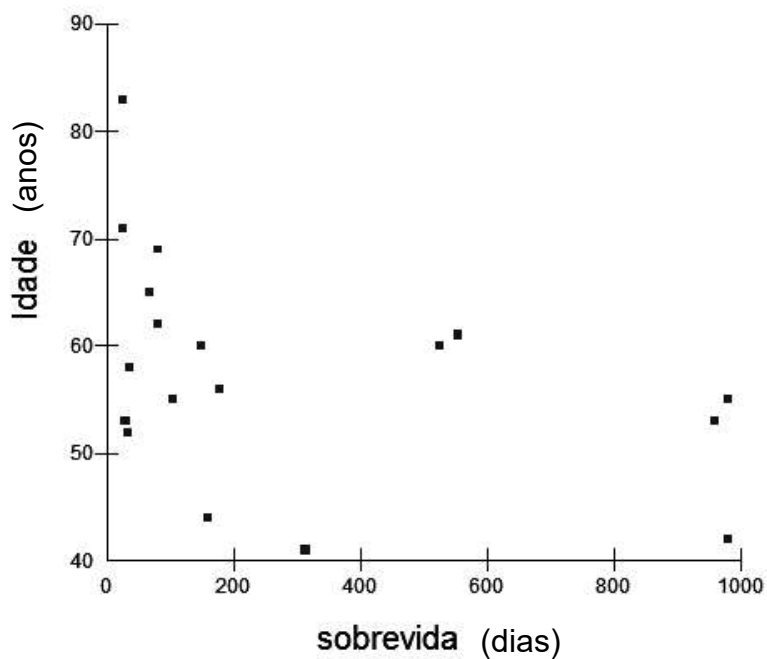


Figura 5. Correlação entre a idade dos pacientes ao diagnóstico do tumor e a sobrevida após a cirurgia.

Tabela 1. Características clínicas e laboratoriais dos pacientes da amostra.

Caso	Sexo	Idade (anos)	História Familiar (neoplasia)	Tipo	Amp. EGFR	Polissomia 7	Deleção PTEN	Monossomia 10	del10q	Óbito	Sobrevida (dias)
1	F	62	-	Primário	+	+	-	+	-	+	79
2	M	42	-	Primário	-	-	-	-	-	-	980
3	M	55	-	Primário	-	+	-	+	-	-	980
4	M	53	-	Primário	+	+	-	+	-	-	959
5	M	60	+	Primário	-	+	-	-	-	+	524
6	M	56	+	Primário	+	+	-	+	-	+	177
7	F	53	+	Primário	-	-	-	-	-	+	28
8	M	65	-	Primário	+	-	+	+	+	+	67
9	F	61	-	Primário	+	+	-	+	-	+	554
10	M	69	-	Primário	-	-	-	+	-	+	80
11	M	52	+	Primário	-	+	-	-	-	+	33
12	M	55	-	Primário	+	+	-	+	-	+	103
13	M	44	NI	Primário	-	-	-	-	+	+	159
14	M	71	-	Primário	-	-	-	-	+	+	25
15	F	83	+	Primário	-	+	-	+	+	+	25
16	F	41	-	Primário	+	-	-	-	+	+	313
17	M	58	-	NI	-	+	-	-	+	+	35
18	M	60	NI	Primário	+	+	-	-	+	+	148
19	M	49	+	Secundário	-	-	-	-	-	-	168
20	M	54	NI	Secundário	-	-	-	-	+	-	134
21	M	73	NI	Primário	-	-	-	+	-	-	69

NI: não informado, * irmão com tumor no cérebro, + presente, - ausente, Amp.: amplificação

B.2 Resultados das análises laboratoriais

B.2.1 Resultados das contagens dos sinais da sonda *EGFR/CEP7*

Os resultados das análises dos sinais da sonda *EGFR/CEP7*, de cada caso, são apresentados nas tabelas a seguir. Os tipos de combinações de sinais verdes e de sinais vermelhos resultam das diferentes possibilidades de combinações encontradas em cada caso.

Tabela 2. Frequências dos índices resultantes das diferentes combinações de sinais vermelho/verde (*EGFR/CEP7*) nas 200 células analisadas no caso 1.

Tipo de combinações	Sinal Verde	Sinal vermelho	Índice vermelho/verde	Número de células	Frequência na amostra (%)
1ª	1	1	1,0	2	1,00
2ª	1	2	2,0	3	1,50
3ª	1	3	3,0	2	1,00
4ª	1	4	4,0	2	1,00
5ª	1	5	5,0	1	0,50
6ª	1	15	15,0	10	5,00
7ª	2	1	0,5	1	0,50
8ª	2	2	1,0	18	9,00
9ª	2	3	1,5	5	2,50
10ª	2	4	2,0	6	3,00
11ª	2	6	3,0	8	4,00
12ª	2	8	4,0	3	1,50
13ª	2	9	4,5	2	1,00
14ª	2	10	5,0	3	1,50
15ª	2	12	6,0	1	0,50
16ª	2	14	7,0	2	1,00
17ª	2	15	7,5	76	38,00
18ª	3	5	1,7	1	0,50
19ª	3	15	5,0	54	27,00

Resultados a partir dos diferentes critérios para análise de amplificação do *EGFR* e polissomia do cromossomo 7 no caso 1:

- percentual de células com índice *EGFR/CEP7* >2: 82%
- percentual de células com índice *EGFR/CEP7* ≥2: 86,5%
- percentual de células com sinal *CEP7* ≥ 3: 27,5%
- índice total *EGFR/CEP7* (total de sinais vermelhos/total de sinais verdes): 5,44

Tabela 3. Frequências dos índices resultantes das diferentes combinações de sinais vermelho/verde (*EGFR/CEP7*) nas 200 células analisadas no caso 2.

Tipo de combinações	Sinal Verde	Sinal vermelho	Índice vermelho/verde	Número de células	Frequência na amostra (%)
1ª	1	1	1,0	52	26,00
2ª	1	2	2,0	19	9,50
3ª	1	3	3,0	3	1,50
4ª	2	1	0,5	13	6,50
5ª	2	2	1,0	68	34,00
6ª	2	3	1,5	12	6,00
7ª	2	4	2,0	2	1,00
8ª	2	5	2,5	1	0,50
9ª	3	1	0,3	2	1,00
10ª	3	2	0,7	6	3,00
11ª	3	3	1,0	12	6,00
12ª	3	4	1,3	2	1,00
13ª	3	5	1,7	2	1,00
14ª	4	3	0,8	4	2,00
15ª	4	4	1,0	1	0,50
16ª	4	5	1,3	1	0,50

Resultados a partir dos diferentes critérios para análise de amplificação do *EGFR* e polissomia do cromossomo 7 no caso 2:

- percentual de células com índice *EGFR/CEP7* >2: 2%
- percentual de células com índice *EGFR/CEP7* ≥2: 12,5%
- percentual de células com sinal *CEP7* ≥3: 15%
- índice total *EGFR/CEP7* (total de sinais vermelhos/total de sinais verdes): 1,07

Tabela 4. Frequências dos índices resultantes das diferentes combinações de sinais vermelho/verde (*EGFR/CEP7*) nas 200 células analisadas no caso 3.

Tipo de combinações	Sinal Verde	Sinal vermelho	Índice vermelho/verde	Número de células	Frequência na amostra (%)
1ª	1	1	1,0	29	14,50
2ª	1	2	2,0	4	2,00
3ª	1	3	3,0	1	0,50
4ª	2	1	0,5	9	4,50
5ª	2	2	1,0	81	40,5
6ª	2	3	1,5	6	3,00
7ª	3	2	0,7	15	7,50
8ª	3	3	1,0	55	27,50

Resultados a partir dos diferentes critérios para análise de amplificação do *EGFR* e polissomia do cromossomo 7 no caso 3:

- percentual de células com índice *EGFR/CEP7* >2: 0,5%
- percentual de células com índice *EGFR/CEP7* ≥2: 2,5%
- percentual de células com sinal CEP7 ≥3: 35%
- índice total *EGFR/CEP7* (total de sinais vermelhos/total de sinais verdes): 0,97

Tabela 5. Frequências dos índices resultantes das diferentes combinações de sinais vermelho/verde (*EGFR/CEP7*) nas 200 células analisadas no caso 4.

Tipo de combinações	Sinal Verde	Sinal vermelho	Índice vermelho/verde	Número de células	Frequência na amostra (%)
1ª	1	1	1,0	10	5,00
2ª	1	2	2,0	4	2,00
3ª	1	4	4,0	3	1,50
4ª	1	5	5,0	3	1,50
5ª	1	6	6,0	1	0,50
6ª	1	8	8,0	1	0,50
7ª	1	9	9,0	1	0,50
8ª	1	15	15,0	7	3,50
9ª	2	1	0,5	3	1,50
10ª	2	2	1,0	42	21,00
11ª	2	3	1,5	9	4,50
12ª	2	5	2,5	7	3,50
13ª	2	6	3,0	5	2,50
14ª	2	7	3,5	2	1,00
15ª	2	8	4,0	5	2,50
16ª	2	9	4,5	1	0,50
17ª	2	10	5,0	3	1,50
18ª	2	11	5,5	2	1,00
19ª	2	12	6,0	1	0,50
20ª	2	15	7,5	42	21,00
21ª	3	3	1,0	4	2,00
22ª	3	5	1,7	2	1,00
23ª	3	6	2,0	2	1,00
24ª	3	10	3,3	1	0,50
25ª	3	11	3,7	2	1,00
26ª	3	15	5,0	32	16,00
27ª	4	15	3,8	3	1,50
28ª	5	3	0,6	1	0,50
29ª	5	10	2,0	1	0,50

Resultados a partir dos diferentes critérios para análise de amplificação do *EGFR* e polissomia do cromossomo 7 no caso 4:

- percentual de células com índice *EGFR/CEP7* >2: 40%
- percentual de células com índice *EGFR/CEP7* ≥2: 43,5%
- percentual de células com sinal CEP7 ≥3: 24%

- índice total *EGFR/CEP7* (total de sinais vermelhos/total de sinais verdes): 0,97

Tabela 6. Frequências dos índices resultantes das diferentes combinações de sinais vermelho/verde (*EGFR/CEP7*) nas 200 células analisadas no caso 5.

Tipo de combinações	Sinal Verde	Sinal vermelho	Índice vermelho/verde	Número de células	Frequência na amostra (%)
1ª	1	1	1,0	39	19,50
2ª	1	2	2,0	12	6,00
3ª	2	1	0,5	9	4,50
4ª	2	2	1,0	67	33,50
5ª	2	3	1,5	19	9,50
6ª	2	4	2,0	3	1,50
7ª	3	1	0,3	2	1,00
8ª	3	2	0,7	8	4,00
9ª	3	3	1,0	33	16,50
10ª	3	4	1,3	5	2,50
11ª	3	5	1,7	1	0,50
12ª	4	3	0,8	1	0,50
13ª	4	4	1,0	1	0,50

Resultados a partir dos diferentes critérios para análise de amplificação do *EGFR* e polissomia do cromossomo 7 no caso 5:

- percentual de células com índice *EGFR/CEP7* >2: 0
- percentual de células com índice *EGFR/CEP7* ≥2: 7,5%
- percentual de células com sinal CEP7 ≥3: 24,5%
- índice total *EGFR/CEP7* (total de sinais vermelhos/total de sinais verdes): 1,05

Tabela 7. Frequências dos índices resultantes das diferentes combinações de sinais vermelho/verde (*EGFR/CEP7*) nas 200 células analisadas no caso 6.

Tipo de combinações	Sinal Verde	Sinal vermelho	Índice vermelho/verde	Número de células	Frequência na amostra (%)
1ª	1	2	2,0	1	0,50
2ª	1	3	3,0	16	8,00
3ª	1	4	4,0	4	2,00
4ª	2	1	0,5	5	2,50
5ª	2	2	1,0	80	40,00
6ª	2	5	2,5	1	0,50
7ª	2	10	5,0	1	0,50
8ª	3	1	0,3	1	0,50
9ª	3	2	0,7	4	2,00
10ª	3	3	1,0	41	20,50
11ª	3	4	1,3	3	1,50
12ª	3	5	1,7	1	0,50
13ª	3	6	2,0	1	0,50
14ª	4	3	0,8	5	2,50
15ª	4	4	1,0	9	4,50
16ª	4	5	1,3	1	0,50
17ª	4	6	1,5	1	0,50
18ª	5	5	1,0	3	1,50
19ª	6	6	1,0	1	0,50
20ª	7	7	1,0	1	0,50
21ª	8	7	0,9	1	0,50

Resultados a partir dos diferentes critérios para análise de amplificação do *EGFR* e polissomia do cromossomo 7 no caso 6:

- percentual de células com índice *EGFR/CEP7* >2: 11%
- percentual de células com índice *EGFR/CEP7* ≥2: 12%
- percentual de células com sinal *CEP7* ≥3: 36,5%
- índice total *EGFR/CEP7* (total de sinais vermelhos/total de sinais verdes): 1,11

Tabela 8. Frequências dos índices resultantes das diferentes combinações de sinais vermelho/verde (*EGFR/CEP7*) nas 200 células analisadas no caso 7.

