

CLASSIFICAÇÃO DOS SUBTIPOS MOLECULARES DE GLIOBLASTOMAS POR MEIO DE PAINEL IMUNOISTOQUÍMICO

ROGÉRIO MENDES GRANDE

**Tese apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do título de Doutor
em Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

**Orientadora: Dra. Maria Dirlei Ferreira Souza
Begnami**

São Paulo

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Grande, Rogério Mendes

Classificação dos subtipos moleculares de glioblastomas por meio de painel imunoistoquímico / Rogério Mendes Grande – São Paulo, 2017.
116p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração:
Oncologia.

Orientadora: Maria Dirlei Ferreira Souza Begnami

Descritores: 1. Neoplasias/Neoplasms. 2. Sistema Nervoso Central/
Central Nervous System. 3. Glioblastoma/Glioblastoma. 4. Tipagem
Molecular/Molecular Typing.

DEDICATÓRIA

Dedico todo meu esforço e tempo à minha amada esposa Sonia e a meu amado filho Felipe, presente maior de Deus para iluminar e preencher nossas vidas.

À Míriam, minha amiga de sempre, e sempre presente nos momentos difíceis e bons de minha vida.

Ao meu avô, Mário Boaventura Mendes (*in memoriam*), que sempre esteve e estará presente em minhas lembranças e em meu coração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente neste trabalho, em especial:

À minha querida orientadora, Dra Maria Dirlei Ferreira de Souza Begnami pela paciência e por todos os valiosos ensinamentos;

Ao Prof. Dr Fernando Augusto Soares pelas oportunidades;

À minha mãe, exemplo de caráter e luta, e ao meu pai;

Aos queridos amigos Fiorita, Hélder e André pela compreensão diária.

À Ana Maria A Rodrigues Kuninari pelo carinho de sempre.

À querida Suely Francisco pela formatação de minha tese e sorriso acolhedor;

Ao Dr José Ivanildo Neves, pela realização do FISH EGFR e pelos esclarecimentos técnicos;

À Marina França de Resende, pelas reações imuno-histoquímicas;

À Lucilene, bibliotecária da UNIVAS, por toda ajuda com as referências bibliográficas.

Ao amigo Vinícius Fernando Causavara pelas análises estatísticas.

RESUMO

Grande GM. **Classificação dos subtipos moleculares de glioblastomas por meio de painel imunoistoquímico.** São Paulo; 2017. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS: O Glioblastoma (GBM) é o tumor maligno mais frequente do sistema nervoso central (SNC) do adulto, apresenta prognóstico muito ruim, sendo que a maioria dos pacientes morre no primeiro ano após o diagnóstico, não obstante a modalidade de tratamento empregada. Os GBMs são classificados em primários e secundários, conforme características histológicas, clínicas e evolutivas da neoplasia relacionadas às alterações genéticas próprias e, recentemente, foram descritos subtipos moleculares: clássico, mesenquimal e proneural, separados por padrões de expressão gênica, protéica e características clínicas distintas. O uso de agentes alquilantes, como a Temozolamida, associado à radioterapia tem sido o principal tratamento adjuvante dos GBMs, entretanto, a grande maioria destes tumores apresenta alto índice de recidivas. O objetivo principal foi a classificação dos subtipos moleculares de GBMs utilizando a expressão das proteínas IDH1, EGFR, p53, CD44, MERTK, OLIG2, ATRX e MGMT. Avaliou-se, ainda, o número de cópias do gene EGFR por hibridização “in situ” fluorescente (FISH). **MATERIAL E MÉTODOS:** Em 59 casos de GBMs as expressões de IDH1, EGFR, p53, CD44, MERTK, OLIG2 e ATRX foram detectadas por imunoistoquímica, e permitiram a subclassificação molecular desses tumores. Utilizou-se, ainda, a técnica de FISH com sonda para EGFR. Os resultados foram correlacionados com as características clínico-patológicas dos pacientes, resposta terapêutica e sobrevida. **RESULTADOS:** A média de idade dos pacientes foi de 51 anos, com média de KPS inicial de 80%. A maioria dos GBMs era localizada nas regiões temporal (25,4%), frontal (20,3%) e parietal (20,3%), com tamanho médio de 4,71 cm. O tempo médio de sobrevida foi

de 19,99 meses, sendo que o segmento médio dos pacientes foi de 43,9 meses. De acordo com o painel de marcadores utilizados neste estudo os GBMs foram subclassificados nos subtipos moleculares proneural (42,4%), mesenquimal (35,6%) e clássico (22,0%). Em relação à imunoexpressão dos anticorpos houve associações entre a expressões positivas de IDH1 e OLIG2, entre OLIG2 e GBM secundário e proneural, além de associação entre ATRX e sexo dos pacientes. Os GBMs secundários mostraram positividade para IDH1, enquanto que os GBMs primários foram IDH1 negativos. Os GBMs subtipo proneural estão associados à positividade de IDH1, os tumores subtipo molecular clássico são caracterizados pela positividade imunoistoquímica para EGFR e / ou amplificação de EGFR, negatividade para IDH1 e os GBMs mesenquimais apresentaram negatividade imunoistoquímica para tanto para IDH1 e EGFR, ausência de amplificação de EGFR e positividade para MERTK e / ou CD44. As taxas de sobrevida globais dos pacientes com GBMs estão associadas à idade do paciente, localização do tumor, positividade para IDH1 e ao tratamento com quimioterapia e radioterapia. O subtipo molecular proneural apresenta as melhores taxas de sobrevida dentre os pacientes com GBMs.

SUMMARY

Grande GM. **[Molecular subtypes classification of glioblastomas by immunohistochemical panel]**. São Paulo; 2017. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

INTRODUCTION AND AIMS: Glioblastoma (GBM) is the most common malignant primary brain tumor in adults and exhibits striking aggressiveness. Most patients die in the first year after the diagnosis, regardless of the treatment modality used. According to specific genetic pathways of onset and evolution and clinical, gbms are classified into primary and secondary. Recently, classic, mesenchimal and proneural molecular subtypes have been described:, separated by gene and protein patterns of expression, in addition to distinct clinical characteristics. The use of alkylating agents, such as Temozolamide, associated with radiotherapy has been the main adjuvant treatment of GBMs, however, the vast majority of these tumors have a high relapse rate. The main objective this study was to classify the molecular subtypes of GBMs through IDH1, EGFR, p53, CD44, MERTK, OLIG2, ATRX and MGMT proteins immunoexpression. We also evaluated *EGFR* gene number of copies by fluorescent "in situ" hybridization (FISH). The results were correlated with the clinical-pathological characteristics of the patients, therapeutic response and overall survival. **MATERIAL AND METHODS:** In 59 cases of GBMs the expressions of IDH1, EGFR, p53, CD44, MERTK, OLIG2, ATRX and MGMT proteins were detected by immunohistochemistry, and allowed molecular subclassification of these tumors. FISH with EGFR probe was used to detect gene amplification. **RESULTS:** The mean age of the patients was 51 years, and the mean initial KPS was 80%. The majority of GBMs were located in the temporal (25.4%), frontal (20.3%) and parietal (20.3%) lobes of the brain, with an average size of 4.71 cm. The mean survival time was 19.99 months, and the mean segment of the patients was 43.9 months. According to the panel of markers used in this study, the GBMs

were subclassified into the proneural (42,4%),mesenchymal (35.6%) and classic (22,0%) molecular subtypes. In relation to the immunoexpression of the antibodies there were associations between the positive expressions of IDH1 and OLIG2, OLIG2 and secondary and proneural GBMs, besides association between ATRX and the gender of the patients. Secondary GBMs showed positivity for IDH1, whereas the primary GBMs were IDH1 negative. Secondary GBMs showed positivity for IDH1, whereas primary GBMs were IDH1 negative. The GBMs proneural subtype are associated with IDH1 positivity, classic molecular subtype tumors are characterized by IDH1 negativity, immunohistochemical positivity for EGFR and / or EGFR amplification, and the mesenchymal GBMs showed immunohistochemical negativity for both IDH1 and EGFR, absence EGFR amplification and positivity to MERTK and / or CD44. The overall survival rates of patients with GBMs are associated with patient age, IDH1 positivity, and treatment with chemotherapy and radiotherapy. The proneural molecular subtype presents the best survival rates among patients with GBMs. The proneural molecular subtype presents the best survival rates among patients with GBMs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Classificação de 2016 da OMS para os Tumores do Sistema Nervoso Central.....	4
Figura 2	Aspecto microscópico do glioblastoma (grau IV, OMS).....	7
Figura 3	Resumo das alterações genéticas associadas aos glioblastomas primários e secundários.....	9
Figura 4	Diagrama explicando a ação de agentes alquilantes (Temozolomida) nos gliomas, e o respectivo reparo pela proteína MGMT.....	15
Figura 5	Olig2 trifosforilada em sua porção N-terminal reduz a acetilação de p53, o que limita sua capacidade de suprimir a progressão do ciclo celular e induzir fatores pró-apoptóticos.....	25
Figura 6	Fluxograma demonstrando a obtenção dos casos do estudo.....	33
Figura 7	Imunoexpressão dos marcadores IDH1, OLIG2 e ATRX.....	52
Figura 8	Imunoexpressão dos marcadores MERTK, CD44, p53 e MGMT.....	53
Figura 9	Imunoexpressão do marcador EGFR.....	54
Figura 10	Técnica de Hibridização <i>in situ</i> Fluorescente (FISH), com sonda para EGFR.....	57

Figura 11	Classificação dos subtipos moleculares de GBMs de acordo com painel de imunoexpressão das proteínas IDH1, EGFR, MERTK / CD44.....	58
Figura 12	Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier dos pacientes em relação à faixa etária.....	65
Figura 13	Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier dos pacientes em relação à localização topográfica do GBM.....	66
Figura 14	Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier dos pacientes em relação à radioterapia adjuvante.....	67
Figura 15	Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier dos pacientes em relação ao tipo de GBM.....	68
Figura 16	Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier dos pacientes em relação ao subtipo molecular de GBM.....	69
Figura 17	Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier dos pacientes em relação à imunoexpressão de IDH1.....	74

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Distribuição dos achados de imunoexpressão proteica entre os subtipos moleculares dos GBMs.....	12
Quadro 2	Escala de desempenho de Karnofsky.....	27
Quadro 3	Informações importantes sobre o protocolo de cada marcador	37
Quadro 4	Descrição dos anticorpos utilizados no estudo.....	38
Quadro 5	Valores dos escores finais para categorização dos casos em relação à interpretação da imunoistoquímica para p53, MGMT, ATRX, CD44, MERKT e OLIG2.....	40
Quadro 6	Critérios para a interpretação dos resultados da imunoexpressão de HER-2 em carcinomas da mama utilizados para a determinação de hiperexpressão de EGFR nos GBMs.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição dos pacientes em relação aos dados demográficos e clínicos.....	49
Tabela 2	Resultados das análises das expressões proteicas dos anticorpos IDH1, p53, MERTK, CD44, OLIG2, ATRX, MGMT e EGFR nos GBMs.....	51
Tabela 3	Resultados de hibridização <i>in situ</i> fluorescente para EGFR.....	55
Tabela 4	Correlações entre o subtipo molecular do GBM, a imunoexpressão dos anticorpos e as variáveis clinico-patológicas dos pacientes.....	59
Tabela 5	Correlações entre as variáveis clinico-patológicas dos pacientes e a imunoexpressão dos anticorpos.....	62
Tabela 6	Sobrevivência dos pacientes em relação aos dados demográficos, clínicos e histológicos.....	70
Tabela 7	Análise univariada dos parâmetros dados demográficos, clínicos e histológicos.....	72
Tabela 8	Sobrevivência dos pacientes em relação à expressão protéica dos marcadores estudados e FISH com sonda para <i>EGFR</i>	75
Tabela 9	Análise univariada da expressão imunoistoquímica dos marcadores pesquisados.....	76

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATRX	Gene da alfa talassemia/síndrome de retardo mental ligado ao X.
CBTRUS	<i>Central Brain Tumor Registry of the United States Statistical</i>
CEP	Região centromérica do cromossomo
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i> (receptor do fator de crescimento epidérmico)
FISH	<i>Fluorescent in situ hybridization</i> (hibridização <i>in situ</i> fluorescente)
GBM	Glioblastoma
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i> (Proteína Fibrilar Glial Ácida)
Gy	Gray
HER2	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i> (receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2)
IDH1	Isocitrato desidrogenase -1
INCA	Instituto Nacional do Câncer
KPS	<i>Karnofsky performance status</i> (estatus de performance de Karnofsky)
MERTK	Proto-oncogene tirosino-quinase C-MER.
MGMT	O6-Metilguanina-DNA Metiltransferase
NADH	Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídeo
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo-nicotinamida-adenina
OLIG2	Oligodendrocyte transcription factor 2 (fator transcripcional oligodendrocítico 2)
OMS/WHO	Organização Mundial da Saúde/World Health Organization
PDGFR	<i>Platelet-derived growth factor receptor</i> (receptor de fator de crescimento derivado de plaqueta)
SNC	Sistema Nervoso Central.
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i> (Atlas Genoma Câncer).
TP53	<i>Tumor protein p53</i> (Proteína tumoral p53).
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> (fator de crescimento endotelial vascular)

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Aspectos Gerais – Definição e Epidemiologia do Glioblastoma	1
1.2	Classificação Histopatológica do Gliomas	3
1.3	Aspectos Morfológicos dos Glioblastomas	5
1.4	Glioblastomas Primários e Glioblastomas Secundários	8
1.5	Classificação Molecular dos Glioblastomas.....	10
1.5.1	Alterações moleculares do gene MGMT nos glioblastomas	12
1.5.2	Alterações moleculares do gene Isocitrato desidrogenase 1 (IDH1) .	15
1.5.3	Alterações moleculares do Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR)	20
1.5.4	Alterações moleculares do gene <i>TP53</i> nos glioblastomas	21
1.5.5	Alterações moleculares do gene <i>ATRX</i> nos glioblastomas	22
1.5.6	Alterações moleculares do gene <i>CD44</i> nos glioblastomas.....	22
1.5.7	Alterações moleculares do gene <i>MERTK</i> nos glioblastomas	23
1.5.8	Alterações moleculares do gene <i>OLIG2</i> nos glioblastomas	24
1.6	Escala de Resultados ou Desempenho de Karnofsky	26
1.7	Tratamento do Glioblastoma.....	28
2	JUSTIFICATIVA.....	30
3	OBJETIVOS	31
3.1	Objetivo Primário	31
3.2	Objetivos Secundários.....	31
4	METODOLOGIA	32
4.1	Casuística.....	32
4.1.1	Crterios de Inclusão	32
4.1.2	Crterios de Exclusão.....	33
4.2	Análises das Expressões Proteicas por imunoistoquímica.....	34

4.3	Interpretações das reações imunoistoquímicas.....	38
4.4	Técnica de Hibridização <i>In Situ</i> Fluorescente (FISH) para Pesquisa de Amplificação do Gene <i>EGFR</i>	41
4.5	Classificação dos subtipos moleculares de GBMs	43
4.6	Classificação dos tipos de GBM primário e secundário e classificação molecular de GBMS	43
4.5	Análises Estatísticas.....	44
5	RESULTADOS.....	46
5.1	Dados demográficos e clínicos dos pacientes.....	46
5.2	Resultados das análises das expressões proteicas dos anticorpos ..	50
5.3	Resultados das Hibridizações <i>in situ</i> Fluorescente (FISH)	54
5.4	Classificação dos Glioblastomas.....	57
5.4.1	Classificação dos glioblastomas primários e secundários	57
5.4.2	Classificação dos subtipos moleculares de glioblastomas	58
5.5	Análises das correlações entre as variáveis clinico-patológicas dos pacientes	60
5.6	Análises das correlações entre os marcadores de imunoistoquímica	60
5.7	Análises das correlações entre as variáveis e a expressão imunoistoquímica dos marcadores estudados.....	61
5.8	Análises das correlações entre as variáveis e os resultados de fish para EGFR	64
5.9	Análises das taxas de sobrevida global dos pacientes com GBMs ...	64
5.9.1	Análises univariadas das taxas de sobrevida global dos pacientes em relação aos dados demográficos, clínicos e histológicos	65
5.9.2	Sobrevivência dos pacientes em relação à expressão proteica dos marcadores estudados e presença de amplificação do EGFR ...	74
6	DISCUSSÃO	78
7	CONCLUSÕES	101

8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102
----------	---	------------

ANEXO

Anexo 1 Carta de aprovação Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS – DEFINIÇÃO E EPIDEMIOLOGIA DO GLIOBLASTOMA

Os gliomas são tumores cerebrais primários derivados da proliferação descontrolada de células gliais, que compreendem os astrócitos e oligodendrócitos. Entre as neoplasias astrocitárias o glioblastoma (GBM) assume notável importância, tanto pela alta frequência, ao representar pelo menos 60% das neoplasias malignas, como por se tratar da neoplasia de maior grau de malignidade. Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), para 2016/2017, foram estimados 5540 casos novos de câncer do SNC em homens e 4.830 em mulheres, totalizando 10370 casos. Esses valores correspondem a um risco estimado de 5,50 casos novos a cada 100 mil homens e 4,68 a cada 100 mil mulheres (Ministério da Saúde 2016). O GBM ocorre, mais frequentemente, após os 50 anos, com um pico na sexta década, sendo raro no grupo pediátrico, mas, quando surge, atinge crianças na primeira década de vida. Há discreto predomínio do sexo masculino, com proporção de 1,3-1,5:1, sendo também mais frequente na raça branca (CHAKRABARTI 2005; JEMAL et al. 2011). Nas últimas décadas, as taxas de incidência e de mortalidade associadas aos tumores do SNC aumentaram na maioria dos países desenvolvidos, principalmente nas faixas etárias mais avançadas (JEMAL et al. 2011). Estudos recentes apontam

aumento de 5% ao ano na incidência de GBM em pacientes acima de 65 anos e aumentos ainda mais significativos de 30% para 254% na faixa etária acima dos 75 anos (CHAKRABARTI 2005). Anatomicamente, os GBMs localizam-se principalmente na substância branca subcortical da região supratentorial. As regiões mais comumente acometidas são lobos frontal, temporal, fronto-parietal, parietal, temporo-parietal e nas regiões occipito-parietais (cerca de 5% dos casos). São pouco comuns no terceiro ventrículo e raramente ocorrem na região infratentorial, fossa posterior e medula espinhal. A maioria dos GBMs (90%) apresenta crescimento rápido com sinais e sintomas de curta duração, ou seja, de instalação recente, usualmente menor que três meses. Os sinais e sintomas apresentados pelos pacientes resultam de um modo geral, da infiltração ou compressão pelo tumor no tecido cerebral normal, do edema peritumoral e da hemorragia que se manifestam como cefaleias, náuseas, vômitos, paresias, afasias e déficits visuais. A vascularização cerebral e o líquido cefalorraquidiano podem também estar comprometidos, levando a déficits neurológicos progressivos e ao aumento da pressão intracraniana (KLEIHUES et al. 2007; JEMAL et al. 2011). A hemorragia tumoral geralmente está associada aos gliomas de alto grau, ocorrendo em 5 a 8% dos GBMs. Aproximadamente um terço dos pacientes apresenta epilepsia e alterações de comportamento (BRANDES et al. 2008a). A sobrevida dos pacientes acometidos por essa neoplasia na grande maioria dos casos é extremamente curta, com médias variando entre 9 a 12 meses a partir do diagnóstico. A maioria morre em 2 anos e menos de 5% sobrevive a 5 anos (STUPP et al. 2005; BRANDES et al. 2008a).

1.2 CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DOS GLIOMAS

Ao longo dos anos os gliomas têm sido classificados pela microscopia óptica de acordo com os tipos celulares predominantes e graduados segundo a presença ou ausência de características histológicas específicas: atipias nucleares, presença de mitoses, proliferação de células endoteliais e necrose. O grau tumoral final é dependente do acúmulo dessas características sendo o **grau 1**: ausência das características; **grau 2**: presença de somente uma característica, geralmente atipia nuclear; **grau 3**: presença de 2 características usualmente atipia nuclear e presença de figuras de mitoses; **grau 4**: presença de 3 ou 4 características (DAUMAS e SZIKLA 1981).

Em 1979, a Organização Mundial de Saúde (OMS), publicou um sistema de classificação englobando todos os tumores do SNC. Conhecido como WHO System (“blue books”) foi posteriormente revisado nos anos de 1993, 2000 e 2007 (KLEIHUES et al. 2007; LOUIS et al. 2007). Em 2016, foi publicada a última revisão e pela primeira vez adicionou parâmetros moleculares às características histológicas para definição de entidades tumorais como o GBM IDH-selvagem, GBM IDH-mutado, glioma difuso da linha média H3K27M mutado (LOUIS et al. 2016), contextualizando e estruturando o diagnóstico dos tumores do SNC na era molecular. O objetivo dessa atual classificação dos tumores do SNC, observada na Figura 1, foi de facilitar estudos clínicos, experimentais e epidemiológicos com o evidente

propósito de impactar numa melhora do tratamento e sobrevida dos pacientes.

Classificação da Organização Mundial de Saúde para os Tumores do SNC	
Tumores Astrocitários Difusos e Oligodendrogliais	
Astrocitoma difuso, IDH-mutado	
Astrocitoma gemistocítico, IDH-mutando	
Astrocitoma difuso, IDH-selvagem	
Astrocitoma difuso, NOS	
Glioblastoma, IDH-selvagem	
Glioblastoma de células gigantes	
Gliosarcoma	
Glioblastoma de células epitelióides	
Glioblastoma, IDH-mutado	
Glioblastoma, NOS	
Glioma difuso da linha média, H3 K27M-mutado	
Oligodendroglioma, IDH-mutado e 1p/19q codeletado	
Oligodendroglioma, NOS	
Oligodendroglioma anaplásico, IDH-mutado e 1p/19q codeletado	
Oligodendroglioma anaplásico, NOS	
Oligoastrocitoma, NOS	
Oligoastrocitoma anaplásico, NOS	

Fonte: Adaptado de LOUIS et al. (2016).

Figura 1 - Classificação de 2016 da OMS para os Tumores do Sistema Nervoso Central

1.3 ASPECTOS MORFOLÓGICOS DOS GLIOBLASTOMAS

Os GBM se apresentam macroscopicamente como massas tumorais distintas e mal delimitadas no cérebro, com superfícies de corte amareladas, evidenciando-se áreas de necrose central em 80% dos casos, hemorragias e cistos irregulares. RUSSELL e RUBINSTEIN (1989) descreveram GBMs múltiplos em 2,3% dos casos. À histologia, os GBMs são neoplasias heterogêneas, compostas por astrócitos anaplásicos com acentuado pleomorfismo celular, intensas atipias nucleares e elevada atividade mitótica. Proliferação endotelial é proeminente e há frequentes áreas de necrose, características essenciais para o diagnóstico. Podem ser identificados dois tipos principais de necrose. O primeiro tipo é decorrente da insuficiência do suprimento sanguíneo nas células neoplásicas, geralmente está associada aos GBMs primários e ao pior prognóstico. Esse tipo de necrose pode ser identificada em exames de neuroimagem e geralmente comprometem mais de 80% da área tumoral. Microscopicamente, caracteriza-se pela presença de células tumorais necróticas associadas a vasos sanguíneos dilatados (BURGUER e GREEN 1987). O segundo tipo é consequente à apoptose das células tumorais em virtude da hipóxia. Ocorre igualmente em GBMs primários e secundários. É caracterizada por múltiplos focos de áreas serpiginosas circundados por células tumorais fusiformes dispostas em “padrão de pseudopaliçada” (Figura 2). A área central é constituída por rede fibrilar delicada acelular. As células da pseudopaliçada expressam intensamente VEGF (PLATE et al. 1992). Os GBMs podem apresentar

células gigantes ou fusiformes, ou ainda, pequenas células (OHGAKI et al. 1999; LOUIS et al. 2016). A presença de astrócitos gemistocíticos, células com núcleo excêntrico e citoplasma volumoso, róseo e homogêneo (aspecto hialino), que sintetizam abundantes quantidades de GFAP, pode ser fator indicativo de progressão tumoral a partir de astrocitomas de menor grau de malignidade (KLEIHUES et al. 2007). A proliferação microvascular observada nos GBMs, é tipicamente formada por vasos com camada muscular e pericitos, sendo revestidos por células endoteliais dispostas em múltiplas camadas com atividade mitótica (HADDAD et al. 1992). O grau e a extensão da imunoexpressão de GFAP são variáveis nos GBMs, podendo ser incomum nos GBMs de pequenas células (OHGAKI et al. 1999). Os GBMs podem apresentar intensa atividade proliferativa, com média de 15-20% (MASTRONARDI et al. 1999).

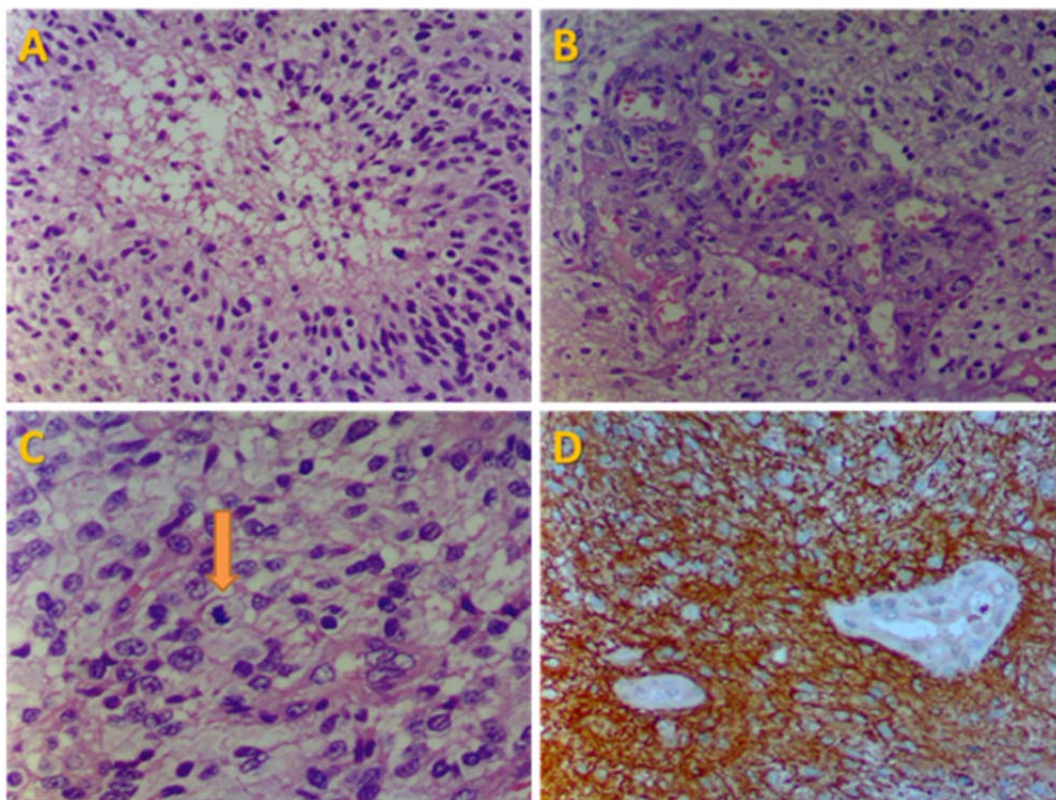


Figura 2 - Aspecto microscópico do glioblastoma (grau IV, OMS). A – Fotomicrografia evidenciando área de necrose em aspecto de “pseudopaliçada” (H&E, tamanho original 100x); B – Presença de neovascularização / formação de pseudoglomerulos (H&E, tamanho original 100x); C – Figura de mitose identificada pela seta (H&E, tamanho original 200x); D – Detecção imunoistoquímica de GFAP em glioblastoma evidenciando padrão de coloração da superfície celular (tamanho original 100x).

1.4 GLIOBLASTOMAS PRIMÁRIOS E SECUNDÁRIOS:

Os GBMs podem ser divididos segundo o tipo histológico e evolutivo, em primários ou secundários (OHGAKI e KLEIHUES 2013). GBMs primários são os mais frequentes e não mostram evidência clínica ou histopatológica de lesão precursora de baixo grau pré-existente. Estes, tipicamente acometem pacientes mais velhos (média de 62 anos) e frequentemente mostram alterações no gene *EGFR*, com amplificações presentes em torno de 40% dos casos. Perdas de expressão *de**p16*^{/NK4a} estão presentes em 31% dos casos e mutações de *PTEN* estão presentes em 25% destes tumores (KLEIHUES et al. 1994).