Tipo de combinações	Sinal Verde	Sinal vermelho	Índice vermelho/verde	Número de células	Frequência na amostra (%)
1ª	1	1	1,0	39	19,50
2ª	1	2	2,0	14	7,00
3ª	1	3	3,0	1	0,50
4ª	2	1	0,5	3	1,50
5ª	2	2	1,0	96	48,00
6ª	2	3	1,5	16	8,00
7ª	3	2	0,7	1	0,50
8ª	3	3	1,0	30	15,00

Resultados a partir dos diferentes critérios para análise de amplificação do *EGFR* e polissomia do cromossomo 7 no caso 7:

- percentual de células com índice *EGFR/CEP7* >2: 0,5%
- percentual de células com índice *EGFR/CEP7* ≥2: 7,5%
- percentual de células com sinal CEP7 ≥3: 15,5%
- índice total *EGFR/CEP7* (total de sinais vermelhos/total de sinais verdes): 1,07

Tabela 9. Frequências dos índices resultantes das diferentes combinações de sinais vermelho/verde (*EGFR/CEP7*) nas 200 células analisadas no caso 8.

Tipo de combinações	Sinal Verde	Sinal vermelho	Índice vermelho/verde	Número de células	Frequência na amostra (%)
1ª	1	1	1,0	23	11,50
2ª	1	2	2,0	2	1,00
3ª	1	3	3,0	1	0,50
4ª	1	11	11,0	1	0,50
5ª	1	15	15,0	37	18,50
6ª	2	1	0,5	5	2,50
7ª	2	2	1,0	30	15,00
8ª	2	3	1,5	9	4,50
9ª	2	5	2,5	1	0,50
10ª	2	8	4,0	1	0,50
11ª	2	15	7,5	77	38,50
12ª	3	2	0,7	1	0,50
13ª	3	3	1,0	2	1,00
14ª	3	15	5,0	10	5,00

Resultados a partir dos diferentes critérios para análise de amplificação do *EGFR* e polissomia do cromossomo 7 no caso 8:

- percentual de células com índice *EGFR/CEP7* >2: 64%

- percentual de células com índice *EGFR/CEP7* ≥ 2 : 65%
- percentual de células com sinal CEP7 ≥ 3 : 6,5%
- índice total *EGFR/CEP7* (total de sinais vermelhos/total de sinais verdes): 5,77

Tabela 10. Frequências dos índices resultantes das diferentes combinações de sinais vermelho/verde (*EGFR/CEP7*) nas 200 células analisadas no caso 9.

Tipo de combinações	Sinal Verde	Sinal vermelho	Índice vermelho/verde	Número de células	Frequência na amostra (%)
1ª	1	1	1,0	11	5,50
2ª	1	2	2,0	2	1,00
3ª	1	8	8,0	1	0,50
4ª	1	9	9,0	1	0,50
5ª	1	12	12,0	1	0,50
6ª	1	15	15,0	25	12,50
7ª	2	2	1,0	23	11,50
8ª	2	4	2,0	1	0,50
9ª	2	6	3,0	2	1,00
10ª	2	15	7,5	79	39,50
11ª	3	15	5,0	51	25,50
12ª	4	15	3,8	2	1,00
13ª	6	15	2,5	1	0,50

Resultados a partir dos diferentes critérios para análise de amplificação do *EGFR* e polissomia do cromossomo 7 no caso 9:

- percentual de células com índice *EGFR/CEP7* > 2 : 81,5%
- percentual de células com índice *EGFR/CEP7* ≥ 2 : 83%
- percentual de células com sinal CEP7 ≥ 3 : 27%
- índice total *EGFR/CEP7* (total de sinais vermelhos/total de sinais verdes): 5,92

Tabela 11. Frequências dos índices resultantes das diferentes combinações de sinais vermelho/verde (*EGFR/CEP7*) nas 200 células analisadas no caso 10.

Tipo de combinações	Sinal Verde	Sinal vermelho	Índice vermelho/verde	Número de células	Frequência na amostra (%)
1ª	1	1	1,0	59	29,50
2ª	1	2	2,0	22	11,00
3ª	1	3	3,0	5	2,50
4ª	2	1	0,5	4	2,00
5ª	2	2	1,0	94	47,00
6ª	2	3	1,5	4	2,00
7ª	3	2	0,7	1	0,50
8ª	3	3	1,0	11	5,50

Resultados a partir dos diferentes critérios para análise de amplificação do *EGFR* e polissomia do cromossomo 7 no caso 10:

- percentual de células com índice *EGFR/CEP7* >2: 2,5%
- percentual de células com índice *EGFR/CEP7* ≥2: 13,5%
- percentual de células com sinal CEP7 ≥3: 2,5%
- índice total *EGFR/CEP7* (total de sinais vermelhos/total de sinais verdes): 1,10

Tabela 12. Frequências dos índices resultantes das diferentes combinações de sinais vermelho/verde (*EGFR/CEP7*) nas 200 células analisadas no caso 11.

Tipo de combinações	Sinal Verde	Sinal vermelho	Índice vermelho/verde	Número de células	Frequência na amostra (%)
1ª	1	1	1,0	54	27,00
2ª	1	2	2,0	7	3,50
3ª	1	3	3,0	2	1,00
4ª	2	1	0,5	3	1,50
5ª	2	2	1,0	80	40,00
6ª	2	3	1,5	11	5,50
7ª	2	4	2,0	1	0,50
8ª	3	2	0,7	4	2,00
9ª	3	3	1,0	34	17,00
10ª	3	4	1,3	1	0,50
11ª	4	3	0,8	1	0,50
12ª	5	5	1,0	2	1,00

Resultados a partir dos diferentes critérios para análise de amplificação do *EGFR* e polissomia do cromossomo 7 no caso 11:

- percentual de células com índice *EGFR/CEP7* >2: 1%
- percentual de células com índice *EGFR/CEP7* ≥2: 5%
- percentual de células com sinal CEP7 ≥3: 21%
- índice total *EGFR/CEP7* (total de sinais vermelhos/total de sinais verdes): 1,04

Tabela 13. Frequências dos índices resultantes das diferentes combinações de sinais vermelho/verde (*EGFR/CEP7*) nas 200 células analisadas no caso 12.

Tipo de combinações	Sinal Verde	Sinal vermelho	Índice vermelho/verde	Número de células	Frequência na amostra (%)
1ª	1	1	1,0	18	9,00
2ª	1	2	2,0	6	3,00
3ª	1	3	3,0	6	3,00
4ª	1	4	4,0	3	1,50
5ª	1	5	5,0	3	1,50
6ª	1	6	6,0	3	1,50
7ª	1	8	8,0	1	0,50
8ª	1	9	9,0	5	2,50
9ª	1	10	10,0	1	0,50
10ª	1	12	12,0	2	1,00
11ª	1	14	14,0	1	0,50
12ª	1	15	15,0	9	4,50
13ª	2	1	0,5	3	1,50
14ª	2	2	1,0	24	12,00
15ª	2	3	1,5	2	1,00
16ª	2	4	2,0	2	1,00
17ª	2	5	2,5	2	1,00
18ª	2	6	3,0	3	1,50
19ª	2	7	3,5	4	2,00
20ª	2	8	4,0	1	0,50
21ª	2	9	4,5	3	1,50
22ª	2	10	5,0	3	1,50
23ª	2	11	5,5	1	0,50
24ª	2	12	6,0	1	0,50
25ª	2	15	7,5	27	13,50
26ª	3	2	0,7	1	0,50
27ª	3	3	1,0	1	0,50
28ª	3	5	1,7	1	0,50
29ª	3	7	2,3	3	1,50
30ª	3	8	2,7	3	1,50
31ª	3	10	3,3	2	1,00
32ª	3	11	3,7	2	1,00
33ª	3	12	4,0	2	1,00
34ª	3	14	4,7	1	0,50
35ª	3	15	5,0	33	16,50
36ª	4	15	3,8	9	4,50
37ª	5	5	1,0	1	0,50
38ª	5	14	2,8	1	0,50
39ª	5	15	3,0	6	3,00

Resultados a partir dos diferentes critérios para análise de amplificação do *EGFR* e polissomia do cromossomo 7 no caso 12:

- percentual de células com índice *EGFR/CEP7* >2: 70,5%
- percentual de células com índice *EGFR/CEP7* ≥2: 74,5%
- percentual de células com sinal CEP7 ≥3: 33%
- índice total *EGFR/CEP7* (total de sinais vermelhos/total de sinais verdes): 4,20

Tabela 14. Frequências dos índices resultantes das diferentes combinações de sinais vermelho/verde (*EGFR/CEP7*) nas 200 células analisadas no caso 13.

Tipo de combinações	Sinal Verde	Sinal vermelho	Índice vermelho/verde	Número de células	Frequência na amostra (%)
1ª	1	1	1,0	51	25,5
2ª	1	2	2,0	21	10,5
3ª	1	3	3,0	4	2
4ª	2	1	0,5	9	4,5
5ª	2	2	1,0	73	36,5
6ª	2	3	1,5	12	6
7ª	2	4	2,0	1	0,5
8ª	3	2	0,7	2	1
9ª	3	3	1,0	26	13
10ª	3	4	1,3	1	0,5

Resultados a partir dos diferentes critérios para análise de amplificação do *EGFR* e polissomia do cromossomo 7 no caso 13:

- percentual de células com índice *EGFR/CEP7* > 2: 2%
- percentual de células com índice *EGFR/CEP7* ≥2: 2,5%
- percentual de células com sinal CEP7 ≥3: 14,5%
- índice total *EGFR/CEP7* (total de sinais vermelhos/total de sinais verdes): 1,09

Tabela 15. Frequências dos índices resultantes das diferentes combinações de sinais vermelho/verde (*EGFR/CEP7*) nas 200 células analisadas no caso 14.

Tipo de combinações	Sinal Verde	Sinal vermelho	Índice vermelho/verde	Número de células	Frequência na amostra (%)
1ª	1	1	1,0	45	22,50
2ª	1	2	2,0	9	4,50
3ª	1	3	3,0	2	1,00
4ª	2	1	0,5	7	3,50
5ª	2	2	1,0	88	44,00
6ª	2	3	1,5	22	11,00
7ª	3	2	0,7	4	2,00
8ª	3	3	1,0	23	11,50

Resultados a partir dos diferentes critérios para análise de amplificação do *EGFR* e polissomia do cromossomo 7 no caso 14:

- percentual de células com índice *EGFR/CEP7* >2: 1%
- percentual de células com índice *EGFR/CEP7* ≥2: 5,5%
- percentual de células com sinal CEP7 ≥3: 13,5%
- índice total *EGFR/CEP7* (total de sinais vermelhos/total de sinais verdes): 1,06

Tabela 16. Frequências dos índices resultantes das diferentes combinações de sinais vermelho/verde (*EGFR/CEP7*) nas 200 células analisadas no caso 15.

Tipo de combinações	Sinal Verde	Sinal vermelho	Índice vermelho/verde	Número de células	Frequência na amostra (%)
1ª	1	1	1,0	58	29,00
2ª	1	2	2,0	15	7,50
3ª	1	3	3,0	3	1,50
4ª	2	1	0,5	4	2,00
5ª	2	2	1,0	61	30,50
6ª	2	3	1,5	16	8,00
7ª	3	1	0,3	2	1,00
8ª	3	2	0,7	7	3,50
9ª	3	3	1,0	31	15,50
10ª	4	4	1,0	2	0,50
11ª	6	6	1,0	1	1,00

Resultados a partir dos diferentes critérios para análise de amplificação do *EGFR* e polissomia do cromossomo 7 no caso 15:

- percentual de células com índice *EGFR/CEP7* >2: 1,5%
- percentual de células com índice *EGFR/CEP7* ≥2: 9%
- percentual de células com sinal CEP7 ≥3: 21,5%
- índice total *EGFR/CEP7* (total de sinais vermelhos/total de sinais verdes): 1,06

Tabela 17. Frequências dos índices resultantes das diferentes combinações de sinais vermelho/verde (*EGFR/CEP7*) nas 200 células analisadas no caso 16.

Tipo de combinações	Sinal Verde	Sinal vermelho	Índice vermelho/verde	Número de células	Frequência na amostra (%)
1ª	1	1	1,0	45	22,50
2ª	1	2	2,0	14	7,00
3ª	1	3	3,0	2	1,00
4ª	1	15	15,0	1	0,50
5ª	2	1	0,5	6	3,00
6ª	2	2	1,0	66	33,00
7ª	2	3	1,5	6	3,00
8ª	2	10	5,0	1	0,50
9ª	2	15	7,5	27	13,50
10ª	3	1	0,3	1	0,50
11ª	3	2	0,7	9	4,50
12ª	3	3	1,0	21	10,50
13ª	3	4	1,3	1	0,50

Resultados a partir dos diferentes critérios para análise de amplificação do *EGFR* e polissomia do cromossomo 7 no caso 16:

- percentual de células com índice *EGFR/CEP7* >2: 15,5%
- percentual de células com índice *EGFR/CEP7* ≥2: 22,5%
- percentual de células com sinal CEP7 ≥3: 16%
- índice total *EGFR/CEP7* (total de sinais vermelhos/total de sinais verdes): 2,03

Tabela 18. Frequências dos índices resultantes das diferentes combinações de sinais vermelho/verde (*EGFR/CEP7*) nas 200 células analisadas no caso 17.

Tipo de combinações	Sinal Verde	Sinal vermelho	Índice vermelho/verde	Número de células	Frequência na amostra (%)
1ª	1	1	1,0	35	17,50
2ª	1	2	2,0	5	2,50
3ª	1	3	3,0	2	1,00
4ª	2	1	0,5	4	2,00
5ª	2	2	1,0	76	38,00
6ª	2	3	1,5	8	4,00
7ª	3	2	0,7	5	2,50
8ª	3	3	1,0	65	32,50

Resultados a partir dos diferentes critérios para análise de amplificação do *EGFR* e polissomia do cromossomo 7 no caso 17:

- percentual de células com índice *EGFR/CEP7* >2: 1%
- percentual de células com índice *EGFR/CEP7* ≥2: 3,5%
- percentual de células com sinal CEP7 ≥3: 35%
- índice total *EGFR/CEP7* (total de sinais vermelhos/total de sinais verdes): 1,02

Tabela 19. Frequências dos índices resultantes das diferentes combinações de sinais vermelho/verde (*EGFR/CEP7*) nas 200 células analisadas no caso 18.

Tipo de combinações	Sinal Verde	Sinal vermelho	Índice vermelho/verde	Número de células	Frequência na amostra (%)
1ª	1	1	1,0	3	1,50
2ª	1	2	2,0	1	0,50
3ª	1	3	3,0	1	0,50
4ª	1	15	15,0	16	8,00
5ª	2	1	0,5	1	0,50
6ª	2	2	1,0	12	6,00
7ª	2	15	7,5	89	44,50
8ª	3	15	5,0	73	36,50
9ª	4	15	3,8	4	2,00

Resultados a partir dos diferentes critérios para análise de amplificação do *EGFR* e polissomia do cromossomo 7 no caso 18:

- percentual de células com índice *EGFR/CEP7* >2: 91,5%
- percentual de células com índice *EGFR/CEP7* ≥2: 92%
- percentual de células com sinal *CEP7* ≥3: 38,5%
- índice total *EGFR/CEP7* (total de sinais vermelhos/total de sinais verdes): 6,01

Tabela 20. Frequências dos índices resultantes das diferentes combinações de sinais vermelho/verde (*EGFR/CEP7*) nas 200 células analisadas no caso 19.

Tipo de combinações	Sinal Verde	Sinal vermelho	Índice vermelho/verde	Número de células	Frequência na amostra (%)
1ª	1	1	1,0	53	26,50
2ª	1	2	2,0	9	4,50
3ª	2	1	0,5	13	6,50
4ª	2	2	1,0	88	44,00
5ª	2	3	1,5	9	4,50
6ª	2	5	2,5	1	0,50
7ª	3	2	0,7	5	2,50
8ª	3	3	1,0	22	11,00

Resultados a partir dos diferentes critérios para análise de amplificação do *EGFR* e polissomia do cromossomo 7 no caso 19:

- percentual de células com índice *EGFR/CEP7* >2: 0,5%
- percentual de células com índice *EGFR/CEP7* ≥2: 5%
- percentual de células com sinal *CEP7* ≥3: 13,5%
- índice total *EGFR/CEP7* (total de sinais vermelhos/total de sinais verdes): 1,01

Tabela 21. Frequências dos índices resultantes das diferentes combinações de sinais vermelho/verde (*EGFR/CEP7*) nas 200 células analisadas no caso 20.

Tipo de combinações	Sinal Verde	Sinal vermelho	Índice vermelho/verde	Número de células	Frequência na amostra (%)
1ª	1	1	1,0	56	28,00
2ª	1	2	2,0	7	3,50
3ª	1	3	3,0	1	0,50
4ª	2	1	0,5	16	8,00
5ª	2	2	1,0	77	38,50
6ª	2	3	1,5	8	4,00
7ª	2	15	7,5	2	1,00
8ª	3	1	0,3	3	1,50
9ª	3	2	0,7	12	6,00
10ª	3	3	1,0	16	8,00
11ª	3	6	2,0	1	0,50
12ª	4	2	0,5	1	0,50

Resultados a partir dos diferentes critérios para análise de amplificação do *EGFR* e polissomia do cromossomo 7 no caso 20:

- percentual de células com índice *EGFR/CEP7* >2: 1,5%
- percentual de células com índice *EGFR/CEP7* ≥2: 5,5%
- percentual de células com sinal CEP7 ≥3: 16,5%
- índice total *EGFR/CEP7* (total de sinais vermelhos/total de sinais verdes): 1,03

Tabela 22. Frequências dos índices resultantes das diferentes combinações de sinais vermelho/verde (*EGFR/CEP7*) nas 200 células analisadas no caso 21.

Tipo de combinações	Sinal Verde	Sinal vermelho	Índice vermelho/verde	Número de células	Frequência na amostra (%)
1ª	1	1	1,0	47	23,50
2ª	1	2	2,0	17	8,50
3ª	1	3	3,0	2	1,00
4ª	2	1	0,5	9	4,50
5ª	2	2	1,0	94	47,00
6ª	2	3	1,5	7	3,50
7ª	3	1	0,3	1	0,50
8ª	3	2	0,7	5	2,50
9ª	3	3	1,0	15	7,50
10ª	3	4	1,3	2	1,00
11ª	4	4	1,0	1	0,50

Resultados a partir dos diferentes critérios para análise de amplificação do *EGFR* e polissomia do cromossomo 7 no caso 21:

- percentual de células com índice *EGFR/CEP7* >2: 1%

- percentual de células com índice *EGFR/CEP7* ≥ 2 : 9,5%
- percentual de células com sinal *CEP7* ≥ 3 : 12%
- índice total *EGFR/CEP7* (total de sinais vermelhos/total de sinais verdes): 1,04

B.2.2 Resultados das contagens dos sinais da sonda *PTEN/CEP10*

Os resultados das análises dos sinais da sonda *PTEN/CEP10*, de cada caso, são apresentados nas tabelas a seguir. Os tipos de combinações de sinais verdes e de sinais vermelhos resultam das diferentes possibilidades de combinações encontradas em cada caso.

Tabela 23. Frequências dos índices resultantes das diferentes combinações de sinais vermelho/verde (*PTEN/CEP10*) nas 200 células analisadas no caso 1.

Tipo de combinações	Sinal Verde	Sinal vermelho	Índice vermelho/verde	Número de células	Frequência na amostra (%)
1ª	1	0	9	0,0	4,50
2ª	1	1	90	1,0	45,00
3ª	1	2	13	2,0	6,50
4ª	2	0	6	0,0	3,00
5ª	2	1	22	0,5	11,00
6ª	2	2	55	1,0	27,50
7ª	2	3	3	1,5	1,50
8ª	3	1	1	0,3	0,50
9ª	3	3	1	1,0	0,50

Resultados a partir dos diferentes critérios para análise da deleção do *PTEN* e monossomia do cromossomo 10 no caso 1:

- percentual de células com ausência dos 2 sinais *PTEN*: 7,5%
- percentual de células com 1 sinal *PTEN* e sinais *CEP10* ≥ 2 ou 2 sinais *PTEN* e sinais *CEP10* ≥ 4 : 11%
- percentual de células com sinal *CEP10* < 2 : 56%
- índice total *PTEN/CEP10* (total de sinais vermelhos/total de sinais verdes): 0,90

Tabela 24. Frequências dos índices resultantes das diferentes combinações de sinais vermelho/verde (*PTEN*/CEP10) nas 200 células analisadas no caso 2.

Tipo de combinações	Sinal Verde	Sinal vermelho	Índice vermelho/verde	Número de células	Frequência na amostra (%)
1ª	1	0	4	0,0	2,00
2ª	1	1	68	1,0	34,00
3ª	1	2	23	2,0	11,50
4ª	1	3	1	3,0	0,50
5ª	2	0	2	0,0	1,00
6ª	2	1	31	0,5	15,50
7ª	2	2	62	1,0	31,00
8ª	2	3	3	1,5	1,50
9ª	3	1	2	0,3	1,00
10ª	3	3	4	1,0	2,00

Resultados a partir dos diferentes critérios para análise da deleção do *PTEN* e monossomia do cromossomo 10 no caso 2:

- percentual de células com ausência dos 2 sinais *PTEN*: 3%
- percentual de células com 1 sinal *PTEN* e sinais CEP10 ≥ 2 ou 2 sinais *PTEN* e sinais CEP10 ≥ 4 : 15,5%
- percentual de células com sinal CEP10 < 2 : 48%
- índice total *PTEN*/CEP10 (total de sinais vermelhos/total de sinais verdes): 0,95

Tabela 25. Frequências dos índices resultantes das diferentes combinações de sinais vermelho/verde (*PTEN*/CEP10) nas 200 células analisadas no caso 3.

Tipo de combinações	Sinal Verde	Sinal vermelho	Índice vermelho/verde	Número de células	Frequência na amostra (%)
1ª	1	0	17	0,0	8,50
2ª	1	1	84	1,0	42,00
3ª	1	2	29	2,0	14,50
4ª	1	3	1	3,0	0,50
5ª	2	0	6	0,0	3,00
6ª	2	1	28	0,5	14,00
7ª	2	2	31	1,0	15,50
8ª	2	3	1	1,5	0,50
9ª	3	1	2	0,3	1,00
10ª	3	3	1	1,0	0,50

Resultados a partir dos diferentes critérios para análise da deleção do *PTEN* e monossomia do cromossomo 10 no caso 3:

- percentual de células com ausência dos 2 sinais *PTEN*: 11,5%

- percentual de células com 1 sinal *PTEN* e sinais CEP10 ≥ 2 ou 2 sinais *PTEN* e sinais CEP10 ≥ 4 : 15%
- percentual de células com sinal CEP10 < 2 : 65,5%
- índice total *PTEN*/CEP10 (total de sinais vermelhos/total de sinais verdes): 0,89

Tabela 26. Frequências dos índices resultantes das diferentes combinações de sinais vermelho/verde (*PTEN*/CEP10) nas 200 células analisadas no caso 4.

Tipo de combinações	Sinal Verde	Sinal vermelho	Índice vermelho/verde	Número de células	Frequência na amostra (%)
1ª	1	0	2	0,0	1,00
2ª	1	1	70	1,0	35,00
3ª	1	2	34	2,0	17,00
4ª	2	0	2	0,0	1,00
5ª	2	1	18	0,5	9,00
6ª	2	2	66	1,0	33,00
7ª	2	3	5	1,5	2,50
8ª	3	2	1	0,7	0,50
9ª	3	3	2	1,0	1,00

Resultados a partir dos diferentes critérios para análise da deleção do *PTEN* e monossomia do cromossomo 10 no caso 4:

- percentual de células com ausência dos 2 sinais *PTEN*: 2%
- percentual de células com 1 sinal *PTEN* e sinais CEP10 ≥ 2 ou 2 sinais *PTEN* e sinais CEP10 ≥ 4 : 9%
- percentual de células com sinal CEP10 < 2 : 53%
- índice total *PTEN*/CEP10 (total de sinais vermelhos/total de sinais verdes): 1,05

Tabela 27. Frequências dos índices resultantes das diferentes combinações de sinais vermelho/verde (*PTEN*/CEP10) nas 200 células analisadas no caso 5.