Os GBMs secundários originam-se da progressão de gliomas de baixo grau, ou seja, gliomas graus II e III que se transformam com o tempo em gliomas de alto grau (OHGAKI e KLEIHUES 2007). Eles acometem principalmente pacientes jovens, apresentam predileção pelo lobo frontal e são menos frequentes, representando menos que 10% de todos os GBMs. O tempo de transformação dos astrocitomas difusos grau II para GBM varia consideravelmente, com intervalos de 1 até 10 anos, com média entre 4 a 5 anos. A sobrevida dos pacientes com GBMs secundários é significativamente maior do que aqueles com GBM primários. Os GBMs secundários são caracterizados por mutações de *TP53*, mutações de *IDH1*, mutações de *ATRX* e ausência de amplificações de *EGFR* (OHGAKI e KLEIHUES 2007; PARSONS et al. 2008; HARTMANN et al. 2010; JANSEN e LOUIS 2010).

OHGAKI e KLEIHUES (2013) fizeram uma ampla revisão dos aspectos epidemiológicos, clínicos, histopatológicos e genéticos dos GBMs primários e secundários (Figura 3). Apesar de apresentarem padrões histológicos similares, os GBMs primários e secundários são entidades tumorais distintas, uma vez que se originam de diferentes células precursoras, necessitando, portanto, de abordagens terapêuticas exclusivas (OHGAKI e KLEIHUES 2013).

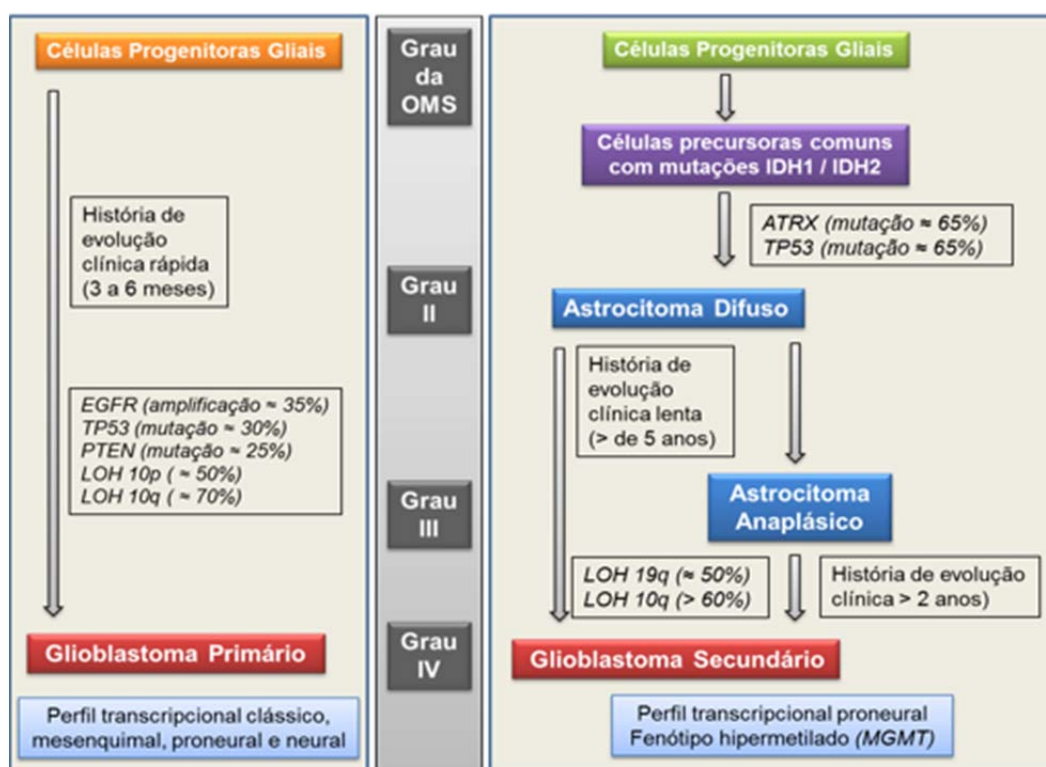


Figura 3 - Resumo das alterações genéticas associadas aos GBMs primários e secundários

1.5 CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DOS GLIOBLASTOMAS

Em 2010, pesquisadores do The Cancer Genome Atlas-TCGA de acordo com as características clínicas e de expressão gênica descreveram quatro subtipos distintos de GBMs: Clássico, Proneural, Mesenquimal e Neural (VERHAAK et al. 2010). Wang et al. (2017), definem estratégia para determinar a transcrição do subtipo molecular do GBM associado aos subtipos de expressão do imuno-ambiente tumoral. Entretanto, discute a existência do subtipo neural.

De acordo com esta classificação, os GBMs clássicos são os mais frequentes, caracterizados por níveis elevados de expressão de *EGFR* e ausência de mutações do gene *TP53*. Os GBMs Proneurais apresentam mutações dos genes *TP53*, *IDH1*, *ATRX*, *PDGFR-A*, podendo também apresentar hipermetilação do promotor do gene *MGMT*. Clinicamente, acometem pacientes mais jovens, que caracteristicamente apresentam altas taxas de resposta terapêutica ao tratamento clássico com Temozolamida (TMZ) e radioterapia, apresentando portanto as melhores taxas de sobrevida. Esse subtipo molecular está associado aos GBMs secundários. O subgrupo mesenquimal apresenta mutações no gene *NF1*, *PTEN* e *TP53*, além de amplificação do *EGFR* e mutações de genes associados à via de sinalização de *Akt*. Acometem com maior frequência os indivíduos mais velhos. O subgrupo neural é caracterizado pela expressão de genes que também são expressos no cérebro normal, células não cancerosas e neurônios. VERHAAK et al. (2010) não observaram associação entre o status de hipermetilação do promotor do gene *MGMT* e os subtipos

moleculares de GBM. Entretanto, OHGAKI e KLEIHUES (2013) verificaram GBMs perfil transcricional proneural com fenótipo hipermetilado de *MGMT*.

A maior limitação do emprego clínico desta subclassificação está no seu elevado custo, bem como na dificuldade operacional, devido à necessidade de pessoal qualificado e treinado em técnicas moleculares. Contudo, é evidente a importância do reconhecimento desses subtipos devido à associação com os desfechos clínicos e possibilidades de tratamentos específicos individualizados. Nesse sentido, alguns trabalhos recentemente publicados mostram a viabilidade desta subclassificação através do uso da imunoistoquímica, utilizando expressões protéicas de EGFR, p53, IDH1, CD44, MERKT e OLIG1 (LE MERCIER et al. 2012; CONROY et al. 2014; POPOVA et al. 2014; TANBOON et al. 2016). Desta forma, os GBMs clássicos são positivos para EGFR e negativos para p53 e IDH1. Os GBMs proneurais são IDH1, OLIG2 e p53 positivos e ATRX negativos. Os GBMs mesenquimais são positivos para as proteínas relacionadas à transição epitélio-mesênquima, como MERKT e CD44 e negativos para EGFR. Tomados em conjunto esses dados de literatura, reunimos no Quadro 1 os achados de imunoexpressão proteica para os anticorpos IDH1, EGFR, p53, MERTK, CD44, ATRX, OLIG2 e MGMT frequentemente associados aos GBMs primário e secundário, bem como os subtipos moleculares dos GBMs.

Quadro 1 - Distribuição dos achados de imunexpressão proteica entre os subtipos moleculares dos GBMs

Subtipos moleculares de GBM	EGFR	IDH1	p53	OLIG2	ATRX	MERTK	CD44	MGMT
Proneural	-	+	+	+	-			- / +
Clássico	+	-	-	-	+			- / +
Mesenquimal	-	-				+	+	- / +
Tipo de GBM	EGFR	IDH1	p53	OLIG2	ATRX	MERTK	CD44	MGMT
Primário	+	-	-	-	+			- / +
Secundário	-	+	+	+	-			-

Fonte: Adaptado de LE MERCIER et al. (2012), CONROY et al. (2014), POPOVA et al. (2014), TANBOON et al. (2016).

1.5.1 Alterações moleculares do gene *MGMT* nos glioblastomas

O gene *MGMT* está localizado no cromossomo 10q e codifica uma proteína, denominada de O⁶-alkylguanine DNA alkyltransferase (MGMT ou AGT), que atua no processo de reparo do DNA removendo radicais alquila do oxigênio da posição 6 (O⁶) das guaninas. A adição de radicais alquila ao O⁶ da guanina é uma importante fonte de mutações, pois a O⁶-metil-guanina, durante a replicação do DNA, faz o pareamento com a timina e não com a citosina, acarretando a troca de pares guanina-citosina por adenina-timina (BRANDES et al. 2008b). Além disso, a O⁶-metil-guanina pode formar ligações cruzadas com citosinas da fita de DNA complementar, impedindo a sua replicação.

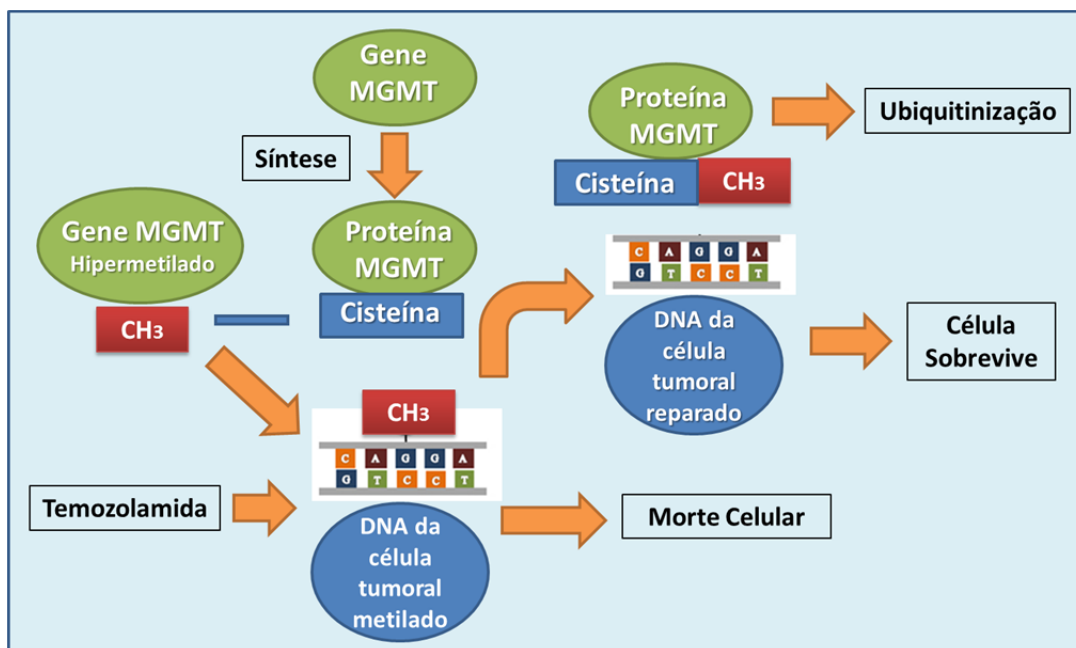
A proteína codificada pelo gene *MGMT* participa no reparo do DNA transferindo os grupos alquila do O⁶ das guaninas para um sítio receptor na sua própria estrutura, e então se desliga do DNA sendo degradada por ubiquitinação (JACINTO e ESTELLER 2007; KAINA et al. 2007).

Um dos mecanismos que causam a perda de expressão do gene *MGMT* é a hipermetilação nas ilhas de CpGs em suas regiões promotoras (ESTELLER et al. 2000). NAKAMURA et al. (2001) demonstraram este mecanismo associado à vários tipos de neoplasias humanas como os carcinomas de cabeça e pescoço, colorretal, linfomas, câncer de mama, câncer de endométrio e leucemias. Também já foi demonstrado que a inativação epigenética da expressão de *MGMT* por hipermetilação, pode estar associada à mutação do gene *K-Ras*, exercendo um papel importante no desenvolvimento do GBM (JESIEN-LEWANDOWICZ et al. 2009). A hipermetilação do promotor do gene *MGMT* tem sido descrita em cerca de 20a50% dos GBMs (ESTELLER et al. 1999; MIKESKA et al. 2007; MARTINEZ e ESTELLER 2010).

Por décadas, o tratamento de escolha para o GBM foi a cirurgia seguida de radioterapia adjuvante. Contudo, a grande maioria destes tumores apresenta um alto índice de recidivas locais, independentes das doses e do tipo de radiação utilizadas (HEGI et al. 2005). Os GBMs são frequentemente resistentes aos tratamentos quimioterápicos devido a alguns fatores como: 1. baixa capacidade de penetração da droga na barreira hematoencefálica; 2. proliferação clonal de células neoplásicas resistentes decorrentes de alterações moleculares como instabilidade genômica, novas mutações, perdas de heterozigose; 3. aumento da capacidade de invasão das células neoplásicas; 4. alteração do mecanismo de reparo de DNA (RODRIGUEZ et al. 2008). Recentemente, foi demonstrado que a adição da TMZ ao tratamento radioterápico gera baixos efeitos de toxicidade

promovendo importante benefício aos pacientes (Medical Research Council Brain Tumor Working Party 2001). Portanto, a radioterapia pós-operatória seguida de quimioterapia com TMZ tem sido considerada a terapia de escolha para a maioria dos pacientes com GBM. Estudos posteriores, demonstraram uma forte associação entre o estatus de metilação das ilhas de CpG na região promotora do gene *MGMT* e melhores taxas de resposta terapêutica ao uso de TMZ (STUPP et al. 2005), Figura 4.

A pesquisa da hipermetilação na região promotora do gene *MGMT* pode ser realizada por várias metodologias. O pirosequenciamento (quando tratado com pirossulfito de sódio) é uma das técnicas mais utilizadas e apresenta diversas vantagens em relação aos demais métodos como: 1. permite a avaliação de diversos sítios de CpG, não sendo necessário a restrição àqueles presentes nos iniciadores e/ou sondas; 2. não requer o sequenciamento de diversos clones; e 3. permite a quantificação dos sítios de CpG (NORDSTROM et al. 2002; RAJEEVAN et al. 2006). Esta técnica tem sido considerada como o melhor método para uso em material fixado em formalina e embocado em parafina (MIKESKA et al. 2007).



Fonte: MARTÍNEZ (2012).

Figura 4 - Diagrama explicando a ação de agentes alquilantes (Temozolomida) nos gliomas, e o respectivo reparo pela proteína MGMT. A Temozolamida introduz resíduos alquila na posição O⁶ da guanina, lesando o DNA da célula tumoral. A proteína MGMT reverte essa formação transferindo o grupo alquila da posição O⁶ da guanina para cistina ativa em sua molécula. MGMT alquilado é degradado por ubiquitinação. Quando ocorre hipermetilação do promotor do gene MGMT, o resíduo alquila transferido para o DNA da célula tumoral pela Temozolamida permanece e lesa preferencialmente o DNA da célula maligna levando à apoptose. Como consequência, pacientes com hipermetilação do promotor do gene *MGMT* possuem melhor resposta ao tratamento quimioterápico adjuvante com Temozolamida.

1.5.2 Alterações moleculares do gene Isocitrato desidrogenase1 (IDH1)

As isocitrato desidrogenases (IDHs) são enzimas que catalizam a descarboxilação oxidativa do isocitrato em alfa-cetoglutarato (α -KG), também conhecida como 2-oxoglutarato (2-OG) e NADPH no ciclo de Krebs. Durante esse processo, NAD⁺ ou NADP⁺ são respectivamente reduzidos a NADH ou NADPH, dependendo da isoforma que catalisa a reação. Em tecidos de mamíferos, três isoformas distintas foram descritas: IDH1 (IDH

citossólica NADP^+); IDH2 (IDH mitocondrial NADP^+) e IDH3 (IDH mitocondrial NAD^+). As isoformas IDH1 e IDH2 são semelhantes em 70% de suas estruturas. Ambas funcionam como homodímeros, são dependentes de NADP^+ e mostram moderada expressão em grande variedade de tecidos, incluindo o cérebro. A IDH1 é ativa no citosol e peroxissomos enquanto a IDH2 possui localização mitocondrial. A presença desta enzima nos peroxissomos sugere sua participação na regeneração das reduções intraperoxissomais do NADPH, bem como nas reações peroxissomais que consomem a 2-oxoglutarato. A enzima citoplasmática indica uma participação significativa na produção do NADPH citoplasmático (ENTREZ GENE 2011). A IDH3 está presente nas mitocôndrias, é dependente de NAD^+ , apresenta estrutura sem relação com as isoformas IDH1 e IDH2, e funciona como um heterodímero com três subunidades (XU et al. 2004).

A atividade das proteínas IDH1 e IDH2 em células normais é regulada pela disponibilidade de substrato e cofatores, sendo estas reações reversíveis. A IDH1, é uma enzima solúvel codificada nos seres humanos pelo gene *IDH1* localizado no cromossomo 2. A estrutura da proteína IDH1 tipo selvagem exibe homólogo do homodímero com um domínio grande, um domínio de fecho (clasp domain) e um domínio pequeno. Cada homodímero contém dois sítios ativos idênticos e assimétricos, sendo cada um deles composto por uma fenda formada pelos domínios grande e pequeno do outro homólogo *IDH1*. Os sítios ativos são expostos ao solvente e são acessíveis ao substrato e cofatores. O domínio de fecho mantém as duas subunidades unidas para formar o sítio ativo. A proteína IDH1 alterna entre

as conformações aberta (inativa), semiaberta (transição) e fechada (ativa com função catalítica). Ela dimeriza com dois sítios ativos na conformação aberta (inativa), mantida por interações intramoleculares entre os resíduos Ser94 e Asp279, bloqueando o acesso ao sítio ativo. Os resíduos Asp279 estão posicionados onde normalmente a isocitrato forma pontes de hidrogênio com Ser94. Durante as duas etapas catalíticas da descarboxilação do isocitrato em α -KG, a IDH1 adota a formação ativa (fechada), em que o impedimento estérico pelo Asp279 para se ligar ao complexo isocitrato-magnésio (Mg^{2+}) é desfeito, e ele pode se ligar entre os domínios grande e pequeno da enzima (XU et al. 2004; ENTREZ GENE 2011). A reação se processa com a produção de α -KG e NADPH, seguida pela reocupação do sítio ativo por outro complexo isocitrato- Mg^{2+} ou pela restauração das interações entre Ser94-Asp279 na conformação aberta (inativa) da enzima. PARKER e METALLO (2015), fizeram extensa revisão das alterações no metabolismo intermediário e outras funções celulares relacionadas à IDH1 com mutação, bem como nas consequências epigenéticas. Esta enzima é crítica para o metabolismo da glicose, glutamina, NADPH, aminoácidos e lipídios.

As mutações no gene *IDH1* em GBMs foram identificadas em 2008 por PARSONS et al., que realizaram uma ampla análise genômica, onde 20661 genes codificadores de proteínas foram sistematicamente sequenciados em 22 GBMs. Mutações somáticas e recorrentes do *IDH1* que afetam o resíduo de arginina (R) no códon 132 do sítio ativo da enzima foram encontradas em 12% dos casos, especialmente nos pacientes mais jovens,

com GBMs secundários. Esse grupo de pacientes apresentava, ainda, um aumento significativo na sobrevida global. Em um pequeno grupo de pacientes com GBM sem mutações do *IDH1*, foram identificadas mutações somáticas recorrentes no gene *IDH2*, embora numa frequência menor. Essas mutações estavam no códon R172, homólogo ao códon R132 do gene *IDH1* (YAN et al. 2009). Em contraste ao que ocorre com os GBMs secundários, as mutações do *IDH1* ou *IDH2* foram encontradas em uma minoria dos GBMs primários (<5-10%) (PARSONS et al. 2008; NOBUSAWA et al. 2009; YAN et al. 2009; MOLENNAR et al. 2014a).

Durante o processo de gliomagenese foram encontradas mutações nos genes *IDH1* ou *IDH2*. Os demais genes, *IDH3a*, *IDH3B* e *IDH3G* não foram implicados na gliomagenese. Todas as mutações *IDH1* e *IDH2* encontradas nos GBMs, de acordo com estes autores, são somáticas, heterozigóticas e sem sentido (missense). Elas tipicamente afetam o códon R132 no gene *IDH1* e seu homólogo R172 no gene *IDH2*. Mais de 90% das mutações do gene *IDH1* no códon R132 levam a uma alteração na histidina, sugerindo este ser um ponto seletivo para esta mutação (LIU et al. 2015). As mutações do gene *IDH2* ocorrem predominantemente em tumores oligodendrogiais (HARTMANN et al. 2009).

A presença de mutações dos genes *IDH1* ou *IDH2* em gliomas mostra associação com algumas características clínicas e histopatológicas como por exemplo a menor média de idade dos pacientes ao diagnóstico. Nos GBMs secundários a média de tempo entre o primeiro sintoma clínico e o diagnóstico histopatológico é significativamente maior nos pacientes com

mutações de *IDH* do que em pacientes com *IDH* selvagem (NOBUSAWA et al. 2009; YAN et al. 2009).

As mutações do gene *IDH* em gliomas mostram associações significantes com outras alterações genéticas e epigenéticas, tais como co-deleção dos cromossomos 1p/19q (WATANABE et al. 2009) e o status de hipermetilação do promotor do gene *MGMT* (MELLAI et al. 2011; MELLAI et al. 2012; MOLENAAR et al. 2014b). Apresentam correlação inversa com amplificação do *EGFR*, deleções de *CDKN2A/CDKN2B* e mutações do *PTEN* (WATANABE et al. 2009; MELLAI et al. 2011; MELLAI et al. 2012; MUKASA et al. 2012).

A maioria dos GBMs secundários com mutações do gene *IDH1* também apresenta mutações de *TP53*. OGURA et al. (2015), analisaram a imunoexpressão de *IDH1*, *p53* e *MGMT* em GBMs. Esses autores verificaram maiores taxas de sobrevida global para os pacientes com tumores com mutação em *IDH1*, associados ao aumento da expressão de *p53* e perdas de expressão da proteína *MGMT*. Desta maneira, propuseram a aplicação de um painel imunoistoquímico simplificado para a caracterização imunofenotípica dos GBMs, relacionando a combinação da expressão dessas três proteínas (*IDH1*, *p53* e *MGMT*), como possível fator prognóstico. Em 2014, WANG et al., já haviam demonstrado a associação entre a hipermetilação do promotor do *MGMT* e mutação de *TP53* e *IDH1* como fatores prognósticos dos GBMs. Dados prévios demonstraram uma sequencia temporal de eventos genéticos e epigenéticos durante a gliomagenese, onde a mutação de *IDH1* seria o evento mais precoce

(WATANABE et al. 2009), seguido de mutações de *TP53* (MELLAI et al. 2011), nas populações de células gliais precursoras comuns.

1.5.3 Alterações moleculares do Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR) nos glioblastomas

O *EGFR* faz parte da família dos receptores de crescimento epidérmico que compreende quatro membros: HER-1 (EGFR), HER-2, HER-3, HER-4. O gene *EGFR* codifica uma proteína transmembrana com um domínio extracelular e um componente intracelular, que inclui o domínio tirosina-quinase, associado as vias de transdução PI3K/AKT/mTOR, RAS/RAF//MAPK e JAK/STAT. A ativação do domínio tirosino-quinase se dá por inúmeros ligantes, entre eles o EGF e o TGF α . Desta forma, o aumento da expressão da proteína ou aumento do número de cópias do gene resultam na proliferação de células tumorais, imortalização das mesmas pela supressão da apoptose, angiogênese, e formação de metástases pela interferência na adesão e migração celular em diversos tumores humanos (HERBST 2004).

Alterações no gene *EGFR* tem sido demonstradas em até 60% dos GBMs, promovendo o crescimento tumoral e sobrevivência celular por meio da ativação persistente de rede de sinalização e reprogramação metabólica (OHGAKI e KLEIHUES 2007; CLOUGHESY et al. 2014; FURNARI et al. 2015; LIU et al. 2015). O subtipo molecular clássico do GBM apresenta a maior frequência de amplificação do *EGFR* (VERHAAK et al. 2010; LE MERCIER et al. 2012; CONROY et al. 2014; POPOVA et al. 2014).

1.5.4 Alterações moleculares do gene *TP53* nos glioblastomas

O gene *TP53*, supressor tumoral, conhecido como "guardião do genoma", possui papel crucial na manutenção da estabilidade genética e consequente prevenção no desenvolvimento do câncer. A presença de lesão celular normalmente ativa o gene *p53* que codifica uma proteína conhecida como proteína supressora tumoral, a p53, induzindo uma série de respostas celulares, tais como reparação celular e sobrevivência ou, de maneira alternativa, a morte celular programada. As isoformas de p53 são diferencialmente expressas em vários tipos de tumores humanos e exibem várias funções biológicas, modulando funções de atividade transcricional e supressora de tumores (KHOURY e BOURDON 2010; SURGET et al. 2014).

Os GBMs secundários frequentemente apresentam mutações do gene *TP53*, podendo a proteína p53 mutada estar presente em quase 70% dos casos (WANG et al. 2014a). A mutação de *TP53* associada à mutação de *IDH1* e hipermetilação do promotor do *MGMT* nestes tumores tem sido associado à melhor prognóstico com ganho nas taxas de sobrevida globais (WANG et al. 2014a; OGURA et al. 2015).

1.5.5 Alterações moleculares do gene *ATRX* nos glioblastomas

O gene da alfa talassemia/síndrome de retardo mental ligado ao X (*ATRX*), codifica uma proteína fundamental na neurogênese. Está associado às chaperonas que atuam na remodelação da cromatina e segregação cromossômica (BÉRUBE et al. 2005). Mutações somáticas foram inicialmente identificadas em GBMs pediátricos. Análises genéticas

identificaram mutações em 3,4% de GBMs em adultos, muito mais frequentes nos GBMs secundários (80%) e incomuns nos primários (7%). As alterações do gene *ATRX* se sobrepõem às mutações em *IDH1/2* e *TP53* (LIU et al. 2012), ocorrem em pacientes mais jovens. Acredita-se que ocorram como evento molecular tardio, sucedendo às outras alterações genéticas (REUSS et al. 2015; EBRAHIMI et al. 2016). A perda de expressão protéica de *ATRX* se relaciona ao subgrupo de tumores gliais com prognóstico mais favorável (WIESTLER et al. 2013).

1.5.6 Alterações moleculares do gene *CD44* nos glioblastomas

O gene *CD44* codifica glicoproteína de membrana homônima que pertence à superfamília dos receptores de imunoglobulina. Existem onze isoformas, sendo a primária expressa em quase todas as células de maneira constitutiva, enquanto que as demais isoformas variantes do *CD44* (*CD44v1-v10*) apresentam distribuição mais restrita, associada à invasão e capacidade metastática presente nas células neoplásicas (GOODISON et al. 1999; MOONEY et al 2016).

Diversos trabalhos tem demonstrado que os gliomas apresentam aumento da expressão de *CD44*. RANUNCOLO et al. (2002) avaliaram a imunoexpressão do *CD44* em GBMs e observaram marcação em mais de 70% das células neoplásicas, especialmente da isoforma *CD44v5* (MOONEY et al 2016). Nesse mesmo estudo, verificou-se a correlação entre a maior expressão de *CD44* e a pior taxa de sobrevida global, além de associação com idade, sexo e estatus de desempenho de Karnofsky (KPS).

Esses autores concluíram, portanto, que a maior expressão dessa proteína poderia ser relevante em determinar os gliomas com maior capacidade de invasão. Em estudo posterior constatou-se a alta expressão de CD44 no GBM subtipo molecular mesenquimal (POPOVA et al. 2014).

1.5.7 Alterações moleculares do gene *MERTK* nos glioblastomas

O proto-oncogene tirosino-quinase C-MER (*MERTK*) codifica uma enzima com propriedades oncogênicas que frequentemente está hiperexpressa ou ativada em vários tumores, como em melanomas e tumores cerebrais (PARINOT e NANDROT 2016). A sinalização do *MERTK* possui um papel primário na sobrevivência celular, alterações do citoesqueleto e migração, sem efeitos relevantes na proliferação celular (CUMMINGS et al. 2013). A imunoexpressão de *MERTK* também foi considerada útil na classificação molecular dos subtipos de GBMs, observando-se maior marcação no subtipo mesenquimal (POPOVA et al. 2014).

1.5.8 Alterações moleculares do gene *OLIG2* nos glioblastomas

O gene *OLIG2* (*fator de transcrição oligodendrocítica 2*) codifica um fator de transcrição hélice-alça-hélice básico (bHLH). Esta proteína possui 329 aminoácidos e 32kDa (ROWITCH 2004/2005). É um dos três membros da família bHLH, sendo os outros dois membros o *OLIG1* e *OLIG3*. A expressão de *OLIG2* é restrita ao SNC onde age tanto como anti-neurogênico e neurogênico em diferentes estágios do desenvolvimento

cerebral. Está também envolvido na diferenciação do neurônio motor e da linhagem oligodendrocítica, além de participar na manutenção da replicação em fases iniciais do desenvolvimento (GARBER e NOVITCH 2011; SUN et al. 2011).

A expressão do gene *OLIG2* tem sido observada em distintos tipos de cânceres, sobretudo nos tumores cerebrais. Tem sido frequentemente encontrada nos GBMs e em outros gliomas difusos como os astrocitomas e os oligodendrogliomas. A expressão de *OLIG2* tem sido demonstrada em um subgrupo de células gliais que são altamente tumorigênicas (LIGON et al. 2007). Estudos recentes mostram evidências da participação de *OLIG2* na progressão dos gliomas. Acredita-se que *OLIG2* promova tanto a proliferação de células tronco quanto de células progenitoras bloqueando a via de ação do *TP53*. Tem-se demonstrado que *OLIG2* atua reprimindo diretamente a via efetora do *p21^{WAF1/CIP1}*, através da supressão da acetilação, impedindo a ligação de *TP53* com diversos sítios intensificadores (MEHTA et al. 2011), conforme pode ser observado na Figura 5.



Fonte: Modificado de GABER e NOVITCH (2011)

Figura 5 - Olig2 trifosforilada em sua porção N-terminal reduz a acetilação de p53, o que limita sua capacidade de suprimir a progressão do ciclo celular e induzir fatores pró-apoptóticos

A imunoexpressão de OLIG2 ocorre de maneira predominante no GBM subtipo proneural. KUPP et al. (2016) demonstraram que OLIG2 modula a sinalização de fatores de crescimento por meio da ativação de receptores tirosino-quinase (RTKs), em duas populações distintas de células gliais semelhantes às células tronco, caracterizadas pela expressão de EGFR ou PDGFR- α (AGUIRRE et al. 2007).

Em resumo, os genes previamente descritos apresentam a seguinte associação com a gliomagenese:

- **IDH1R132H** – oncogene, onde a forma mutada se associa com alterações no metabolismo celular e modificações epigenéticas.
- **EGFR** – oncogene, onde há aumento da expressão proteína mutada e / ou aumento do número de cópias do gene.

- **MGMT** – gene supressor tumoral codifica proteína associada ao reparo do DNA. A perda da função geralmente ocorre por metilação do promotor
- **TP53** – gene supressor tumoral da manutenção da estabilidade gênica. A mutação leva à perda de função gênica.
- **ATRX** – oncogene, onde mutações determinam perda da função do transcrito.
- **CD44** – oncogene, onde o transcrito mutado, geralmente isoforma CD44v5 se relaciona com invasão e desdiferenciação.
- **MERTK** – oncogene, onde o ganho de função se relaciona com supressão da apoptose.
- **OLIG** – oncogene, onde o ganho de função bloqueia a atuação de *TP53*.

1.6 ESCALA DE RESULTADOS OU DESEMPENHO DE KARNOFSKY

A escala de resultados ou desempenho de Karnofsky (KPS) é um método amplamente utilizado para avaliar o estado funcional de um paciente. Foi apresentado por David A. Karnofsky e Joseph H. Burchenal em 1949 em um artigo originalmente publicado como um capítulo do livro “*Avaliação de Agentes Quimioterapêuticos*”, editado por Colin M. MacLeod (KARNOFSKY et al. 1948; KARNOFSKY e BURCHENAL 1949). Originalmente intitulado *Performance Status*, o termo atualmente empregado

é uma homenagem ao seu criador. O KPS é a escala mais utilizada para classificar os pacientes de acordo com suas inaptidões ou deficiências funcionais. Permite, ainda, comparar a efetividade de diferentes terapias, bem como avaliar o prognóstico dos pacientes individualmente. A escala de resultados ou desempenho de Karnofsky varia de 100 a 0, onde 100 se refere ao paciente “perfeitamente” saudável e 0 indica o óbito do paciente. Em alguns casos se utiliza intervalos de 10 (Quadro 2).

Quadro 2 - Escala de desempenho de Karnofsky

Apto para atividades normais e para o trabalho. Nenhum cuidado especial é necessário.	100	Normal, nenhuma queixa, nenhuma evidência de doença
	90	Capacitado para atividades normais. Pequenos sinais e sintomas.
	80	Atividade normal com esforço. Alguns sinais e sintomas de doença.
Inapto para o trabalho; Apto para viver em casa e cuidar de muitas de suas necessidades. As quantidades de assistências e suportes são bastante variáveis.	70	Cuidados para si. Incapaz para seguir com as atividades normais ou trabalho ativo.
	60	Requer ajuda ocasional, porém apto a cuidar de muitas de suas necessidades pessoais.
	50	Requer ajuda considerável e frequente assistência médica especializada.
Inapto para cuidar de si mesmo. Requer cuidados hospitalares ou equivalentes especializado. Doença pode estar progredindo rapidamente.	40	Incapacitado. Requer cuidado especial e assistência.
	30	Severamente incapacitado. Admissão hospitalar é indicada, mas a morte não é iminente.
	20	Muito doente. Admissão hospitalar é necessária, requerendo terapia e cuidados intensivo.
	10	Moribundo. Processo de fatalidade progredindo rapidamente.
	0	Morte.

Fonte: Adaptado de KARNOFSKY e BURCHENAL (1949)

O KPS inicial dos pacientes no momento do diagnóstico do GBM tem sido considerado como um fator prognóstico. Em 2007, KREX et al. demonstraram que pacientes com KPS>70 ao diagnóstico de GBM apresentam melhor prognóstico. Sabe-se que o KPS é influenciado por outros aspectos clínicos do paciente como idade e localização do tumor. Pacientes com KPS maiores geralmente são mais jovens e apresentam tumores em hemisférios superficiais. GBMs localizados em regiões profundas, fossa posterior e tronco cerebral invariavelmente se relacionam ao espectro de incapacidades ou deficiências funcionais que determinarão o KPS inicial com valores menores. Apesar de alguma subjetividade, o KPS demonstra grande confiabilidade em refletir a qualidade de vida do paciente. Em 2013, PÉUS et al. propuseram um algoritmo que usa de duas a três perguntas para facilitar uma avaliação adequada e eficiente do KPS, acreditando, assim, que haveria diminuição na subjetividade de seu emprego

1.7 TRATAMENTO DO GLIOBLASTOMA

Após o diagnóstico de suspeição deste tumor, seja por exames de imagem e degradação clínica, ou ainda por meio de biópsias esterotáxicas para comprovação histológica, os pacientes serão assistidos por equipe de manejo tumoral em onconeurologia e onconeurocirurgia. O tratamento padrão inclui a ressecção cirúrgica do maior volume tumoral, preservando-se as funções neurológicas do paciente, associada com radioterapia e ao mesmo tempo por primeira linha de quimioterapia com Temodal

(Temozolomida). Como complemento ao tratamento inicial, ou em casos de recidiva tumoral costuma-se associar a quimioterapia de segunda linha com a droga Avastin (Bevacizumabe), e / ou Camptosar (Irinotecano).

Por mais de 30 anos, a quimioterapia administrada como complemento à radioterapia ou antes da radioterapia foi amplamente investigada em pacientes com GBM, apresentando limitado sucesso. STUPP et al (2005), demonstraram que a adição de quimioterapia com Temozolamida à radioterapia no início do tratamento em cronograma contínuo prolonga significativamente a sobrevivência entre pacientes com GBM recém-diagnosticado, com um aumento médio de sobrevida de 2,5 meses ou uma redução relativa no risco de morte de 37%. Ocorre sinergismo entre essas modalidades de adjuvância. Observaram, ainda, que os efeitos tóxicos induzidos pela quimioterapia foram gerenciáveis. Desta forma, o tratamento adjuvante do GBM com Temozolomida associada à radioterapia no início do tratamento proporciona um benefício de sobrevivência estatisticamente significativo e clinicamente significativo. No entanto, o desafio continua a melhorar ainda mais os resultados clínicos, seja pela avaliação de fatores prognósticos associados, ou pela estratificação dos pacientes conforme subtipo tumoral com características próprias.

2 JUSTIFICATIVA

O GBM é um dos tumores mais estudados em todo o mundo. Tal fato é amplamente justificado pelo fato de se tratar de uma neoplasia com uma das maiores taxas de letalidade entre todos os cânceres humanos conhecidos. Desta forma, muitas classificações já foram propostas baseadas em aspectos histológicos, clínicos, de expressão proteica e expressão gênica na tentativa de se desvendar a intimidade e complexidade deste tumor. A condição *sine qua non* para reunir o conjunto de características próprias a determinado grupo de GBMs é a identificação de subtipos que se associem a fatores prognósticos e que viabilizem terapêutica específica.

Neste cenário, a identificação dos subtipos moleculares, de biomarcadores isolados ou associados dos GBMs são de fundamental importância nas análises dos fatores associados ao prognóstico e resposta terapêutica destes pacientes.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO PRIMÁRIO

Classificar os glioblastomas em seus subtipos moleculares através do perfil de expressão imunoistoquímica de proteínas específicas.

3.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- 1 Determinar as expressões imunoistoquímicas das proteínas IDH1, p53, MERTK, CD44, OLIG2, ATRX, MGMT e EGFR nos GBMs e suas associações com os dados clínicos e subtipos moleculares de GBMs.
- 2 Determinar a presença de amplificação de EGFR por FISH e suas associações com as expressões imunoistoquímicas dos anticorpos pesquisados, com os dados clínicos e os subtipos moleculares de GBMs.
- 3 Determinar as associações entre os subtipos moleculares e os dados clínicos dos pacientes com GBMs.

4 METODOLOGIA

4.1 CASUÍSTICA

Através de banco de dados da patologia para o período de 1997 a 2000 foram identificados 180 casos. Destes, 37 foram selecionados para o estudo. Por meio do programa de busca de dados dos prontuários eletrônicos (RECRUIT) utilizando-se a palavra chave GLIOBLASTOMA, para o período de 2012 a 2014, foram identificados 190 casos, dos quais 15 foram incluídos no estudo. Foram incluídos 7 casos de GBM sabidamente IDH1 positivos. Utilizando-se os critérios de inclusão e exclusão 59 pacientes foram selecionados para o estudo, como observado na Figura 6.

Para este estudo, um banco de dados foi criado contendo as variáveis clínicas dos pacientes como idade ao diagnóstico, gênero, valor do KPS inicial, localização e tamanho aproximado do tumor, tipo de tratamento cirúrgico e adjuvante realizados, de acordo com os dados presentes nos prontuários médicos.

4.1.1 Critérios de Inclusão

O critério de inclusão absoluto foi o diagnóstico histopatológico confirmado de GBM, sendo todos os casos revisados por dois patologistas.

Para isto, os blocos de parafina correspondentes aos tumores, foram resgatados do arquivo da anatomia patológica do departamento de patologia

do A.C.Camargo Cancer Center. Novos cortes histológicos de 3µm de espessura foram realizados e corados por hematoxilina e eosina e o diagnóstico foi realizado de acordo com os critérios histopatológicos da Classificação das Neoplasias do Sistema Nervoso Central estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (KLEIHUES et al. 2007).

4.1.2 Critérios de Exclusão

Foram excluídos deste estudo os casos cujos blocos de parafina dos tumores não foram acessíveis ou cujo material era insuficiente para a realização das técnicas propostas. Da mesma forma, foram excluídos os casos cujos dados dos prontuários eram incompletos, tais como falta ou ausência total das informações clínicas e epidemiológicas dos pacientes.

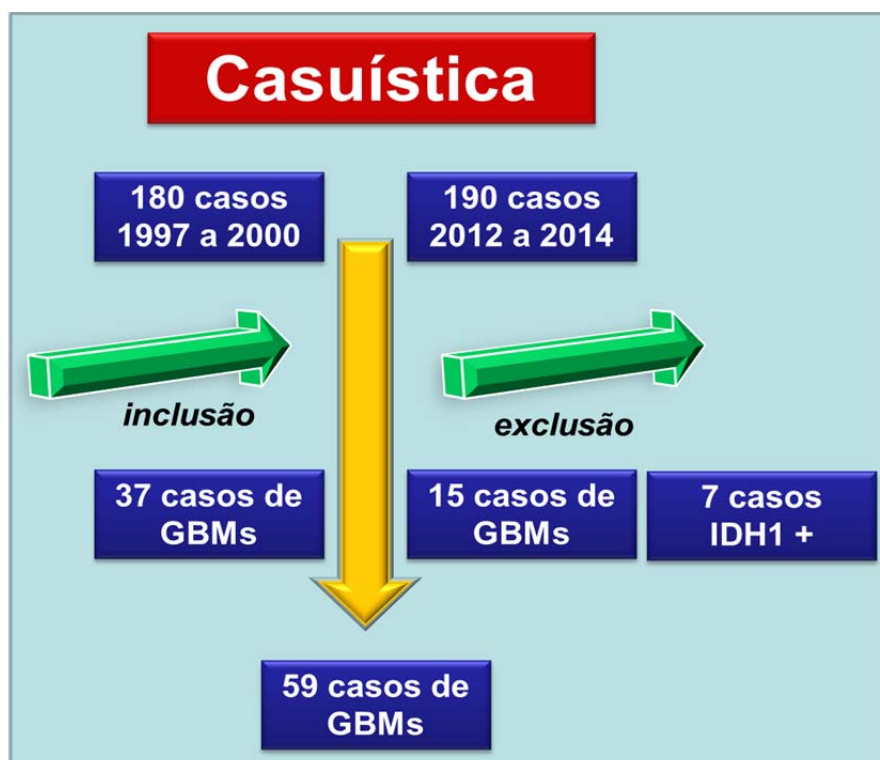


Figura 6 – Fluxograma demonstrando a obtenção dos casos do estudo.

4.2 ANÁLISES DAS EXPRESSÕES PROTEICAS POR IMUNOISTOQUÍMICA

Para a identificação dos subtipos moleculares dos GBMs, a partir das expressões de proteínas previamente selecionadas, foram realizadas as reações imunoistoquímicas em lâminas eletricamente carregadas contendo cortes tradicionais (inteiros) de 3µm de espessura dos tumores selecionados. O protocolo adotado foi o padronizado e utilizado pelo Departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center sendo descrito a seguir:

Reações de imunoistoquímica para IDH1, ATRX, MGMT, EGFR e CD44:

As lâminas foram identificadas com etiquetas de códigos de barras e processadas no equipamento Benchmark XT (Ventana – Roche Diagnostics®) para desparafinização em solução de EZ PREP e recuperação antigênica por calor em solução de pH alto, com temperatura e tempo previamente padronizados para o anticorpo. A peroxidase endógena foi bloqueada por 5 minutos utilizando-se o reagente de bloqueio de peroxidase (ultraView Universal DAB Inhibitor (3% H₂O₂), seguido de lavagem em solução apropriada (Wash-buffer). Em seguida, os cortes foram incubados com anticorpo primário (IDH1–clone H09, Dianova®; p53 – DO7, Dakocytomation®; ATRX – policlonal, Sigma Aldrich®, MGMT – clone MT3.1, Thermo Scientific®; EGFR – clone 3C6, Ventana – Roche Diagnostics® e CD44 – clone SP37, Ventana– Roche Diagnostics®), por tempo previamente padronizado. Na sequência, os cortes foram incubados com polímero HRP

(HRP Multimer) com subseqüentes lavagens em tampão. Logo após, foram incubados com cromógeno Diaminobenzidina (DAB), lavados em tampão e contracolorados com hematoxilina (Hematoxilina II (Ventana Roche Diagnostics®)). Seguiu-se com lavagem com solução própria, água com detergente e água corrente destilada. As lâminas foram desidratadas em álcool, xilol e montadas em equipamento automatizado (Tissue-Tek Film). As informações mais específicas para cada anticorpo utilizado segue abaixo:

Reações de imunoistoquímica para MERTK e OLIG2:

- 1 Desparafinização das lâminas em Xilol a 60°C e à temperatura ambiente por 20 minutos cada etapa. Alcoolização em série decrescente de etanol a 100%, 85% e 70% por 30 segundos cada passagem. Lavar as lâminas em água corrente e destilada.
- 2 Ferver a solução tampão Tris - EDTA (Trizma Base 10mM + EDTA 1 mM) pH 9.0 (Trizma base, Sigma, T1503-500G e EDTA dissódico dihidratado, E5134, St. Louis, MO, EUA) em panela de pressão (Eterna, Nigro®, Araraquara, SP) destampada.
- 3 Mergulhar as lâminas e lacrar a panela com a válvula de segurança aberta. Após a saída do vapor saturado, abaixar a válvula de segurança e aguardar a pressurização total. Cronometrar 3 min e 30 segundos. Deixar a panela fechada sob água corrente até a despressurização total. Destampar a panela com as lâminas e lavar em água corrente e destilada

- 4 Proceder ao bloqueio da peroxidase endógena com solução aquosa de peróxido de hidrogênio a 3% (Rioquímica, São José do Rio Preto, SP), com 4 trocas de 5 minutos cada. Lavar em água corrente e destilada. Incubar as lâminas com o anticorpo primário (MERTK – policlonal de coelho Abgent® e OLIG2 – clone 3C9 – Abnova®), diluído no título previamente estabelecido, (Quadro 3), em tampão PBS contendo albumina bovina (BSA) 1% (Inlab, 1870, São Paulo, SP) e azida sódica (Merck, 6688, Rio de Janeiro, RJ) 0,1%, por 30 min a 37°C e por 18 horas a 4°C em câmara úmida.
- 5 Lavar em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada.
- 6 Incubar as lâminas com Post Primary Block (NovoLink Max Polymer, Leica Biosystems Newcastle Ltd, RE7150-k, Newcastle Upon Tyne, Reino Unido) por 30 min a 37° C. Lavar com tampão PBS com 3 trocas de 3 min cada.
- 7 Incubar com o NovoLink Polymer do kit por 30 min a 37° C. Lavar em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada.
- 8 Incubar as lâminas em solução substrato: 100 mg de 3, 3' Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB) (Sigma, D-5637, St Louis, MO, EUA); 1 mL de Dimetilsulfóxido (J. T. Baker, 9224-03, Center Valley, PA, EUA); 1 mL de solução de peróxido de hidrogênio a 6% (Quimesp Química, Guarulhos, SP); 100 mL de PBS; por 5 minutos a 37°C, ao abrigo da luz.

- 9 Observar ao microscópio, nas lâminas controles, o desenvolvimento de precipitado castanho dourado, como produto final da reação. Lavar em água corrente e água destilada por 3 minutos.
- 10 Contracorar com Hematoxilina de Harris por 20 segundos. Lavar bem em água corrente e destilada
- 11 Imergir 2 vezes em solução de hidróxido de amônio a 0,5%, lavando em seguida em água corrente e destilada.
- 12 Desidratar as lâminas em etanol série crescente de 80%, 95% e 100% por 30 segundos cada passagem.
- 13 Diafanização em Xilol por 4 vezes, 30 segundos cada passagem.
- 14 Montagem das lâminas com lamínula e Entellan neu (Merck, 1.07961, Darmstadt, Alemanha).

Quadro 3 - Informações importantes sobre o protocolo de cada marcador

Marcador	Recuperação Antigênica	Tempo de Incubação	Método de revelação
IDH1	60 minutos, EDTA, pH9,0	32min	DAB, com kit Ultraview
p53	60 minutos, EDTA, pH9,0	32 min	DAB, com kit Ultraview
ATRX	30 minutos, EDTA, pH9,0	32 min	DAB, com kit Ultraview
MGMT	40 minutos, EDTA, pH9,0	32min	DAB, com kit Optiview
EGFR	30 minutos, EDTA, pH9,0	32min	DAB, com kit Ultraview
CD44	36 minutos, citrato, pH6,0	16 min	DAB, com kit Ultraview
MERTK	30 minutos, EDTA, pH9,0	30 min	NovoLink Max Polymer, Leica Biosystems Newcastle Ltd
OLIG2	30 minutos, EDTA, pH9,0	30min	NovoLink Max Polymer, Leica Biosystems Newcastle Ltd

Casos controles positivos e negativos foram utilizados em todas as reações, sendo os controles positivos específicos para cada anticorpo pesquisado, conforme demonstrado na Quadro 4. Para os controles negativos, substituímos os anticorpos primários por tampão de lavagem.

Quadro 4 - Descrição dos anticorpos utilizados no estudo

Anticorpo	Source	Code	Clone	Diluição	Controle positivo	Padrão de marcação
IDH1	<i>Dianova</i>	<i>DIA H09</i>	<i>H09</i>	<i>1:50</i>	<i>Oligodendroglioma</i>	<i>Coloração citoplasmática e nuclear</i>
p53	<i>DakoCytomation</i>	<i>M7001</i>	<i>DO-7</i>	<i>1:50</i>	<i>Carcinoma mamário</i>	<i>Núcleo das células tumorais</i>
ATRX	<i>SigmaAldrich</i>	<i>HPA001906</i>	<i>policlonal</i>	<i>1:50</i>	<i>Núcleo das células normais</i>	<i>Perda da expressão nuclear nas células tumorais</i>
MGMT	<i>Thermo Scientific</i>	<i>Ab-1</i>	<i>MT 3.1</i>	<i>1:20</i>	<i>Carcinoma colorretal</i>	<i>Núcleo e citoplasma das células tumorais</i>
EGFR	<i>Invitrogen</i>	<i>28-005</i>	<i>31G7</i>	<i>1:100</i>	<i>Pele normal</i>	<i>Coloração de superfície celular</i>
CD44	<i>Ventana</i>	<i>790-4537</i>	<i>SP37</i>	<i>1:100</i>	<i>Tonsila palatina</i>	<i>Coloração de superfície celular</i>
MERTK	<i>Abgent</i>	<i>AP7662a</i>	<i>policlonal</i>	<i>1:25</i>	<i>Tonsila palatina</i>	<i>Coloração citoplasmática e nuclear</i>
OLIG2	<i>Abnova</i>	<i>H00010215-M03</i>	<i>3C9</i>	<i>1:100</i>	<i>Placenta humana</i>	<i>Núcleo das células tumorais</i>

4.3 INTERPRETAÇÕES DAS REAÇÕES IMUNOISTOQUÍMICAS

A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico por três patologistas, de maneira independente, havendo consenso para os casos discrepantes. Todas as reações de imunoistoquímica foram metodicamente avaliadas em aumentos de 40x até 400x. As microfotografias foram obtidas a partir no escaneamento das lâminas em Aperio ScanScope XT (Leica

Biosystems), e obtidas a partir do software imagescope (Copyright © 2016 Leica Biosystems Imaging).

A interpretação foi realizada para cada anticorpo de acordo com critérios previamente descritos em literatura (RODRIGUEZ et al. 2008; ENGELMAN et al. 2013; POPOVA et al. 2014).

Para o anticorpo IDH1 foram considerados positivos os casos que exibiam marcação nuclear e/ou citoplasmática nas células tumorais de qualquer intensidade ou quantidade de células. Ausência de marcação foi considerado como negatividade para este marcador.

Nas análises dos anticorpos p53, MGMT, ATRX, CD44, MERKT e OLIG2 os casos foram avaliados utilizando escores de interpretação de acordo com a intensidade (0: ausência de expressão; 1: marcação fraca; 2: marcação moderada, 3: marcação forte), e a quantidade de células tumorais marcadas (0: ausência de marcação; 1: marcação em menos de 10% das células tumorais; 2: marcação entre 10 a 50% das células tumorais; 3: marcação em mais de 50% das células tumorais). A interpretação final foi determinada pela multiplicação dos escores obtidos sendo classificados como negativos (escore 0), positivos fracos (escores 1 e 2), positivos moderados (escores 3 e 4), positivos fortes, ou alta expressão para a proteína (escores 6 e 9), Quadro 5.

Quadro 5 - Valores dos escores finais para categorização dos casos em relação à interpretação da imunoistoquímica para p53, MGMT, ATRX, CD44, MERKT e OLIG2

Categorias da imunoexpressão dos marcadores	Valores de escores finais (índice semiquantitativo da imunoexpressão)
Negativo	0
Positivo Fraco	1 e 2
Positivo Moderado	3 e 4
Positivo Forte	6 e 9

Em nosso estudo, a expressão de EGFR foi realizada utilizando o escore de interpretação descrito para a análise imunoistoquímica de expressão de HER2 em tumores da mama (WOLFF et al. 2013). O padrão de coloração e o escore correspondente à presença ou ausência da expressão desse biomarcador estão descritos no Quadro 6.

Quadro 6 - Critérios para a interpretação dos resultados da imunoexpressão de HER-2 em carcinomas da mama utilizados para a determinação de hiperexpressão de EGFR nos GBMs.

Padrão de coloração	Escore	Hiperexpressão de EGFR
Ausência de coloração ou coloração de membrana citoplasmática em menos de 10% das células tumorais.	0	Negativo
Coloração fraca, quase imperceptível, em mais de 10% das células tumorais. As células são coradas em parte da membrana.	1+	Negativo
Coloração fraca a moderada em toda a circunferência da membrana, observada em mais de 10% das células tumorais.	2+	Positivo fraco
Coloração intensa em toda a membrana, observada em mais de 10% das células tumorais.	3+	Positivo forte

Fonte: WOLFF et al. (2013).

4.4 TÉCNICA DE HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH) PARA PESQUISA DE AMPLIFICAÇÃO DO GENE *EGFR*

As reações de FISH foram realizadas de acordo com as recomendações do fabricante da sonda, utilizando o protocolo do Departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center. As reações de FISH foram realizadas exclusivamente em cortes histológicos convencionais (cortes inteiros) dos tumores selecionados. Os passos da técnica utilizada foram realizados em 2 dias consecutivos:

Primeiro dia:

- 1 Desparafinização em Xilol – 3 banhos de 10 minutos cada;
- 2 Passagens em álcool – 3 banhos de 5 minutos cada;
- 3 Passagem em água destilada – 3 banhos de 2 minutos cada;
- 4 Banho em solução 0.2N HCL – por 20 minutos à temperatura ambiente;
- 5 Pré-tratamento em Citrato pH 6,0 – 80° C em banho-maria por 1 hora;
- 6 Digestão enzimática com pepsina (pronta para uso) por 8 minutos à temperatura ambiente (tempo variável em decorrência do tipo de tecido);
- 7 Lavagem em solução de 2 X SSC por 2 minutos à temperatura ambiente;
- 8 Desidratação em álcool, 75%, 80%, 100% por 2 minutos cada;
- 9 Secagem das lâminas ao ar;

- 10 Aplicação da sonda: 10µl da sonda ZytoLight SPEC EGFR/CEN 7 Dual Color Probe, da marca Zytovision, e incubação no Hibridizador para Denaturação e Hibridização.
 - Observação 1: cobrir os cortes com lamínula e aplicar selante em volta.
 - Observação 2: Aplicar a sonda ao abrigo da luz.

Segundo dia:

- 1 Pré-aquecer solução de 1,5M UREA/0,1 X SSC em banho-maria à 45° C;
- 2 Mergulhar as lâminas em solução de UREA / 0,1 SSC – 45° C por 30 minutos;
- 3 Lavar em solução 2x SSC por 2 minutos à temperatura ambiente;
- 4 Desidratar em álcool, 75%, 80%, 100% por 2 minutos cada;
- 5 Secagem das lâminas ao ar;
- 6 Aplicar 15 µl DAPI, montar com lamínula.