Tipo de combinações	Sinal Verde	Sinal vermelho	Índice vermelho/verde	Número de células	Frequência na amostra (%)
1ª	1	0	6	0,0	3,00
2ª	1	1	68	1,0	34,00
3ª	1	2	14	2,0	7,00
4ª	1	3	2	3,0	1,00
5ª	2	0	10	0,0	5,00
6ª	2	1	36	0,5	18,00
7ª	2	2	53	1,0	26,50
8ª	2	3	2	1,5	1,00
9ª	3	1	1	0,3	0,50
10ª	3	2	4	0,7	2,00
11ª	3	3	4	1,0	2,00

Resultados a partir dos diferentes critérios para análise da deleção do *PTEN* e monossomia do cromossomo 10 no caso 5:

- percentual de células com ausência dos 2 sinais *PTEN*: 8%
- percentual de células com 1 sinal *PTEN* e sinais CEP10 ≥ 2 ou 2 sinais *PTEN* e sinais CEP10 ≥ 4 : 18,5%
- percentual de células com sinal CEP10 < 2 : 45%
- índice total *PTEN*/CEP10 (total de sinais vermelhos/total de sinais verdes): 0,85

Tabela 28. Frequências dos índices resultantes das diferentes combinações de sinais vermelho/verde (*PTEN*/CEP10) nas 200 células analisadas no caso 6.

Tipo de combinações	Sinal Verde	Sinal vermelho	Índice vermelho/verde	Número de células	Frequência na amostra (%)
1ª	1	0	5	0,0	2,50
2ª	1	1	66	1,0	33,00
3ª	1	2	28	2,0	14,00
4ª	1	3	2	3,0	1,00
5ª	2	0	2	0,0	1,00
6ª	2	1	32	0,5	16,00
7ª	2	2	51	1,0	25,50
8ª	2	3	5	1,5	2,50
9ª	3	1	1	0,3	0,50
10ª	3	2	2	0,7	1,00
11ª	3	3	6	1,0	3,00

Resultados a partir dos diferentes critérios para análise da deleção do *PTEN* e monossomia do cromossomo 10 no caso 6:

- percentual de células com ausência dos 2 sinais *PTEN*: 3,5%
- percentual de células com 1 sinal *PTEN* e sinais CEP10 ≥ 2 ou 2 sinais *PTEN* e sinais CEP10 ≥ 4 : 16,5%
- percentual de células com sinal CEP10 < 2 : 50,5%
- índice total *PTEN*/CEP10 (total de sinais vermelhos/total de sinais verdes): 0,97

Tabela 29. Frequências dos índices resultantes das diferentes combinações de sinais vermelho/verde (*PTEN*/CEP10) nas 200 células analisadas no caso 7.

Tipo de combinações	Sinal Verde	Sinal vermelho	Índice vermelho/verde	Número de células	Frequência na amostra (%)
1ª	1	0	1	0,0	0,50
2ª	1	1	66	1,0	33,00
3ª	1	2	31	2,0	15,50
4ª	2	0	3	0,0	1,50
5ª	2	1	15	0,5	7,50
6ª	2	2	66	1,0	33,00
7ª	2	3	8	1,5	4,00
8ª	3	2	5	0,7	2,50
9ª	3	3	5	1,0	2,50

Resultados a partir dos diferentes critérios para análise da deleção do *PTEN* e monossomia do cromossomo 10 no caso 7:

- percentual de células com ausência dos 2 sinais *PTEN*: 2%
- percentual de células com 1 sinal *PTEN* e sinais CEP10 ≥ 2 ou 2 sinais *PTEN* e sinais CEP10 ≥ 4 : 7,5%
- percentual de células com sinal CEP10 < 2 : 49%
- índice total *PTEN*/CEP10 (total de sinais vermelhos/total de sinais verdes): 1,04

Tabela 30. Frequências dos índices resultantes das diferentes combinações de sinais vermelho/verde (*PTEN*/CEP10) nas 200 células analisadas no caso 8.

Tipo de combinações	Sinal Verde	Sinal vermelho	Índice vermelho/verde	Número de células	Frequência na amostra (%)
1ª	1	0	65	0,0	32,50
2ª	1	1	46	1,0	23,00
3ª	1	2	17	2,0	8,50
4ª	1	3	1	3,0	0,50
5ª	2	0	18	0,0	9,00
6ª	2	1	10	0,5	5,00
7ª	2	2	38	1,0	19,00
8ª	2	3	1	1,5	0,50
9ª	3	1	1	0,3	0,50
10ª	3	2	1	0,7	0,50
11ª	3	3	2	1,0	1,00

Resultados a partir dos diferentes critérios para análise da deleção do *PTEN* e monossomia do cromossomo 10 no caso 8:

- percentual de células com ausência dos 2 sinais *PTEN*: 41,5%
- percentual de células com 1 sinal *PTEN* e sinais CEP10 ≥ 2 ou 2 sinais *PTEN* e sinais CEP10 ≥ 4 : 5,5,%
- percentual de células com sinal CEP10 < 2 : 64,5%
- índice total *PTEN*/CEP10 (total de sinais vermelhos/total de sinais verdes): 0,66

Tabela 31. Frequências dos índices resultantes das diferentes combinações de sinais vermelho/verde (*PTEN*/CEP10) nas 200 células analisadas no caso 9.

Tipo de combinações	Sinal Verde	Sinal vermelho	Índice vermelho/verde	Número de células	Frequência na amostra (%)
1ª	1	0	3	0,0	1,50
2ª	1	1	108	1,0	54,00
3ª	1	2	17	2,0	8,50
4ª	2	0	7	0,0	3,50
5ª	2	1	25	0,5	12,50
6ª	2	2	40	1,0	20,00

Resultados a partir dos diferentes critérios para análise da deleção do *PTEN* e monossomia do cromossomo 10 no caso 9:

- percentual de células com ausência dos 2 sinais *PTEN*: 5%
- percentual de células com 1 sinal *PTEN* e sinais CEP10 ≥ 2 ou 2 sinais *PTEN* e sinais CEP10 ≥ 4 : 12,5%
- percentual de células com sinal CEP10 < 2 : 64%
- índice total *PTEN*/CEP10 (total de sinais vermelhos/total de sinais verdes): 0,91

Tabela 32. Frequências dos índices resultantes das diferentes combinações de sinais vermelho/verde (*PTEN*/CEP10) nas 200 células analisadas no caso 10.

Tipo de combinações	Sinal Verde	Sinal vermelho	Índice vermelho/verde	Número de células	Frequência na amostra (%)
1ª	1	0	7	0,0	3,50
2ª	1	1	84	1,0	42,00
3ª	1	2	33	2,0	16,50
4ª	1	3	1	3,0	0,50
5ª	2	0	1	0,0	0,50
6ª	2	1	22	0,5	11,00
7ª	2	2	47	1,0	23,50
8ª	3	1	2	0,3	1,00
9ª	3	2	2	0,7	1,00
10ª	3	3	1	1,0	0,50

Resultados a partir dos diferentes critérios para análise da deleção do *PTEN* e monossomia do cromossomo 10 no caso 10:

- percentual de células com ausência dos 2 sinais *PTEN*: 4%
- percentual de células com 1 sinal *PTEN* e sinais CEP10 ≥ 2 ou 2 sinais *PTEN* e sinais CEP10 ≥ 4 : 12%
- percentual de células com sinal CEP10 < 2 : 62,5%
- índice total *PTEN*/CEP10 (total de sinais vermelhos/total de sinais verdes): 0,99

Tabela 33. Frequências dos índices resultantes das diferentes combinações de sinais vermelho/verde (*PTEN*/CEP10) nas 200 células analisadas no caso 11.

Tipo de combinações	Sinal Verde	Sinal vermelho	Índice vermelho/verde	Número de células	Frequência na amostra (%)
1ª	1	0	3	0,0	1,5
2ª	1	1	70	1,0	35
3ª	1	2	10	2,0	5
4ª	1	3	1	3,0	0,5
5ª	2	0	3	0,0	1,5
6ª	2	1	32	0,5	16
7ª	2	2	73	1,0	36,5
8ª	2	3	1	1,5	0,5
9ª	3	1	6	0,3	3
10ª	3	2	1	0,7	0,5

Resultados a partir dos diferentes critérios para análise da deleção do *PTEN* e monossomia do cromossomo 10 no caso 11:

- percentual de células com ausência dos 2 sinais *PTEN*: 3%
- percentual de células com 1 sinal *PTEN* e sinais CEP10 ≥ 2 ou 2 sinais *PTEN* e sinais CEP10 ≥ 4 : 19%

- percentual de células com sinal CEP10 <2: 42%
- índice total *PTEN*/CEP10 (total de sinais vermelhos/total de sinais verdes): 0,87

Tabela 34. Frequências dos índices resultantes das diferentes combinações de sinais vermelho/verde (*PTEN*/CEP10) nas 200 células analisadas no caso 12.

Tipo de combinações	Sinal Verde	Sinal vermelho	Índice vermelho/verde	Número de células	Frequência na amostra (%)
1ª	1	0	2	0,0	1,00
2ª	1	1	105	1,0	52,50
3ª	1	2	33	2,0	16,50
4ª	2	1	10	0,5	5,00
5ª	2	2	50	1,0	25,00

Resultados a partir dos diferentes critérios para análise da deleção do *PTEN* e monossomia do cromossomo 10 no caso 12:

- percentual de células com ausência dos 2 sinais *PTEN*: 1%
- percentual de células com 1 sinal *PTEN* e sinais CEP10 ≥ 2 ou 2 sinais *PTEN* e sinais CEP10 ≥ 4 : 5%
- percentual de células com sinal CEP10 <2: 70%
- índice total *PTEN*/CEP10 (total de sinais vermelhos/total de sinais verdes): 1,08

Tabela 35. Frequências dos índices resultantes das diferentes combinações de sinais vermelho/verde (*PTEN*/CEP10) nas 200 células analisadas no caso 13.

Tipo de combinações	Sinal Verde	Sinal vermelho	Índice vermelho/verde	Número de células	Frequência na amostra (%)
1ª	1	0	4	0,0	2,00
2ª	1	1	66	1,0	33,00
3ª	1	2	6	2,0	3,00
4ª	2	0	3	0,0	1,50
5ª	2	1	65	0,5	32,50
6ª	2	2	46	1,0	23,00
7ª	2	3	2	1,5	1,00
8ª	3	1	5	0,3	2,50
9ª	3	2	3	0,7	1,50

Resultados a partir dos diferentes critérios para análise da deleção do *PTEN* e monossomia do cromossomo 10 no caso 13:

- percentual de células com ausência dos 2 sinais *PTEN*: 3,5%
- percentual de células com 1 sinal *PTEN* e sinais CEP10 ≥ 2 ou 2 sinais *PTEN* e sinais CEP10 ≥ 4 : 35%
- percentual de células com sinal CEP10 <2: 38%

- índice total *PTEN*/CEP10 (total de sinais vermelhos/total de sinais verdes): 0,76

Tabela 36. Frequências dos índices resultantes das diferentes combinações de sinais vermelho/verde (*PTEN*/CEP10) nas 200 células analisadas no caso 14.

Tipo de combinações	Sinal Verde	Sinal vermelho	Índice vermelho/verde	Número de células	Frequência na amostra (%)
1ª	1	0	8	0,0	4,00
2ª	1	1	48	1,0	24,00
3ª	1	2	2	2,0	1,00
4ª	2	0	35	0,0	17,50
5ª	2	1	42	0,5	21,00
6ª	2	2	21	1,0	10,50
7ª	2	3	1	1,5	0,50
8ª	3	0	11	0,0	5,50
9ª	3	1	23	0,3	11,50
10ª	3	2	4	0,7	2,00
11ª	4	0	2	0,0	1,00
12ª	4	1	1	0,3	0,50
13ª	5	0	2	0,0	1,00

Resultados a partir dos diferentes critérios para análise da deleção do *PTEN* e monossomia do cromossomo 10 no caso 14:

- percentual de células com ausência dos 2 sinais *PTEN*: 29%
- percentual de células com 1 sinal *PTEN* e sinais CEP10 ≥ 2 ou 2 sinais *PTEN* e sinais CEP10 ≥ 4 : 33%
- percentual de células com sinal CEP10 < 2 : 29%
- índice total *PTEN*/CEP10 (total de sinais vermelhos/total de sinais verdes): 0,44

Tabela 37. Frequências dos índices resultantes das diferentes combinações de sinais vermelho/verde (*PTEN/CEP10*) nas 200 células analisadas no caso 15.

Tipo de combinações	Sinal Verde	Sinal vermelho	Índice vermelho/verde	Número de células	Frequência na amostra (%)
1ª	1	0	5	0,0	2,50
2ª	1	1	83	1,0	41,50
3ª	1	2	17	2,0	8,50
4ª	2	0	10	0,0	5,00
5ª	2	1	44	0,5	22,00
6ª	2	2	27	1,0	13,50
7ª	2	3	1	1,5	0,50
8ª	3	0	4	0,0	2,00
9ª	3	1	5	0,3	2,50
10ª	3	2	3	0,7	1,50
11ª	4	0	1	0,0	0,50

Resultados a partir dos diferentes critérios para análise da deleção do *PTEN* e monossomia do cromossomo 10 no caso 15:

- percentual de células com ausência dos 2 sinais *PTEN*: 10%
- percentual de células com 1 sinal *PTEN* e sinais *CEP10* ≥ 2 ou 2 sinais *PTEN* e sinais *CEP10* ≥ 4 : 24,5%
- percentual de células com sinal *CEP10* < 2 : 52,5%
- índice total *PTEN/CEP10* (total de sinais vermelhos/total de sinais verdes): 0,74

Tabela 38. Frequências dos índices resultantes das diferentes combinações de sinais vermelho/verde (*PTEN/CEP10*) nas 200 células analisadas no caso 16.

Tipo de combinações	Sinal Verde	Sinal vermelho	Índice vermelho/verde	Número de células	Frequência na amostra (%)
1ª	1	0	14	0,0	7,00
2ª	1	1	37	1,0	18,50
3ª	1	2	5	2,0	2,50
4ª	2	0	32	0,0	16,00
5ª	2	1	35	0,5	17,50
6ª	2	2	26	1,0	13,00
7ª	2	3	2	1,5	1,00
8ª	3	0	7	0,0	3,50
9ª	3	1	23	0,3	11,50
10ª	3	2	16	0,7	8,00
11ª	3	3	1	1,0	0,50
12ª	4	2	2	0,5	1,00

Resultados a partir dos diferentes critérios para análise da deleção do *PTEN* e monossomia do cromossomo 10 no caso 16:

- percentual de células com ausência dos 2 sinais *PTEN*: 26,5%
- percentual de células com 1 sinal *PTEN* e sinais CEP10 ≥ 2 ou 2 sinais *PTEN* e sinais CEP10 ≥ 4 : 30%
- percentual de células com sinal CEP10 < 2 : 28%
- índice total *PTEN*/CEP10 (total de sinais vermelhos/total de sinais verdes): 0,51

Tabela 39. Frequências dos índices resultantes das diferentes combinações de sinais vermelho/verde (*PTEN*/CEP10) nas 200 células analisadas no caso 17.

Tipo de combinações	Sinal Verde	Sinal vermelho	Índice vermelho/verde	Número de células	Frequência na amostra (%)
1ª	1	0	2	0,0	1,00
2ª	1	1	49	1,0	24,50
3ª	1	2	20	2,0	10,00
4ª	2	0	14	0,0	7,00
5ª	2	1	42	0,5	21,00
6ª	2	2	48	1,0	24,00
7ª	3	0	1	0,0	0,50
8ª	3	1	12	0,3	6,00
9ª	3	2	6	0,7	3,00
10ª	3	3	1	1,0	0,50
11ª	4	1	4	0,3	2,00
12ª	4	2	1	0,5	0,50

Resultados a partir dos diferentes critérios para análise da deleção do *PTEN* e monossomia do cromossomo 10 no caso 17:

- percentual de células com ausência dos 2 sinais *PTEN*: 8,5%
- percentual de células com 1 sinal *PTEN* e sinais CEP10 ≥ 2 ou 2 sinais *PTEN* e sinais CEP10 ≥ 4 : 29,5%
- percentual de células com sinal CEP10 < 2 : 35,5%
- índice total *PTEN*/CEP10 (total de sinais vermelhos/total de sinais verdes): 0,72

Tabela 40. Frequências dos índices resultantes das diferentes combinações de sinais vermelho/verde (*PTEN*/CEP10) nas 200 células analisadas no caso 18.

Tipo de combinações	Sinal Verde	Sinal vermelho	Índice vermelho/verde	Número de células	Frequência na amostra (%)
1ª	1	0	5	0,0	2,5
2ª	1	1	82	1,0	41
3ª	1	2	9	2,0	4,5
4ª	1	3	1	3,0	0,5
5ª	2	0	13	0,0	6,5
6ª	2	1	34	0,5	17
7ª	2	2	31	1,0	15,5
8ª	2	3	1	1,5	0,5
9ª	3	0	5	0,0	2,5
10ª	3	1	8	0,3	4
11ª	3	2	7	0,7	3,5
12ª	4	0	3	0,0	1,5
13ª	5	1	1	0,2	0,5

Resultados a partir dos diferentes critérios para análise da deleção do *PTEN* e monossomia do cromossomo 10 no caso 18:

- percentual de células com ausência dos 2 sinais *PTEN*: 13%
- percentual de células com 1 sinal *PTEN* e sinais CEP10 ≥ 2 ou 2 sinais *PTEN* e sinais CEP10 ≥ 4 : 21,5%
- percentual de células com sinal CEP10 < 2 : 48,5%
- índice total *PTEN*/CEP10 (total de sinais vermelhos/total de sinais verdes): 0,68

Tabela 41. Frequências dos índices resultantes das diferentes combinações de sinais vermelho/verde (*PTEN*/CEP10) nas 200 células analisadas no caso 19.

Tipo de combinações	Sinal Verde	Sinal vermelho	Índice vermelho/verde	Número de células	Frequência na amostra (%)
1ª	1	0	4	0,0	2,00
2ª	1	1	61	1,0	30,50
3ª	1	2	21	2,0	10,50
4ª	1	3	2	3,0	1,00
5ª	2	0	1	0,0	0,50
6ª	2	1	21	0,5	10,50
7ª	2	2	75	1,0	37,50
8ª	2	3	7	1,5	3,50
9ª	3	0	1	0,0	0,50
10ª	3	1	1	0,3	0,50
11ª	3	2	3	0,7	1,50
12ª	3	3	2	1,0	1,00
13ª	4	4	1	1,0	0,50

Resultados a partir dos diferentes critérios para análise da deleção do *PTEN* e monossomia do cromossomo 10 no caso 19:

- percentual de células com ausência dos 2 sinais *PTEN*: 3%
- percentual de células com 1 sinal *PTEN* e sinais CEP10 ≥ 2 ou 2 sinais *PTEN* e sinais CEP10 ≥ 4 : 11%
- percentual de células com sinal CEP10 < 2 : 44%
- índice total *PTEN*/CEP10 (total de sinais vermelhos/total de sinais verdes): 0,99

Tabela 42. Frequências dos índices resultantes das diferentes combinações de sinais vermelho/verde (*PTEN*/CEP10) nas 200 células analisadas no caso 20.

Tipo de combinações	Sinal Verde	Sinal vermelho	Índice vermelho/verde	Número de células	Frequência na amostra (%)
1ª	1	0	4	0,0	2,00
2ª	1	1	37	1,0	18,50
3ª	1	2	7	2,0	3,50
4ª	2	0	9	0,0	4,50
5ª	2	1	39	0,5	19,50
6ª	2	2	36	1,0	18,00
7ª	3	0	4	0,0	2,00
8ª	3	1	26	0,3	13,00
9ª	3	2	15	0,7	7,50
10ª	3	3	1	1,0	0,50
11ª	4	0	1	0,0	0,50
12ª	4	1	7	0,3	3,50
13ª	4	2	1	0,5	0,50
14ª	5	0	1	0,0	0,50
15ª	5	1	6	0,2	3,00
16ª	5	2	3	0,4	1,50
17ª	6	0	1	0,0	0,50
18ª	6	1	2	0,2	1,00

Resultados a partir dos diferentes critérios para análise da deleção do *PTEN* e monossomia do cromossomo 10 no caso 20:

- percentual de células com ausência dos 2 sinais *PTEN*: 10%
- percentual de células com 1 sinal *PTEN* e sinais CEP10 ≥ 2 ou 2 sinais *PTEN* e sinais CEP10 ≥ 4 : 42%
- percentual de células com sinal CEP10 < 2 : 24%
- índice total *PTEN*/CEP10 (total de sinais vermelhos/total de sinais verdes): 0,53

Tabela 43. Frequências dos índices resultantes das diferentes combinações de sinais vermelho/verde (*PTEN*/CEP10) nas 200 células analisadas no caso 21.

Tipo de combinações	Sinal Verde	Sinal vermelho	Índice vermelho/verde	Número de células	Frequência na amostra (%)
1ª	1	0	7	0,0	3,50
2ª	1	1	78	1,0	39,00
3ª	1	2	35	2,0	17,50
4ª	1	3	1	3,0	0,50
5ª	2	0	3	0,0	1,50
6ª	2	1	11	0,5	5,50
7ª	2	2	56	1,0	28,00
8ª	2	3	3	1,5	1,50
9ª	3	2	3	0,7	1,50
10ª	3	3	3	1,0	1,50

Resultados a partir dos diferentes critérios para análise da deleção do *PTEN* e monossomia do cromossomo 10 no caso 21:

- percentual de células com ausência dos 2 sinais *PTEN*: 5%
- percentual de células com 1 sinal *PTEN* e sinais CEP10 ≥ 2 ou 2 sinais *PTEN* e sinais CEP10 ≥ 4 : 5,5%
- percentual de células com sinal CEP10 < 2 : 60,5%
- índice total *PTEN*/CEP10 (total de sinais vermelhos/total de sinais verdes): 1,05

B.2.3 Frequências das alterações encontradas através das análises das sondas *EGFR/CEP7* e *PTEN/CEP10*

A alteração genética observada com maior frequência na amostra foi a polissomia do cromossomo 7 (52,30%), seguida da monossomia do cromossomo 10 (47,61%). Em 23,80% das amostras, as 2 alterações foram encontradas em conjunto (Tabela 44).

A amplificação do gene *EGFR* foi observada em 38,09% dos casos (Figura 6), sendo que a maioria deles apresentou, também, polissomia do cromossomo 7 (75,00%). Todos os casos que apresentaram amplificação do *EGFR* evidenciaram, também, alguma alteração do cromossomo 10: 1 caso (12,50%) apresentou deleção do *PTEN* em homozigose, 6 casos (75,00%) apresentaram monossomia do cromossomo 10 e 3 casos (37,50%) apresentaram deleção do braço curto do cromossomo 10 (Tabela 44).

Os dois pacientes com glioblastoma secundário não apresentaram amplificação do *EGFR* (Tabela 1).

A deleção em homozigose do gene *PTEN* foi observada em apenas 1 paciente da amostra (4,76%). Este paciente apresentou, também, amplificação do gene *EGFR*, monossomia do cromossomo 10 e deleção do braço longo do cromossomo 10. A deleção em hemizigose do gene *PTEN* não foi observada em nenhum paciente da amostra (Tabela 44).

A deleção do braço longo do cromossomo 10 foi encontrada em 8 pacientes, sendo que metade deles apresentou, também, outras alterações genéticas (Tabela 44).