A leitura das lâminas foi realizada em microscópico óptico trinocular com fluorescência de mercúrio (OLYMPUS® BX41-FL-III), equipado com objetiva de imersão e com filtros adequados. Na interpretação do FISH para EGFR foram avaliadas 100 células neoplásicas identificando os sinais referentes ao gene e os sinais referentes à região centromérica (CEP). Foram considerados amplificados os casos cuja média de sinais de EGFR foi de pelo menos 4,0 sinais por núcleo e a razão EGFR/CEP7 maior que

2,0. A amplificação foi considerada alta quando a média de sinais por célula foi acima de 6,0 ou a razão EGFR/CEP7 foi acima de 3,0, baseado em WOLFF et al. (2013).

4.5 CLASSIFICAÇÃO DOS SUBTIPOS MOLECULARES DE GBMS

Para a classificação dos subtipos moleculares de GBMs utilizamos um algoritmo simplificado no qual consideramos a imunoexpressão de IDH1, a imunoexpressão e / ou FISH para EGFR e a imunoexpressão de MERTK e / ou CD44. Os GBMs proneurais apresentaram positividade para imunoexpressão de IDH1. Os GBMs clássicos foram IDH1 negativos e apresentaram aumento de imunoexpressão de EGFR e / ou presença de amplificação pelo FISH. Finalmente os GBMs mesenquimais foram IDH1 negativos, apresentaram negatividade imunoistoquímica para EGFR e / ou ausência de amplificação pelo FISH.

4.6 CLASSIFICAÇÃO DOS TIPOS DE GBM PRIMÁRIO E SECUNDÁRIO E CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DE GBMS

Os GBMs secundários foram aqueles tumores com expressão positiva para o anticorpo IDH1. Os GBMs classificados como primários apresentaram ausência de expressão para IDH1.

4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As informações coletadas dos prontuários médicos, os resultados das expressões imunoistoquímicas e das reações de FISH foram armazenadas em um banco de dados informatizado (Excel®, versão 2003, Microsoft).

Inicialmente, foram realizadas análises descritivas das variáveis, sendo apresentadas as distribuições de frequência absoluta (n) e relativa (%) para as variáveis qualitativas, e as principais medidas resumo, como a média, desvio padrão, mediana, valores mínimo e máximo para as variáveis quantitativas. Para avaliar a associação entre duas variáveis qualitativas, o teste de qui-quadrado ou o teste exato de Fisher, dependendo dos valores esperados nas tabelas de contingência, foram aplicados. Para comparar as variáveis quantitativas em relação às variáveis qualitativas, os testes não-paramétricos U de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis foram aplicados. Nos casos em que houve indícios de alguma diferença entre os grupos (3 ou mais), foi realizado uma análise de comparação múltipla (pairwise) levando em conta a correção do nível de significância. O coeficiente de correlação de Spearman foi calculado para as análises de correlações entre as variáveis quantitativas.

Utilizou-se o estimador de Kaplan-Meier para os cálculos de probabilidade de sobrevida global. A data da cirurgia foi considerada como o momento inicial do seguimento. Para o cálculo da sobrevida global considerou-se como momento final a data do óbito. Considerou-se como censura o caso em que não se registrou óbito, e, nesta situação, o momento

final da análise correspondeu à data da última informação clínica. A determinação de dois grupos de interesse com respeito a um simples ponto de corte foi estimada utilizando o valor máximo da estatística log-rank padronizada proposta por LAUSEN e SHUMACHER (1992). As variáveis estatisticamente significativas em análise univariada, bem como as que tiveram $p < 0,20$, foram selecionadas para o modelo de riscos proporcionais de Cox, utilizando-se a técnica do tipo stepwise backward selection. As análises estatísticas foram realizadas por meio do software SPSS versão 23 (Chicago, IL) e também pelo software livre R versão 3.3.0.

Em todos os casos adotamos um nível de 5% de significância.

5 RESULTADOS

5.1 DADOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS DOS PACIENTES

Foram avaliados 59 pacientes com GBMs, dos quais 34 (57,6%) eram do sexo masculino e 25 casos (42,4%) do sexo feminino. Os pacientes na faixa etária entre 40 e 60 anos foram os predominantes no estudo compreendendo quase a metade dos casos (49,2%); seguidos pelos pacientes com idade superior à 60 anos. A média de idade dos pacientes no momento do diagnóstico foi de 51 anos (mediana de 54 anos e DP=17,47). Os pacientes do sexo feminino apresentaram uma média de idade de 47 anos, e do sexo masculino de 54 anos.

Dos 59 casos estudados, 29 casos eram localizados no hemisfério direito, 23 casos no hemisfério esquerdo. Um caso apresentou ocorrência bi-hemisférica e 4 casos eram de localização profunda no parênquima cerebral, ou seja, região talâmica e corpo caloso. Em relação à distribuição topográfica tumoral, os tumores se localizavam preferencialmente nos lobos frontal, temporal e parietal. As principais regiões combinadas (mais de um lobo cerebral, ou comprometimento de regiões profundas), foram: parieto-occipital, frontoparietal, têmporo-parietal, têmporo-occipital e fronto-temporal.

A média do tamanho dos tumores na ocasião do diagnóstico foi de 4,71 cm (DP=1,19), variando de 2,3 cm à 7,0 cm. A média de tamanho dos

tumores nos pacientes do sexo masculino foi de 4,73 cm (DP=1,21), e no feminino de 4,67 cm (DP=1,19).

Os pacientes apresentaram média de KPS inicial de 80% (DP=0,11). Não foram observadas variações significativas de acordo com a faixa etária categorizada, sendo o KPS de 76% para os pacientes entre 20 a 40 anos; 81% para os pacientes entre 40 e 60 anos e 79% para os pacientes acima de 60 anos.

A maioria dos pacientes deste estudo foi submetida inicialmente a procedimento cirúrgico com ressecção completa/radical dos tumores, representando 64,4% dos casos. A ressecção incompleta/parcial do tumor foi realizada em 18,6% dos casos e somente a biópsia estereotática diagnóstica em 11,9% dos pacientes. Estes dados não estavam disponíveis nos prontuários de 3 pacientes (5,1%).

O tratamento quimioterápico adjuvante foi realizado em 38 pacientes. Foram realizados 3 principais esquemas diferentes de tratamento de acordo com o tipo de droga e combinações utilizadas:

- Esquema 1: Temozolamida exclusiva, realizado em 22 pacientes;
- Esquema 2: Temozolamida seguido de Bevacizumabe + Irinotecano, realizado em 7 pacientes;
- Esquema 3: Temozolamida seguido de Bevacizumabe, realizado em 5 pacientes;

Outros esquemas terapêuticos, incluindo o uso de Carmustin ou Metotrexato foi a opção utilizada em 4 pacientes.

Quimioterapia adjuvante não foi realizada em 17 pacientes e 4 pacientes não apresentavam estes dados nos prontuários médicos.

O tratamento radioterápico adjuvante foi empregado em 48 pacientes do estudo (81,4%). Sete pacientes (11,9%) não realizaram radioterapia e em 4 casos estes dados não estavam presentes nos prontuários médicos.

Todos os dados demográficos e clínicos dos pacientes estão contidos da Tabela 1.

Tabela 1 - Distribuição dos pacientes em relação aos dados demográficos e clínicos

Variáveis	Categorias	Frequência (n)	Porcentagem (%)
Sexo	Feminino	25	42,4
	Masculino	34	57,6
	Total	59	100,0
Idade Categorizada	≤20 anos	4	6,8
	(20 - 40]	9	15,3
	(40-60]	29	49,2
	>60	17	28,8
	Total	59	100,0
Localização geral do glioblastoma no encéfalo	Hemisfério Direito	29	49,2
	Hemisfério Esquerdo	23	39,0
	Profunda	4	6,8
	Bi-hemisférica	1	1,7
	Omisso/Não avaliável	2	3,4
	Total	59	100,0
Localização específica do glioblastoma no encéfalo	Frontal	12	20,3
	Temporal	15	25,4
	Parietal	12	20,3
	Combinadas/Profunda	17	28,8
	Omisso/Não avaliável	3	5,1
	Total	59	100,0
Procedimento Cirúrgico Inicial	Ressecção Completa	38	64,4
	Ressecção Incompleta	11	18,6
	Estereotática	7	11,9
	Omisso/Não avaliável	3	5,1
	Total	59	100,0
Tratamento quimioterápico adjuvante	Esquema-1	22	37,3
	Esquema-2	7	11,9
	Esquema-3	5	8,5
	Outros/Diversos	4	6,8
	Não realizou	17	28,8
	Omisso/Não avaliável	4	6,8
	Total	59	100,0
Radioterapia	Realizada	48	81,4
	Não realizada	7	11,9
	Omisso/Não avaliável	4	6,8
	Total	59	100,0

5.2 RESULTADOS DAS ANÁLISES DAS EXPRESSÕES PROTEICAS DOS ANTICORPOS

As expressões proteicas dos anticorpos IDH1, p53, MERTK, CD44, OLIG2, ATRX, MGMT e EGFR foram avaliadas nos 59 GBMs por meio da imunohistoquímica. Os resultados estão resumidos na Tabela 2.

Para o anticorpo IDH134 (57,6%) casos foram classificados como negativos e 25 (42,4%) como positivos. Para o anticorpo p5326 (44,1%) casos foram classificados como negativos e 33 (55,9%) casos foram positivos, sendo 11 (18,6%) casos positivos fracos, 7 (11,9 %) casos positivos moderados e 15 (25,4%) casos positivos forte. A análise de MERTK revelou 17 (28,8%) casos negativos (28,8%), 12 (20,3%) positivos fraco (20,3%), 16 (27,1%) positivos moderado e 14 (23,7%) casos positivos forte. A expressão do anticorpo CD44 mostrou positividade forte em 36 (61%) casos. A expressão de OLIG2 foi observada em 47 (79,7%) casos, sendo 11 (18,6%) casos positivos fraco, 13 (22,0%) casos positivos moderado e 23 (39,0%) casos positivos forte. Doze (20,3%) casos foram negativos para OLIG2. Cinquenta e um GBMs foram avaliados para a expressão de ATRX, sendo 42 (82,4%) deles classificados como positivos. Apenas 9 (17,6%) casos apresentaram imunoexpressão negativa para ATRX (47,1%). Neste estudo não foram encontrados casos negativos para MGMT. Observamos 24 casos (40,7%) positivos fraco, 7 (11,9%) positivos moderado e 28 (47,5%) casos positivos forte.

De acordo com os critérios utilizados na interpretação da expressão imunohistoquímica de EGFR nos GBMs 25 (42,4%) casos foram classificados

como escore 0, 8 (13,6%) casos como escore 1+, 9 (15,2%) casos como escore 2+ e 17 (28,8%) casos como escore 3+.As Figuras 7 a 9 ilustram a imunoistoquímica desses anticorpos nos GBMs.

Tabela 2 - Resultados das análises das expressões proteicas dos anticorpos IDH1, p53, MERTK, CD44, OLIG2, ATRX, MGMT e EGFR nos GBMs

Anticorpos	Imunoexpressão	Frequência (n)	Porcentagem (%)
IDH1	Negativa	34	57,6
	Positiva	25	42,4
	Total	59	100,0
p53	Negativa	26	44,1
	Fraca	11	18,6
	Moderada	7	11,9
	Forte	15	25,4
	Total	59	100,0
MERTK	Negativa	17	28,8
	Fraca	12	20,3
	Moderada	16	27,1
	Forte	14	23,7
	Total	59	100,0
CD44	Negativa	2	3,4
	Fraca	7	11,9
	Moderada	14	23,7
	Forte	36	61,0
	Total	59	100,0
OLIG2	Negativa	12	20,3
	Fraca	11	18,6
	Moderada	13	22,0
	Forte	23	39,0
	Total	59	100,0
ATRX	Negativa	9	17,6
	Fraca	8	15,7
	Moderada	10	19,6
	Forte	24	47,1
	Total	51	100,0
MGMT	Negativa	0	0,0
	Fraca	24	40,7
	Moderada	7	11,9
	Forte	28	47,5
	Total	59	100,0
EGFR	Escore 0	25	42,4
	Escore 1+	8	13,6
	Escore 2+	9	15,2
	Escore 3+	17	28,8
	Total	59	100,0

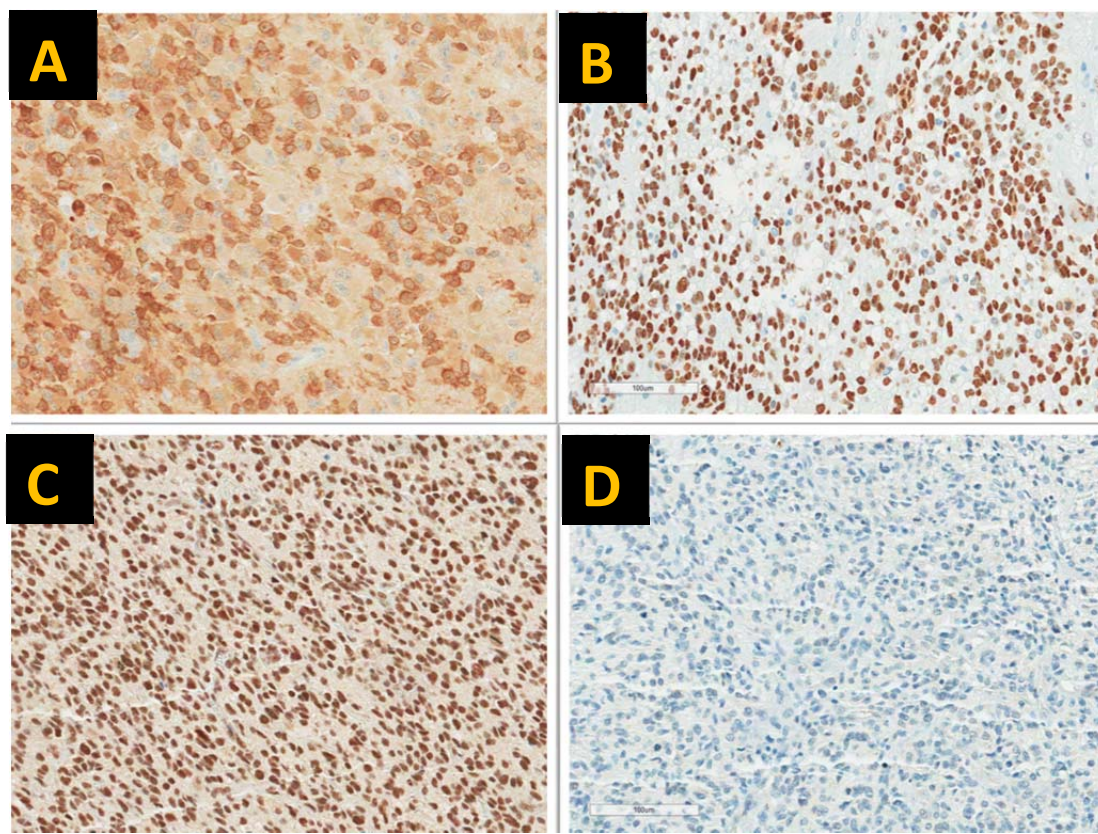


Figura 7 - Imunoexpressão dos marcadores IDH1, OLIG2 e ATRX. A - Positividade imunoistoquímica para IDH1, com marcação citoplasmática e nuclear em GBM proneural; B - Positividade imunoistoquímica para OLIG2, com marcação nuclear nas células neoplásicas; C - Positividade imunoistoquímica para ATRX, com marcação nuclear nas células neoplásicas; D - Negatividade imunoistoquímica para ATRX. Perda de expressão nuclear em GBM proneural. Microfotografias obtidas pelo escaneamento das lâminas em Aperio ScanScope XT (Leica Biosystems), e obtidas a partir do software imagescope (Copyright © 2016 Leica Biosystems Imaging). Tamanhos originais de 200x.

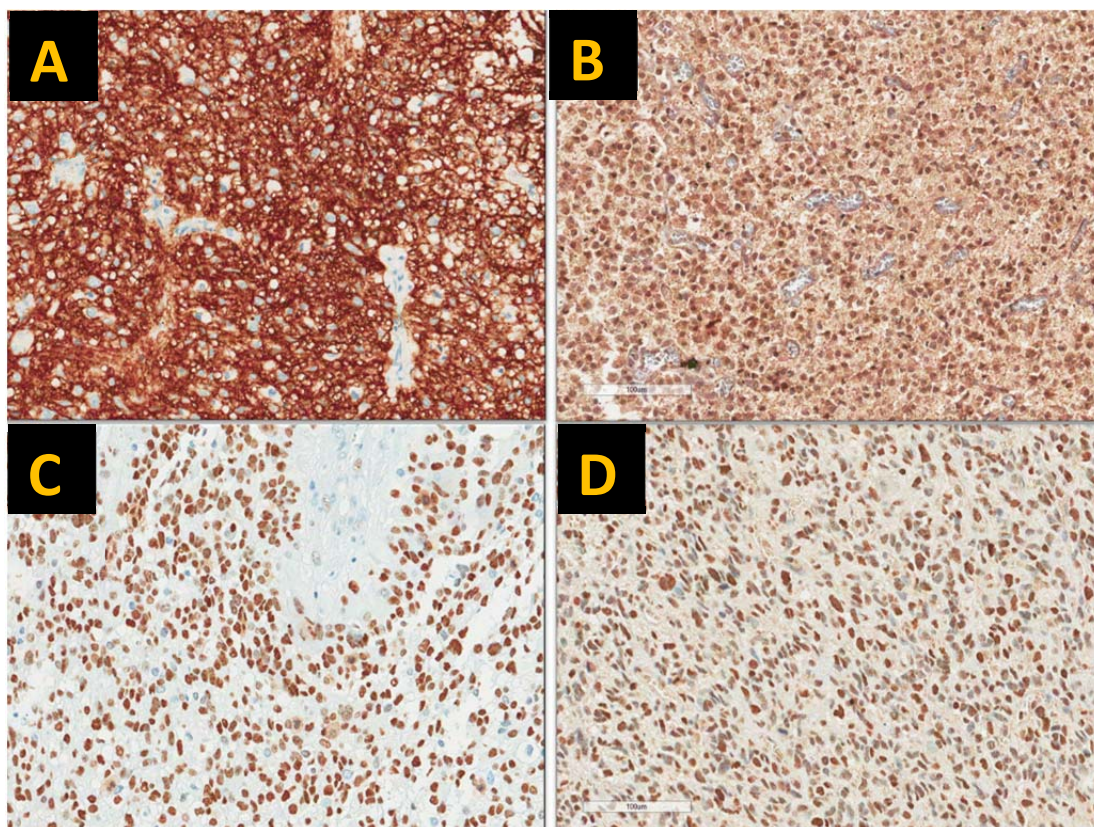


Figura 8 - Imunoexpressão dos marcadores MERTK, CD44, p53 e MGMT. A - Positividade imunoistoquímica para CD44, com marcação em superfície celular em GBM mesenquimal; B - Positividade imunoistoquímica para MERTK, com marcação citoplasmática e nuclear em GBM mesenquimal; C - Positividade imunoistoquímica para p53 com marcação nuclear células neoplásicas; D - Positividade imunoistoquímica para MGMT, com marcação nuclear nas células neoplásicas. Microfotografias obtidas pelo escaneamento das lâminas em Aperio ScanScope XT (Leica Biosystems), e obtidas a partir do software imagescope (Copyright © 2016 Leica Biosystems Imaging). Tamanhos originais de 200x.

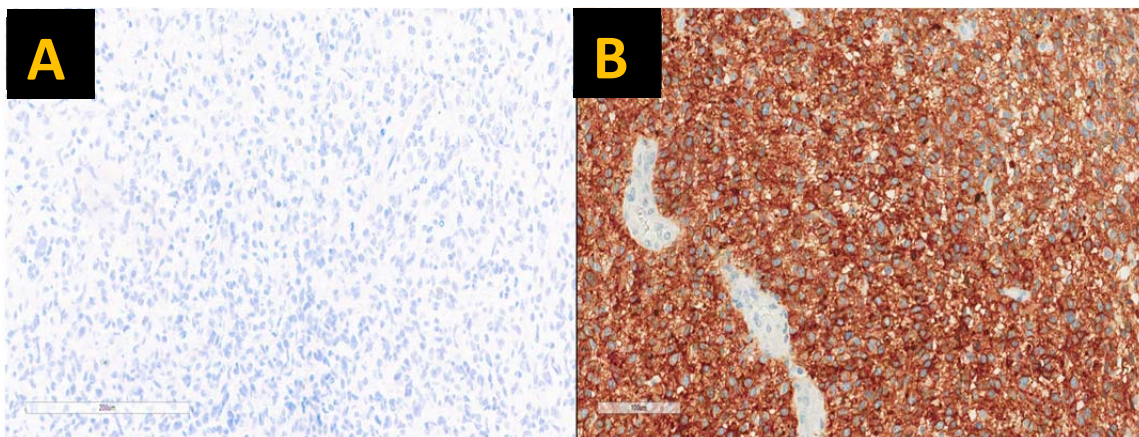


Figura 9 – Imunoexpressão do marcador EGFR. A - escore 0, ausência de marcação nas células neoplásicas; B - escore 3+, com marcação na superfície das células de GBM subtipo molecular clássico. Microfotografias obtidas pelo escaneamento das lâminas em Aperio ScanScope XT (Leica Biosystems), e obtidas a partir do software imagescope (Copyright © 2016 Leica Biosystems Imaging). Tamanhos originais de 200x.

5.3 RESULTADOS DAS HIBRIDIZAÇÕES *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH)

Avaliação numérica das cópias do Gene EGFR:

A técnica de FISH com sonda para EGFR foi realizada em 44 amostras. Dentre essas amostras, doze casos foram considerados não avaliáveis pela ausência de sinais da sonda utilizada. Os casos restantes apresentaram a quantidade mínima de 100 células marcadas contendo os sinais fluorescentes para a avaliação. Não foram observados casos com marcação única somente do gene EGFR ou da região centromérica (CEP).

A média de sinais representativos do gene EGFR foi de 9,71, variando entre 1,91 e 20,0. Quatorze (43,7%) casos apresentaram média de sinais acima de 6,0 e 1 (3,1%) caso abaixo de 2,0.

A média de sinais da região centromérica do cromossomo 17 foi de 1,73, variando entre 1,0 e 2,69. Onze (34,4%) casos apresentavam média de sinais acima de 2,0 e 17 (65,6%) casos abaixo de 2,0. Em nenhum caso a média foi inferior a 1,0.

A razão das médias dos sinais do EGFR/CEP17 variou entre 1,01 e 20,0, com valor médio de 8,28. Quinze (46,9%) casos tiveram esta razão superior a 2,0, sendo a média de sinais de EGFR superior de 6,0 em 13 (40,6%) casos, considerados, portanto, com alta amplificação. Dois (6,2%) casos apresentaram esta razão inferior a 6,0, sendo portanto, considerados de baixa amplificação. Os resultados estão resumidos na Tabela 3. A Figura 10 ilustra da técnica de FISH com sonda para EGFR no GBM.

Tabela 3 - Resultados das reações de FISH para avaliação de EGFR

Caso	CEP média	EGFR média	razão EGFR/CEP	conclusão EGFR
1	N/A	N/A	N/A	N/A
2	2,03	2,07	1,01	Não amplificado
3	1	20	20	Alta amplificação
4	N/A	N/A	N/A	N/A
5	2,24	2,52	1,12	Não amplificado
6	1,97	8,11	4,11	Baixa amplificação
7	N/A	N/A	N/A	N/A
8	1	20	20	Alta amplificação
9	2,35	3,06	1,3	Não amplificado
10	1	20	20	Alta amplificação
11	N/A	N/A	N/A	N/A
12	1,97	3,01	1,52	Não amplificado
13	2,51	3,70	1,47	Não amplificado
14	1	20	20	Alta amplificação
15	2,29	4,40	1,92	Não amplificado
16	Não realizado	Não realizado	Não realizado	Não realizado
17	N/A	N/A	N/A	N/A
18	1	20	20	Alta amplificação

Cont/Tabela 3

Caso	CEP média	EGFR média	razão EGFR/CEP	conclusão EGFR
19	1	20	20	Alta amplificação
20	N/A	N/A	N/A	N/A
21	N/A	N/A	N/A	N/A
22	Não realizado	Não realizado	Não realizado	Não realizado
23	Não realizado	Não realizado	Não realizado	Não realizado
24	1,93	2,03	1,05	Não amplificado
25	1,96	3,06	1,56	Não amplificado
26	2,47	3,39	1,37	Não amplificado
27	N/A	N/A	N/A	N/A
28	1	20	20	Alta amplificação
29	Não realizado	Não realizado	Não realizado	Não realizado
30	2,53	3,88	1,53	Não amplificado
31	N/A	N/A	N/A	N/A
32	2,69	2,73	1,01	Não amplificado
33	N/A	N/A	N/A	N/A
34	1,63	9,93	6,09	Alta amplificação
35	N/A	N/A	N/A	N/A
36	1,84	9,38	5,11	Baixa amplificação
37	1,87	1,91	1,02	Não amplificado
38	Não realizado	Não realizado	Não realizado	Não realizado
39	1	20	20	Alta amplificação
40	1,78	2,08	1,17	Não amplificado
41	1	20	20	Alta amplificação
42	N/A	N/A	N/A	N/A
43	Não realizado	Não realizado	Não realizado	Não realizado
44	Não realizado	Não realizado	Não realizado	Não realizado
45	1,89	12,64	6,68	Alta amplificação
46	2,42	3,76	1,55	Não amplificado
47	Não realizado	Não realizado	Não realizado	Não realizado
48	Não realizado	Não realizado	Não realizado	Não realizado
49	Não realizado	Não realizado	Não realizado	Não realizado
50	Não realizado	Não realizado	Não realizado	Não realizado
51	Não realizado	Não realizado	Não realizado	Não realizado
52	Não realizado	Não realizado	Não realizado	Não realizado
53	Não realizado	Não realizado	Não realizado	Não realizado
54	1	20	20	Alta amplificação
55	2,03	2,69	1,32	Não amplificado
56	2,11	3,37	1,58	Não amplificado
57	Não realizado	Não realizado	Não realizado	Não realizado
58	1,97	2,90	1,47	Não amplificado
59	1	20	20	Alta amplificação

NA – não avaliável; CEP – região centromérica

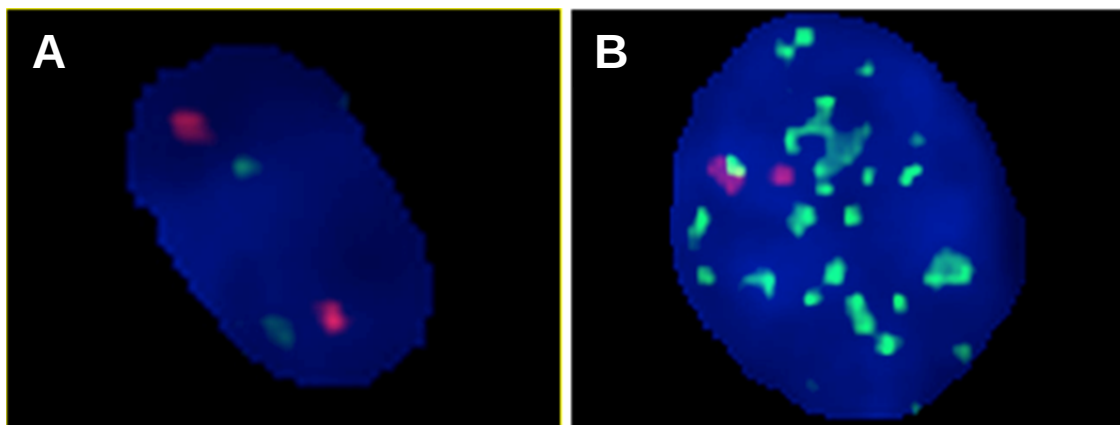


Figura 10 - Técnica de Hibridização in situ Fluorescente (FISH), com sonda para EGFR. A: Dois sinais para a sonda alvo (verde) e referência (vermelho), indicando se tratar uma célula sem alterações no número de cópias do gene EGFR. B: Amplificação do gene EGFR (verde) e dois sinais normais para o centrômero do cromossomo 7 (referência normal).

5.4 CLASSIFICAÇÃO DOS GLIOBLASTOMAS

5.4.1 Classificação dos glioblastomas primários e secundários

De acordo com a expressão de IDH1 os GBMs foram classificados em primários 34 (57,63%) e 25 secundários (42,37%).