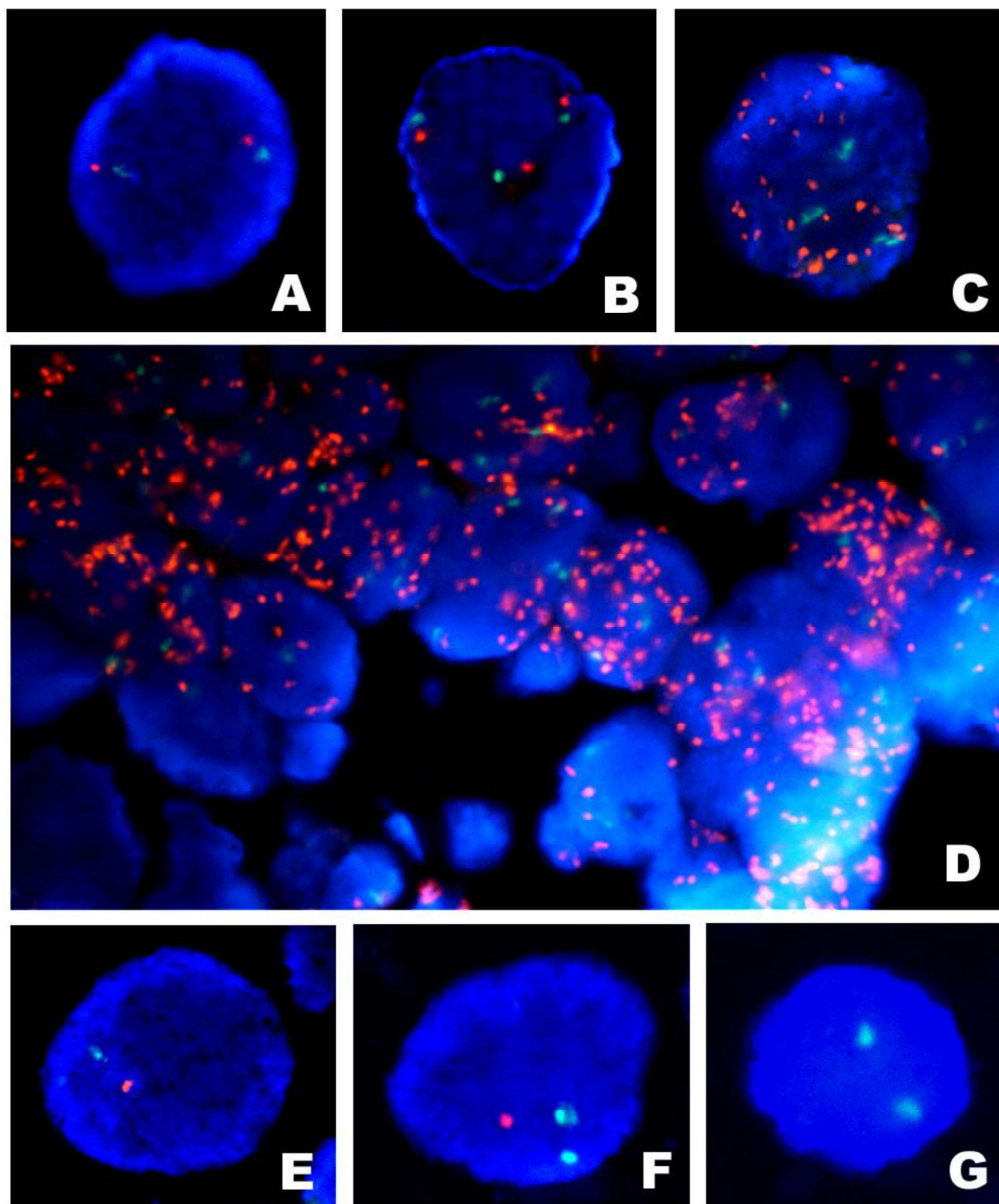


Figura 6. Foto (filtro triplo) da hibridização *in situ* das células tumorais usando as sondas LSI *EGFR/CEP7* e a LSI *PTEN/CEP10*. A) Núcleo normal, apresentando 2 sinais *CEP7* (verdes) e 2 sinais *EGFR* (vermelhos). B) Núcleo apresentando trissomia do cromossomo 7, com 3 sinais *CEP7* (verdes) e 3 sinais *EGFR* (vermelhos). C) Núcleo com amplificação do gene *EGFR*, apresentando 3 sinais verdes (*CEP7*) e em torno de 30 sinais vermelhos (*EGFR*). D) Vários núcleos com amplificação do gene *EGFR* (representada pelos aglomerados de sinais vermelhos). E) Núcleo apresentando monossomia do cromossomo 10, com 1 sinal *CEP10* (verde) e 1 sinal vermelho (*PTEN*). F) Núcleo apresentando deleção do gene *PTEN* em hemizigose (apenas 1 sinal vermelho). G) Núcleo com deleção do gene *PTEN* em homizigose (ausência de sinal vermelho).

Tabela 44. Frequência das alterações genéticas encontradas nos pacientes da amostra.

Caso	Amplificação do <i>EGFR</i>	Polissomia do cromossomo 7	Deleção do <i>PTEN</i>	Monossomia do cromossomo 10	del10q
1	+	+	-	+	-
2	-	-	-	-	-
3	-	+	-	+	-
4	+	+	-	+	-
5	-	+	-	-	-
6	+	+	-	+	-
7	-	-	-	-	-
8	+	-	+	+	+
9	+	+	-	+	-
10	-	-	-	+	-
11	-	+	-	-	-
12	+	+	-	+	-
13	-	-	-	-	+
14	-	-	-	-	+
15	-	+	-	+	+
16	+	-	-	-	+
17	-	+	-	-	+
18	+	+	-	-	+
19	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	+
21	-	-	-	+	-
Total (%)	38,09%	52,38%	4,76%	47,61%	38,09%

+ presente, - ausente

B.2.4 Correlação entre os resultados das alterações encontradas nas análises das sondas *EGFR/CEP7* e *PTEN/CEP10* e o prognóstico dos pacientes

Ao comparar o tempo de sobrevida entre os pacientes que apresentaram amplificação do gene *EGFR* com os pacientes que não apresentaram amplificação, não foi encontrada diferença significativa (Figura 7). O mesmo ocorreu ao comparar

os pacientes que apresentaram polissomia do cromossomo 7 com os que não apresentaram polissomia (Figura 8), e entre os grupos com monossomia do cromossomo 10 e sem monossomia (Figura 9).

Ao comparar o grupo dos pacientes que apresentaram deleção do braço longo do cromossomo 10 com o grupo dos que não apresentaram deleção, observou-se que o grupo sem deleção apresentou uma média de sobrevida maior (13,6 meses) em relação ao outro grupo (3,6 meses) (Figura 10). Não houve diferença entre a faixa etária dos pacientes nestes 2 grupos ($p = 0,2075$).

Para análise da sobrevida, apenas 18 pacientes da amostra foram utilizados (casos que tinham tempo de acompanhamento suficiente para esta análise, tendo sido operados até janeiro de 2014).

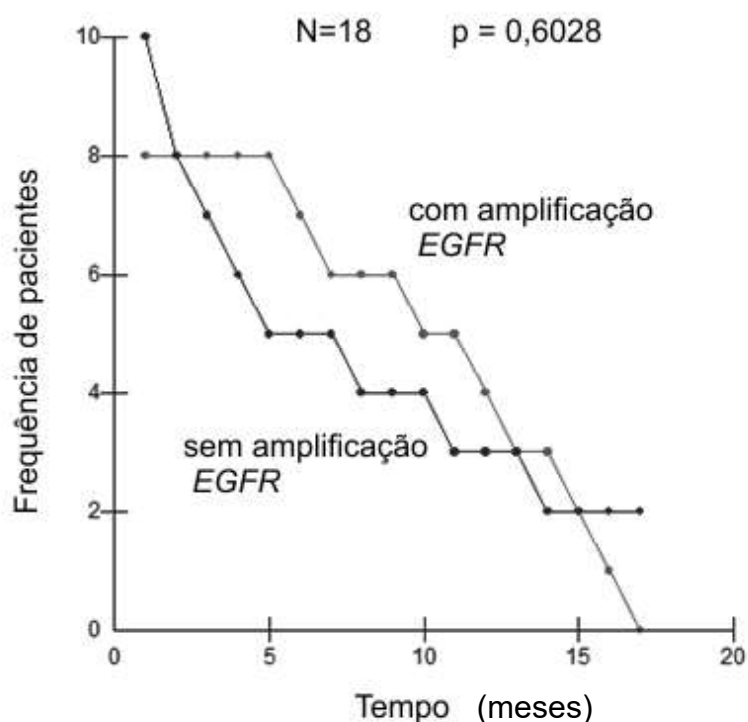


Figura 7. Gráfico de comparação da curva de sobrevida entre os grupos de pacientes com e sem amplificação do gene *EGFR* (*Log-Rank Test*).

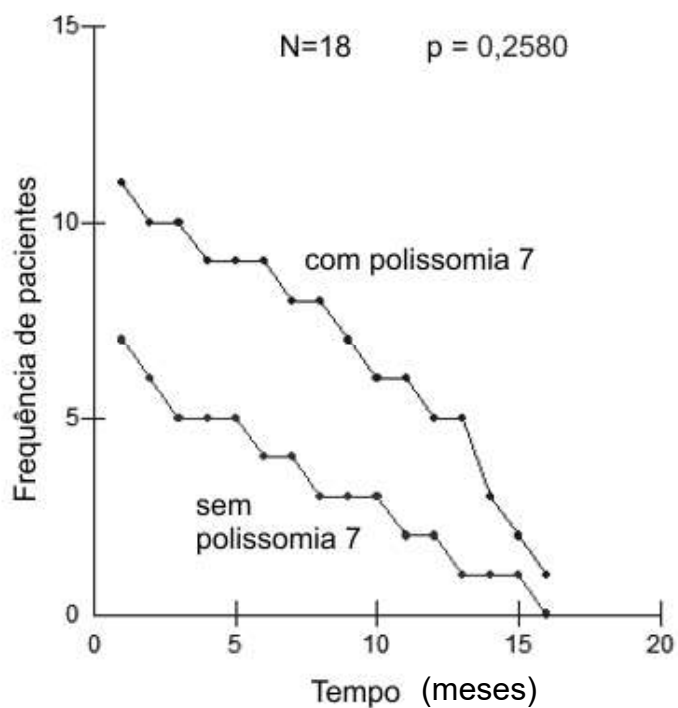


Figura 8. Gráfico de comparação da curva de sobrevida entre os grupos de pacientes com e sem polissomia do cromossomo 7 (*Log-Rank Test*).

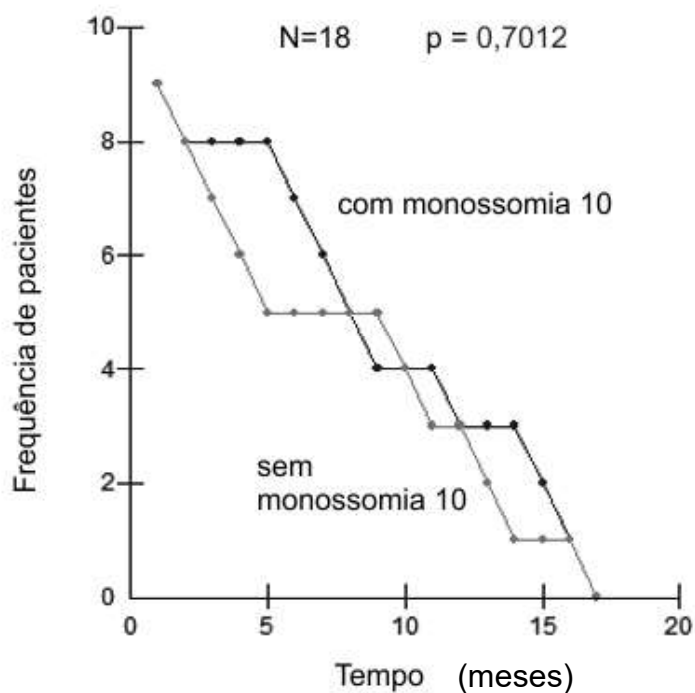


Figura 9. Gráfico de comparação da curva de sobrevida entre os grupos de pacientes com e sem monossomia do cromossomo 10 (*Log-Rank Test*).

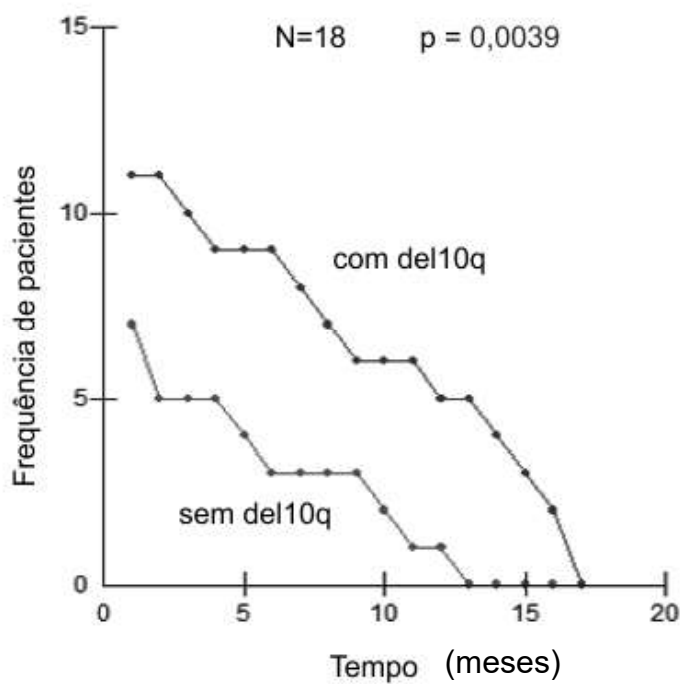


Figura 10. Gráfico de comparação da curva de sobrevivência entre os grupos de pacientes com e sem deleção do braço longo do cromossomo 10 (*Log-Rank Test*).

Anexo C. Discussão

C.1 Características clínicas dos pacientes da amostra

O glioblastoma pode se manifestar em qualquer idade, mas ele afeta, preferencialmente, adultos com um pico de incidência entre 45 e 75 anos (Kleihues e cols., 2007). No estudo baseado em populações realizado por Ohgaki e cols. (2004), a idade média dos pacientes afetados por glioblastoma foi 61,3 anos. Embora o nosso estudo tenha sido realizado apenas em pacientes adultos, a média de idade dos pacientes afetados foi 57,9 anos e esteve dentro do intervalo esperado.

A maioria dos pacientes deste trabalho pertenceu ao sexo masculino, o que está de acordo com o observado na literatura (índice masculino:feminino = 1,6) (Ostrom e cols., 2014).

Embora a maioria dos glioblastomas seja esporádica, estima-se que 5% dos casos sejam familiares (Fisher e cols., 2007). Alguns tumores ocorrem como uma das características de uma síndrome de câncer hereditário, enquanto outros acontecem isoladamente (Kleihues e cols., 2007). Malmer e cols. (2003) demonstraram que a recorrência familiar acontece principalmente em parentes de primeiro grau, o que reforça a ideia de que há uma predisposição genética destas famílias a estes tumores. De acordo com o descrito na literatura, encontramos recorrência em parentes de primeiro grau em 9,52% dos casos.

A cefaleia é um dos sintomas mais frequentes no diagnóstico dos glioblastomas e costuma estar presente em 50% dos casos. Em nossa amostra, ela foi referida por 47,61% dos pacientes. Os sinais focais são menos frequentes e foram verificados em 14,28% dos nossos pacientes. Crise convulsiva é observada

em 20% a 40% dos pacientes, e ela esteve presente em 19,04% dos nossos casos (Omuro e DeAngelis, 2013).

A maioria dos glioblastomas (90%) se desenvolve *de novo* e é denominada de glioblastoma primário (Kleihues e cols., 2007). Este dado foi constatado na nossa amostra onde 85,71% dos glioblastomas foram primários e 9,52% foram secundários.

Em uma série de 987 glioblastomas do Hospital Universitário de Zurique, a região do cérebro mais frequentemente afetada pelo glioblastoma foi a região temporal (31%), seguida pela região parietal (24%) e região frontal (23%) (Kleihues e cols., 2007). Da mesma forma, na nossa amostra, a maioria dos tumores estava localizada na região temporal (33,33%). A região frontal ocupou o segundo lugar, em 28,57% dos casos.

Os sinais de hipertensão intracraniana, como hidrocefalia e papiledema, são mais raramente observados atualmente uma vez que os diagnósticos por neuroimagem são realizados mais precocemente e antecipam a ocorrência destas sequelas (Omuro e DeAngelis, 2013). Efetivamente, nenhum dos pacientes da nossa amostra evidenciou estes sinais.

No estudo realizado por Ohgaki e cols. (2004), no período de 1980 a 1994, a média de sobrevida dos pacientes que realizaram tratamento neurocirúrgico foi de $7,9 \pm 5$ meses. Na nossa amostra, a média de sobrevida foi de 9,7 meses. É provável que este aumento da sobrevida se deva às melhores condições de diagnóstico e tratamento existentes atualmente. Nós observamos que os pacientes mais jovens apresentaram uma sobrevida maior e este fato está de acordo com o verificado na literatura (Kleihues e cols., 2007; Das e cols., 2011; Appin e cols., 2013).

C.2 Resultados das análises laboratoriais

C.2.1 Frequências das alterações encontradas através das análises das sondas *EGFR/CEP7* e *PTEN/CEP10* e comparação com os dados da literatura

A amplificação do gene *EGFR* é uma das alterações mais comuns encontradas nos glioblastomas. Na revisão da literatura, observou-se uma grande variabilidade entre a frequência de casos com amplificação do *EGFR* nas diferentes amostras estudadas pela técnica de FISH (21,88% a 65,00%) (Tabela 45). Uma vez que os autores usaram critérios diferentes para determinar se houve amplificação, averiguou-se a possibilidade da variabilidade estar relacionada à escolha do critério de análise. No entanto, ao comparar a frequência de amplificação entre os grupos que usaram critérios diferentes, não observamos diferença estatística (Tabela 46). É provável que esta variabilidade esteja relacionada à alta heterogeneidade observada na morfologia dos glioblastomas, o que leva uma mesma amostra tumoral a apresentar áreas com grande concentração de amplificação contrastando com áreas sem amplificação (Klink e cols., 2011; Little e cols., 2012). Embora se tente contornar este viés analisando-se diferentes quadrantes da lâmina hibridizada, este cuidado não afasta a possibilidade da perda de regiões tumorais que não estejam presentes nos cortes teciduais analisados nas lâminas.

Não houve diferença significativa ao comparar a frequência de amplificação do *EGFR* observada neste trabalho com a frequência total observada na literatura (Tabela 47).

Tabela 45. Trabalhos da literatura que observaram amplificação do *EGFR*, através da análise da técnica de FISH, em amostras de glioblastomas de pacientes adultos, e comparação das frequências de amplificação com o presente trabalho.

	Critério para amplificação do <i>EGFR</i>		Número total de núcleos analisados	N	Casos com amplificação	Frequência (%)	Comparação com o presente trabalho
Kouwenhoven, 2009	I > 2		200	233	51	21,88	p = 0,0829
Nagasaka, 2007	I* ≥ 2	> 10%	200	20	5	25,00	p = 0,2868
K-DeMasters, 2005	I > 2		100	20	5	25,00	p = 0,2868
Layfield, 2006	I ≥ 2		40	34	9	26,47	p = 0,2707
K-DeMasters, 2006	I > 2		100	25	7	28,00	p = 0,3397
Gaiser, 2009	I > 2,2		60	93	28	30,10	p = 0,3204
Burger, 2001	I > 2		?	79	25	31,64	p = 0,3772
Korshunov, 2005	I* > 2	> 10%	200	189	60	31,74	p = 0,3580
Jha, 2010	I* > 2	> 10%	200	38	12	32,00	p = 0,4101
Rodriguez, 2008	I > 2		100	27	9	33,33	p = 0,4834
Quan, 2005	I > 2		40	107	36	33,64	p = 0,4370
Appin, 2013	> 10 sinais <i>EGFR</i>	> 10%	200	187	65	34,75	p = 0,4674
Mott, 2008	I > 2		100	129	45	34,88	p = 0,4773
Toth, 2009	I ≥ 2		60	20	7	35,00	p = 0,5474
Korshunov, 2004	I* > 2	> 10%	300	114	46	40,35	p = 0,5238
Smith, 2001	I > 1,2		?	111	46	41,44	p = 0,4866
Faulkner, 2014	I ≥ 2		30	51	22	43,13	p = 0,4503
Hobbs, 2012	I ≥ 2		60	532	231	43,42	P = 0,7959
Little, 2012	> 5 sinais <i>EGFR</i>	1 célula	100	240	106	44,00	p = 0,3821
Kakkar, 2011	I* > 2	> 10%	200	22	10	45,45	p = 0,4290
Joensuu, 2005	> 7 sinais <i>EGFR</i>	> 10%	50	47	22	46,80	p = 0,3446
Coulibaly, 2010	I ≥ 2		200	99	47	47,47	p = 0,2953
Ruano, 2009	> 5 sinais <i>EGFR</i>	> 5%	?	147	75	51,02	p = 0,1911
Das, 2011	I* > 2	> 10%	200	7	4	57,14	p = 0,3275
Kim, 2010	I* ≥ 2	> 10%	100	84	48	57,14	p = 0,0934
Lopez-Gines, 2010	I > 2		100	35	22	62,85	p = 0,0638
Okada, 2003	I > 3		100	14	9	64,28	p = 0,1202
Hinkle, 2011	I > 2		60	40	26	65,00	p = 0,0410
Presente trabalho	I* > 2	> 10%	200	21	8	38,09	

I: índice total de sinais *EGFR/CEP7*, I*: índice de sinais *EGFR/CEP7* em cada célula (o resultado deve ser encontrado em > de 10% das células do tumor)

Tabela 46. Comparação da frequência de amplificação do *EGFR* entre o grupo da literatura que usou o critério do índice total de sinais *EGFR/CEP7* e o grupo que usou o critério do índice de sinais *EGFR/CEP7* em cada célula.

Amplificação do <i>EGFR</i>	Índice por célula		Índice total		Teste do χ^2
	N	%	N	%	
Sim	347	40,58	625	37,90	p = 0,2025
Não	508	59,42	1024	62,10	
Total	855		1649		

Tabela 47. Comparação da frequência de amplificação do *EGFR* entre o total de casos da literatura e o presente trabalho.

Amplificação do <i>EGFR</i>	Trabalhos da Literatura		Presente trabalho		Teste do χ^2
	N	%	N	%	
Sim	1078	39,28	8	38,09	p = 0,3151
Não	1666	60,72	13	61,91	
Total	2744		21		

A polissomia do cromossomo 7 também é uma alteração comum nos glioblastomas e frequentemente está acompanhada da amplificação do gene *EGFR* (Tabela 48). Esta associação foi observada por nós em 75% dos casos de amplificação (Tabela 44).

A frequência de polissomia do cromossomo 7, detectada pela técnica de FISH, apresenta grande variação entre os diferentes trabalhos da literatura (18,18% a 95,65%). Observa-se, também, que os autores utilizam critérios diferentes para caracterizar a polissomia do cromossomo 7 nas amostras (Tabela 48). É possível que esta variação esteja relacionada tanto com os diferentes critérios utilizados como com a heterogeneidade dos tumores.

Ao comparar a frequência de polissomia do 7 deste trabalho com o conjunto total de pacientes da literatura, não observamos diferença significativa (Tabela 49).

Tabela 48. Trabalhos da literatura que observaram polissomia do cromossomo 7, através da análise da técnica de FISH, em amostras de glioblastomas de pacientes adultos, e comparação das frequências de polissomia do 7 com o presente trabalho.

	Critério para polissomia 7*	Número total de núcleos analisados	N	Casos com polissomia 7	Frequência na amostra (%)	Comparação com o presente trabalho
Coulibaly, 2010	?	200	99	18	18,18	p = 0,0019
Kakkar, 2011	>10%	20	22	5	22,73	p = 0,0444
Kouwenhoven, 2009	>10%	200	230	68	29,56	p = 0,0311
Rodriguez, 2008	>30%	100	48	16	33,33	p = 0,1110
Smith, 2001	>10%	?	111	43	38,73	p = 0,1774
Korshunov, 2004	>10%	300	114	67	58,77	p = 0,3777
K-DeMasters, 2005	>30%	100	20	14	70,00	p = 0,2020
K-DeMasters, 2006	>10%	100	25	20	80,00	p = 0,0468
Amalfitano, 2000	>8%	100	64	52	81,25	p = 0,0116
Benito, 2010	>15%	100	40	34	85,00	p = 0,0080
Korshunov, 2005	>20%	200	189	171	90,47	p < 0,0001
Lopez-Gines, 2010	?	100	35	32	91,42	p = 0,0013
Klink, 2011	>20%	200	23	22	95,65	p = 0,0011
Presente trabalho	>20%	200	21	11	52,38	

*Percentual de células (com mais de 2 sinais CEP7) necessário para que a amostra seja considerada positiva para polissomia do cromossomo 7

Tabela 49. Comparação da frequência de polissomia do cromossomo 7 entre o total de casos da literatura e o presente trabalho.

Polissomia 7	Trabalhos da Literatura		Presente trabalho		Teste do X ²
	N	%	N	%	
Sim	562	55,09	11	52,39	p = 0,9791
Não	458	44,91	10	47,61	
Total			21		

Na nossa amostra, tanto a amplificação do *EGFR* como a polissomia do cromossomo 7 não foram observadas nos pacientes que apresentavam glioblastoma secundário. Este dado concorda com os fatos da literatura que revelam que as

alterações de ganho do cromossomo 7 são muito comuns nos glioblastomas primários mas não costumam ocorrer nos glioblastomas secundários (Joensuu e cols., 2005; Ohgaki e Kleihues, 2013).

As perdas no cromossomo 10 são as alterações genéticas mais frequentes dos glioblastomas, ocorrendo em 60% a 80% dos casos. Muitos glioblastomas apresentam perda de uma cópia inteira do cromossomo 10, mas estudos da perda da heterozigidade já identificaram pelo menos 3 regiões comumente deletadas: 10p14-p15, 10q23-24 e 10q25-qter. Entre elas, a perda da heterozigidade da região contendo o gene *PTEN* (10q23) é observada em 75% a 95% dos glioblastomas (Kleihues e cols., 2007). Neste trabalho, as perdas do cromossomo 10 foram igualmente frequentes e ocorreram em 76,19% dos casos, nas formas de monossomia do cromossomo 10 (47,61%), deleção do braço longo do cromossomo 10 (38,09%) e deleção do *PTEN* em homozigose (4,76%).

Ao revisar a frequência de monossomia do cromossomo 10 nos estudos de FISH publicados na literatura, observamos uma grande variabilidade entre as diferentes amostras (16,38% a 82,60%) (Tabela 50). No entanto, ao compararmos a frequência de monossomia do 10 encontrada no presente trabalho com o total de casos da literatura, não observamos diferença significativa (Tabela 51).

Tabela 50. Trabalhos da literatura que observaram monossomia do cromossomo 10, através da análise da técnica de FISH, em amostras de glioblastomas de pacientes adultos, e comparação das frequências de monossomia 10 com o presente trabalho.

	Critério para monossomia 10*	Número total de núcleos analisados	N	Casos com monossomia 10	Frequência na amostra (%)	Comparação com o presente trabalho
Kouwenhoven, 2009	?	200	238	39	16,38	p = 0,0017
Rodriguez, 2008	>60%	100	54	17	31,48	p = 0,1494
Korshunov, 2004	>50%	300	114	36	31,57	p = 0,1211
Korshunov, 2005	>50%	200	189	60	31,74	p = 0,1127
Wessels, 2003	?	100	10	6	60,00	p = 0,3983
Benito, 2010	?	100	37	26	70,27	p = 0,0773
Amalfitano, 2000	>17%	100	64	49	76,56	p = 0,0146
Klink, 2011	>30%	200	23	19	82,60	p = 0,0161
Presente trabalho	>50%	200	21	10	47,61	

*Percentual de células (com 1 sinal CEP10) necessário para que a amostra seja considerada positiva para monossomia do cromossomo 10

Tabela 51. Comparação da frequência de monossomia do cromossomo 10 entre o total de casos da literatura e o presente trabalho.

Monossomia 10	Trabalhos da Literatura		Presente trabalho		Teste do χ^2
	N	%	N	%	
Sim	252	34,56	10	47,61	p = 0,3151
Não	477	65,44	11	52,39	
Total	729		21		

A revisão da literatura nos mostra que há poucos autores utilizando a técnica de FISH como método para estudar a perda da heterozigidade da região do gene *PTEN*. Outras técnicas, como análise de microsatélites e SNP *array*, têm sido mais escolhidas, talvez porque elas permitam a detecção de outros tipos de alterações como a perda da heterozigidade sem alteração do número de cópias (Kuga e cols., 2008).

Ao analisar a deleção do *PTEN* em homozigose ou hemizigose, detectada pela técnica de FISH, observamos muita discordância entre os achados da literatura. Srividya e cols. (2011) foram os únicos autores que encontraram deleção em homozigose entre os pacientes estudados, e este achado ocorreu em 42,46% dos casos. Na nossa amostra, esta alteração ocorreu apenas em 1 paciente, o que difere estatisticamente do achado da literatura ($p= 0,0032$). A deleção em hemizigose, que foi observada por 4 autores da literatura, não ocorreu em nenhum dos nossos casos (Tabela 52). As diferenças observadas por nós podem estar relacionadas ao pequeno tamanho da nossa amostra e a pouca quantidade de amostras da literatura.

Tabela 52. Trabalhos da literatura que observaram deleção do gene *PTEN*, através da análise da técnica de FISH, em amostras de glioblastomas, e comparação das frequências de deleção com o presente trabalho.

	Número total de núcleos analisados	N	Casos com deleção em homozigose	Frequência na amostra (%)	Casos com deleção em hemizigose	Frequência na amostra (%)
Srividya, 2011	100	73	31	42,46	0	0,00
Suri, 2009*	200	18	0	0,00	1	5,55
Korshunov, 2004	300	114	0	0,00	61	53,50
Korshunov, 2005	200	189	0	0,00	111	58,73
Korshunov ^b , 2005*	200	44	0	0,00	27	61,36
Presente trabalho	200	21	1	4,76	0	0,00

*Amostras constituídas por crianças e adultos jovens

Utilizando como critério o índice total de sinais *PTEN/CEP10* em cada amostra tumoral, analisado através da técnica de FISH, os autores da literatura encontraram deleção do braço curto do cromossomo 10 em 31% a 44% dos

pacientes analisados. Estas frequências não diferiram daquela observada no presente trabalho (Tabela 53).

Tabela 53. Trabalhos da literatura que observaram deleção do braço longo do cromossomo 10, através da análise da técnica de FISH, em amostras de glioblastomas de pacientes adultos, e comparação das frequências de del10q com o presente trabalho.

	Critério para deleção 10q	Número total de núcleos analisados	N	Casos com del10q	Frequência na amostra (%)	Comparação com o presente trabalho
Rodriguez, 2008	I < 0,8	100	22	7	31,81	p = 0,4554
Smith, 2001	I < 0,9	?	107	48	44,85	p = 0,3731
Presente trabalho	I < 0,8	200	21	8	38,09	

I: índice total de sinais *PTEN*/CEP10

Na nossa amostra, observamos que todos os casos que apresentaram amplificação do gene *EGFR* apresentaram, também, perda da heterozigosidade do cromossomo 10. De acordo com a classificação molecular proposta por Verhaak e cols. (2010), estes casos devem pertencer ao subtipo “clássico” dos glioblastomas onde a amplificação do *EGFR* associada à perda do cromossomo 10 é vista em 100% dos casos. Ainda assim, a análise de outros marcadores genéticos como *TP53*, 1p19q e *CDKN2A* auxiliaria a melhor classificar os tumores neste subgrupo. A classificação dos glioblastomas nestes subtipos pode ajudar a compreender melhor o comportamento clínico destes tumores heterogêneos e pode auxiliar na escolha de terapias alternativas futuras, desenhadas especificamente para os subtipos tumorais.

C.2.2 Correlação entre os resultados das alterações encontradas nas análises das sondas *EGFR/CEP7* e *PTEN/CEP10* e o prognóstico dos pacientes

Uma das principais finalidades dos estudos genéticos na patologia dos tumores tem sido correlacionar as alterações genéticas com o prognóstico dos pacientes (Appin e cols., 2013). Na nossa amostra, nós observamos que os pacientes pertencentes ao grupo com deleção no braço longo do cromossomo 10 (envolvendo a região do gene *PTEN*) apresentaram pior prognóstico, com redução no período de sobrevida, em relação aos que não apresentaram esta alteração. Nós observamos que esta correlação não foi influenciada pela idade dos pacientes no momento do diagnóstico. Tal fato está de acordo com o que foi observado por Smith e cols. (2001) e por Korshunov e col. (2005). A piora do prognóstico deve estar relacionada à perda da função da proteína *PTEN* que não pode mais exercer a sua função de supressor tumoral.

Não houve correlação entre as alterações envolvendo o cromossomo 7 (amplificação do gene *EGFR* e polissomia do cromossomo 7) e o prognóstico dos pacientes. Embora fosse esperado que a amplificação do gene *EGFR* tivesse exercido influência sobre a piora do prognóstico (Korshunov e cols., 2004; Korshunov e cols., 2005; Coulibaly e cols., 2010; Kim e cols., 2010; McNamara e cols., 2013), vários trabalhos da literatura também não perceberam diferença em relação à sobrevida (Joensuu e cols., 2005; Quan e cols., 2005; Layfield e cols., 2006; Rodriguez e cols., 2008; Lopez-Gines e cols., 2010; Hobbs e cols., 2012; Faulkner e cols., 2014), sendo que alguns autores observaram uma melhora, com prolongamento da sobrevida (Smith e cols., 2001; Kleinschmidt-DeMasters e cols., 2006).

É provável que a amplificação do gene *EGFR* exerça influências complexas sobre a evolução dos glioblastomas e a elucidação do mecanismo patológico ainda necessita de mais estudos.

No nosso trabalho, o número pequeno de pacientes da amostra pode ter influenciado a ausência de mais respostas sobre o impacto das alterações genéticas dos tumores na sobrevida dos pacientes.

Referências bibliográficas

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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.

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

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

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

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

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

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

Kouwenhoven MC, Gorlia T, Kros JM, Ibdaih A, Brandes AA, Bromberg JE, et al. Molecular analysis of anaplastic oligodendroglial tumors in a prospective randomized study: A report from EORTC study 26951 *Neuro Oncol.* 2009 Dec;11(6):737-46.

Kuga D, Mizoguchi M, Guan Y, Hata N, Yoshimoto K, Shono T, et al. Prevalence of copy-number neutral LOH in glioblastomas revealed by genomewide analysis of laser-microdissected tissues. *Neuro Oncol.* 2008 Dec;10(6):995-1003.

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

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

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

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

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

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

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 Oct 1;64(19):6892-9.

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

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

Omuro A, DeAngelis LM. Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review. *Jama*. 2013 Nov 6;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 Oct;16 Suppl 4:iv1-iv63.

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

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

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

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

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

Suri V, Das P, Pathak P, Jain A, Sharma MC, Borkar SA, et al. Pediatric glioblastomas: a histopathological and molecular genetic study. *Neuro Oncol*. 2009 Jun;11(3):274-80.

Toth J, Egervari K, Klekner A, Bogнар L, Szanto J, Nemes Z, et al. Analysis of EGFR gene amplification, protein over-expression and tyrosine kinase domain mutation in recurrent glioblastoma. *Pathol Oncol Res*. 2009 Jun;15(2):225-9.

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 Jan 19;17(1):98-110.

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

Anexo D. Protocolo ClínicoPROTOCOLO DE TUMORES ENCEFÁLICOSSERVIÇO DE NEUROLOGIA E NEUROCIRURGIA DR MARIO COUTINHO

NOME: _____

REGISTRO: _____ SEXO: _____ DATA DE NASCIMENTO: ___/___/___

IDADE (anos) : _____ DATA DA CIRURGIA: ___/___/___

INTERNAÇÃO: ___/___/___ ALTA: ___/___/___ TEMPO DE INTERNAÇÃO: ___ dias

PROCEDÊNCIA: _____ FONE: (____) _____

APRESENTAÇÃO CLÍNICA:

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

COMORBIDADES:

ANTECEDENTES:

 consanguinidade parental tipo: _____ história familiar de câncer

familiar: _____ idade no diagnóstico: _____ neoplasia: _____

familiar: _____ idade no diagnóstico: _____ neoplasia: _____

 história pessoal de câncer neoplasia: _____

Idade no diagnóstico: _____

LOCALIZAÇÃO DO TUMOR:

HIDROCEFALIA: sim não DVP

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

 Ressecção total Ressecção subtotal _____% retirado Biópsia

VIA DE ABORDAGEM:

ANATOMO-PATOLÓGICO:

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

COMPLICAÇÕES CIRÚRGICAS:

TRATAMENTO COMPLEMENTAR:

() quimioterapia - protocolo: _____

() Radioterapia - dose: _____

DATA DA ÚLTIMA REVISÃO: ____/____/____

() vivo SEM doença _____ meses após a cirurgia

() vivo COM doença estável _____ meses após a cirurgia

() vivo COM doença em progressão _____ meses após a cirurgia

óbito _____ meses após a cirurgia DATA DO ÓBITO: ____/____/____

Anexo E. 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
TC LE
APROVADO

30

Anexo F. Ficha de análise ao microscópio

Ficha de análise de FISH – Glioblastomas

Caso: _____ Lâmina: _____ Sonda: _____ Data: _____

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

Imagens:

Anexo G. Parecer do Comitê de Ética

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

-