5.4.2 Classificação dos subtipos moleculares de glioblastomas

O subtipo proneural foi determinado em 25 casos (42,4%), o subtipo mesenquimal em 21 casos (35,6%) e o subtipo clássico em 13 casos (22,0%). A Figura 11 mostra a distribuição dos subtipos de GBMs de acordo com o Algoritmo utilizado para a sua classificação. A Tabela 4 apresenta os dados das correlações entre o subtipo molecular do GBM com a

imunoexpressão dos anticorpos e as variáveis clínico-patológicas dos pacientes.

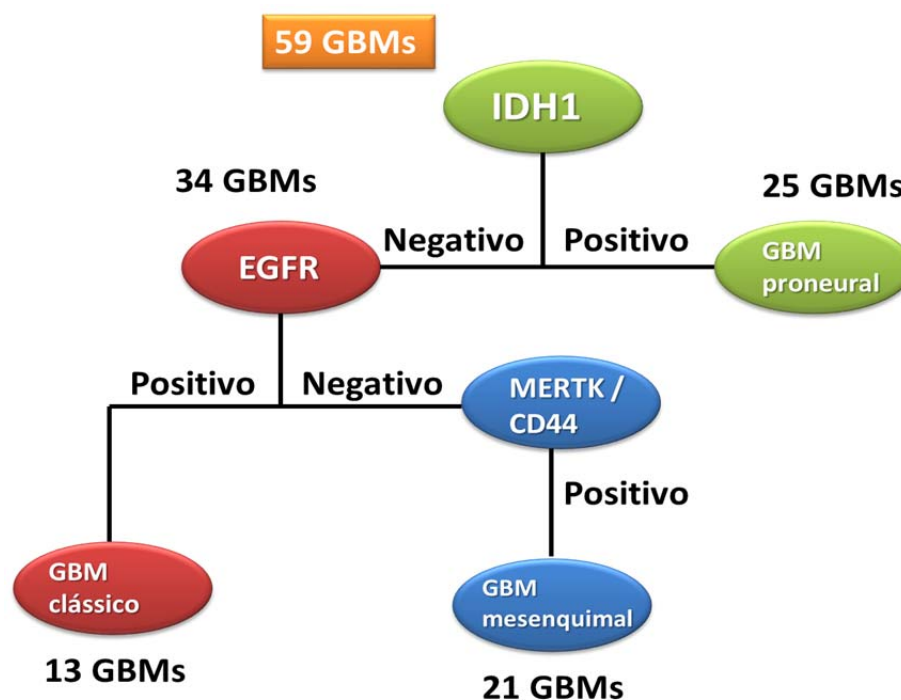


Figura 11 - Classificação dos subtipos moleculares de GBMs de acordo com painel de imunoexpressão das proteínas IDH1, EGFR, MERTK / CD44.

Nas correlações entre o subtipo molecular do GBM, a imunoexpressão dos anticorpos e as variáveis clínico-patológicas dos pacientes observou-se associação estatisticamente significativa entre tumores de menores dimensões e GBMs mesenquimais ($p=0,04$), e entre a imunoexpressão forte de OLIG2 e GBMs proneurais ($p=0,001$). Os demais dados estão disponíveis na Tabela 4.

Tabela 4 - Correlações entre o subtipo molecular do GBM, a imunexpressão dos anticorpos e as variáveis clínico-patológicas dos pacientes

Variáveis	Categorias	Subtipos moleculares de GBM			Valor de p
		Proneural (n=25)	Mesenquimal (n=21)	Clássico (n=13)	
Sexo	Feminino	12 (48,0%)	8 (38,1%)	5 (38,5%)	0,79
	Masculino	13 (52,0%)	13 (61,9%)	8 (61,5%)	
Idade	≤ 42 anos	9 (36,0%)	5 (23,8%)	2 (15,4%)	0,39
	> 42 anos	16 (64,0%)	16 (76,2%)	11 (84,6%)	
Tamanho do Tumor	≤ 5,2 cm	14 (56,0%)	17 (89,5%)	8 (61,5%)	0,04
	> 5,2 cm	11 (44,0%)	2 (10,5%)	5 (38,5%)	
Localização do GBM	Frontal	7 (33,4%)	2 (11,1%)	3 (25,0%)	0,36
	Temporal	5 (23,8%)	7 (38,9%)	3 (25,0%)	
	Parietal	5 (23,8%)	6 (33,3%)	1 (8,3%)	
	Combinadas	4 (19,0%)	3 (16,7%)	5 (41,7%)	
Procedimento Cirúrgico Realizado	Ressecção Completa	15 (62,5%)	15 (78,9%)	8 (61,5%)	0,12
	Ressecção Incompleta	5 (20,8%)	1 (5,3%)	5 (38,5%)	
Quimioterapia	Estereotóxica	4 (16,7%)	3 (15,8%)	0 (0%)	0,04
	Realizada	20 (87,0%)	10 (52,6%)	8 (61,5%)	
Radioterapia	Não realizada	3 (13,0%)	9 (47,4%)	5 (38,5%)	0,30
	Realizada	18 (78,3%)	18 (94,7%)	12 (92,3%)	
EGFR IHQ	Escore 0	9 (36,0%)	16 (76,2%)	0 (0%)	<0,0001
	Escore 1+	2 (8,0%)	5 (23,8%)	0 (0%)	
	Escore 2+	5 (20,0%)	0 (0%)	4 (30,8%)	
	Escore 3+	9 (36,0%)	0 (0%)	9 (69,2%)	
IDH1	Positivo	25 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	<0,0001
	Negativo	0 (0%)	21 (100%)	13 (100%)	
MERTK	Negativo	8 (32,0%)	4 (19,0%)	5 (38,5%)	0,40
	Positivo fraco	4 (16,0%)	4 (19,0%)	4 (30,8%)	
	Positivo moderado	7 (28,0%)	6 (28,6%)	3 (21,1%)	
	Positivo forte	6 (24,0%)	7 (33,3%)	1 (7,7%)	
p53	Negativo	10 (40,0%)	10 (47,6%)	6 (46,2%)	0,46
	Positivo fraco	3 (12,0%)	5 (23,8%)	3 (23,1%)	
	Positivo moderado	4 (16,0%)	1 (4,8%)	2 (15,4%)	
	Positivo forte	8 (32,0%)	5 (23,8%)	2 (15,4%)	
CD44	Negativo	2 (8,0%)	0 (0%)	0 (0%)	0,46
	Positivo fraco	2 (8,0%)	3 (14,3%)	2 (15,4%)	
	Positivo moderado	8 (32,0%)	5 (23,8%)	1 (7,7%)	
	Positivo forte	13 (52,0%)	13 (61,9%)	10 (76,9%)	
OLIG2	Negativo	5 (20,0%)	5 (23,8%)	2 (15,4%)	0,001
	Positivo fraco	1 (4,0%)	5 (23,8%)	5 (38,5%)	
	Positivo moderado	3 (12,0%)	4 (19,0%)	6 (16,2%)	
	Positivo forte	16 (64,0%)	7 (33,3%)	0 (0%)	

Cont/ Tabela 4

Variáveis	Categorias	Subtipos moleculares de GBM			Valor de p
		Proneural (n=25)	Mesenquimal (n=21)	Clássico (n=13)	
ATRX	Negativo	6 (35,3%)	2 (9,5%)	1 (7,7%)	0,14
	Positivo fraco	1 (5,9%)	3 (14,3%)	4 (30,8%)	
	Positivo moderado	3 (17,6%)	3 (14,3%)	4 (30,8%)	
	Positivo forte	7 (41,2%)	13 (61,9%)	4 (30,8%)	
MGMT	Positivo fraco	9 (36,0%)	10 (47,6%)	5 (38,5%)	0,37
	Positivo moderado	1 (4,0%)	3 (14,3%)	3 (23,1%)	
	Positivo forte	15 (60,0%)	8 (38,1%)	5 (38,5%)	
Subtipo de GBM	Primário	0 (0%)	21 (100%)	13 (100%)	<0,0001
	Secundário	25 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	

5.5 ANÁLISES DAS CORRELAÇÕES ENTRE AS VARIÁVEIS CLINICO-PATOLÓGICAS DOS PACIENTES

A escala de resultados ou desempenho de Karnofsky (KPS) inicial dos pacientes foi a única variável clínico-patológica que apresentou correlação estatisticamente significativa. O KPS inicial apresentou menor média no sexo feminino em relação ao sexo masculino ($p < 0,0001$).

5.6 ANÁLISES DAS CORRELAÇÕES ENTRE OS MARCADORES DE IMUNOISTOQUÍMICA

Alguns dos marcadores estudados apresentaram correlação significativa entre eles. Observamos que existe correlação estatisticamente significativa entre a imunopositividade para IDH1 e OLIG2 com marcação forte ($p = 0,002$). Da mesma forma, OLIG2 mostrou marcação forte quando inversamente MGMT apresentou marcação fraca ($p = 0,004$).

5.7 ANÁLISES DAS CORRELAÇÕES ENTRE AS VARIÁVEIS E A EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DOS MARCADORES ESTUDADOS

Correlações estatisticamente significativas foram observadas entre algumas variáveis clínicas e padrões de expressão dos anticorpos estudados:

- Associação entre a expressão positiva forte de ATRX e os pacientes de sexo masculino ($p=0,02$);
- Associação em relação à positividade forte de OLIG2 e GBMs secundários ($p=0,002$), e GBMs subtipo molecular proneural ($p=0,002$);
- Observamos associação entre pacientes submetidos a ressecção cirúrgica completa do tumor e EGFR score 0 ($p=0,03$);
- Houve associação entre pacientes que realizaram tratamento quimioterápico adjuvante e imunoexpressão positiva para IDH1 / GBMs proneurais ($p=0,02$);
- Finalmente, houve correlação entre os tumores menores e o subtipo molecular mesenquimal ($p=0,04$).

Não foram encontradas associações estatisticamente significativas entre o padrão de expressão de p53, CD44, MGMT e todas as variáveis estudadas. A Tabela 5 apresenta os dados das correlações entre as variáveis clinico-patológicas dos pacientes e a imunoexpressão dos anticorpos.

Tabela 5 - Correlações entre as variáveis clínico-patológicas dos pacientes e a imunoeexpressão dos anticorpos

Variáveis	Categorias	IDH1			EGFR				Valor de p	MERTK				Valor de p	p53				Valor de p
		Neg (n=41)	Pos (n=25)	Valor de p	Neg (n= 25)	1+ (n= 8)	2+ (n= 9)	3+ (n= 17)		Neg (n=17)	Pos Fraco (n=12)	Pos Mod (n=16)	Pos Forte (n=14)		Neg (n=26)	Pos Fraco (n=11)	Pos Mod (n=7)	Pos Forte (n=15)	
Sexo	Feminino	13 (38,2%)	12 (48%)	0,59	9 (36,0%)	3 (37,5%)	5 (55,6%)	8 (47,1%)	0,74	6 (35,3%)	7 (58,3%)	7 (43,8%)	5 (35,7%)	0,62	12(46,2%)	4(36,4%)	1 (14,3%)	8 (53,3%)	0,36.
	Masculino	21 (61,8%)	13 (52,0%)		16 (64,0%)	5 (62,5%)	4 (44,4%)	9 (52,9%)		11(64,7%)	5 (41,7%)	9 (56,2%)	9 (64,3%)		14(53,8%)	7(63,6%)	6 (85,7%)	7 (46,7%)	
Idade	≤ 42 anos	7 (20,6%)	9 (36,0%)	0,24	7 (28,0%)	3 (37,5%)	3 (33,3%)	3 (17,6%)	0,69	4(23,5%)	5 (41,7%)	5 (31,3%)	2 (14,3%)	0,47	7(26,9%)	2(18,2%)	0 (0%)	7 (46,7%)	0,13
	> 42 anos	27 (79,4%)	16 (64,0%)		18 (72,0%)	5 (62,5%)	6 (66,7%)	14 (82,4%)		13(76,5%)	7 (58,3%)	11 (68,2%)	12 (85,7%)		19(73,1%)	9(81,2%)	7 (100%)	8 (53,3%)	
Tamanho do Tumor	≤ 5,2 cm	25 (78,1%)	14 (56,0%)	0,09	15 (65,2%)	8 (100%)	4 (44,4%)	12 (70,6%)	0,08	12(70,6%)	7 (58,3%)	11 (78,6%)	9 (64,3%)	0,76	17(70,8%)	7(63,6%)	5 (71,4%)	10 (66,7%)	0,97
	> 5,2 cm	7 (21,9%)	11 (44,0%)		8 (34,8%)	0 (0%)	5 (55,6%)	5 (29,4%)		5(29,4%)	5 (41,7%)	3 (21,4%)	5 (35,7%)		7(50,0%)	4(36,4%)	2 (28,6%)	5 (33,3%)	
Localização do GBM	Frontal	5 (16,7%)	7(33,4%)	0,58	2 (9,1%)	2 (33,3%)	3 (42,8%)	5 (31,3%)	0,59	6(40,0%)	2 (20,0%)	2 (16,7%)	2 (14,3%)	0,83	4(19,0%)	1(10,0%)	4 (66,7%)	3 (21,4%)	0,42
	Temporal	10 (33,3%)	5(23,8%)		8 (36,4%)	1 (16,7%)	2 (28,6%)	4 (25,0%)		3(20,0%)	2 (20,0%)	5 (41,6%)	5 (35,7%)		7(33,3%)	4(40,0%)	0 (0%)	4 (28,6%)	
	Parietal	7 (23,3%)	5(23,8%)		7 (31,8%)	2 (33,3%)	1 (14,3%)	2 (12,4%)		2(13,3%)	3 (30,0%)	3 (25,0%)	4 (28,6%)		4(19,0%)	2(20,0%)	2 (33,3%)	4 (28,6%)	
	Combinadas	8 (26,7%)	4(19,0%)		5 (22,7%)	1 (16,7%)	1 (14,3%)	5 (31,3%)		4(26,7%)	3 (30,0%)	2 (16,7%)	3 (21,4%)		6(28,7%)	3(30,0%)	0 (0%)	3 (21,4%)	
Procedimento Cirúrgico Realizado	Ressecção Completa	23 (71,9%)	15 (62,5%)	0,72	16 (69,6%)	7 (100%)	4 (44,4%)	11 (64,7%)	0,03	10(58,8%)	9 (81,8%)	10 (66,7%)	9 (69,2%)	0,56	16(64,0%)	4(40,0%)	4 (66,7%)	14 (93,3%)	0,12
	Ressecção Incompleta	6 (18,8%)	5 (20,8%)		2 (8,7%)	0 (0%)	3 (33,3%)	6 (35,3%)		4(23,5%)	2 (18,2%)	4 (26,7%)	1 (7,7%)		5(20,0%)	4(40,0%)	1 (16,7%)	1 (6,7%)	
	Estereotáxia	3 (9,4%)	4 (16,7%)		5 (21,7%)	0 (0%)	2 (22,2%)	0 (0%)		3(17,7%)	0 (0%)	1 (6,6%)	3 (23,1%)		4(16,0%)	2(20,0%)	1 (16,7%)	0 (0%)	
	Realizada	18 (56,3%)	20 (87,0%)		13 (59,1%)	7 (100%)	4 (44,4%)	14 (82,4%)		11(68,8%)	8 (72,7%)	10 (66,7%)	9 (69,2%)		15(60,0%)	8(80,0%)	4 (80,0%)	11 (73,3%)	
Quimioterapia Adjuvante	Não realizada	14 (43,7%)	3 (13,0%)	0,02	9 (40,9%)	0 (0%)	5 (55,6%)	3 (17,6%)	0,23	5(31,2%)	3 (27,3%)	5 (33,3%)	4 (30,8%)	0,99	10(40,0%)	2(20,0%)	1 (20,0%)	4 (26,7%)	0,65
	Realizada	30 (93,8%)	18 (78,3%)		20 (90,9%)	6 (85,7%)	6 (66,7%)	16 (94,1%)		13(81,3%)	11 (100%)	13 (86,7%)	11 (84,6%)		20(80,0%)	9(90,0%)	5 (100%)	14 (93,3%)	
Radioterapia Adjuvante	Não realizada	2 (6,2%)	5 (21,7%)	0,12	2 (9,1%)	1 (14,3%)	3 (33,3%)	1 (5,9%)	0,20	3(18,7%)	0 (0%)	2 (13,3%)	2 (15,4%)	0,57	5(20,0%)	1(10,0%)	0 (0%)	1 (6,7%)	0,68
	Realizada	34 (100%)	0(0%)		16 (64,0%)	5 (71,4%)	4 (44,4%)	9 (50,0%)		9 (52,9%)	8 (66,7%)	9 (56,3%)	8 (57,1%)		16 (61,5%)	872,7%)	4 (57,1%)	6 (40,0%)	
Subtipos de GBM	Primário	34 (100%)	0(0%)	<0,0001	16 (64,0%)	5 (71,4%)	4 (44,4%)	9 (50,0%)	0,74	9 (52,9%)	8 (66,7%)	9 (56,3%)	8 (57,1%)	0,91	16 (61,5%)	872,7%)	4 (57,1%)	6 (40,0%)	0,38
	Secundário	0 (0%)	25 (100%)		9 (36,0%)	2 (28,6%)	5 (55,6%)	9 (50,0%)		8 (47,1%)	4 (33,3%)	7 (43,8%)	6 (42,9%)		10 (38,5%)	3 (27,3%)	3 (42,9%)	9 (60,0%)	

Cont/Tabela 5

Variáveis	Categorias	CD44				Valor de p	OLIG2				Valor de p	ATRX				Valor de p	MGMT				Valor de p
		Neg (n=2)	Pos Fraco (n=7)	Pos Mod (n=14)	Pos Forte (n=36)		Neg (n=12)	Pos Fraco (n=11)	Pos Mod (n=13)	Pos Forte (n=23)		Neg (n=9)	Pos Fraco (n=8)	Pos Mod (n=10)	Pos Forte (n=24)		Pos Fraco (n=24)	Pos Mod (n=7)	Pos Forte (n=28)		
Sexo	Feminino	1 (50,0%)	2 (28,6%)	7 (50,0%)	15 (41,7%)	0,81.	6 (50,0%)	5 (45,5%)	5 (38,5%)	9 (39,1%)	0,95	7 (77,8%)	4 (50,0%)	4 (40,0%)	5 (20,8%)	0,02	12 (50,0%)	3 (42,9%)	29 (35,7%)	0,61	
	Masculino	1 (50,0%)	5 (71,4%)	7 (50,0%)	21 (58,3%)		6 (50,0%)	6 (54,5%)	8 (61,5%)	14 (60,9%)		2 (22,2%)	4 (50,0%)	6 (60,0%)	19 (79,2%)		12 (50,0%)	4 (57,1%)	34 (64,3%)		
Idade	≤ 42 anos	1 (50,0%)	2 (28,6%)	5 (35,7%)	8 (22,2%)	0,56	2 (16,7%)	2 (18,2%)	4 (30,8%)	8 (34,8%)	0,64	2 (22,2%)	3 (37,5%)	3 (30,0%)	5 (20,8%)	0,76	8 (33,3%)	2 (28,6%)	6 (21,4%)	0,60	
	> 42 anos	1 (50,0%)	5 (71,4%)	9 (64,3%)	28 (77,8%)		10 (83,3%)	9 (81,8%)	9 (69,2%)	15 (65,2%)		7 (77,8%)	5 (62,5%)	7 (70,0%)	19 (79,2%)		16 (66,7%)	5 (71,4%)	22 (78,6%)		
Tamanho do Tumor	≤ 5,2 cm	2 (100%)	6 (85,7%)	6 (42,9%)	25 (73,5%)	0,11	8 (66,7%)	8 (80,0%)	11 (84,6%)	12 (54,5%)	0,26	6 (66,7%)	5 (71,4%)	5 (50,0%)	18 (78,3%)	0,45	16 (66,7%)	6 (100%)	17 (63,0%)	0,25	
	> 5,2 cm	0 (0%)	1 (14,3%)	8 (57,1%)	9 (26,5%)		4 (33,3%)	2 (20,0%)	2 (15,4%)	10 (45,5%)		3 (33,3%)	2 (28,6%)	5 (50,0%)	5 (21,7%)		8 (33,3%)	0 (0%)	10 (37,0%)		
Localização do GBM	Frontal	0 (0%)	1 (14,2%)	2 (18,1%)	9 (28,1%)	0,96	3 (27,3%)	1 (11,1%)	3 (25,0%)	5 (26,3%)	0,54	3 (50,0%)	1 (14,3%)	1 (10,0%)	4 (18,1%)	0,69	5 (25,0%)	0 (0%)	7 (28,0%)	0,47.	
	Temporal	0 (0%)	2 (28,6%)	3 (27,3%)	10 (31,2%)		3 (27,3%)	2 (22,2%)	3 (25,0%)	7 (36,8%)		1 (16,7%)	4 (57,1%)	4 (40,0%)	6 (27,3%)		5 (25,0%)	2 (33,3%)	8 (32,0%)		
	Parietal	0 (0%)	2 (28,6%)	3 (27,3%)	7 (21,9%)		3 (27,3%)	5 (55,6%)	1 (8,3%)	3 (15,8%)		1 (16,7%)	0 (0%)	2 (20,0%)	6 (27,3%)		7 (35,0%)	1 (16,7%)	4 (16,0%)		
	Combinadas	1 (100%)	2 (28,6%)	3 (27,3%)	6 (18,8%)		2 (18,1%)	1 (11,1%)	5 (41,2%)	4 (21,1%)		1 (16,6%)	2 (28,6%)	3 (30,0%)	6 (27,3%)		3 (15,0%)	3 (50,0%)	6 (24,0%)		
Procedimento Cirúrgico	Ressecção Completa	2 (100%)	4 (66,7%)	10 (71,4%)	22 (64,7%)	0,51.	7 (58,3%)	6 (60,0%)	11 (84,6%)	14 (66,7%)	0,29	3 (37,5%)	6 (75,0%)	8 (80,0%)	16 (72,7%)	0,47	14 (60,9%)	4 (66,6%)	20 (74,1%)	0,48	
	Ressecção Incompleta	0 (0%)	0 (0%)	2 (14,3%)	9 (26,5%)		4 (33,3%)	3 (30,0%)	2 (15,4%)	2 (9,5%)		4 (50,0%)	1 (12,5%)	1 (10,0%)	4 (18,2%)		7 (30,4%)	1 (16,7%)	3 (11,1%)		
	Estereotóxica	0 (0%)	2 (33,3%)	2 (14,3%)	3 (8,8%)		1 (8,4%)	1 (10,0%)	0 (0%)	5 (23,8%)		1 (12,5%)	1 (12,5%)	1 (10,0%)	2 (9,1%)		2 (8,7%)	1 (16,7%)	4 (14,8%)		
Quimioterapia	Realizada	2 (100%)	5 (83,3%)	10 (71,4%)	21 (63,6%)	0,74	10 (83,3%)	3 (30,0%)	9 (69,2%)	16 (80,0%)	0,03	6 (75,0%)	2 (25,0%)	7 (70,0%)	14 (77,3%)	0,07	11 (47,8%)	5 (83,3%)	22 (84,6%)	0,01	
	Não realizada	0 (0%)	1 (16,7%)	4 (28,6%)	12 (36,4%)		2 (16,7%)	7 (70,0%)	4 (30,8%)	4 (20,0%)		2 (25,0%)	6 (75,0%)	3 (30,0%)	5 (22,7%)		12 (52,2%)	1 (16,7%)	4 (15,4%)		
Radioterapia	Realizada	2 (100%)	5 (83,3%)	12 (85,7%)	29 (87,9%)	1,0	12 (100%)	8 (80,0%)	12 (92,3%)	16 (80,0%)	0,32	7 (87,5%)	7 (87,5%)	10 (100%)	19 (86,4%)	0,77	21 (91,3%)	6 (100%)	21 (80,8%)	0,42	
	Não realizada	0 (0%)	1 (16,7%)	2 (14,3%)	4 (12,1%)		0 (0%)	2 (20,0%)	1 (7,7%)	4 (20,0%)		1 (12,5%)	1 (12,5%)	0 (0%)	3 (13,6%)		2 (8,7%)	0 (0%)	5 (19,2%)		
Subtipos de GBM	Primário	0 (0%)	5 (71,4%)	6 (42,9%)	23 (63,9%)	0,16	7 (58,3%)	10 (90,9%)	10 (76,9%)	7 (30,4%)	0,002	3 (33,3%)	7 (87,5%)	7 (70,0%)	17 (70,8%)	0,12	15 (62,5%)	6 (85,7%)	13 (46,4%)	0,14	
	Secundário	2 (100%)	2 (28,6%)	8 (57,1%)	13 (36,1%)		5 (41,7%)	1 (9,1%)	3 (23,1%)	16 (69,6%)		6 (66,7%)	1 (12,5%)	3 (30,0%)	7 (29,2%)		9 (37,5%)	1 (14,3%)	15 (53,6%)		

5.8 ANÁLISES DAS CORRELAÇÕES ENTRE AS VARIÁVEIS E OS RESULTADOS DE FISH PARA EGFR

Para às análises das correlações das diversas variáveis em relação aos resultados de FISH com sonda para *EGFR* foram encontradas as seguintes associações estatisticamente significativas:

- Entre a negatividade imunoistoquímica de IDH1 e a presença de amplificação de EGFR ($p=0,004$), escore 3+ de EGFR ($p=0,03$);
- Associação entre GBMs escore 0 e 1+ para EGFR e ausência de amplificação gênica ($p=0,001$), e entre GBMs escore 3+ e a presença de amplificação de sinal para *EGFR* ($p=0,001$).

A imunoexpressão para EGFR foi escore 2+ em 9 GBMs. A técnica de FISH com sonda para *EGFR* foi realizada em 5 destes casos. Foi observada presença de amplificação de sinal para *EGFR* em 3 casos e ausência de amplificação para este gene em 2 casos. Nos demais casos não foi realizado FISH para *EGFR* por ausência de material disponível.

Não observamos diferenças estatisticamente significativas entre os resultados de FISH para EGFR e as demais variáveis estudadas.

5.9 ANÁLISES DAS TAXAS DE SOBREVIDA GLOBAL DOS PACIENTES COM GBM

Dos 59 pacientes estudados, 52 (88,1%) foram a óbito e 7 (11,9%) se encontram vivos. O tempo médio de sobrevivência dos pacientes foi de

19,99 meses (EP=2,63), sendo que 50% dos pacientes vieram a óbito em 14 meses (IC (95%) = [11,11 – 16,91]). O segmento médio dos pacientes foi de 43,9 meses (EP=5,9).

5.9.1 Análises univariadas das taxas de sobrevida global dos pacientes em relação aos dados demográficos, clínicos e histológicos

Foram observadas diferenças estatisticamente significativas para as curvas de sobrevivência entre a variável idade, tanto para faixa etária categorizada ($p=0,02$), como para ponto de corte em 42 anos ($p=0,007$), por meio da estatística log-rank padronizada com o propósito e se obter valor que melhor discrimina a sobrevida/prognóstico em relação à idade até o óbito, como pode ser observado na Figura 12.

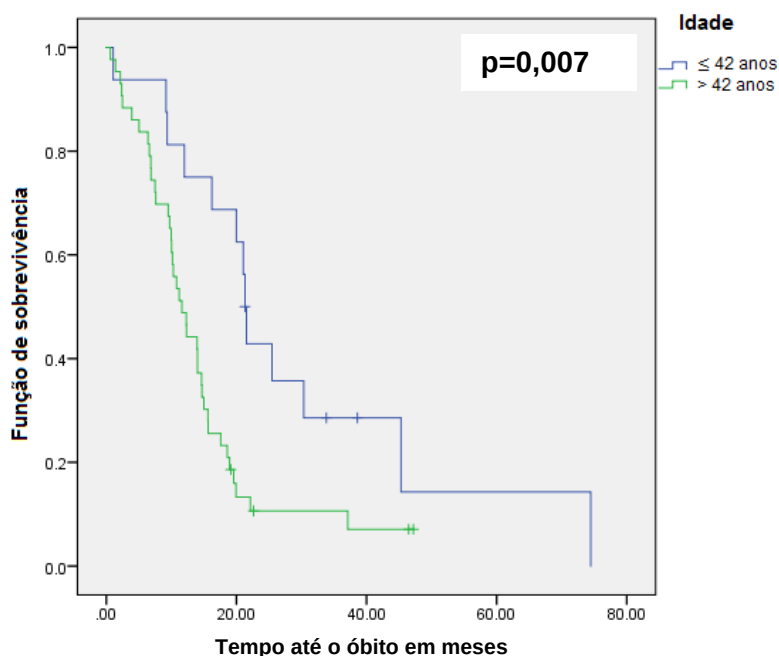


Figura 12 - Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier dos pacientes em relação à faixa etária.

A Figura 13 demonstra as curvas de sobrevivência dos pacientes em relação à localização topográfica específica do GBM no encéfalo, havendo diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$). Os pacientes acometidos por tumores da região frontal apresentaram a maior média de sobrevivência, com 34,43 meses. Os GBMs localizados na região parietal apresentaram 16,92 meses, 17,55 meses para tumores localizados em região temporal, 16,67 meses para tumores acometendo regiões combinadas, e 2,94 meses para GBMs localizados em regiões profundas do encéfalo.

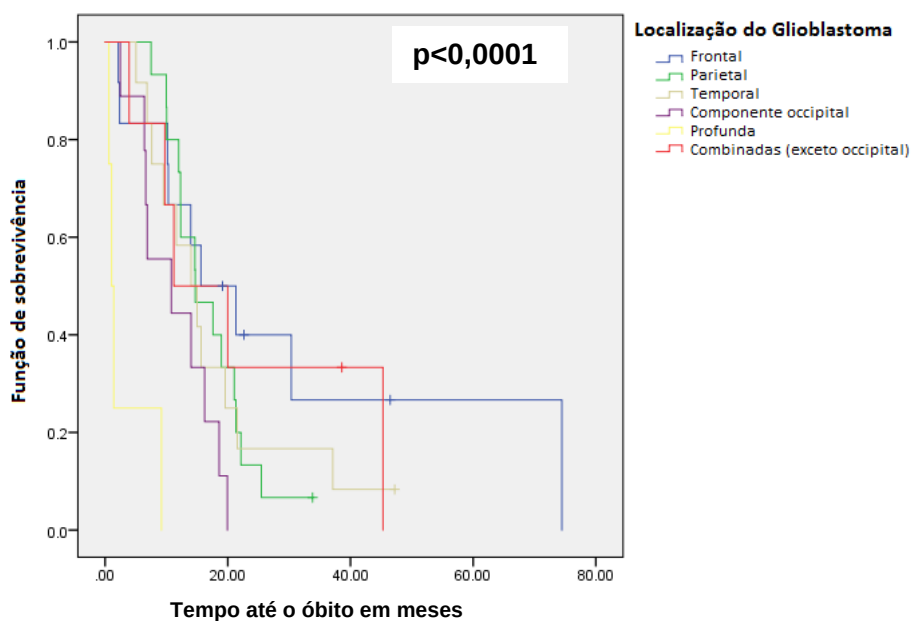


Figura 13 – Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier dos pacientes em relação à localização topográfica do GBM.

A sobrevivência média dos pacientes submetidos à radioterapia foi de 20,18 meses, e de 4,68 meses para os pacientes que não realizaram essa

modalidade de tratamento, havendo diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) entre as curvas de sobrevivência, como observado na Figura 14.

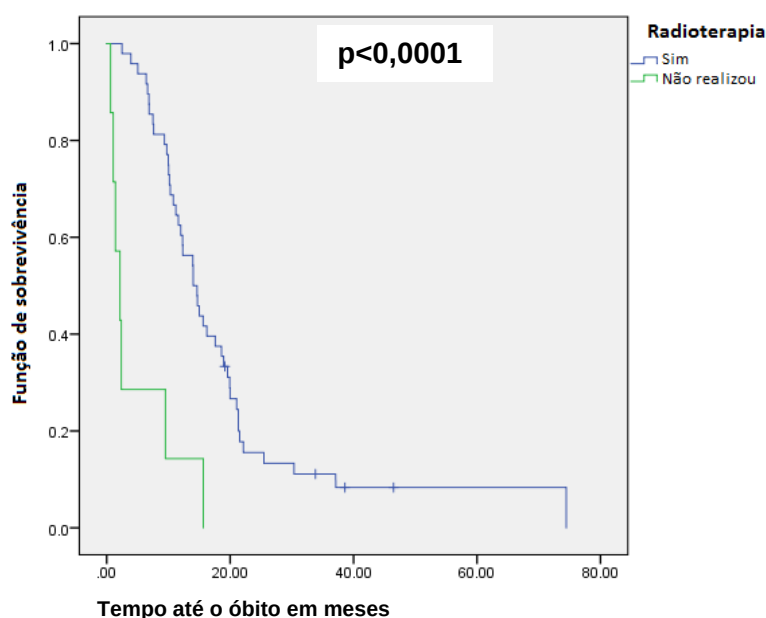


Figura 14 - Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier dos pacientes em relação à radioterapia adjuvante.

Em relação à variável GBM subtipo primário e secundário se observou sobrevida média de 14,09 meses para GBMs primários e de 28,23 meses para GBMs secundários, havendo diferença estatisticamente significativa ($p = 0,02$) entre as curvas de sobrevida, como demonstrado na Figura 15.

Em relação ao subtipo molecular de GBM a maior média de sobrevida foi observada para os pacientes com GBM proneural (28,23 meses), e a menor para os pacientes com GBM mesenquimal (13,37 meses). Os pacientes com GBM clássico apresentaram média de sobrevida de 15,25 meses. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0,05$), entre as curvas de sobrevida, como demonstrado na Figura 16.

Em relação às variáveis sexo, localização hemisférica do GBM, tamanho tumoral (ponto de corte estabelecido de 5,2cm), escala de resultado ou desempenho de Karnofsky (ponto corte de 90%), procedimento cirúrgico inicial, modalidade de tratamento quimioterápico adjuvante, não se observou diferenças estatisticamente significativas para as curvas de sobrevivência. Todos esses dados se encontram na Tabela 6.

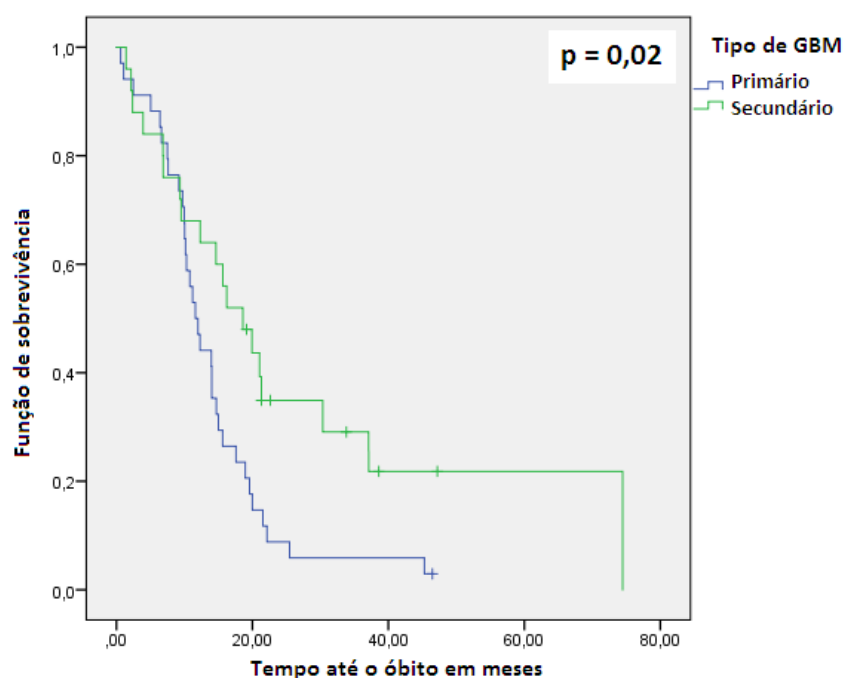


Figura 15 - Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier dos pacientes em relação ao tipo de GBM.

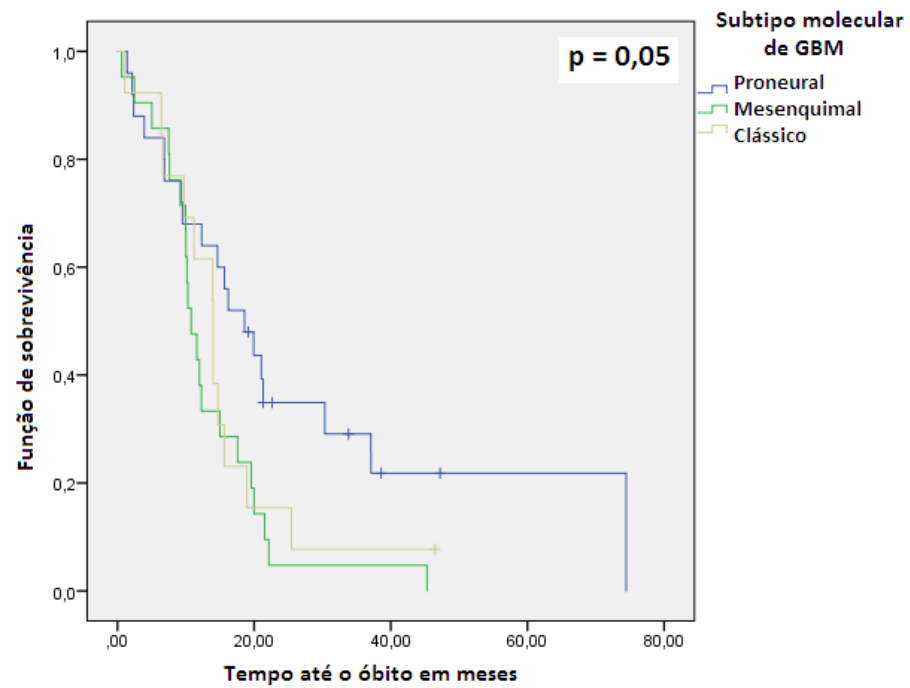


Figura 16 - Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier dos pacientes em relação ao subtipo molecular de GBM.

Tabela 6 – Sobrevivência dos pacientes em relação aos dados demográficos, clínicos e histológicos

Variáveis	Categorias	Sobrevida (meses)	Valor de p
Sexo	Feminino	23,75	0,13
	Masculino	14,71	
Idade	< 20	19,58	0,02
	(20 - 40]	32,67	
	(40-60]	16,68	
Categorizada	> 60	12,27	
Idade ponto de corte em 42 anos	≤ 42 anos	29,52	0,007
	> 42 anos	14,45	
Tamanho do Tumor	≤ 5,2 cm	23,40	0,20
	> 5,2 cm	13,04	
Localização Topográfica	Frontal	34,43	<0,0001
	Temporal	17,55	
Especificado Tumor	Parietal	16,92	<0,0001
	Combinadas	16,67	
Localização Hemisférica GBM	Profunda	2,94	0,32
	Direito	16,39	
KPS	Esquerdo	24,01	0,31
	≤ 90%	17,82	
Procedimento cirúrgico inicial	> 90%	22,39	0,72
	Ressecção radical	17,50	
Quimioterapia	Ressecção parcial	22,13	0,06
	Biópsia estereotáxica	8,72	
Radioterapia	Temozolamida	18,85	<0,0001
	Temozolamida + Bevacizumabe + Irinotecano	12,82	
Tipo de GBM	Temozolamida + Bevacizumabe	14,73	0,02
	Não realizou	10,87	
Subtipo Molecular do GBM	Sim	20,18	0,05
	Não	4,68	
	Primário	14,09	0,02
	Secundário	28,23	
	Proneural	28,23	0,05
	Mesenquimal	13,37	
	Clássico	15,25	

Posteriormente, a fim de avaliar a influência das variáveis independentes no tempo até o óbito, o modelo de regressão de riscos proporcionais de Cox simples foi ajustado aos dados. As estimativas do risco relativo e os correspondentes intervalos de confiança (IC 95%), são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Análise univariada dos parâmetros dados demográficos, clínicos e histológicos.

Variáveis	Categorias	n (n=59)	Número de óbitos	HR	IC95% (HR)	valor p
Sexo	Feminino	25 (42,4%)	21	Referência		
	Masculino	34 (57,6%)	31	1,54	0,87 – 2,72	0,13
Idade Categorizada	(20 - 40]	9 (15,3%)	8	Referência		
	(40-60]	29 (49,2%)	25	2,05	0,87 – 4,81	0,09
	>60	17 (28,8%)	16	3,41	1,38 – 8,45	0,008
Idade ponto de corte em 42 anos	≤ 42 anos	16 (27,1%)	13	Referência		
	> 42 anos	43 (72,9%)	39	2,42	1,24 – 4,72	0,009
Tamanho do Tumor	≤ 5,2 cm	39 (66,1%)	33	Referência		
	> 5,2 cm	18 (30,5%)	17	1,46	0,80 – 2,68	0,20
Localização Topográfica do Tumor (n=56)	Frontal	12 (20,3%)	8	Referência		
	Temporal	15 (25,4%)	14	1,85	0,74 – 4,64	0,18
	Parietal	12 (20,3%)	11	1,90	0,73 – 4,93	0,18
	Combinadas	12 (20,3%)	11	2,22	0,85 – 5,74	0,10
	Profunda	5 (8,5%)	5	26,48	7,11 – 98,63	< 0,0001
Procedimento Cirúrgico Inicial (n=56)	Ressecção Completa	38 (64,4%)	34	Referência		
	Ressecção Incompleta	11 (18,6%)	10	1,16	0,55 – 2,43	0,69
	Estereotáxica	7 (11,9%)	6	1,74	0,72 – 4,18	0,21
KPS	> 90 %	4 (6,8%)	3	Referência		
	≤ 90 %	49(83,1%)	45	1,83	0,56 – 5,91	0,32
Radioterapia (n=55)	Sim	48 (81,4%)	44	Referência		
	Não	7 (11,9%)	7	5,36	2,31 – 12,44	< 0,0001
Esquema Quimioterápico (n=55)	Esquema 1	22 (37,3%)	18	Referência		
	Esquema 2	7 (11,9%)	7	2,06	0,82 – 5,16	0,12
	Esquema 3	5 (8,5%)	5	1,48	0,54 – 4,07	0,44
	Outros	4 (6,8%)	3	0,40	0,09 – 1,73	0,22
	Não realizou	17 (31,0%)	17	2,11	1,06 – 4,19	0,03
Tipo de GBM	Secundário	25 (42,4%)	19	Referência		
	Primário	34 (57,6%)	33	1,98	1,10 – 3,55	0,02
Subtipo Molecular do GBM	Proneural	25(42,4%)	19	Referência		
	Mesenquimal	21 (35,6%)	21	2,14	1,13 – 4,06	0,02
	Clássico	13 (22,0%)	12	1,75	0,84 – 3,67	0,13

HR – Hazard ratio; IC95% - Intervalo de confiança de 95%

Esquema 1: Temozolamida; Esquema 2: Temozolamida + Bevacizumabe + Irinotecano; Esquema 3: Temozolamida + Bevacizumabe; outros (Carmustin, Metrotexate, etc).

Em relação a variável idade verificou-se que os pacientes com idade superior a 60 anos apresentam risco três vezes maior de óbito ($RR=3,41$), em relação àqueles com idade entre 20 e 40 anos. Ao se considerar idade o ponto de corte em 42 anos, o risco de óbito é duas vezes maior para os pacientes com idade acima deste ponto de corte ($RR=2,41$). Os pacientes com GBMs localizados em região cerebral profunda apresentam risco de óbito 26 vezes maior ($RR=26,48$), em relação aos pacientes apresentando tumor localizado na região frontal.

Ao se considerar o tratamento adjuvante radioterápico, os pacientes que não realizaram a radioterapia apresentaram risco de óbito cinco vezes maior ($RR=5,36$), em relação aos pacientes que foram tratados com radioterapia. Já os pacientes que não realizaram tratamento adjuvante quimioterápico apresentaram risco duas vezes maior de óbito nos em relação àqueles que receberam esquema terapêutico contendo somente Temozolamida ($RR=2,11$).

Em relação ao tipo de GBM, os pacientes com GBM primário apresentaram risco de óbito aumentado em quase duas vezes ($RR=1,98$), em relação ao GBM primário. Finalmente, ao se considerar a variável subtipo molecular de GBM, os pacientes com GBM mesenquimal apresentam risco de óbito aumentado em mais de duas vezes ($RR=2,14$), em relação ao GBM subtipo molecular proneural.

5.9.2 Sobrevivência dos pacientes em relação à expressão protéica dos marcadores estudados e presença de amplificação do EGFR

Os pacientes portadores de GBMs IDH1-positivos apresentaram sobrevida média de 28,23 meses, enquanto que para tumores com imunoexpressão negativa para IDH1 sobrevida foi de 14,09 meses. Ao avaliar as curvas de sobrevivência em relação à imunoexpressão de IDH1 nos GBMs, houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,02$), como demonstrado na Figura 17.

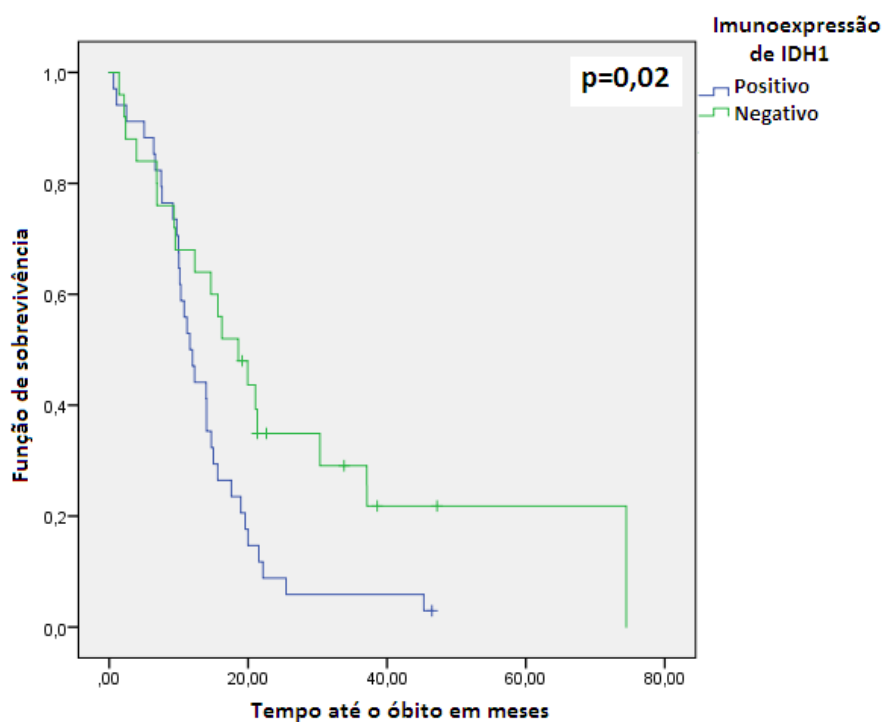


Figura 17 - Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier dos pacientes em relação à imunoexpressão de IDH1.

Não se observou diferenças estatisticamente significativas entre as curvas de sobrevivência para a imunoexpressão protéica dos antiporpos p53, MERTK,

CD44, OLIG2, ATRX, MGMT, EGFR, bem como FISH com sonda para *EGFR*.

Todos esses dados se encontram na Tabela 8.

Tabela 8 - Sobrevida dos pacientes em relação à expressão protéica dos marcadores estudados e FISH com sonda para *EGFR*

Marcador	Imunoexpressão	Sobrevida (meses)	Valor de <i>p</i>
IDH1	Positiva	28,23	0,02
	Negativa	14,09	
p53	Negativa	18,64	0,08
	Fraca	15,09	
	Moderada	33,66	
	Forte	15,13	
MERTK	Negativa	26,09	0,37
	Fraca	17,94	
	Moderada	17,02	
	Forte	12,62	
CD44	Negativa	14,63	0,95
	Fraca	17,29	
	Moderada	15,23	
	Forte	22,97	
OLIG2	Negativa	23,18	0,70
	Fraca	13,58	
	Moderada	16,77	
	Forte	18,21	
ATRX	Negativa	31,41	0,49
	Fraca	12,92	
	Moderada	15,80	
	Forte	16,05	
MGMT	Fraca	20,94	0,75
	Moderada	13,83	
	Forte	17,37	
	Escore 0	22,41	
EGFR (IHQ)	Escore 1+	14,49	0,21
	Escore 2+	11,72	
	Escore 3+	21,12	
	Amplificado	21,65	
EGFR (FISH)	Não amplificado	23,10	0,30

Posteriormente, a fim de avaliar a influência das variáveis independentes no tempo até o óbito, o modelo de regressão de riscos proporcionais de Cox simples foi ajustado aos dados. As estimativas do risco relativo e os correspondentes intervalos de confiança (IC 95%), são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Análise univariada da expressão imunoistoquímica dos marcadores pesquisados

Variáveis	Categorias	n (n=59)	Número de óbitos	HR	IC95% (HR)	valor p
IDH1	Positivo	25 (42,4%)	19	Referência		0,02
	Negativo	34 (57,6%)	33	1,98	1,10 – 3,55	
p53	Negativo	26 (44,1%)	24	Referência		
	Fraco	11 (18,6%)	11	1,16	0,56 – 2,40	0,68
	Moderado	7 (11,9%)	3	0,25	0,07 – 0,83	0,02
	Forte	15 (25,4%)	14	0,99	0,51 – 1,94	0,99
MERTK	Negativo	17 (28,8%)	13	Referência		
	Fraco	12 (20,3%)	10	1,13	0,50 – 2,56	0,75
	Moderado	16 (27,2%)	15	1,22	0,56 – 2,67	0,61
	Forte	14 (23,7%)	14	1,73	0,87 – 4,28	0,10
CD44	Negativo	2 (3,4%)	2	Referência		
	Fraco	7 (11,9%)	7	0,83	0,17 – 4,05	0,82
	Moderado	14 (23,7%)	13	0,81	0,18 – 3,61	0,78
	Forte	36 (61,0%)	30	0,72	0,17 – 3,06	0,65
OLIG2	Negativo	12 (20,4%)	11	Referência		
	Fraco	11 (18,6%)	10	1,58	0,65 – 3,83	0,30
	Moderado	13 (22,0%)	11	1,30	0,55 – 3,08	0,54
	Forte	23 (39,0%)	20	1,08	0,50 – 2,31	0,84
ATRX	Negativo	9 (12,3%)	7	Referência		
	Fraco	8 (13,6)	8	2,21	0,75 – 6,47	0,14
	Moderado	10 (16,9%)	9	1,60	0,56 – 4,59	0,37
	Forte	24 (40,7%)	22	1,83	0,73 – 4,54	0,19
MGMT	Fraco	24 (40,7%)	21	Referência		
	Moderado	7 (11,8%)	6	1,42	0,56 – 3,56	0,45
EGFR	Forte	28 (47,5%)	25	1,09	0,60 – 1,96	0,77
	Negativo (0)	25 (42,4%)	22	Referência		
	Negativa (1+)	8 (13,5%)	8	1,19	0,50 – 2,82	0,67
	Fraca (2+)	9 (15,3%)	9	1,25	0,57 – 2,75	0,57
FISH EGFR	Forte (3+)	17 (28,8%)	13	0,89	0,45 – 1,76	0,74
	Amplificado	15 (25,4%)	11	Referência		
	Não amplificado	17 (28,8%)	15	0,91	0,48 – 1,72	0,78

HR – Hazard ratio; IC95% - Intervalo de confiança de 95%; NA – não avaliável.

Ao se avaliar a sobrevida dos pacientes em relação à imunoexpressão de IDH1 observamos risco de óbito duas vezes maior para os pacientes com GBM negativo para esse marcador ($RR=1,98$). Em relação ao anticorpo p53 verificou-se que os pacientes com imunoexpressão proteica moderada para esse biomarcador apresentaram risco de óbito reduzido em 75% ($RR=0,25$), em relação àqueles tumores com imunoexpressão negativa para p53.

6 DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, alterações genéticas e epigenéticas relacionadas ao desenvolvimento do câncer foram identificadas por meio do uso de tecnologias moleculares avançadas, empregadas simultaneamente em um grande número de tumores (FUTREAL et al. 2004). Isso tem alterado a compreensão da biologia tumoral, evidenciando, sobretudo, a presença de heterogeneidade entre as neoplasias. A compreensão das alterações genéticas é de central importância para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas eficazes, seja limitando o crescimento tumoral, ou permitindo a compreensão dos mecanismos de resistência do tumor à determinadas estratégias de quimioterapia ou radioterapia (SOUZA et al. 2009).

A espécie humana contabiliza mais de uma centena de diferentes tipos de cânceres (National Cancer Institute-NCI 2014). O GBM é um tumor maligno originário de células astrocitárias extremamente agressivo, com evolução rápida e devastadora no organismo com comprometimento de funções vitais culminando com o êxito letal em poucos meses após o diagnóstico em virtualmente todos os pacientes diagnosticados (LOUIS et al 2007). Diversos estudos têm sido realizados com o objetivo de proporcionar uma compreensão mais ampla das alterações genéticas associadas a este tumor (APPIN E BRAT 2015; KONDO 2017; NISSIRI E DAS 2017).

O presente estudo determinou a classificação dos subtipos moleculares de GBMs baseados no perfil de expressão imunoistoquímica dos anticorpos

IDH1, p53, MGMT, EGFR, OLIG2, ATRX, MERTK e CD44, e pesquisa de amplificação do gene *EGFR* por FISH em 59 GBMs, bem como as associações dos subtipos com as características clínicas e taxas de sobrevida global dos pacientes.

A nossa casuística foi selecionada aleatoriamente em diferentes períodos do tempo (casos entre 2012 a 2014, e casos entre 1997 e 2000), com inclusão de casos de GBMs sabidamente IDH positivos. Inicialmente, o intuito foi de realizar pirosequenciamento nos casos mais recentes de GBM, por conter material embocado de melhor qualidade para extração de DNA e realização de técnicas moleculares, além de maior confiabilidade e facilidade de acesso dos dados de prontuário clínico. Devido às dificuldades técnicas e orçamentárias não foi possível esse procedimento. Desta forma, casos já disponíveis em arquivo do departamento de patologia com dados clínicos e blocos disponíveis foram incluídos. Como referido, alguns GBMs IDH1 positivos da rotina do Departamento de Anatomia Patológica do AC Camargo Cancer Center foram incluídos com a finalidade de criar grupos passíveis de comparação. Existe, portanto, vício de amostragem, embora pouco relevante em relação ao objetivo principal deste trabalho, deve ser considerada.

Em nosso estudo houve predomínio do GBM em pacientes do sexo masculino, e maior frequência dos GBMs primários em pacientes masculinos. Nossos achados são concordantes com dados prévios da literatura, sem, contudo, descrever qualquer fator epidemiológico, genético ou molecular que justifique este achado (OHGAKI e KLEIHUES 2007). Verificamos maior sobrevida em pacientes do sexo feminino. O gênero não parece constituir fator

prognóstico isolado. A média de idade dos pacientes na ocasião do diagnóstico do GBM foi de 51 anos. O GBM pode ocorrer em qualquer faixa etária, porém, de modo geral a maior incidência é verificada após os 60 anos, com média de idade ao diagnóstico de 64 anos (JEMAL et al. 2011; LOUIS et al. 2016; Ministério da Saúde 2016). A discordância com dados de literatura pode ser justificada pela casuística reduzida, incluir pacientes pediátricos, e finalmente conter pacientes com tumor sabidamente IDH1 positivos, que ocorrem em indivíduos com menor idade.

Constituem fatores prognóstico para o GBM a menor idade dos pacientes e o KPS > 80% (LAMBORN et al. 2004; PÉUS et al. 2013). Neste estudo os pacientes com idade inferior a 42 anos foram os que apresentaram maior sobrevida. Por outro lado, demonstramos que nos pacientes com idade superior a 60 anos o risco de óbito foi três vezes maior. A idade avançada é fator relacionado ao pior prognóstico deste tumor, por vários motivos, entre os quais a presença de comorbidades próprias do idoso e maior frequência do tipo histológico primário do GBM e subtipos moleculares clássico e mesenquimal nesses pacientes. Revisões epidemiológicas indicam que a incidência deste tumor aumenta consideravelmente com a idade, atinge pico aos 75 anos e apresenta queda após os 85 anos (JEMAL et al. 2011; OSTROM et al. 2013; Ministério da Saúde 2016). Portanto, nos países que apresentam envelhecimento da população, como é o caso do Brasil, ao ganho expressivo na expectativa de vida nas últimas décadas, deve-se associar maior número de casos diagnosticados deste tumor. Desta maneira, esse dado torna-se de extrema relevância, pois o GBM é um tumor de difícil manejo, envolve equipes

multidisciplinares complexas, com alto investimento humano e financeiro (STUPP et al. 2005).

O GBM é raro na infância com incidência de 0,8 casos por 100 mil habitantes, enquanto que no adulto estima-se acima de 7,2 casos por 100 habitantes a cada ano (OSTROM et al. 2013). Apresenta características genéticas e epigenéticas distintas dos GBMs de adultos (JONES et al 2012). Em nosso estudo 3 GBMs pediátricos foram incluídos. De maneira interessante dois deles foram classificados como subtipo molecular mesenquimal e o terceiro correspondeu a GBM clássico, todos com evolução rápida para o óbito (média de 7 meses). Os GBMs desta faixa etária são especialmente agressivos, característica também descrita nestes subtipos moleculares. Não se disponibiliza na literatura dados sobre a distribuição dos subtipos moleculares de GBMs entre os gliomas pediátricos (LOUIS et 2016).

Apesar da nossa pequena casuística, esses achados são bastante interessantes, e mostram a importância de se determinar os subtipos moleculares dos GBMs incidentes em todas as faixas etárias, uma vez que pode agregar informações sobre o prognóstico da doença, e eventualmente selecionar grupos para tratamentos específicos. Estudos adicionais devem ser realizados nos tumores dessa faixa etária reunindo maior número de casos para confirmar a predominância do subtipo molecular mesenquimal e / ou clássico. Em nossa casuística um paciente pediátrico apresentou GBM localizado em região mediana cerebral supraselar, classificado como GBM clássico. Os gliomas difusos da linha média H3 K27M mutados ocorrem em pacientes com idade entre 5 a 11 anos e reúnem características de agressividade. Apresentam perfil

genético distinto, que inclui mutações heterozigóticas na posição K27 de genes codificadores de histonas, além de mutações *TP53*, amplificação de *PDGFRA* e mutações de *ATRX* (LOUIS et 2016). Não verificamos, contudo, descrições em dados prévios de literatura de associação deste tipo de glioma com o subtipo molecular específico do GBM.

Neste estudo, semelhante a dados prévios da literatura, o acometimento dos lobos frontal, temporal e parietal, juntamente com a combinação de mais de uma região topográfica representam a localização preferencial da grande maioria dos GBMs. Sabe-se que os GBMs tipicamente estão localizados na região supratentorial, sendo raros no cerebelo e muito raros na coluna espinhal (ENGELHARD et al. 2010; JEMAL et al. 2011; KONAR et al. 2016; Ministério da Saúde 2016). Associações entre os subtipos moleculares e a topografia dos GBMs já foram demonstradas, e consoante com dados prévios de literatura observamos GBM proneurais (IDH1 positivos) localizados predominantemente na região frontal (LOUIS et al. 2016). Não há dados que expliquem a predominância da localização de subtipos de GBMs, entretanto, o local de ocorrência deste tumor no SNC impacta diretamente na evolução da doença.

A localização do GBM está diretamente relacionada com a evolução da doença. Os tumores hemisféricos, sobremaneira os localizados nos lobos frontais são os que apresentam maior tempo de sobrevida (LAMBORN et al 2004), dado verificado em nosso estudo. Nos chamou bastante atenção a diferença do tempo médio de sobrevida para os tumores localizados em região profunda, quando comparados para outras regiões. Nessas situações, esse

tumores comprometem precocemente regiões eloquentes cerebrais, conferem rápido declínio do KPS com óbito em poucos meses.

Os exames de imagem são fundamentais no diagnóstico dos tumores do SNC, pois são capazes de fornecer informações importantes como o tamanho estimado e a localização exata do tumor, o comprometimento de áreas eloquentes, presença de áreas de necrose e hemorragia, entre outras (YU et al. 2016). Em nosso estudo, utilizamos os dados observados nos exames de ressonância magnética do encéfalo para determinação do tamanho estimado do tumor no momento do diagnóstico. Portanto, o tamanho da lesão tumoral não é exato, pois depende da aferição por meio de exame de imagem. A área de neoplasia pode estar sobreposta à regiões de edema, hemorragia e necrose. Os GBMs são neoplasias extremamente infiltrativas, não havendo limite tumoral evidente com o tecido normal adjacente (LOUIS et al. 2007). A medida do tumor a partir do conjunto da peça enviada ao estudo histopatológico oferece menor acurácia para se estimar o tamanho do GBM, pois as ressecções podem ser parciais pela necessidade de preservar áreas eloquentes, além de parte do tumor podendo ser aspirada no procedimento operatório.

Nem sempre o tamanho de tumor reflete seu potencial de letalidade. Quando se considera a topografia de ocorrência do GBM, ou seja, o SNC, as dimensões do tumor podem, em algumas situações, ser relegadas ao segundo plano, pois tumores pequenos acometendo regiões cerebrais profundas, tronco cerebral e fossa posterior cursam com tempo curto de doença até o óbito. Desta forma, o tamanho da neoplasia deve ser associado à topografia exata no SNC.

Em nosso estudo o tamanho médio dos tumores no momento do diagnóstico foi de 4,7 cm, variando de 3,0 cm a 7,0 cm. Os nossos dados relacionados às dimensões dos GBMs demonstraram que tumores com maiores dimensões ($\geq 5,2$ cm), conferiram menor taxa de sobrevida. Dados semelhantes são demonstrados por AHMADLOO et al. (2013). Esses autores consideraram ponto de corte em 5,0 cm em relação ao tamanho dos GBMs, associando-se às menores taxas de sobrevida os pacientes com tumores com dimensões superiores a 5,0 cm. Neoplasias agressivas progridem rapidamente em tamanho por intensa atividade proliferativa e infiltrativa. Ganham e destroem os tecidos vizinhos, promovendo extenso comprometimento do tecido cerebral e da capacidade funcional do paciente. Atingem grande volume, o que indica doença avançada e restringem a possibilidade de ressecção cirúrgica, associando-se ao pior prognóstico e menor sobrevida global (OHGAKI et al. 1999).

Diversos estudos tem demonstrado que o KPS dos pacientes ao diagnóstico de GBM é um fator associado ao prognóstico (LAMBORN et al. 2004; KREX et al. 2007). Sabe-se que os melhores valores de KPS estão associados principalmente à idade dos pacientes, sendo os melhores resultados observados em pacientes mais jovens (KREX et al. 2007; WALID 2008). A capacidade de realizar as atividades diárias do paciente no momento do diagnóstico reflete o grau de comprometimento das funções cerebrais provocadas pelo tumor. Em 2004 LAMBORN et al. estudaram os fatores prognósticos associados às taxas de sobrevida dos pacientes com GBM estratificando-os em grupos de risco, sendo o grupo de menor risco composto por pacientes com idade inferior a 40 anos e com tumor de localização frontal, o

grupo de risco intermediário constituído por pacientes com KPS>70, idade entre 40 e 65 anos e com ressecção tumoral total ou subtotal, e o grupo de maior risco composto por pacientes com idade superior a 65 anos, KPS<80 ou nos quais somente foram realizadas biópsias para o diagnóstico da doença. Em nosso estudo não observamos correlações estatisticamente significativa entre o valor do KPS inicial, faixa etária e modalidade de ressecção cirúrgica, bem como em relação às taxas de sobrevivência dos pacientes, entretanto verificamos maior sobrevida nos pacientes com KPS>90%.

O procedimento cirúrgico tem como objetivo remover maior quantidade de tecido neoplásico possível. De fato, a sobrevida média dos pacientes em nosso foi maior naqueles submetidos à ressecção radical do tumor, quando comparado às ressecções parciais ou às biópsias estereotáxicas diagnósticas. A localização e tamanho do tumor são decisivos para a estratégia cirúrgica, ou ainda, para contra indicar este procedimento. Os tumores localizados em regiões cerebrais profundas, próximos à áreas motoras ou sensitivas são de abordagem cirúrgica difícil, pelo risco de mortalidade ou grande morbidade pós operatória. O KPS também orienta pela decisão cirúrgica. Pacientes com grande comprometimento de estatus funcional podem não se favorecer da abordagem para ressecção tumoral. Por outro lado, a queda súbita do KPS pode indicar áreas hemorrágicas tumorais, que necessitam de operação iminente. Nestes casos, o KPS pode se elevar pela remoção de “efeito de massa” tumoral associado a piora do estatus do paciente (NIEDER et al. 2005) .

A ressecção cirúrgica completa do tumor é o tratamento recomendado para a maioria dos tumores cerebrais, tendo como objetivo principal a remoção

ampla da neoplasia com a máxima preservação do tecido normal adjacente e das suas funções neurológicas (STUPP et al. 2005). Tem se observado que os pacientes com abordagem cirúrgica do tumor com máxima excisão de tecido neoplásico apresentam maiores taxas de sobrevida global (BURGER e GREEN 1987).

Contudo, a localização do tumor em área eloquente permite apenas a citorredução do volume neoplásico ou biópsia da lesão com finalidade diagnóstica. A maioria dos pacientes de nosso estudo (64,4%), foi submetida a procedimento cirúrgico com o objetivo de ressecar o maior volume tumoral possível (completa/radical), mas este dado não mostrou associação significativa com as curvas de sobrevida global.

Esquemas de tratamentos adjuvantes com quimioterapia e radioterapia vêm sendo utilizados para os pacientes com GBM desde 1999. Os esquemas de quimioterapia adjuvantes para os pacientes com GBM são centrados essencialmente no uso de um fármaco alquilante: a Temozolamida (ESTELLER et al. 2000; STUPP et al. 2005). Esse agente de administração oral tem sido considerado a primeira linha de tratamento adjuvante destes tumores, essencialmente nos GBMs que apresentem hipermetilação no promotor do gene *MGMT* (HEGI et al. 2005; MOLENAAR et al. 2014b). A mediana de sobrevida global é aumentada em 2,5 meses com o uso de Temozolamida associada à radioterapia em comparação à radioterapia como modalidade terapêutica exclusiva (STUPP et al. 2005; KHOSLA 2016). Entretanto, na presença de recidivas ou progressão tumoral, outras drogas, inicialmente

utilizadas no tratamento de outros tipos de tumores, têm sido empregadas, como o Bevacizumabe e o Irinotecano (MESTI et al. 2015).

A grande maioria dos pacientes do nosso estudo foi tratada com algum tipo de esquema quimioterápico adjuvante, sendo o uso isolado de Temozolamida o esquema mais utilizado. Para os pacientes que apresentaram recidivas, progressão tumoral ou ausência de resposta adequada com o uso da Temozolamida, optou-se por segunda linha de adjuvância empregando-se Bevacizumabe e/ou Irinotecano. Não observamos diferenças nas curvas de sobrevida globais entre os pacientes de acordo com os esquemas de quimioterapia utilizados, porém o risco de óbito foi duas vezes maior para os pacientes que não realizaram nenhum tipo de quimioterapia.

A radioterapia desempenha um papel central no tratamento dos GBMs, tanto no cenário adjuvante, quanto no paliativo de doença inicialmente inoperável ou recorrente (STUPP et al. 2005; KAINA et al. 2007). A irradiação focal por meio de técnicas convencionais permite estabilizar ou melhorar a condição funcional de muitos doentes. A dose empregada situa-se entre 54-60 Gy, podendo atingir 72 Gy com hiperfracionamento; o campo irradiado deve incluir a área de realce visível à TC com margens de 2-3 cm ou margem de 1-2 cm em torno das imagens de RM ponderadas em T2. Doentes com lesão pequena (até 4,0 cm) e contra indicação para cirurgia podem se beneficiar de radioterapia focal estereotáxica. Tipicamente o tratamento radioterápico é realizado concomitantemente ao uso da Temozolamida (MESTI et al. 2015). Em nosso estudo a grande maioria dos pacientes recebeu tratamento adjuvante radioterápico, e os pacientes que não foram submetidos a esse tratamento

apresentaram risco de óbito cinco vezes maior. Contudo, este dado deve ser interpretado com cautela uma vez que a gravidade da doença com rápida progressão ao óbito pode limitar, ou ainda, inviabilizar o uso de qualquer modalidade terapêutica.

O principal objetivo deste estudo foi determinar os subtipos moleculares em 59 GBMs. Conforme a assinatura genética o GBM é classificado nos subtipos clássico, mesenquimal e proneural (VERHAAK et al. 2010). A distinção entre os subtipos moleculares de GBMs não faz parte da caracterização deste tumor rotina diagnóstica, pois necessita de técnica complexa e dispendiosa, muitas vezes envolvendo a utilização de material congelado. Portanto, está indisponível na maioria dos serviços de diagnóstico em Patologia. Entretanto, a definição do subtipo molecular do GBM complementa os aspectos morfológicos e fornece informações valiosas em relação ao prognóstico da doença. Pode, ainda, permitir a estratificação dos pacientes em relação ao tratamento associado ao tipo de GBM. Desta forma, a caracterização do subtipo molecular de GBM deve ser estimulada por meio de painéis imunoistoquímicos validados que reproduzam a assinatura genética desses tumores.

Recentemente, alguns trabalhos procurando aproximar os resultados de sequenciamento do DNA para a caracterização das alterações genéticas do GBM avaliaram a expressão de seus produtos proteicos (VERHAAK et al. 2010). Assim, a confecção de painéis imunoistoquímicos tem o objetivo de determinar a assinatura molecular aproximada e específica entre os subtipos moleculares do GBM (LE MERCIER et al. 2012; CONROY et al 2014; POPOVA et al. 2014; TANBOON et al. 2016). Contudo, não há consenso, nem para a

escolha dos anticorpos a serem pesquisados, nem na padronização das interpretações das reações imunoistoquímicas. O número de anticorpos incluídos nos painéis são variáveis. Nos parece razoável o emprego do menor número possível de marcadores para se evitar confusões de interpretação, ou dificuldade de reprodutibilidade entre os observadores. O GBM é neoplasia de grande heterogeneidade intra e intertumoral.

Em 2014 TANBOON et al. fizeram revisão da imunoexpressão de diversos anticorpos com possível aplicabilidade na detecção aproximada de alterações moleculares em gliomas, não propondo especificamente um painel para a distinção dos subtipos moleculares de GBMs. POPOVA et al. (2014) consideraram suficiente reações imunoistoquímicas para EGFR, CD44, MERTK, p53 e OLIG2 na distinção dos subtipos moleculares do GBM. Já Le MERCIER et al. (2012) utilizaram a imunoexpressão de EGFR, IDH1 e PDGFRA como capazes de distinguir dois subtipos de GBMs: *“Proneural-like”* and *“Classical-like”*. Todos esses estudos mostram que há necessidade de aprimoramento da classificação morfológica dos GBMs integrando os dados moleculares aos achados histológicos.

Nossa proposta foi utilizar conjunto de marcadores imunoistoquímicos com a possibilidade de identificar alterações genéticas das células tumorais, através de seus efeitos na expressão proteica. Desta forma, realizamos reações imunoistoquímica para grupo de anticorpos relacionados às alterações genéticas mais comumente observadas nos subtipos moleculares dos GBMs (PHILLIPS et al 2006; VERHAACK et al. 2010; MOTOMURA et al. 2012). O subtipo clássico é caracterizado pela amplificação de *EGFR*, relacionada com a

hiperexpressão protéica de EGFR, bem como ausência de expressão da proteína p53. Há aumento da expressão de proteínas relacionadas à transição epitélio-mesênquima no GBM subtipo mesenquimal, como para MERTK e CD44. Finalmente, GBM subtipo proneural é caracterizado pela expressão de IDH1, aumento das expressões proteicas para p53, OLIG2 e ATRX (PHILLIPS et al 2006; VERHAAK et al. 2010; MOTOMURA et al. 2012)..

Tumores com fenótipo hipermetilado (como a presença de metilação do promotor de *MGMT*), também se relacionam com o perfil transcricional proneural (OHGAKI e KLEIHUES 2013). Finalmente, OGURA et al. (2015), analisaram as imunoexpressões do IDH1, p53 e *MGMT* em GBMs. Esses autores verificaram que o perfil imunoistoquímico dos GBMs com positividade para IDH1, associado à hiperexpressão de p53 e metilação do promotor do *MGMT*, se relacionou com maior sobrevida global. Desta maneira, propuseram painel simplificado imunoistoquímico para caracterização imunofenotípica dos GBMs, relacionando a combinação da expressão dessas três proteínas (IDH1, p53 e *MGMT*), como possível fator prognóstico prático de rotina. Não fizeram especificamente referência ao subtipo molecular de GBM, entretanto os tumores proneurais apresentam o perfil imunofenotípico relacionado aos tumores com melhor prognóstico descritos por esses autores.

Em relação à classificação dos GBMs conforme o tipo evolutivo consideramos os tumores com imunoexpressão positiva para IDH1 secundários, e os negativos, independente das demais imunoexpressões protéicas GBMs primários. Para a distinção entre os subtipos moleculares de GBMs construímos um algoritmo simplificado. Desta forma, a positividade imunoistoquímica para

IDH1 distinguiu o GBM proneural. Tumor IDH1 negativo associado ao aumento da expressão de EGFR o GBM clássico, e finalmente a imunexpressão de MERTK e / ou CD44 em tumores com negatividade tanto para IDH1 e EGFR o subtipo molecular mesenquimal.

Em nosso estudo classificamos 25 GBMs como subtipo molecular proneural, e da mesma forma 25 tumores secundários. A presença de imunofenótipo IDH1-mutado é característica destes tipos GBMs. Ocorrem em pacientes mais jovens e associam melhor prognóstico (VERHAAK et al. 2010, LE MERCIER et al. 2012; CONROY et al. 2014; POPOVA et al. 2014).

A avaliação de *IDH1*, por sequenciamento do gene, ou pela imunexpressão da proteína, é amplamente adotada como marcador prognóstico e auxilia na individualização das estratégias de tratamento. A positividade imunoistoquímica para a proteína *IDH1* mutada se relaciona com a presença de mutação de *IDH1* (status avaliado pelo sequenciamento do DNA), com taxas de concordância variando entre 88%-100% (JABBAR et al 2015). Portanto, a pesquisa da proteína mutada deve sempre ser realizada na avaliação dos GBMs, pois a imunoistoquímica é uma técnica simples, barata de fácil execução e interpretação. Auxilia na caracterização de perfil molecular do GBM e agrega fator prognóstico (KRELL et al. 2011; KRELL et al. 2013; KRELL et al. 2015).

Verificamos entre os GBMs proneurais associações com outras expressões proteicas características deste subtipo molecular, tais como imunexpressão forte para OLIG2 e a perda da expressão nuclear de ATRX. Esses marcadores também devem ser avaliados, pois auxiliam na distinção dos

perfis imunofenotípicos do GBM. Em nosso estudo encontramos associação estatisticamente significativa entre as imunoexpressões de IDH1 e OLIG2. Verificamos, ainda, associação estatisticamente significativa entre OLIG2 e os GBMs proneurais e secundários. A imunomarcagem para OLIG2 tem sido relacionada aos GBMs com componente de menor grau de malignidade (KUPP et al. 2016). Desta forma, associa-se a aos subtipos de tumores com história evolutiva a partir da progressão de astrocitoma difusos (grau II da OMS) e astrocitomas anaplásicos (grau III da OMS). Portanto, existe associações entre a presença de IDH1 mutada, aumento da expressão de OLIG2 entre GBMs proneurais (KUPP et al. 2016).

Em nosso estudo 13 GBMs foram classificados como subtipo molecular clássico, conforme a imunoexpressão positiva para EGFR e / ou presença de amplificação para *EGFR*. Alterações de *EGFR* ocorrem em cerca de 57% dos GBMs, acometendo mais de 60% dos primários e somente 10% dos tumores secundários (OHGAKI e KLEIHUES 2007). Cerca de 50% dos GBMs classificados como primários em nosso estudo apresentaram aumento da expressão de EGFR e / ou amplificação deste gene, concordante com dados prévios de literatura. Portanto, alterações em *EGFR* parecem ser tumor específicas, ou seja, se associam ao subtipo molecular clássico e GBM primário, mas a validade de seu uso como marcador prognóstico não é clara até o momento. De fato, em nosso estudo não observamos diferenças nas curvas de sobrevida dos pacientes em relação às avaliações tanto de expressão protéica ou amplificação gênica de *EGFR*. Até o momento, o uso de inibidores de EGFR não tem demonstrado eficácia do tratamento desta neoplasia,

provavelmente por mecanismos de escape que prejudicam a ação da droga. Entretanto, estudos recentes tem demonstrado que pacientes com amplificação e super expressão de *EGFR*, tem se beneficiado com tratamentos com Temozolamida (WELLER et al. 2014; COMINELLI et al. 2015).

Em relação às outras alterações genéticas concomitantes, os GBMs com amplificação de *EGFR* geralmente apresentam *IDH1* tipo selvagem. Nossos resultados foram concordantes com esse dado prévio de literatura, ou seja, observamos correspondência entre os achados imunoistoquímicos das expressões protéicas de *EGFR* e *IDH1* (LOUIS et al. 2016). Desta forma houve correlação entre a negatividade imunoistoquímica para *IDH1* e *EGFR* 3+ (positivo forte). Para os casos de imunoexpressão *EGFR* 2+, pode-se complementar com a realização de técnica de FISH com sonda para *EGFR*. Conforme referido por OHGAKI e KLEIHUES (2007), todos os GBMs que apresentam amplificação de *EGFR* mostram aumento da expressão proteica de *EGFR*. Por outro lado, cerca de 70%-90% de todos os tumores com aumento da de *EGFR* apresentam amplificação deste gene.

Para a determinação do subtipo mesenquimal de GBM consideramos tumores com presença da imunoexpressão de *MERTK* e / ou *CD44* associado ao imunofenótipo negativo para expressão de *EGFR* e de *IDH1*. Desta forma, identificamos 21 GBMs mesenquimais. Mutações de *MERTK* parecem estar associadas com imunofenótipo mais agressivo, onde a hiperexpressão desta proteína se associa com maior capacidade de invasão e sobrevivência das células tumorais (WANG et al. 2013). Em 2014, POPOVA et al. propuseram uma classificação molecular dos GBMs por meio do uso de biomarcadores, e

observaram que a marcação para o anticorpo MERTK se associou com o subtipo molecular mesenquimal. Os GBMs com esse imunofenótipo ocorrem em pacientes mais velhos, apresentam evolução clínica agressiva, caracterizam-se morfológicamente por células com atipias pronunciadas, com núcleos bizarros e extensas áreas de necrose (PHILLIPS et al. 2006). Essas características morfológicas foram observadas nos cortes histológicos dos GBMs mesenquimais de nosso estudo, ou seja, tumores com grande pleomorfismo celular e intensa atipia nuclear.

As células gliais apresentam capacidade de sofrer alterações do tipo de transição epitélio-mesênquima (KUPP et al. 2004). Este processo é influenciado pelo microambiente tumoral, particularmente pela presença de hipóxia. Essas células transformadas reúnem maior capacidade infiltrativa e destrutiva (WANG et al. 2017). A presença de transformação mesenquimal nas células do GBM evidencia a intensa modificação tumoral quer seja pela aquisição de novas mutações genéticas quer por aquisição de alterações epigenéticas, o que se associa à grande heterogeneidade intratumoral. Isso tudo se reflete na dificuldade de abordagem terapêutica desses tumores, que invariavelmente apresentam recidivas e progressão por radio e quimiorresistência. A compreensão da aquisição de fenótipo mesenquimal observada nos GBMs pode ser extremamente útil em se estabelecer recursos terapêuticos individualizados (IWADATE 2016).

Uma das características mais importantes do GBM é a heterogeneidade do tumor. A heterogeneidade intertumoral é caracterizada principalmente por alterações genéticas distintas que ocorrem em tumores individuais originários

do mesmo órgão e permitem a classificação desses tumores em diferentes subtipos moleculares. A heterogeneidade intratumoral, ou seja, a diversidade dentro dos tumores individuais, se relaciona à plasticidade das células tumorais como uma nova fonte de células-tronco cancerígenas (WANG et al. 2017). Desta forma, o perfil genético do GBM parece ser dinâmico, mudando ao longo do tempo, e tornado a heterogeneidade intertumoral ainda maior. Fato interessante é que mesmo com tamanha complexidade genética, os subtipos de GBM muitas vezes são indistintos em suas características morfológicas e histopatológicas. Entretanto, é importante a diferenciação destes tumores, pois implica em diferenças em relação ao prognóstico e estratégias de tratamento. Por isso o interesse em se compor painéis que aproximem o perfil genético do subtipo molecular a padrões de expressão protéica.

Os dados disponíveis em literatura relacionados à composição de painéis imunoistoquímicos para a detecção dos subtipos moleculares de GBMs são bastante escassos (LE MERCIER et al. 2012; MOTORUBA et al. 2012; CONROY et al. 2014; POPOVA et al. 2014). A dificuldade de se estabelecer esses painéis pode também ser justificada pela complexidade biológica desta neoplasia. A mudança de perfil genético e alterações no transcrito podem se refletir no aumento ou diminuição expressão de suas proteínas. Sabe-se que os GBMs “transitam” por diferentes subtipos moleculares. BHAT et al. (2013), propuseram um fenômeno por eles denominado “*Transição Proneural-Mesenchimal*” como responsável pela radio-resistência e recorrência agressiva nos gliomas. Neste modelo de resistência à radioterapia e progressão agressiva do tumor com sobrevida curta, as células do glioma adquirem características

mesenquimais e perdem a expressão de genes proneurais. Desta forma, o perfil de expressão protéica relacionada a esses genes pode ser modificado dentro dos subtipos moleculares do GBM. KUPP et al. (2016), nos exemplificam esse fato, pois demonstraram que células tronco gliais de glioma proneural fortemente apresentam hiperregulação da proteína CD44, característica relacionada ao GBM mesenquimal.

Deve-se, ainda, levar em consideração que o perfil de imunoexpressão das proteínas tumorais sofre alterações devido ao tratamento empregado para o GBM. Neste sentido, tem se considerado a avaliação de MGMT por meio da imunoistoquímica bastante controversa. A expressão de MGMT pode ser hiperregulada pelo tratamento adjuvante, e sintomático que incluem quimioterápicos, radioterapia, corticosteroides e anticonvulsivantes (TANBOON et al 2016). Em nosso estudo não observamos a perda da expressão de MGMT em nenhum dos casos. Observamos, ao contrário, imunoexpressão forte na maioria dos GBMs. Em relação aos subtipos moleculares, o GBM proneural geralmente se associa à hipermetilação de *MGMT*, o que leva ao silenciamento do gene com perda da expressão proteica.

Em relação à associação entre imunoexpressão dos anticorpos e sobrevida dos pacientes, encontramos correlações significativas. Os pacientes com GBMs IDH1 negativos pela imunoistoquímica apresentaram o risco de óbito aumentado em 2 vezes. Esse dado indica que tumores IDH1 negativos correspondem aos subtipos moleculares clássico e mesenquimal, que apresentam pior prognóstico. Observamos, ainda, para a imunoexpressão protéica moderada de p53 nos GBMs risco de óbito reduzido em 75%

(RR=0,25), em relação àqueles tumores com imunoexpressão negativa para p53. A imunoexpressão positiva de p53 se associa ao subtipo molecular proneural, que possui melhor prognóstico, em oposição à negatividade imunoistoquímica desse biomarcador que se relaciona com GBMs clássicos.

Em nosso estudo 7 pacientes sobreviveram à doença até a última consulta de dados em prontuário (agosto de 2016). Cerca de noventa por cento dos pacientes evoluíram com óbito em segmento médio foi de 43,9 meses. Cinquenta por cento dos paciente morreram nos primeiros 14 meses, e o tempo médio de sobrevivência foi em torno de 20 meses. Esses achados são absolutamente concordantes com dados prévios de literatura. O GBM é um dos cânceres humano de maior letalidade. Todas as revisões relacionadas a esse tumor mostram sobrevida entre 12 a 24 meses. Nas últimas décadas houve possibilidade em ganho de sobrevida com utilização de esquemas quimioterápicos adjuvantes.

Ao avaliar a sobrevivência dos pacientes relacionada com as classificações dos tumores verificamos maior sobrevida para os GBMs secundários e subtipo molecular proneural. Pacientes com GBMs mesenquimais tiveram a menor sobrevida. A classificação dos fenótipos primário e secundário e dos subtipos moleculares dos GBMs tem o mesmo objetivo: obter melhor compreensão deste tumor complexo e heterogêneo, selecionando grupos de pacientes para abordagens terapêuticas direcionadas para cada subtipo. A sobreposição dos GBMs secundários e o subtipo molecular proneural, indicam imunofenótipo do tipo *IDH1*-mutado, associam o mesmo perfil clínico e epidemiológico de pacientes jovens, com doença de evolução clínica

geralmente mais lenta, associadas às mesmas características de expressão proteica e alterações genéticas. Os GBMs primários se associam aos subtipos moleculares clássico e mesenquimal, seja pela evolução intempestiva da doença, predileção por pacientes com idade superior a 60 anos, além do perfil de expressão proteica, alterações genéticas e epigenéticas semelhantes (OHGALI e KLEIHUES 2007; HARTMANN et al. 2010; JANSEN e LOUIS 2010; OHGAKI e KLEIHUES 2013).

O uso de marcadores imunoistoquímicos isolados ou agrupados como fator prognóstico do GBM é bastante discutido. Em artigo de revisão, TANBOON et al. (2016) demonstraram a importância de se empregar os biomarcadores IDH1 e ATRX. Entretanto o valor preditivo de ATRX em gliomas, bem como de p53 permanece controverso. Enquanto alguns estudos demonstram que a perda de expressão de ATRX, ou níveis baixos de expressão dessa proteína, se associam ao melhor prognóstico em astrocitomas *IDH1*-mutados, outros não mostram tal associação (REUSS et al. 2015). Não encontramos associações entre a imunoexpressão dos anticorpos prognóstico ou valor preditivo de resposta terapêutica.

Nosso propósito central foi avaliar por meio de painel imunoistoquímico simplificado a possibilidade da classificação dos subtipos moleculares de GBMs. Existe interesse crescente no uso de terapias moleculares alvo-específicas no tratamento de diversos tumores malignos. A determinação dos subtipos moleculares dos GBMs é muito importante no sentido de se oferecer terapêutica personalizada. Portanto, é fundamental que estas informações estejam

disponíveis e que de forma coerente se traduzam em dados preditivos e prognósticos do tumor.

O GBM é uma neoplasia extremamente heterogênea e complexa ponto de vista epidemiológico, clínico, morfológico e genético. Desta forma, o emprego de painéis imunoistoquímicos objetivando a distinção entre os subtipos moleculares dos GBMs deve ser estimulado, mesmo que ainda não haja consenso na literatura em relação aos marcadores empregados. Discrepâncias entre o perfil imunofenotípico e caracterização morfológica quando encontradas devem ser compreendidas dentro do contexto da complexidade deste tumor, e elucidadas do ponto de vista genético, avaliando-se as mutações gênicas mais comuns aos subtipos moleculares do GBM. Estudos que relacionem a imunoexpressão proteica e mutação devem ser realizados para validar o emprego desses painéis.

Os subtipos moleculares de GBMs podem ser determinados por diversas técnicas laboratoriais, tais como sequenciamento direto com PCR, pirosequenciamento e técnica de hibridização fluorescente “in situ” (FISH). As técnicas moleculares são complexas e caras, envolvem pessoal altamente treinado e qualificado, consomem maior tempo e não estão disponíveis na rotina da maioria dos laboratórios de Patologia.

A imunoistoquímica é técnica bem mais acessível, tanto em termos financeiros, como rapidez e facilidade da execução. Deve, entretanto, apresentar acurácia e confiabilidade na aproximação do perfil molecular a partir da expressão proteica. Pode, portanto, permitir subclassificação tumoral agregando aos aspectos morfológicos e histológicos dados prognósticos e

preditivos de resposta terapêutica. O uso desta técnica é rotineiro na complementação da avaliação patológica dos carcinomas mamários, em detrimento ao sequenciamento genético, permitindo a classificação molecular aproximada destes tumores e indispensável na condução clínica oncológica da doença (ELIYATKIN et al. 2015).

Demonstramos em nosso estudo que é possível a classificação molecular de GBMs por meio da expressão protéica de anticorpos relacionados a esses subtipos. Assim, a detecção da imunoexpressão positiva de IDH1 através da imunoistoquímica distingue o subtipo molecular proneural. Quando comparada ao sequenciamento direto do DNA em gliomas, demonstra que há correlação estatisticamente significativa entre a expressão do anticorpo monoclonal e as mutações relevantes detectadas pelo sequenciamento direto do DNA (MELLAI et al. 2011; TAKANO et al. 2011). Os GBMs clássicos apresentam aumento da expressão de EGFR e os GBMs mesenquimais expressam proteínas relacionados à transição epitélio-mesênquima, como MERTK e CD44. Assim, devem ser pesquisadas rotineiramente em neuropatologia, por detectar o imunofenótipo molecular aproximado do GBM, estratificar os pacientes para estratégias de tratamento adjuvante e agregar fatores prognósticos (MELLAI et al. 2011)

Tratou-se aqui de neoplasia complexa, com grande dificuldade de tratamento, evolução desfavorável, e que todo esforço na direção de melhor seleção dos pacientes para terapêutica deve ser empreendido.

7 CONCLUSÕES

- 1 De acordo com o painel de marcadores utilizados neste estudo os GBMs foram subclassificados nos subtipos moleculares clássico, proneural e mesenquimal.
- 2 As expressões imunoistoquímicas das proteínas IDH1, p53, MERTK, CD44, OLIG2, ATRX, MGMT e EGFR foram determinadas nos GBMs e associações entre a expressão de ATRX e sexo dos pacientes foram demonstradas.
- 3 Os GBMs primários se caracterizaram pela negatividade para IDH1 e amplificação de EGFR. Os GBMs secundários mostraram positividade para IDH1 e OLIG2. Os GBMs subtipo molecular clássico são caracterizados pela negatividade de IDH1, positividade forte (3+) para EGFR e amplificação de EGFR. Os GBMs subtipo proneural estão associados à positividade IDH1, sendo a positividade para MERTK e / ou CD44, negatividade para EGFR e ausência de amplificação de EGFR característica dos GBMs de subtipo mesenquimal.
- 4 As taxas de sobrevida globais dos pacientes com GBMs estão associadas à idade do paciente, localização tumoral e ao tratamento com quimioterapia e radioterapia. O subtipo molecular proneural apresenta as melhores taxas de sobrevida dentre os pacientes com GBMs.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguirre A, Dupree JL, Mangin JM, Gallo V. A functional role for EGFR signaling in myelination and remyelination. **Nat Neurosci** 2007; 10:990-1002.

Ahmadloo N, Kani A, Mohammadianpanah M, et al. Treatment outcome and prognostic factors of adult glioblastoma multiforme. **J Egyptian Natl Cancer Inst** 2013; 25:21-30.

Appin CL, Brat DJ. Molecular Pathways in Gliomagenesis and Their Relevance to Neuropathologic Diagnosis. **Adv Anat Pathol** 2015; 22:50-58.

Bérubé NG, Mangelsdorf M, Jagla M, et al. The chromatin-remodeling protein ATRX is critical for neuronal survival during corticogenesis. **J Clin Invest** 2005; 115:258-67.

Bhat KPL, Balasubramaniyan V, Vaillant B, et al. Mesenchymal differentiation mediated by NF- κ B promotes radiation resistance in glioblastoma. **Cancer Cell** 2013; 24:331-46.

Brandes AA, Franceschi E, Tosoni A, et al. MGMT promoter methylation status can predict the incidence and outcome of pseudo progression after concomitant radiochemotherapy in newly diagnosed glioblastoma patients. **J Clin Oncol** 2008b; 26:2192-7.

Brandes AA, Tosoni A, Franceschi E, Reni M, Gatta G, Vecht C. Glioblastoma in adults. **Crit Rev Oncol Hematol** 2008a; 67:139-52.

Burger PC, Green SB. Patient age, histologic features, and length of survival in patients with glioblastomas multiforme, **Cancer** 1987; 59:1617-25.

Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. **Nature** 2008; 455:1061-18.

Carro MS, Lim WK, Alvarez MJ, et al. The transcriptional network for mesenchymal transformation of brain tumors. **Nature** 2010; 463:318-25.

Chakrabarti I, Cockburn M, Cozen W, et al. A population-based description of glioblastoma multiforme in Los Angeles County, 1974-1999. **Cancer** 2005; 104:2798-806.

Cloughesy TF, Cavenee WK, Mischel PS. Glioblastoma: from molecular pathology to targeted treatment. **Annu Rev Pathol** 2014; 9:1-25.

Cominelli M, Grisanti S, Mazzoleni S, et al. EGFR amplified and overexpressing glioblastomas and association with better response to adjuvant metronomic temozolomide. **J Natl Cancer Inst** 2015; 107:djv041.

Conroy S, Krut FAE, Joseph JV, et al. Subclassification of newly diagnosed glioblastomas through an immunohistochemical approach. **PLoS One** 2014; 9:e115687.

Cummings C, Deryckere D, Earp H, Graham D. Molecular pathways: MERTK signaling in cancer. **Clin Cancer Res** 2013; 19:5275-80.

Daumas-Duport C, Szikla G. Definition of limits and 3D configuration of cerebral gliomas: histological data, therapeutic incidences (author's transl). **Neurochirurgie** 1981; 27:273-84.

Ebrahimi A, Skardelly M, Bonzheim I, et al. ATRX immunostaining predicts IDH and H3F3A status in gliomas. **Acta Neuropathol Commun** 2016; 4:60.

Eliyatkın N, Yalçın E, Zengel B, Aktaş S, Vardar E. Molecular classification of breast carcinoma: from traditional, old-fashioned way to a new age, and a new way. **J Breast Health** 2015; 11:59-66.

Engelhard HH, Villano JL, Porter KR, et al. Clinical presentation, histology, and treatment in 430 patients with primary tumors of the spinal cord, spinal meninges, or cauda equina. **J Neurosurg Spine** 2010; 13:67-77.

Engelman, M, Grande RM, Naves MA, et al. Integrin-linked kinase (ILK) expression correlates with tumor severity in clear cell renal carcinoma. **Pathol Oncol Res** 2013; 19: 27-33.

Entrez Gene. Isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble. Retrieved 2011-12-30.

Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. **Cancer Res** 1999; 59:793-7.

Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, et al. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. **N Engl J Med** 2000; 343:1350-4.

Furnari FB, Cloughesy TF, Cavenee WK, Mischel PS. Heterogeneity of epidermal growth factor receptor signalling networks in glioblastoma. **Nat Rev Cancer** 2015; 15:302-10.

Futreal PA, Coin L, Marshall M, et al. A census of human cancer genes. **Nat Rev Cancer** 2004; 4:177-83.

Gaber ZB, Novitch BG. All the embryo's a stage, and Olig2 in its time plays many parts. **Neuron** 2011; 69:833-5.

Goodison S, Urquidí V, Tarin D. CD44 cell adhesion molecules. **Mol Pathol** 1999; 52:189-96.

Haddad SF, Moore SA, Schelper RL, Goeken JA. Vascular smooth muscle hyperplasia underlines the formation of glomeruloid vascular structures of glioblastoma multiforme. **J Neuropathol Exp Neurol** 1992; 51:488-92.

Hartmann C, Hentschel B, Wick W, et al. Patients with IDH1 wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis than IDH1-mutated glioblastomas, and IDH1 mutation status accounts for the unfavorable prognostic effect of higher age: implications for classification of gliomas. **Acta Neuropathol** 2010; 120:707-18.

Hartmann C, Meyer J, Balss J, et al. Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: a study of 1,010 diffuse gliomas. **Acta Neuropathol** 2009; 118:469-74.

Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, et al. MGMT Gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. **N Engl J Med** 2005; 352:997-1003.

Herbst RS. Review of epidermal growth factor receptor biology. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2004; 59(2 Suppl):21-6.

Iwadata Y. Epithelial-mesenchymal transition in glioblastoma progression. **Oncol Lett** 2016; 11:1615-20.

Jabbar KJ, Luthra R, Patel KP, et al. Comparison of next-generation sequencing mutation profiling with BRAF and IDH1 mutation-specific immunohistochemistry. **Am J Surg Pathol** 2015; 39:454-61.

Jacinto FV, Esteller M. MGMT hypermethylation: a prognostic foe, a predictive friend. **DNA Repair (Amst)** 2007; 6:1155-60.

Jansen M, Yip S, Louis DN. Molecular pathology in adult gliomas: diagnostic, prognostic, and predictive markers. **Lancet Neurol** 2010; 9:717-26.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. **CA Cancer J Clin** 2011; 61:69-90.

Jesien-Lewandowicz E, Jesionek-Kupnicka D, Zawlik I, et al. High incidence of MGMT promoter methylation in primary glioblastomas without correlation with TP53 gene mutations. **Cancer Genet Cytogenet** 2009; 188:77-82.

Jones C, Perryman L, Hargrave D. Paediatric and adult malignant glioma: close relatives or distant cousins? **Nat Rev Clin Oncol** 2012; 9:400-13.

Joseph NM, Phillips J, Dahiya S, et al. Diagnostic implications of IDH1-R132H and OLIG2 expression patterns in rare and challenging glioblastoma variants. **Mod Pathol** 2013; 26:315-26.

Kaina B, Christmann M, Naumann S, Roos WP. MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. **DNA Repair (Amst)** 2007; 6:1079-99.

Karnofsky DA, Abelmann WH, Craver LF, Burchenal JH. The use of the nitrogen mustards in the palliative treatment of carcinoma - with particular reference to bronchogenic carcinoma. **Cancer** 1948; 1:634-56.

Karnofsky DA, Burchenal JH. The clinical evaluation of chemotherapeutic agents in cancer. In: MacLeod CM, editor. **Evaluation of chemotherapeutic agents**. New York: Columbia University Press; 1949. p.191-205.

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

Khoury MP, Bourdon JC. The isoforms of the p53 protein. **Cold Spring Harb Perspect Biol** 2010; 2.

Kleihues H, Burger P, Aldape KD, et al. Glioblastoma. In: Louis DN, Oghaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, editors. **WHO classification of tumours of the central nervous system**. 4th ed Lyon: IARC Press; 2007. (WHO Classification of Tumours, v. 1; IARC WHO Classification of Tumours, n° 1).

Kleihues P, Lubbe J, Watanabe K, von Ammon K, Ohgaki H. Genetic alterations associated with glioma progression. **Verh Dtsch Ges Pathol** 1994; 78:43-7.

Konar SK, Bir SC, Maiti TK, Nanda A. A systematic review of overall survival in pediatric primary glioblastoma multiforme of the spinal cord. **J Neurosurg Pediatr** 2016; 4:1-10.

Kondo T. Molecular Mechanisms involved in Gliomagenesis. **Brain Tumor Pathol** 2017; 34:1-7.

Krell D, Assoku M, Galloway M, et al. Screen for IDH1, IDH2, IDH3, D2HGDH and L2HGDH mutations in glioblastoma. **PloS One** 2011; 6:e19868.

Krell D, Mulholland P, Frampton AE, et al. IDH mutations in tumorigenesis and their potential role as novel therapeutic targets. **Future Oncol** 2013; 9:1923-35.

Krell D, Mulholland P, Stebbing J, Tomlinson I, Bardella C. HOT mutation screening in human glioblastomas. **Future Sci OA** 2015; 1(3):pii: FSO22.

Krex D, Klink B, Hartmann C, et al. Long-term survival with glioblastoma multiforme. **Brain** 2007; 130:2596-606.

Kupp R, Shtayer L, Tien AC, et al. Lineage-restricted OLIG2-RTK signaling governs the molecular subtype of glioma stem-like cells. **Cell Rep** 2016; 16:2838-45.

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

Lausen B, Schumacher M. Maximally selected rank statistics. **Biometrics** 1992; 48:73-85.

Le Mercier M, Hastir D, Moles Lopez X, et al. A simplified approach for the molecular classification of glioblastomas. **PloS One** 2012; 7:e45475.

Ligon KL, Huillard E, Mehta S, et al. Olig2-regulated lineage-restricted pathway controls replication competence in neural stem cells and malignant glioma. **Neuron** 2007; 53:503-17.

Liu F, Hon GC, Villa GR, et al. EGFR Mutation promotes glioblastoma through epigenome and transcription factor network remodeling. **Mol Cell** 2015; 60:307-18.

Liu XY, Gerges N, Korshunov A, et al. Frequent ATRX mutations and loss of expression in adult diffuse astrocytic tumors carrying IDH1/IDH2 and TP53 mutations. **Acta Neuropathol** 2012; 124:615-25.

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. **Acta Neuropathol** 2007; 114:97-109.

Louis DN, Perry A, Reifenberger G, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Acta Neuropathol** 2016; 131:803-20.

Martinez R, Esteller M. The DNA methylome of glioblastoma multiforme. **Neurobiol Dis** 2010; 39:40-6.

Martínez R. Beyond genetic in glioma pathways: the ever-increasing cross talk between epigenomic and genomic events. **J Signal Transduct** 2012; 2012:519807.

Mastronardi L, Guiducci A, Puzzilli F, Ruggeri A. Relationship between Ki-67 labeling index and survival in high-grade glioma patients treated after surgery with tamoxifen. **J Neurosurg Sci** 1999; 43:263-70.

Medical Research Council Brain Tumor Working Party. Randomized trial of procarbazine, lomustine, and vincristine in the adjuvant treatment of high-grade astrocytoma: a Medical Research Council trial. **J Clin Oncol** 2001; 19:509-18.

Mehta S, Huillard E, Kesari S, et al. The central nervous system-restricted transcription factor Olig2 opposes p53 responses to genotoxic damage in neural progenitors and malignant glioma. **Cancer Cell** 2011; 19:359-71.

Mellai M, Caldera V, Annovazzi L, Schiffer D. The distribution and significance of idh mutations in gliomas. In: Lichtor T, editor. **The distribution and significance of idh mutations in gliomas, evolution of the molecular biology of brain tumors and the therapeutic implications**. 2013. Available from: <URL:<https://www.intechopen.com/books/evolution-of-the-molecular-biology-of-brain-tumors-and-the-therapeutic-implications/the-distribution-and-significance-of-idh-mutations-in-gliomas>> [2017 jan 15]

Mellai M, Monzeglio O, Piazzzi A, et al. MGMT promoter hypermethylation and its associations with genetic alterations in a series of 350 brain tumors. **J Neurooncol** 2012; 107:617-31.

Mellai M, Piazzzi A, Caldera V, et al. IDH1 and IDH2 mutations, immunohistochemistry and associations in a series of brain tumors. **J Neurooncol** 2011; 105:345-57.

Mesti T, Moltara ME, Boc M, Rebersek M, Ocvirk J. Bevacizumab and irinotecan in recurrent malignant glioma, a single institution experience. **Radiol Oncol** 2015; 49:80-5.

Mikeska T, Bock C, El-Maarri O, et al. Optimization of quantitative MGMT promoter methylation analysis using pyrosequencing and combined bisulfite restriction analysis. **J Mol Diagn** 2007; 9:368-81.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa/2016 incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2016.

Molenaar RJ, Radivoyevitch T, Maciejewski JP, van Noorden CJ, Bleeker FE. The driver and passenger effects of isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in oncogenesis and survival prolongation. **Biochim Biophys Acta** 2014a; 1846:326-41.

Molenaar RJ, Verbaan D, Lamba S, et al. The combination of IDH1 mutations and MGMT methylation status predicts survival in glioblastoma better than either IDH1 or MGMT alone. **Neuro Oncol** 2014b; 16:1263-73.

Mooney KL et al. The role of CD44 in glioblastoma multiforme. **J Clin Neurosci** (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jocn.2016.05.012>; article in press.

Motomura K, Natsume A, Watanabe R, et al. Immunohistochemical analysis-based proteomic subclassification of newly diagnosed glioblastomas. **Cancer Sci** 2012; 103:1871-9.

Mukasa A, Takayanagi S, Saito K, et al. Significance of IDH mutations varies with tumor histology, grade, and genetics in Japanese glioma patients. **Cancer Sci** 2012; 103:587-92.

[NCI] National Cancer Institute. **Defining cancer**. Updated: February 9, 2015. Available form: <URL:<https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms?cdrid=45333>> [2017 jan 12]

Nakamura M, Watanabe T, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Promoter methylation of the DNA repair gene MGMT in astrocytomas is frequently associated with G:C --> A:T mutations of the TP53 tumor suppressor gene. **Carcinogenesis** 2001; 22:1715-9.

Nieder C, Grosu AL, Astner S, Molls M. Treatment of unresectable glioblastoma multiforme. **Anticancer Res** 2005; 25:4605-10.

Nissiri F, Das S. Letter: A Role for Wild-Type Isocitrate Dehydrogenase 1 in Gliomagenesis. **Neurosurgery** 2017; nyx395.

Nobusawa S, Watanabe T, Kleihues P, Ohgaki H. IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas. **Clin Cancer Res** 2009; 15:6002-7.

Nordstrom T, Alderborn A, Nyren P. Method for one-step preparation of double-stranded DNA template applicable for use with pyrosequencing technology. **J Biochem Biophys Methods** 2002; 52:71-82.

Ogura R, Tsukamoto Y, Natsumeda M, et al. Immunohistochemical profiles of IDH1, MGMT and P53: practical significance for prognostication of patients with diffuse gliomas. **Neuropathology** 2015; 35:324-35.

Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. **Am J Pathol** 2007; 170:1445-53.

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

Ohgaki H, Watanabe K, Peraud A, et al. A case history of glioma progression. **Acta Neuropathol** 1999; 97:525-32.

Ostrom QT, Gittleman H, Farah P, et al. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010. **Neuro Oncol** 2013; 15(Suppl 2):ii1-ii56.

Parinot C, Nandrot EF. A comprehensive review of mutations in the MERTK proto-oncogene. **Adv Exp Med Biol** 2016; 854:259-65.

Parker SJ, Metallo CM. Metabolic consequences of oncogenic IDH mutations. **Pharmacology & therapeutics** 2015; 152:54-62.

Parsons DW, Jones S, Zhang X, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. **Science** 2008; 321:1807-12.

Pennacchia I, Carbone A, Di Cerbo A, et al. 2013 ASCO/CAP updated guidelines for human epidermal growth factor receptor 2 testing: impact on routine practice. **Breast** 2015; 24:285-6.

Péus D, Newcomb N, Hofer S. Appraisal of the Karnofsky performance status and proposal of a simple algorithmic system for its evaluation. **BMC Med Inform Decis Mak** 2013; 19:13-72.

Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, et al. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. **Cancer Cell** 2006; 9; 157-73.

Pilkington GJ. The role of extracellular matrix in neoplastic glial invasion of the nervous system. **Braz J Med Biol Res** 1996; 29:159-71.

Plate KH, Breier G, Weich HA, Risau W. Vascular endothelial growth factor is a potential tumor angiogenesis factor in human gliomas in vivo. **Nature** 1992; 359:845-8.

Popova SN, Bergqvist M, Dimberg A, et al. Subtyping of gliomas of various WHO grades by the application of immunohistochemistry. **Histopathology** 2014; 64:365-79.

Rajeevan MS, Swan DC, Duncan K, Lee DR, Limor JR, Unger ER. Quantitation of site-specific HPV 16 DNA methylation by pyrosequencing. **J Virol Methods** 2006; 138:170-6.

Ranuncolo SM, Ladedá V, Specterman S, et al. CD44 expression in human gliomas. **J Surg Oncol** 2002; 79:30-5; discussion 35-6.

Reitman ZJ, Parsons DW, Yan H. IDH1 and IDH2: not your typical oncogenes. **Cancer Cell** 2010; 17:215-6.

Reuss DE, Sahm F, Schrimpf D, et al. ATRX and IDH1-R132H immunohistochemistry with subsequent copy number analysis and IDH sequencing as a basis for an "integrated" diagnostic approach for adult astrocytoma, oligodendroglioma and glioblastoma. **Acta Neuropathol** 2015; 129:133-46.

Rodriguez FJ, Thibodeau SN, Jenkins RB, et al. MGMT immunohistochemical expression and promoter methylation in human glioblastoma. **Appl Immunohistochem Mol Morphol** 2008; 16:59-65.

Russell DS, Rubinstein LJ. **Pathology of tumours of the nervous system**. 5th ed. London: Edward Arnold; 1989.

Souza, SJ, Stransky B, Camargo AA. Insights into gliomagenesis: systems biology unravels key pathways. **Genome Med** 2009; 1:101.

Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, et al. European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. **N Engl J Med** 2005; 352:987-96.

Sun Y, Meijer DH, Alberta JA, et al. Phosphorylation state of Olig2 regulates proliferation of neural progenitors. **Neuron** 2011; 69:906-17.

Surget S, Khoury MP, Bourdon J-C. Uncovering the role of p53 splice variants in human malignancy: a clinical perspective. **Oncol Targets Ther** 2014; 7:57-68.

Takano S, Tian W, Matsuda M, et al. Detection of IDH1 mutation in human gliomas: comparison of immunohistochemistry and sequencing. **Brain Tumor Pathol** 2011; 28:115-23.

Tanboon J, Williams EA, Louis DN. The diagnostic use of immunohistochemical surrogates for signature molecular genetic alterations in gliomas. **Neuropathol Exp Neurol** 2016; 75:4-18.

van den Bent MJ. Interobserver variation of the histopathological diagnosis in clinical trials on glioma: a clinician's perspective. **Acta Neuro-Pathol** 2010; 120:297-304.

Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR and NF1. **Cancer Cell** 2010; 17:98-110.

Walid MS. Prognostic factors for long-term survival after glioblastoma. **Perm J** 2008; 12:45-8.

Walker MD, Alexander E, Hun WE, et al. Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. **J Neurosurg** 1978; 49:333-43.

Wang K, Wang YY, Ma J, et al. Prognostic value of MGMT promoter methylation and TP53 mutation in glioblastomas depends on IDH1 mutation. **Asian Pac J Cancer Prev** 2014b; 15:10893-8.

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

Wang Q, Hu B, Hu X, et al. Tumor Evolution of Glioma-Intrinsic Gene Expression Subtypes Associates with Immunological Changes in the Microenvironment **Cancer Cell** 2017, 32:42–56.

Wang Y, Moncayo G, Morin P, et al. Mer receptor tyrosine kinase promotes invasion and survival in glioblastoma multiforme. **Oncogene** 2013; 32:872-82.

Watanabe T, Nobusawa S, Kleihues P, Ohgaki H. IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas. **Am J Pathol** 2009; 174:1149-53.

Weller M, Kaulich K, Hentschel B, et al. Assessment and prognostic significance of the epidermal growth factor receptor VIII mutation in glioblastoma patients treated with concurrent and adjuvant temozolomide radiochemotherapy. **Int J Cancer** 2014; 134:2437-47.

Wiestler B, Capper D, Holland-Letz T, et al. ATRX loss refines the classification of anaplastic gliomas and identifies a subgroup of IDH mutant astrocytic tumors with better prognosis. **Acta Neuropathol** 2013; 126:443-51.

Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, et al. Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology / College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. **J Clin Oncol** 2013; 31:3997-4013.

Xu X, Zhao J, Xu Z, et al. Structures of human cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase reveal a novel self-regulatory mechanism of activity. **J Biol Chem** 2004; 279:33946-57.

Yan H, Parsons DW, Jin G, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. **N Engl J Med** 2009; 360:765-73.

Yu V, Ruan D, Nguyen D, et al. SU-F-R-17: Advancing glioblastoma multiforme (GBM) recurrence detection with MRI image texture feature extraction and machine learning. **Med Phys** 2016; 43:3376-7.

Anexo 1 - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP



**A.C. Camargo
Cancer Center**

**Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 25 de abril de 2013.

A

Dra. Maria Dirlei Ferreira de Souza Begnami.

Aluno: Rogério Mendes Grande (Doutorado).

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1771/13

“Avaliação do perfil de hipermetilação do gene MGMT como potencial marcador prognóstico nos subtipos moleculares dos glioblastomas”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 23/04/2013, aprovaram a realização do projeto do estudo (datado de 20 de março de 2013) em referência e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Declaração Sobre os Dados Coletados, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Oncologia Clínica do Hospital AC Camargo;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital AC Camargo;
- Declaração de Infraestrutura e Instalações do Departamento de Urologia do Hospital AC Camargo;
- Orçamento Financeiro Detalhado.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 12 meses.

Atenciosamente,

**Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa**