

**AVALIAÇÃO GÊNICA DE ISOCITRATO  
DESIDROGENASE 1, ALFA-INTERNEXINA, RECEPTOR  
DE FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO, O6-  
METILGUANINA-DNA METILTRANSFERASE E  
CODELEÇÃO 1p/19q COMO FATOR PROGNÓSTICO EM  
ASTROCITOMAS ANAPLÁSICOS**

**LUIZ GUILHERME CERNAGLIA AURELIANO DE LIMA**

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio  
Prudente para obtenção do título de Mestre em  
Ciências**

**Área de Concentração: Oncologia**

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

**São Paulo**

**2015**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Lima, Luiz Guilherme Cernaglia Aureliano de

**Avaliação gênica de isocitrato desidrogenase 1, alfa-internexina, fator de crescimento epidérmico, O6-metilguanina-DNA metiltransferase e codeleção 1p/19q como fator prognóstico em astrocitomas anaplásicos** / Luiz Guilherme Cernaglia Aureliano de Lima – São Paulo; 2015.

69p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientadora: Maria Dirlei Ferreira de Souza Begnami

Descritores: 1. ASTROCITOMA. 2. PROGNÓSTICO 3. GLIOMA  
4. ISOCITRATO DESIDROGENASE/genética. 5. FATOR DE CRESCIMENTO  
EPIDÉRMICO/genética. 6. IMUNO-HISTOQUÍMICA 7. O(6)-  
METILGUANINA-DNA METILTRANSFERASE. 8. GENE ERBB-1.

## **AGRADECIMENTOS**

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

À minha orientadora, Dra Maria Dirlei Ferreira de Souza Begnami, pelo incentivo;

Ao Dr Fernando Augusto Soares, pelas oportunidades;

Ao Dr Luciano Néder Serafini, pelo auxílio na separação da casuística;

Ao Dr Antônio Hugo José Fróes Marques Campos, pela ajuda com os cálculos estatísticos;

Ao Dr José Ivanildo Neves, pelos esclarecimentos técnicos;

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

Aos colegas patologistas do Departamento de Anatomia Patológica do A.C. Camargo Cancer Center e do Hospital das Clínicas – Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, pelo apoio profissional;

A Dayane da Silva Medeiros, pelo auxílio na tabulação de alguns dados;

Aos meus colegas de pós-graduação, pelo enriquecimento das discussões e pela parceria;

À Biblioteca, pela formatação.

## RESUMO

Lima LGCA. **Avaliação gênica de isocitrato desidrogenase 1, alfa-internexina, receptor de fator de crescimento epidérmico, O6-metilguanina-DNA metiltransferase e codeleção 1p/19q como fator prognóstico em astrocitomas anaplásicos.** São Paulo; 2015. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

**INTRODUÇÃO e OBJETIVOS:** Os astrocitomas anaplásicos (AAs) são gliomas classificados como grau III pela OMS, constituindo um grupo intermediário de agressividade e uma zona cinzenta na atuação clínica e interpretação histológica. Além disso, o material obtido nas neurocirurgias muitas vezes é pouco representativo, seja por amostras exíguas, seja por amostragem da periferia da lesão. Metodologias como imuno-histoquímica, hibridização *in situ* e/ou sequenciamento tem sido amplamente utilizadas para analisar a expressão e a validação de marcadores biológicos de agressividade, reclassificar as entidades e avaliar as vias de tumorigênese, com o intuito também de direcionar a terapêutica. Nos gliomas, algumas alterações moleculares têm sido pesquisadas, como em IDH1, alfa-internexina (INA), EGFR, MGMT e nos cromossomos 1p/19q, sem caracterização precisa nos AAs. O presente estudo pretendeu avaliar tais alterações moleculares em material parafinado e correlacionar com dados clínicos e anátomo-patológicos. **MATERIAL E MÉTODOS:** Estudamos 22 casos de AA, com diagnóstico histopatológico confirmado por 2 patologistas. Os dados clínicos e demográficos (idade, gênero, localização, KPS ao diagnóstico, dimensão e tratamento utilizado) foram obtidos dos prontuários. A pesquisa de expressão de IDH1, INA e MGMT foi realizada por imuno-histoquímica (IHQ). A determinação do estatus 1p/19q foi realizada por FISH. A pesquisa do gene EGFR e sua expressão proteica foi realizada pelos 2 métodos (IHQ e FISH). **RESULTADOS:** Os pacientes incluídos neste estudo apresentaram média de idade de 41,7 anos, sendo 14 mulheres e 8 homens. A maioria dos casos era de localização intracerebral. 13 casos foram considerados “de novo” (primários) e 9 provenientes de recidivas de astrocitomas difusos. Terapia

adjuvante foi realizada em 20 pacientes, sendo que em 14 pacientes a radio (RT) e a quimioterapia (QT) foram concomitantes, em 3 casos foram tratados exclusivamente com QT e 3 exclusivamente com RT. A positividade para IDH1 (R132H) foi identificado em metade dos casos. A positividade forte e de membrana para EGFR foi identificada em 4 casos. A positividade para MGMT foi identificada em praticamente todos os casos. Não foi observado nenhum caso de codeleção 1p/19q, mas 9 casos apresentaram ganhos de 1p e 7 casos ganhos de 19q. Não foi identificada positividade para INA. Foi observada associação entre ressecção cirúrgica parcial, amplificação e expressão imuno- histoquímica forte e padrão membrana de EGFR, imunonegatividade para IDH1-mutado, ganho de 19q e ausência de terapia adjuvante como fatores associados à redução da taxa de sobrevida global. Assim, status de EGFR, IDH1 e 19q, tipo de cirurgia e tratamento adjuvante parecem ser fatores prognósticos em AAs.

## SUMMARY

Lima LGCA. [Isocitrate dehydrogenase 1, alpha-internexin, epidermal growth factor receptor, O6-methylguanine-DNA methyltransferase and 1p / 19q codeletion as prognostic factors in anaplastic astrocytomas]. São Paulo; 2015. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

**INTRODUCTION and AIMS:** Anaplastic astrocytomas (AAs) are classified as grade III gliomas by WHO, constituting an intermediate group of malignancy and a gray zone for clinical management and histological interpretation. In addition, through technical difficulties, the material obtained from neurosurgery is often suboptimal, either by too small samples or by sampling the periphery of the lesion. Immunohistochemistry, *in situ* hybridization and / or sequencing has been widely used to analyze the biomarkers expression and validation, to predict aggressiveness, reclassify and evaluate tumorigenesis pathways and guide the therapeutics. In gliomas, some molecular alterations have been researched, such as IDH1, alpha-internexin (INA), EGFR, MGMT and status 1p / 19q, without precise characterization in AAs. This study aimed to evaluate such molecular changes in paraffin embedded material and correlate with clinical and pathological data.

**MATERIALS AND METHODS:** We studied 22 cases of AA, with histopathological diagnosis confirmed by two pathologists. Clinical and demographic data (age, gender, tumor location, KPS at diagnosis, size and treatment used) were obtained from medical records. IDH1 (R132H), INA and MGMT expression were evaluated by immunohistochemistry (IHC). The determination of the status 1p / 19q was evaluated by FISH. The number of EGFR gene copies and its protein expression were obtained by both methods (IHC and FISH). **RESULTS:** The patients included in this study had a mean age of 41.7 years, being 14 women and 8 men. Most cases were intracerebral. 13 cases were considered "de novo" (primary) and 9 relapses from diffuse astrocytomas. Adjuvant therapy was performed in 20 patients: 14 had radio (RT) and chemotherapy (CT) simultaneously, 3 were treated exclusively with CT and 3 exclusively with RT. Immunopositivity for IDH1 (R132H) was identified

in half of the cases. The strong and membrane pattern positivity of EGFR was identified in 4 cases. The positivity for MGMT was identified in virtually all cases. There were no cases of 1p / 19q codeletion, but 9 cases showed gains of 1p and 7 had 19q gains. None case was positive for INA. Association was observed between partial surgical resection, amplification and strong membrane pattern EGFR immunoexpression, immunonegativity for IDH1-mutated, 19q gain and absence of adjuvant therapy as factors associated with reduced overall survival rate. Thus, status of EGFR, IDH1 and 19q, extension of surgery and adjuvant treatment appear to be prognostic factors in AA.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Critérios de avaliação da marcação imuno-histoquímica para HER2..	12
<b>Figura 2</b>	Distribuição dos astrocitomas anaplásicos segundo localização no sistema nervoso central.....	18
<b>Figura 3</b>	Marcação de EGFR por imuno-histoquímica.....	22
<b>Figura 4</b>	Positividade para IDH1, com marcação citoplasmática (400x).....	24
<b>Figura 5</b>	Positividade para MGMT, com marcação nuclear (400x).....	25
<b>Figura 6</b>	Taxas de sobrevida global em relação ao tipo de material dos pacientes com astrocitoma anaplásico.....	34
<b>Figura 7</b>	Taxas de sobrevida global em relação ao tipo de abordagem cirúrgica nos grupos de tumores primários (gráfico à esquerda) e recidivas (gráfico à direita).....	35
<b>Figura 8</b>	Taxas de sobrevida global em relação à associação de tratamento adjuvante nos grupos de tumores primários (gráfico à esquerda) e recidivas (gráfico à direita).....	36
<b>Figura 9</b>	Taxas de sobrevida global em relação à positividade imuno-histoquímica para IDH1 em neoplasias primárias.....	37
<b>Figura 10</b>	Taxas de sobrevida global em relação à extensão de positividade imuno-histoquímica de EGFR em neoplasias primárias.....	38
<b>Figura 11</b>	Taxas de sobrevida global em relação ao padrão de positividade imuno-histoquímica de EGFR em neoplasias primárias.....	39

<b>Figura 12</b>	Taxas de sobrevida global em relação ao escore de positividade imuno-histoquímica de EGFR em neoplasias primárias.....	39
<b>Figura 13</b>	Taxas de sobrevida global em relação à amplificação de EGFR por FISH em neoplasias primárias.....	40
<b>Figura 14</b>	Taxas de sobrevida global em relação ao ganho de 19q por FISH em neoplasias primárias.....	41

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

<b>Quadro 1</b>	Relação dos anticorpos primários utilizados nas reações imunoistoquímicas.....	11
<b>Quadro 2</b>	Relação das sondas utilizadas no FISH.....	13
<b>Quadro 3</b>	Aspectos clínicos e demográficos pesquisados.....	20
<b>Quadro 4</b>	Resultado dos achados imuno-histoquímicas para EGFR.....	23
<b>Tabela 1</b>	Dados clínicos e demográficos.....	16
<b>Tabela 2</b>	Resultados obtidos pelo estudo imuno-histoquímico, sem avaliação de intensidade e extensão.....	25
<b>Tabela 3</b>	Resultados das reações de FISH para avaliação de 19q e 19p.....	27
<b>Tabela 4</b>	Resultados das reações de FISH para avaliação de 1p e 1q.....	29
<b>Tabela 5</b>	Resultados das reações de FISH para avaliação de EGFR.....	31
<b>Tabela 6</b>	Comparação entre os achados imuno-histoquímicos e de hibridização <i>in situ</i> para avaliação de EGFR.....	32
<b>Tabela 7</b>	Marcadores pesquisados, com seus respectivos resultados.....	33

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>10q</b>	braço longo do cromossomo 10
<b>19p</b>	braço curto do cromossomo 19
<b>19q</b>	braço longo do cromossomo 19
<b>1p</b>	braço curto do cromossomo 1
<b>1q</b>	braço longo do cromossomo 1
<b>AA</b>	Astrocitoma anaplásico
<b>CBTRUS</b>	<i>Central Brain Tumor Registry of the United States Statistical</i>
<b>CEP</b>	região centromérica do cromossomo
<b>CGH</b>	<i>comparative genomic hybridization</i> (hibridização genômica comparativa)
<b>EGFR</b>	<i>Epidermal growth factor receptor</i> (receptor do fator de crescimento epidérmico)
<b>FISH</b>	<i>Fluorescent in situ hybridization</i> (hibridização <i>in situ</i> fluorescente)
<b>Gy</b>	Gray
<b>HER2</b>	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i> (receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2)
<b>HIF</b>	<i>Hypoxia induced factor</i> (fator induzido por hipóxia)
<b>IDH1</b>	isocitrato desidrogenase -1
<b>IHQ</b>	imuno-histoquímica
<b>INA</b>	alfa-internexina
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>KPS</b>	<i>Karnofsky performance status</i> (status performance de Karnofsky)
<b>MGMT</b>	O6-Metilguanina-DNA Metiltransferase
<b>NADH</b>	Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídeo
<b>NADPH</b>	Fosfato de dinucleotídeo-nicotinamida-adenina
<b>OMS/WHO</b>	World Health Organization/Organização Mundial da Saúde
<b>PDGFR</b>	<i>Platelet-derived growth factor receptor</i> (receptor de fator de crescimento derivado de plaqueta)
<b>QT</b>	quimioterapia
<b>RT</b>	radioterapia
<b>RTC3D</b>	radioterapia tridimensional conformacional

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1	Astrocitomas Anaplásicos.....	1
1.2	Alguns Marcadores Moleculares Relevantes em Gliomas .....	3
1.2.1	Alfa-Internexina (INA) .....	3
1.2.2	Isocitrato Desidrogenase 1 (IDH1) .....	4
1.2.3	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR) .....	5
1.2.4	Codeleção 1p/19q.....	5
1.2.5	O6-Metilguanina-DNA Metiltransferase (MGMT).....	6
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>7</b>
2.1	Objetivo Primário.....	7
2.2	Objetivos Secundários.....	7
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>8</b>
3.1	Casuística .....	8
3.2	Imuno-histoquímica .....	10
3.2.1	Método de Avaliação das Marcações Imuno-histoquímicas.....	11
3.3	Hibridização <i>in situ</i> Fluorescente (FISH) .....	12
3.3.1	Métodos de Avaliação das Sondas por FISH.....	13
3.4	Análise Estatística .....	14
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>15</b>
4.1	Dados Clínicos e Demográficos.....	15
4.2	Resultados das Reações Imuno-histoquímicas .....	21
4.2.1	Expressão de EGFR .....	21
4.2.2	Expressão de IDH1 e INA .....	24
4.2.3	Expressão de MGMT .....	24
4.3	Resultados das Hibridizações <i>in situ</i> Fluorescentes (FISH) .....	26
4.3.1	Avaliação numérica do Braço longo do Cromossomo 19 (19q).....	26

4.3.2	Avaliação numérica do Braço curto do Cromossomo 1 (1p).....	27
4.3.3	Avaliação numérica das cópias do Gene EGFR .....	30
4.4	Resultados das Taxas de Sobrevida Global .....	34
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>42</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>58</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>59</b>

## **ANEXOS**

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

**Anexo 2** Quadro Geral de Dados Coletados

**Anexo 3** Protocolo de Exame Imuno-histoquímico

**Anexo 4** Protocolo de Hibridização *in situ* Fluorescente

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 ASTROCITOMAS ANAPLÁSICOS

Os astrocitomas são neoplasias primárias do sistema nervoso central com diferenciação astrocitária e que compreendem a maior parte dos tumores desta topografia. Estes podem ser classificados em difusos (infiltrativos) ou circunscritos. A graduação das neoplasias do sistema nervoso, preconizada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), é baseada em critérios histológicos e apresenta relação com o prognóstico. O astrocitoma anaplásico (AA), dentre os difusos, é considerado um glioma de alto grau (grau 3 dos 4 possíveis) e caracteriza-se por hiper celularidade, atipia citológica e atividade mitótica aumentada sem proliferação endotelial e/ou necrose associadas (KLEIHUES et al. 2007). Compreendem cerca de 7% de todos os gliomas (Central Brain Tumor Registry of the United States Statistical-CBTRUS 2012). Envolvem preferencialmente a substância branca dos hemisférios cerebrais em pacientes adultos ainda em idade produtiva (quinta década de vida principalmente), com pequena predileção pelo sexo masculino (KLEIHUES et al. 2007). Podem representar neoplasias primárias (“de novo”) ou secundárias (que surgem de uma lesão de baixo grau prévia) (KLEIHUES et al. 2007). O tratamento é primariamente cirúrgico, porém insatisfatório, pois recorrem com frequência e/ou evoluem para neoplasias de mais alto grau (glioblastomas, grau IV) devido à impossibilidade de ressecção completa. O consenso de tratamento adjuvante também é limitado tanto para a abordagem de lesões não tratadas como recorrentes, sendo

uma extrapolação do que é realizado para o tratamento dos glioblastomas (STUPP et al. 2005, 2007; DEANGELIS 2009).

Os AAs são lesões heterogêneas, com comportamento e curso clínico variável. A sobrevida média é de 2 a 3 anos, com variações de alguns meses até 5 anos, assemelhando-se com o glioblastoma em um extremo e com o astrocitoma de baixo grau no outro, respectivamente (DAUMAS-DUPORT et al. 1988). As variantes morfológicas (como o subtipo gemistocítico) não apresentam diferenças significativas na evolução clínica (RAO et al. 2002). Os fatores preditivos e prognósticos bem definidos (grau histológico, idade, extensão de ressecção e status de Karnofsky - KPS) são limitados e que, mesmo conjuntamente, não contemplam toda a variação observada nas taxas de sobrevida global e livre de doença, inserindo-o em uma zona cinzenta para tratamento e prognóstico (DAUMAS-DUPORT et al. 1988; SMITH et al. 2001; COMPOSTELLA et al. 2007). O diagnóstico e a graduação também são limitados pela subjetividade do observador e pela amostragem cirúrgica, fazendo-se necessárias novas estratégias além do aspecto morfológico (COONS et al. 1997; SMITH et al. 2001; SEE e GILBERT 2002; MISCHÉL et al. 2003; DEANGELIS 2009).

A caracterização de moléculas por método de imuno-histoquímica, hibridização *in situ* e/ou sequenciamento genético tem sido amplamente utilizada para analisar a expressão e a validação de marcadores biológicos de agressividade (fator prognóstico) e avaliar as vias de tumorigênese, com o intuito também de direcionar a terapêutica (fator preditivo). Assim, marcadores moleculares têm sido estudados em diversas neoplasias na tentativa de subclassificá-las através da avaliação gênica (mutação, metilação, amplificação, etc) e expressão proteica

(SMITH e JENKINS 2000; SMITH et al. 2001; MISCHEL et al. 2003; HUSE e HOLLAND 2010). A associação de alterações genéticas com o comportamento clínico de astrocitomas já foi documentada, como a relação entre mutação de PTEN e pior prognóstico nos tumores anaplásicos (SMITH et al. 2001; HUSE e HOLLAND 2010). Outros estudos sugeriram ainda que os gliomas anaplásicos são geneticamente diferentes dos glioblastomas e devem ser tratados como entidades distintas (VAN DEN BENT et al. 2009; WICK et al. 2009; DEANGELIS 2009). Os astrocitomas em crianças (abaixo de 17 anos) e adultos também se apresentam geneticamente distintos (NAKAMURA et al. 2007), bem como tumores primários e secundários/recidivados (APPIN e BRAT 2015). Entretanto, alguns marcadores moleculares analisados nem sempre apresentam relevância clínica (SMITH et al. 2001).

## **1.2 ALGUNS MARCADORES MOLECULARES EM GLIOMAS**

### **1.2.1 Alfa-Internexina (INA)**

INA é uma proteína codificada por gene homônimo, que interage com neurofilamentos. Está envolvida na neurogênese e pode estar expressa em algumas neoplasias gliais. A sua expressão pode ser detectada por imuno-histoquímica (MOKHTARI et al. 2011). Alguns estudos apontam que gliomas grau III (oligodendrogliomas e oligoastrocitomas anaplásicos) que expressam INA por imuno-histoquímica evoluem clinicamente melhor, são mais quimiossensíveis e apresentam correlação positiva com mutação de IDH1 (MOKHTARI et al. 2011) e codeleção de 1p19q (DURAND et al. 2010; MOKHTARI et al. 2011). A expressão

dessa proteína em astrocitomas infiltrativos ainda precisa ser mais bem caracterizada (MOKHTARI et al. 2011).

### **1.2.2 Isocitrato Desidrogenase 1 (IDH1)**

A enzima IDH1 é envolvida no ciclo do ácido cítrico, catalisando a descarboxilação oxidativa do isocitrato e a formação de NADH e alfa-cetoglutarato (DANG et al. 2010). Sua mutação é freqüente em astrocitomas graus II e III, oligodendrogliomas, oligoastrocitomas e glioblastomas secundários, e rara em outras neoplasias, incluindo glioblastomas primários (SONODA et al. 2009; WATANABE et al. 2009; YAN et al. 2009). Trata-se de uma alteração pontual específica na posição 395 do códon/aminoácido 132 do éxon 4, resultando na troca de uma arginina para outro aminoácido, em sua maioria histidina (DANG et al. 2009; WANATABE et al. 2009; TAKANO et al. 2012). A mutação é tida como uma alteração genética precoce e resulta em níveis mais baixos de prolil-hidroxilases e níveis altos de fator induzido por hipóxia (HIF)1alfa e 2-hidroxiglutarato, podendo contribuir assim na tumorigênese (ZHAO et al. 2009). Alguns estudos (SONODA et al. 2009; YAN et al. 2009; TAKANO et al. 2012) demonstraram melhor prognóstico em pacientes com astrocitomas anaplásicos e glioblastomas IDH1 mutados, apontando –a como um fator prognóstico independente (SANSON et al. 2009). A expressão da proteína mutada pode ser detectada através da imuno-histoquímica, com uma sensibilidade de até 94% de acordo com o clone utilizado (WANATABE et al. 2009; TAKANO et al. 2012).

### **1.2.3 Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR)**

O EGFR é um receptor protéico tirosino-quinase transmembrana envolvido na via da MAPK e do PI3KCA, sintetizado a partir de gene homônimo localizado no braço curto do cromossomo 7. A amplificação do gene, em geral associada à sua mutação, traduz-se para a célula como radioquimiorresistência e maior capacidade replicativa (USHIO et al. 2003). A amplificação e hiperexpressão de EGFR podem ser identificadas na maioria dos glioblastomas primários, diferentemente do PDGFR, IDH1 e TP53, que são mais comuns nos secundários (BEHIN et al. 2003). Estudos revelam que esta alteração prediz maiores taxas de sobrevida em pacientes mais velhos (acima de 60 anos) com glioblastomas e piores prognósticos em pacientes mais jovens com glioblastomas sem TP53 mutado. Em AAs, esta amplificação ocorre em uma proporção inferior aos glioblastomas e parece estar pouco relacionada ao prognóstico (SMITH et al. 2001; LIU et al. 2005; PUPUTTI et al. 2006). A avaliação genética pode ser realizada pelo método de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) (SMITH et al. 2001).

### **1.2.4 Estatus dos cromossomos 1p/19q**

A deleção combinada do braço curto do cromossomo 1 (1p) e do braço longo do cromossomo 19 (19q) tem sido estudada em diversos tipos de gliomas, sendo mais comumente (mas não exclusivamente) detectada em oligodendrogliomas (FALLON et al. 2004; REDDY KS 2005; GRESNER et al. 2007). É uma alteração molecular que se correlaciona com aumento nas taxas de sobrevida e quimiossensibilidade nessas neoplasias, levantando a possibilidade que o mesmo ocorra em outros gliomas (BRAT et al. 2004; WOEHRER et al. 2011). A deleção parece reduzir o número de cópias do gene NOTCH2, produzindo uma alteração

global na expressão gênica que induz a hiperexpressão de genes envolvidos na neurogênese, com conseqüente restrição à migração e à proliferação (FERRER-LUNA et al. 2009). Alguns estudos isolados apontam que é uma alteração rara em AAs e de relevância ainda inconclusiva, embora pareça estar correlacionado com melhor prognóstico mesmo com deleções isoladas do cromossomo 1p ou 19q (INO et al. 2000; BRAT et al. 2004; DEANGELIS 2009). A avaliação numérica cromossômica pode ser realizada pelo método de FISH, com boa correlação morfológica (WOEHRER et al. 2011).

#### **1.2.5 O6-Metilguanina-DNA Metiltransferase (MGMT)**

A enzima O6-metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT) é uma proteína relacionada ao reparo do DNA, com gene homônimo localizado no braço longo do cromossomo 10 (região 10q26). A metilação de seu promotor é fator prognóstico positivo e apresenta associação preditiva independente com a quimiossensibilidade ao uso de agentes alquilantes (como a temozolamida) em glioblastomas (HEGI et al. 2005; COSTA et al. 2010). O estudo de sua expressão proteica pode ser realizado por imuno-histoquímica, porém não apresenta correlação com o status de metilação de seu promotor em glioblastomas (MELGUIZO et al. 2012). Entretanto, o silenciamento gênico provocado pela metilação também apresenta relatos de associação com perda de marcação imuno-histoquímica em outros grupos de neoplasias, como carcinoma ductal invasivo da mama (ASIAF et al. 2015) e outras pesquisas (JIANG et al. 2014) apontam a sua marcação imuno-histoquímica em astrocitomas difusos e anaplásicos como fator prognóstico desfavorável em pacientes pós-radioterapia.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO PRINCIPAL**

Avaliar o status de EGFR, 1p/19q, INA, MGMT e IDH1 em AAs, em nível gênico e/ou proteico.

### **2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS**

- 1 Detectar a frequência e correlacionar os achados de hibridização “*in situ*” de EGFR e 1p/19q e a expressão imuno-histoquímica de IDH1 (R132H), INA, EGFR e MGMT com dados clínico-demográficos (idade, gênero, dimensão e localização tumoral, momento e extensão da ressecção cirúrgica, uso de terapia adjuvante) em casos de AAs tratados no A.C. Camargo Cancer Center;
- 2 Propor um protocolo de marcadores moleculares relevantes para essas neoplasias, enfocando fatores prognósticos (taxas de sobrevida global).

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 CASUÍSTICA**

Foram selecionados 50 casos com o diagnóstico de AA no período de 2007 a 2012 a partir de banco de dados disponível pelo Departamento de Oncologia Clínica do A.C. Camargo Cancer Center e por sistema de busca interna por diagnóstico no Departamento de Anatomia Patológica da mesma instituição. Após a aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa-CEP, identificado com o número de aprovação 1780/13 (Anexo 1), estes casos foram revistos e reclassificados por um patologista (L. G. C. A. L.) e um neuropatologista experiente (L. N. S.), separadamente. Os diagnósticos discordantes foram definidos através de consenso entre os patologistas. Os critérios histológicos utilizados foram baseados na classificação da OMS (KLEIHUES et al. 2007): hiper celularidade, atipia citológica (caracterizada por hiper cromasia, pleomorfismo e irregularidade nuclear), índice mitótico (pelo menos 1 figura de mitose inequívoca em 10 campos de grande aumento – 400x) e ausência de proliferação endotelial e/ou áreas de necrose.

Foram utilizados os seguintes critérios de exclusão:

- 1 Pacientes menores de 17 anos ao primeiro diagnóstico;
- 2 Presença de padrão morfológico que represente a possibilidade de componente oligodendroglial (arredondamento celular frequente);
- 3 Pacientes com dados de exames de imagem indisponíveis, ou com alterações radiológicas sugestivas de glioblastoma (realce anelar pós-contraste ou

suspeita de área de necrose) ou de outra neoplasia (neoplasia glioneuronal, por exemplo);

- 4 Ausência ou insuficiência de material emblocado em parafina representativo do tumor;
- 5 Pacientes com dados clínicos controversos ou não coletados.

Desta forma, foram selecionados 22 casos de AA. Os casos foram divididos em dois grupos de acordo com o procedimento cirúrgico no qual foram coletadas as amostras: grupo de tumores primários/"de novo" (material proveniente da primeira ressecção cirúrgica) e grupo de tumores recidivados/secundários (neoplasias já submetidas a ressecções prévias).

Foram coletados os seguintes dados: idade do paciente ao primeiro diagnóstico e na recidiva (alguns casos), gênero, tipo de material (neoplasia primária ou recidiva tumoral), data do primeiro diagnóstico, data da recidiva, KPS do paciente ao diagnóstico de AA, dimensão aproximada, localização e lateralidade do tumor, data da cirurgia, extensão da ressecção cirúrgica, tratamento adjuvante, data da última consulta, status do paciente na última consulta, ocorrência e data de recidiva. Informações quanto ao óbito foram obtidas através do prontuário médico da instituição ou através de consultas ao diário oficial (site: [www.jusbrasil.com.br](http://www.jusbrasil.com.br)) até 15 de fevereiro de 2015. Pacientes que permaneceram vivos durante o período avaliado tiveram a data da última ou menção em diário oficial chamada de data da última movimentação.

O tempo de sobrevida global (sobrevida global = data do óbito ou última movimentação – data da cirurgia) foi calculado em todos os pacientes.

O tipo do procedimento cirúrgico foi classificado em 2 modalidades: ressecção parcial (incluindo biópsia) com intenção diagnóstica/paliativa e ressecção radical com intenção curativa. A abordagem cirúrgica foi considerada radical quando mais de 90% do volume neoplásico foi retirado, conforme informações clínicas contidas no prontuário.

Para as reações imuno-histoquímicas e de hibridização *in situ*, foram selecionadas as amostras de tecido com quantidade de neoplasia viável, melhor preservada e sem artefatos de autólise.

### **3.2 IMUNO-HISTOQUÍMICA**

O protocolo completo das reações imuno-histoquímicas com os anticorpos primários encontra-se no Anexo 3. As reações foram padronizadas com casos sabidamente positivos, nas seguintes concentrações, clones e fabricantes de anticorpos primários (Quadro 1).

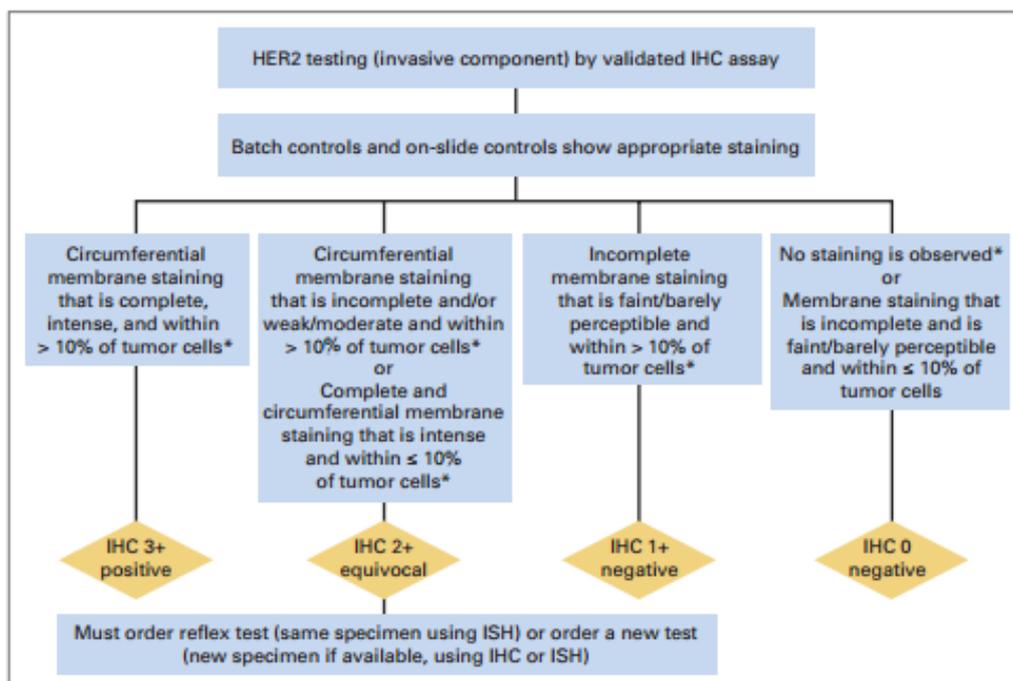
**Quadro 1** - Relação dos anticorpos primários utilizados nas reações imunoistoquímicas

anticorpo primário	clone	fabricante	diluição	controle positivo	padrão de marcação
<b>IDH1-R132H</b>	H09	Dianova	1:50	glioma de baixo grau	citoplasma
<b>INA</b>	2E3	Novus Biologicals	1:100	córtex cerebral	citoplasma
<b>EGFR</b>	3C6	Ventana (Roche Diagnostics)	pronto para uso	placenta	membrana e/ou citoplasma
<b>MGMT</b>	MT3.1	Thermo Scientific	1:20	adenocarcinoma de cólon	núcleo

### 3.2.1 Método de avaliação das marcações imuno-histoquímicas

As lâminas foram avaliadas em microscópio óptico comum por um único observador (L. G. C. A. L.). Foram consideradas positivas as células neoplásicas com marcação marrom no padrão esperado para cada anticorpo pesquisado.

Na avaliação do anticorpo EGFR, foram observados os padrões de marcação (membrana e/ou citoplasma), a porcentagem de células marcadas, a extensão (difusa – marcação presente em 100% das células neoplásicas; maioria – entre 50% e 100% das células neoplásicas e minoria – menos de 50% das células neoplásicas) e a intensidade de marcação (forte – marcação visível já no aumento de 40x, fraca – marcação visível somente no aumento de 400x ou moderada – marcação visível no aumento de 100x). Nos casos de marcação heterogênea, foi anotada a porcentagem total de células positivas e a porcentagem de células marcadas com forte intensidade. Os casos foram classificados em escores, semelhantes ao protocolo de interpretação da expressão HER2 utilizado nos carcinomas mamários invasivos (WOLFF et al. 2013).



Fonte: WOLFF et al, (2013)

**Figura 1** - Critérios para interpretação da marcação imuno-histoquímica para HER2.

Notar que o escore 3+ é atribuído à marcação de membrana completa, forte e em mais de 10% das células neoplásicas.

### 3.3 HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH)

O protocolo completo das reações de hibridização *in situ* fluorescente encontra-se no Anexo 4. As sondas utilizadas encontram-se disponíveis no Quadro 2, com dados do fabricante e o tipo de coloração identificada pelo fluoróforo utilizado.

**Quadro 2 - Relação das sondas utilizadas no FISH**

sonda	região	fabricante	coloração identificada pelo fluoróforo
EGFR	7p12 (D7S2542 – D7S499) CEP7 (D7Z1)	Zytovision	Verde = EGFR Vermelho = CEP7
1p	1p36.32 1q25	Vysis	Verde = 1q25 Vermelho = 1p36.32
19q	19q13.32 19p13	Vysis	Verde = 19p13 Vermelho = 19q13.32

### 3.3.1 Métodos utilizados para a avaliação gênica por FISH

As reações de hibridização *in situ* foram analisadas em microscópio trinocular com fluorescência de mercúrio (OLYMPUS® BX41-FL-III), equipado com objetiva de imersão e filtros adequados por um único observador (L. G. C. A. L.) e confirmadas por outro (M. D. F. S. B.) nos casos duvidosos. Foram considerados “não avaliáveis” os casos em que não foram observados sinais em pelo menos 100 células neoplásicas, mesmo após a repetição da técnica.

- **EGFR**

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).

- **Regiões dos cromossomos 1p e 19q**

As avaliações das reações de FISH para determinação do estatus dos cromossomos 1p e de 19q foram realizadas em 100 células neoplásicas, identificando-se o número de sinais referentes a cada braço dos cromossomos nos núcleos. Foi considerada perda do respectivo braço cromossômico quando a média de sinais/núcleo foi inferior a 1,4. Foi considerado ganho quando a média de sinais/núcleo foi superior a 2,4. Quando a razão 1p/1q ou 19q/19p foi menor que 0,75, foi considerada perda desbalanceada de 1p ou 19q. Quando tal razão foi maior que 1,33, foi considerado ganho desbalanceado de 1p ou 19q. Quando a razão ficou entre 0,75 e 1,33, foi considerado perda ou ganho balanceado (SMITH e JENKINS 2000; SNUDERL et al. 2009; WOEHRER et al. 2011).

### **3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

As avaliações estatísticas foram realizadas utilizando o software SPSS ® 18.0. Foram realizados os testes de long-rank para comparação das taxas de sobrevida e o teste exato de Fisher para avaliação entre associação dos dados clínicos e demográficos com os achados dos marcadores pesquisados. Foi estabelecido valor- $p < 0,05$  para significância.

## **4 RESULTADOS**

### **4.1 DADOS CLÍNICOS E DEMOGRÁFICOS**

Foram coletados os dados clínicos e demográficos de 22 pacientes, com diagnósticos confirmados de AA e tratados no A.C.Camargo Cancer Center no período de 2007 a 2012 (Tabela 1).

**Tabela 1** – Dados clínicos e demográficos.

VARIÁVEIS	CATEGORIA	QUANTIDADE(%)
<b>Idade</b>	20 – 40 anos	11 (50%)
	41 – 76 anos	11 (50%)
	Média = 41,7 anos	
	Mediana = 40,5 anos	
<b>Gênero</b>	Feminino	14 (63,6%)
	Masculino	8 (36,4%)
<b>Tipo de material/Momento de ressecção</b>	Primário	13 (59,1%)
	Recidiva	9 (40,9%)
<b>Dimensão</b>	Maior que 4,0cm	12 (54,5%)
	Menor que 4,0cm	7 (31,8%)
	Não avaliável	3 (13,6%)
<b>Tipo de ressecção cirúrgica</b>	Radical	9 (40,9%)
	Não-radical	13 (59,1%)
<b>Localização</b>	Intracerebral	21 (95,5%)
	Frontal	6 (28,5%)
	Temporal	4 (19,4%)
	Fronto-temporal	3 (14,2%)
	Fronto-parietal	2 (9,5%)
	Parieto-occipital	1 (4,7%)
	Parietal	1 (4,7%)
	Occipital	1 (4,7%)
	Têmporo-occipital	1 (4,7%)
	Talâmico	2 (9,5%)
	Tronco cerebral	1 (4,5%)
	Mesencéfalo	1 (100%)
<b>Terapia adjuvante</b>	Sim	21 (95,5%)
	QT exclusiva	3 (14,2%)
	QT+ RT	15 (71,4%)
	RT exclusiva	3 (14,2%)
	Não	1 (4,5%)
<b>Recidiva após terapia adjuvante</b>	Sim	2 (9,1%)
	Não	20 (90,9%)
<b>Desfecho</b>	Óbitos	9 (40,9%)
	Vivos	13 (59,1%)
	Com doença	7 (53,85%)
	Sem doença	6 (46,15%)

QT – quimioterapia; RT - radioterapia

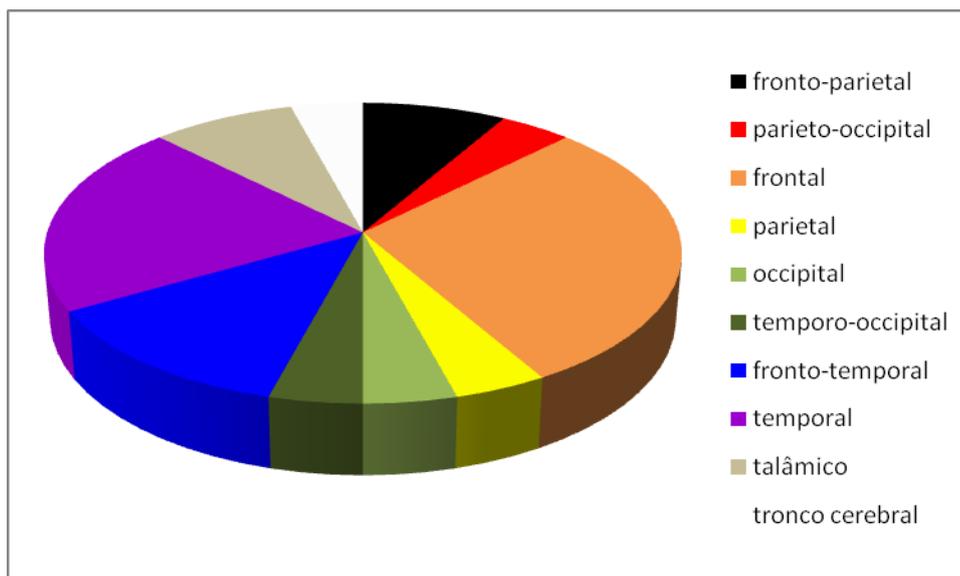
A média de idade dos pacientes ao diagnóstico foi de 41,7 anos e a mediana de 40,5 anos. A idade mínima foi de 20 anos e a máxima de 76 anos. Nenhum paciente tinha idade inferior a 17 anos ao primeiro diagnóstico. Em relação ao gênero, 8 (36,4%) pacientes eram homens e 14 (60,9%) eram mulheres.

Treze amostras (59,1%) eram representadas por gliomas primários e 9 amostras (40,9%) eram obtidas de gliomas recidivados. Destes tumores recidivados, todos tiveram origem em astrocitomas difusos (grau II, OMS), sendo que alguns pacientes apresentaram até 2 recidivas. Todos os pacientes apresentavam *performance status* muito bom ao diagnóstico, com KPS de, pelo menos, 80.

A medida da dimensão tumoral não foi exata, sendo obtida nas descrições dos exames de imagem (tomografia computadorizada ou ressonância magnética), no prontuário ou por dados descritos no exame macroscópico presente no laudo de anatomia patológica. Os casos foram divididos em dois grupos: tumores com diâmetro maior ou diâmetro menor que 4,0cm. Sete lesões (31,8%) apresentavam diâmetro tumoral menor que 4,0 cm e 12 lesões (54,5%) maior que 4,0cm. Em 3 casos (casos 9, 12 e 19) não conseguimos obter estas informações devido à falta da descrição ou discordância dos dados.

Todas as amostras foram obtidas por procedimentos cirúrgicos (entre biópsias e ressecções), mas somente em 9 (40,9%) a cirurgia realizada foi considerada radical. Nos demais (59,1%), a abordagem cirúrgica foi paliativa ou com intenção de coleta de material para confirmação diagnóstica.

A grande maioria dos tumores era intracerebral (95,5%) e concentrada nas regiões frontal e/ou temporal, com a seguinte distribuição: 6 na região frontal (28,5%), 5 na região temporal (19,4%), 3 na região fronto-temporal (14,2%) 2 na região fronto-parietal (9,5%) 1 na região parieto-occipital (4,7%) 1 na região parietal (4,7 %), 1 na região occipital (4,7%), 1 na região têmporo-occipital (4,7%) e 2 na região talâmica (9,5%). Apenas 1 neoplasia (4,5%) (caso 13) era localizada em tronco cerebral, região de mesencéfalo (Figura 2).



**Figura 2** - Distribuição dos astrocitomas anaplásicos segundo localização no sistema nervoso central

A maioria dos gliomas (13 lesões) estava localizada no hemisfério cerebral esquerdo (59,1%). Dentre os restantes, 8 tumores (36,2%) eram localizados no hemisfério cerebral direito e apenas 1 no tronco cerebral (caso 13), em linha média em região de mesencéfalo (4,7%).

Tratamento adjuvante com quimio e/ou radioterapia foi realizado em 21 (95,5%) pacientes, sendo 15 (71,4%) submetidos a radioterapia e quimioterapia adjuvantes concomitantemente. Três pacientes (14,2%) foram submetidos apenas a quimioterapia e outros 3 (14,2%) apenas a radioterapia. Apenas 1 caso (caso 8) não recebeu tratamento adjuvante e 1 caso (caso 10) não foi feita menção no prontuário, sendo interpretada como não-realizada. O protocolo de tratamento foi similar entre os casos, com os seguintes esquemas:

- Quimioterapia: Temozolamida 150 - 200mg/m<sup>2</sup> associada a radioterapia por 1 – 2 meses, seguido de 6 ciclos de temozolamida isolada na mesma dose (1

ciclo/mês durante os 6 meses seguintes);

- Radioterapia: conformacional tridimensional (RTC3D), com uma dose total de 40 a 60 Gy totais no centro tumoral e 45Gy na periferia da lesão, dividida em cerca de 30 frações, realizadas em 1 -2 meses após a cirurgia.

Recidivas tumorais após o tratamento cirúrgico e adjuvante foram observadas em apenas 2 pacientes (9,1%) (casos 8 e 17). Nestes casos, o diagnóstico da doença foi realizado somente com os exames de imagem e dados clínicos, sem reabordagem cirúrgica. Apenas 1 caso (caso 8) recebeu terapia adjuvante na recidiva.

Os pacientes tiveram um seguimento clínico mínimo de 3 meses e máximo de 7,3 anos, com uma média de 4,5 anos. Neste período, foram observados 9 óbitos (40,9%), sendo 2 (casos 7 e 12) detectados através da pesquisa em diário oficial. Dentre os 13 vivos, 7 (53,85%) apresentaram doença residual e 6 (46,15%) não apresentaram sinais de doença aos exames de imagem.

O Quadro 3 sumariza os principais dados clínico-demográficos obtidos.

**Quadro 3 - Aspectos clínicos e demográficos pesquisados**

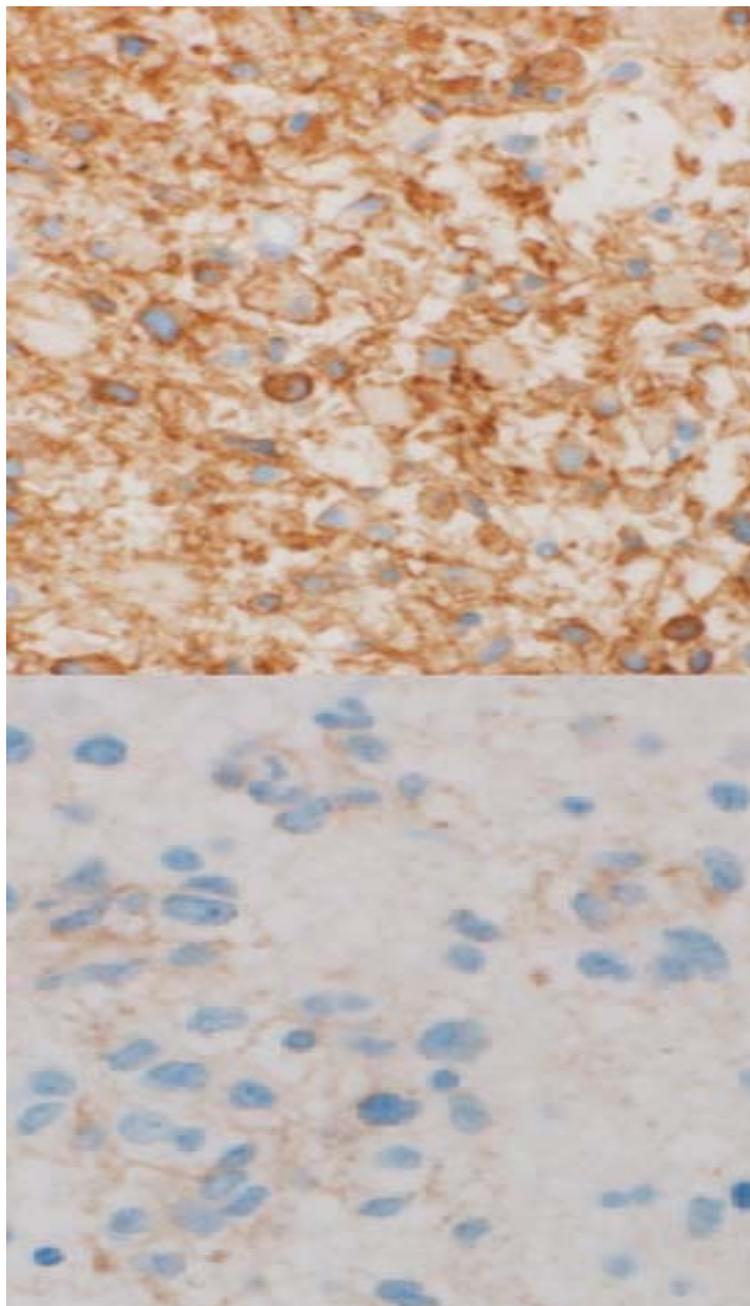
caso	gênero	idade	tipo	localização	dimensão	cirurgia	tratamento	recidiva	status final	sobrevida global (dias)
1	F	34	primário	fronto-parietal	maior que 4,0cm	parcial	temodal + 60Gy	não	morto	1250 (3,5 anos)
2	M	37	primário	parieto-occipital	maior que 4,0cm	radical	temodal + 60Gy	não	vivo sem doença	2617 (7,3 anos)
3	M	46	recidiva	frontal	maior que 4,0cm	radical	temodal + 61Gy	não	vivo sem doença	2314 (6,42 anos)
4	M	70	primário	parietal	maior que 4,0cm	parcial	40Gy	não	vivo com doença	247 (0,68 anos)
5	M	62	primário	occipital	maior que 4,0cm	parcial	temodal + 60Gy	não	vivo com doença	901 (2,5 anos)
6	M	31	primário	frontal	menor que 4,0cm	radical	temodal + 60Gy	não	vivo sem doença	1636 (4,5 anos)
7	M	43	recidiva	frontal	maior que 4,0cm	parcial	carmustin + 48Gy	não	morto	840 (2,3 anos)
8	F	42	primário	frontal	menor que 4,0cm	radical	não	sim	morto	1026 (2,85 anos)
9	M	24	recidiva	frontal	não referido	parcial	temozolamida	não	vivo com doença	2426 (6,7 anos)
10	F	41	primário	fronto-temporal	menor que 4,0cm	radical	temodal + 60Gy	não	vivo sem doença	404 (1,12 anos)
11	M	62	primário	temporo-occipital	menor que 4,0cm	parcial	temodal + 62Gy	não	morto	251 (0,69 anos)
12	M	74	primário	fronto-temporal	não referido	parcial	temodal+ 60Gy	não	morto	1767 (4,9 anos)
13	M	36	recidiva	mesencéfalo	menor que 4,0cm	parcial	54Gy	não	morto	724 (2 anos)
14	F	52	primário	temporal	maior que 4,0cm	parcial	temodal + 60Gy	não	morto	555 (1,54 anos)
15	F	47	recidiva	temporal	menor que 4,0cm	radical	temodal + 54Gy	não	vivo sem doença	1789 (5 anos)
16	M	37	primário	temporal	maior que 4,0cm	parcial	54Gy	não	morto	122 (0,33 anos)
17	F	40	recidiva	frontal	maior que 4,0cm	radical	temodal + 35Gy	sim	vivo com doença	1149 (3,19 anos)
18	M	29	recidiva	fronto-parietal	maior que 4,0cm	parcial	temozolamida	não	vivo com doença	1630 (4,5 anos)
19	M	23	recidiva	temporal	não referido	parcial	temodal/bevacizumab + 59,4Gy	não	vivo com doença	1269 (3,5 anos)
20	M	26	primário	tálamo	maior que 4,0cm	parcial	nizotinumabe/temozolamida	não	morto	222 (0,61 anos)
21	F	20	primário	tálamo	maior que 4,0cm	parcial	temodal + 54Gy	não	vivo com doença	1365 (3,8 anos)
22	F	47	recidiva	temporal	menor que 4,0cm	radical	temodal + 54Gy	não	vivo sem doença	1784 (4,9 anos)

F- feminino, M- masculino

## **4.2 RESULTADOS DAS REAÇÕES IMUNO-HISTOQUÍMICAS**

### **4.2.1 Expressão de EGFR**

Das 22 amostras estudadas, 12 (54,5%) foram classificadas como positivas, sendo identificados padrões de membrana e de citoplasma em 4 casos (17,3%); padrão de membrana isolada em 4 casos (17,3%) e somente citoplasma nos 4 casos restantes (17,3%, Figura 3). A positividade de padrão difuso (em 100% das células neoplásicas) e com escore 3+ foi observada em 3 amostras (casos 8,11 e 16) e em 4 amostras (casos 8, 11, 14 e 16), respectivamente. A imunomarcção de membrana foi identificada em 6 amostras (casos 3,5,8,11,14 e 16), sendo apenas 01 (caso 3) neoplasia recidivada.



**Figura 3** - Marcação de EGFR por imuno-histoquímica. Marcação de padrão membrana e citoplasma, escore 3+ (200x) – figura superior. Marcação de padrão de membrana isolada (400x) – figura inferior.

A intensidade, extensão de marcação e o escore final obtidos nos casos corados por EGFR por imuno-histoquímica estão sumarizados no Quadro 4.

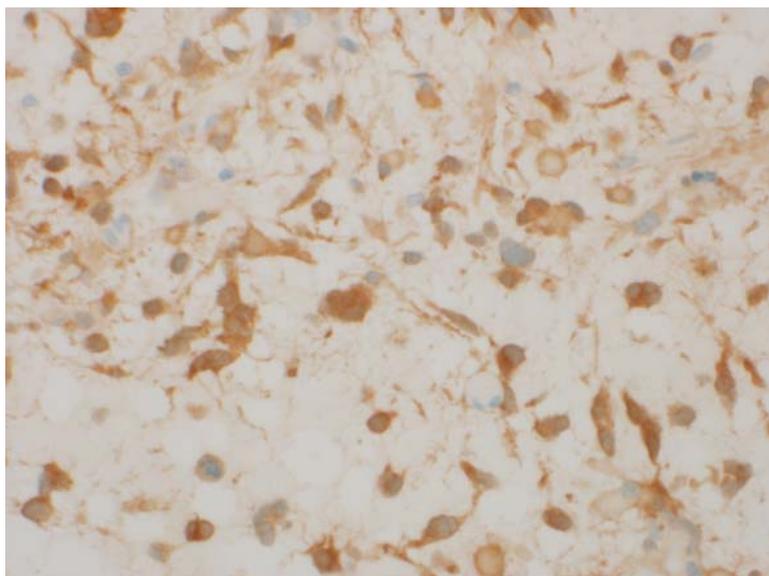
**Quadro 4 - Resultado dos achados imuno-histoquímicas para EGFR**

caso	tipo de material	marcação	padrão	intensidade	porcentagem	porcentagem de marcação forte	escore
1	primário	negativo	não se aplica	x	0	0	0
2	primário	negativo	não se aplica	x	0	0	0
3	recidiva	positivo maioria	membrana	fraco/moderada	80	0	2+
4	primário	negativo	não se aplica	x	0	0	0
5	primário	positivo minoria	membrana e citoplasma	fraco	5	0	1+
6	primário	positivo minoria	citoplasma	fraco	5	0	0
7	recidiva	negativo	não se aplica	x	0	0	0
8	primário	positivo difuso	membrana e citoplasma	moderada/forte	100	40	3+
9	recidiva	negativo	não se aplica	x	0	0	0
10	primário	negativo	não se aplica	x	0	0	0
11	primário	positivo difuso	membrana e citoplasma	moderada/forte	100	60	3+
12	primário	negativo	não se aplica	x	0	0	0
13	recidiva	negativo	não se aplica	x	0	0	0
14	primário	positivo maioria	membrana e citoplasma	moderada/forte	70	30	3+
15	recidiva	positivo minoria	citoplasma	fraco	5	0	0
16	primário	positivo difuso	membrana	forte	100	90	3+
17	recidiva	positivo minoria	citoplasma	fraco/moderado	5	0	0
18	recidiva	positivo minoria	membrana	fraco	5	0	1+
19	recidiva	negativo	não se aplica	x	0	0	0
20	primário	negativo	não se aplica	x	0	0	0
21	primário	positivo minoria	membrana	fraco	15	0	1+
22	recidiva	positivo minoria	citoplasma	fraco	5	0	0

**X – não se aplica**

#### 4.2.2 Expressão de IDH1 e INA

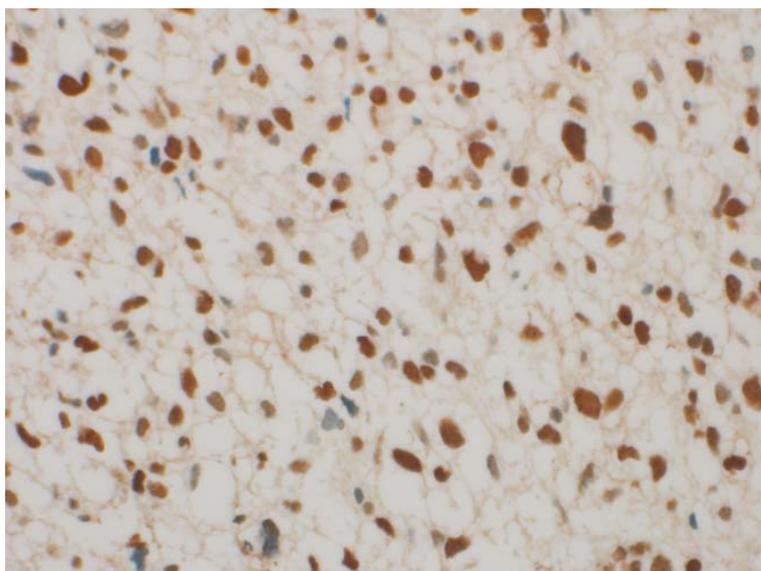
Dez amostras (45,5%) foram consideradas positivas para o IDH1, sendo a marcação observada apenas no citoplasma das células tumorais (Figura 4). A positividade foi observada em 6 amostras de tumores recidivados (60,0%) e 4 amostras de tumores primários (40,0%). O restante dos casos foi considerado negativo. Somente em 1 caso (4,5%) (caso 21) não foi possível a avaliação deste anticorpo. Os casos positivos apresentavam todas as células neoplásicas imunomarcadas (padrão difuso e homogêneo de marcação). A expressão de INA não foi observada em nenhum caso, sendo todos considerados negativos.



**Figura 4** - Positividade para IDH1, com marcação citoplasmática (400x)

#### 4.2.3 Expressão de MGMT

A expressão nuclear de MGMT foi observada em 21 amostras (95,5%, Figura 5). Apenas 1 amostra (4,5%) (caso 1) foi classificada como negativa para este marcador.



**Figura 5** - Positividade imuno-histoquímica para MGMT, com marcação nuclear nas células neoplásicas (400x).

A Tabela 2 mostra os resultados para todos os anticorpos estudados.

**Tabela 2** - Resultados obtidos pelo estudo imuno-histoquímico, sem avaliação de intensidade e extensão

<b>Marcador</b>	<b>Resultado</b>	<b>Número de amostras (%)</b>
EGFR	positivo	12 (54,5%)
	padrão membrana isolada	4 (33,3%)
	padrão membrana e citoplasma	4 (33,3%)
	padrão citoplasma isolado	4 (33,3%)
	negativo	10 (45,5%)
IDH1	positivo	10 (45,5%)
	negativo	11 (50,0%)
	não avaliável	1 (4,5%)
INA	positivo	0 (0,0%)
	negativo	22 (100,0%)
MGMT	positivo	21 (95,5%)
	negativo	1 (4,5%)

### **4.3 RESULTADOS DAS HIBRIDIZAÇÕES *IN SITU* FLUORESCENTES (FISH)**

#### **4.3.1 Avaliação numérica do braço longo do cromossomo 19 (19q)**

Dezoito casos apresentaram a quantidade mínima de 100 células marcadas com os 2 sinais referentes à sonda em estudo. Não foram observados casos com marcação exclusiva (presença de apenas um dos sinais) para 19p ou 19q.

A razão da média de sinais 19q/19p variou entre 0,68 e 1,46. Nenhum caso apresentou razão inferior a 0,75. Quatro casos (casos 2, 5, 13 e 16) apresentaram média superior a 1,33, caracterizando desbalanço positivo entre a quantidade de braços cromossômicos a favor de 19q. Um caso (caso 19) apresentou média inferior a 0,75, caracterizando desbalanço positivo a favor de 19p.

Dentre esses casos desbalanceados, os achados foram heterogêneos. Um caso (caso 5) apresentou média de 19p e 19q inferior a 1.4, caracterizando deleção de ambos os braços. Entretanto, a perda de 19p foi mais expressiva do que a perda de 19q, tendo assim o desbalanço. Três casos (casos 2, 16 e 19) apresentaram média de 19p e 19q superior a 2.4, caracterizando ganho de ambos os braços. A ganho de 19q foi menor em 02 casos (casos 16 e 19) e o ganho de 19p foi menor em um caso (caso 2). Um caso (caso 13) apresentou critérios para ganho de 19q e perda de 19p.

Dentre os casos balanceados, quatro casos (casos 6, 9,17 e 18) apresentaram ganhos de ambos os braços na mesma proporção e um caso (caso 21) apresentou perda de ambos os braços também proporcionalmente. Os demais não apresentaram alterações. Não foi observado predomínio em neoplasias primárias ou recidivadas. Os dados estão presentes na Tabela 3.

**Tabela 3** - Resultados das reações de FISH para avaliação de 19q e 19p

caso	19q média	19p média	razão 19q/19p	conclusão 19q
1	1,57	1,67	1,07	normal
2	<b>3,65</b>	<b>2,63</b>	<b>1,39</b>	<b>ganho de 19q e ganho (menor) de 19p</b>
3	1,62	1,6	1,01	normal
4	NA	NA	NA	NA
5	<b>1,22</b>	<b>0,84</b>	<b>1,46</b>	<b>perda de 19p e perda (menor) de 19q</b>
6	<b>3,75</b>	<b>2,86</b>	<b>1,31</b>	<b>ganho de 19p e ganho de 19q</b>
7	NA	NA	NA	NA
8	1,93	1,69	1,14	normal
9	<b>3,02</b>	<b>2,99</b>	<b>1,01</b>	<b>ganho de 19p e ganho de 19q</b>
10	NA	NA	NA	NA
11	NA	NA	NA	NA
12	2,05	1,53	1,33	normal
13	<b>2,48</b>	<b>1,33</b>	<b>1,87</b>	<b>ganho de 19q e perda de 19p</b>
14	2,21	1,66	1,33	normal
15	1,92	1,64	1,17	normal
16	<b>3,95</b>	<b>2,69</b>	<b>1,47</b>	<b>ganho de 19p e ganho (menor) de 19q</b>
17	<b>2,39</b>	<b>3,16</b>	<b>0,76</b>	<b>ganho de 19p</b>
18	<b>3,02</b>	<b>2,54</b>	<b>1,19</b>	<b>ganho de 19p e ganho de 19q</b>
19	<b>2,7</b>	<b>3,97</b>	<b>0,68</b>	<b>ganho de 19p e ganho (menor) de 19q</b>
20	2,2	1,79	1,23	normal
21	<b>1,22</b>	<b>1,2</b>	<b>1,02</b>	<b>perda de 19p e perda de 19q</b>
22	2,09	1,8	1,16	normal

NA – não avaliável

#### 4.3.2 Avaliação numérica do braço curto do cromossomo 1 (1p)

Dezessete casos apresentaram a quantidade mínima de 100 células marcadas com os 2 sinais referentes à sonda em estudo. Não foram observados casos com marcação exclusiva (presença de apenas um dos sinais) para 1p ou 1q.

A razão da média de sinais 1p/1q variou entre 0,97 e 2,48. Nenhum caso apresentou razão inferior a 0,75. Doze casos apresentaram razão superior a 1,33, caracterizando desbalanço positivo entre a quantidade de braços cromossômicos a favor de 1p.

Dentre os casos desbalanceados, 03 casos (casos 4, 12 e 20) apresentaram média de 1q inferior a 1.4, caracterizando deleção deste braço. Sete casos (casos 6, 7, 13, 14, 17, 19 e 20) apresentaram apenas a média de 1p superior a 2.4, caracterizando ganho deste braço. Dois casos (15 e 16) apresentaram concomitantemente ganho de 1p e deleção de 1q. Desta forma, sete casos foram considerados com ganho de 1p, três casos com deleção de 1q e dois casos com ganho de 1p e deleção de 1q. A maioria (nove casos) com ganho de 1p pertencia ao grupo de neoplasias recidivadas (Anexo 2).

Dentre os casos balanceados, nenhum caso apresentou perdas ou ganhos, ou seja, a quantidade de braços por núcleo ficou próxima à razão 2 : 2. Os dados estão presentes na Tabela 4.

**Tabela 4** - Resultados das reações de FISH para avaliação de 1p e 1q

caso	1p média	1q média	razão 1p/1q	conclusão 1p
1	2,39	1,93	1,24	normal
2	2,28	2,35	0,97	normal
3	1,95	1,47	1,33	normal
<b>4</b>	<b>1,65</b>	<b>0,85</b>	<b>1,94</b>	<b>deleção de 1q</b>
5	NA	NA	NA	NA
<b>6</b>	<b>3,53</b>	<b>1,94</b>	<b>1,82</b>	<b>ganho de 1p</b>
<b>7</b>	<b>3,18</b>	<b>2,3</b>	<b>1,38</b>	<b>ganho de 1p</b>
8	NA	NA	NA	NA
9	2,38	2,12	1,12	normal
10	NA	NA	NA	NA
11	NA	NA	NA	NA
<b>12</b>	<b>2,1</b>	<b>1,26</b>	<b>1,67</b>	<b>deleção de 1q</b>
<b>13</b>	<b>3,16</b>	<b>1,73</b>	<b>1,83</b>	<b>ganho de 1p</b>
<b>14</b>	<b>2,43</b>	<b>1,8</b>	<b>1,35</b>	<b>ganho de 1p</b>
<b>15</b>	<b>3,23</b>	<b>1,3</b>	<b>2,48</b>	<b>ganho de 1p e deleção de 1q</b>
<b>16</b>	<b>3</b>	<b>1,38</b>	<b>2,17</b>	<b>ganho de 1p e deleção de 1q</b>
<b>17</b>	<b>3,28</b>	<b>1,99</b>	<b>1,65</b>	<b>ganho de 1p</b>
<b>18</b>	<b>2,48</b>	<b>1,69</b>	<b>1,47</b>	<b>ganho de 1p</b>
<b>19</b>	<b>3,32</b>	<b>2,29</b>	<b>1,45</b>	<b>ganho de 1p</b>
<b>20</b>	<b>1,88</b>	<b>1,34</b>	<b>1,4</b>	<b>deleção de 1q</b>
21	NA	NA	NA	NA
22	1,9	1,46	1,3	normal

NA – não avaliável

### 4.3.3 Avaliação numérica das cópias do Gene EGFR

Dentre todas as amostras, sete casos foram considerados não avaliáveis pela ausência de sinais da sonda utilizada, mesmo após repetição da técnica. 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 6.35, variando entre 1,63 e 20,0.

Quatro casos (23,5%) apresentaram média de sinais acima de 6,0 e 2 casos (11,7%) abaixo de 2,0.

A média de sinais da região centromérica do cromossomo 17 foi de 2.11, variando entre 1,0 e 3,89. Dez casos (58,8%) apresentavam média de sinais acima de 3,0 e 7 casos (41,2%) 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 1,11 e 20,0, com valor médio de 4,87. Quatro casos (23,5%) tiveram esta razão superior a 2,0 sendo a média de sinais de EGFR superior de 6.0 em todos estes casos, considerados, portanto, com alta amplificação. Todos os casos amplificados eram do grupo de tumores primários. Não foram observados casos com baixa amplificação. Os dados estão presentes na Tabela 5.

**Tabela 5** - Resultados das reações de FISH para avaliação de EGFR

caso	CEP média	EGFR média	razão EGFR/CEP	conclusão EGFR
1	2,16	2,45	1,13	não amplificado
2	2,96	3,28	1,1	não amplificado
3	1,2	1,63	1,35	não amplificado
4	NA	NA	NA	NA
5	NA	NA	NA	NA
6	2,2	1,94	0,88	não amplificado
7	1,98	2,28	1,15	não amplificado
<b>8</b>	<b>1</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>alta amplificação</b>
9	NA	NA	NA	NA
10	3,1	3,44	1,11	não amplificado
<b>11</b>	<b>1</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>alta amplificação</b>
12	1,98	2,41	1,21	não amplificado
13	3,89	3,79	0,97	não amplificado
<b>14</b>	<b>1,47</b>	<b>9,94</b>	<b>6,77</b>	<b>alta amplificação</b>
15	NA	NA	NA	NA
<b>16</b>	<b>1</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>alta amplificação</b>
17	3,15	3,52	1,12	não amplificado
18	2,14	3,37	1,57	não amplificado
19	2,19	2,8	1,27	não amplificado
20	NA	NA	NA	NA
21	2,21	3,88	1,76	não amplificado
22	2,25	3,35	1,48	não amplificado

---

NA – não avaliável; CEP – região centromérica

A Tabela 6 correlaciona os achados imuno-histoquímicos com os achados de hibridização *in situ* para o EGFR. Os casos classificados como escore 3+ à imuno-histoquímica corresponderam aos casos amplificados ao FISH.

**Tabela 6** - Comparação entre os achados imuno-histoquímicos e de hibridização *in situ* para avaliação de EGFR

caso	padrão	intensidade	extensão	%	Forte intensidade (% de células)	Escore por IHQ	FISH
3	M	fraco/moderada	maioria	80	0	2+	x
5	MC	fraco	minoría	5	0	1+	NA
6	C	fraco	minoría	5	0	0	NA
<b>8</b>	<b>MC</b>	<b>moderada/forte</b>	<b>difuso</b>	<b>100</b>	<b>40</b>	<b>3+</b>	<b>A</b>
<b>11</b>	<b>MC</b>	<b>moderada/forte</b>	<b>difuso</b>	<b>100</b>	<b>60</b>	<b>3+</b>	<b>A</b>
<b>14</b>	<b>MC</b>	<b>moderada/forte</b>	<b>maioria</b>	<b>70</b>	<b>30</b>	<b>3+</b>	<b>A</b>
15	C	fraco	minoría	5	0	0	x
<b>16</b>	<b>M</b>	<b>forte</b>	<b>difuso</b>	<b>100</b>	<b>90</b>	<b>3+</b>	<b>A</b>
17	C	fraco/moderada	minoría	5	0	0	NA
18	M	fraco	minoría	5	0	1+	NA
21	M	fraco	minoría	15	0	1+	NA
22	C	fraco	minoría	5	0	0	NA

M – membrana. C – citoplasma, A – amplificação, NA – não amplificação, % - porcentagem, x – não avaliável

A Tabela 7 sumariza todos os resultados encontrados por IHQ e FISH dos marcadores pesquisados.

**Tabela 7** - Marcadores pesquisados, com seus respectivos resultados

caso	IDH1	INA	EGFR escore	EGFR - FISH	MGMT	19q	1p
1	positivo	negativo	0	NA	negativo	N	N
2	positivo	negativo	0	NA	positivo	+19p/+19q	N
3	positivo	negativo	2+	NA	positivo	N	N
4	negativo	negativo	0	x	positivo	x	-1q
5	negativo	negativo	1+	x	positivo	-19p/-19q	x
6	negativo	negativo	0	NA	positivo	+19p/+19q	+1p
7	positivo	negativo	0	NA	positivo	X	+1p
8	negativo	negativo	3+	A	positivo	N	x
9	negativo	negativo	0	x	positivo	+19p/+19q	N
10	positivo	negativo	0	NA	positivo	x	x
11	negativo	negativo	3+	A	positivo	x	x
12	negativo	negativo	0	NA	positivo	N	-1q
13	negativo	negativo	0	NA	positivo	+19q/-19p	+1p
14	negativo	negativo	3+	A	positivo	N	+1p
15	positivo	negativo	0	x	positivo	N	+1p e - 1q
16	negativo	negativo	3+	A	positivo	+19p/+19q	+1p e - 1q
17	positivo	negativo	0	NA	positivo	+19p	+1p
18	negativo	negativo	1+	NA	positivo	+19p/+19q	+1p
19	positivo	negativo	0	NA	positivo	+19p/+19q	+1p
20	x	negativo	0	x	positivo	N	-1q
21	negativo	negativo	1+	NA	positivo	-19p/-19q	x
22	positivo	negativo	0	NA	positivo	N	N

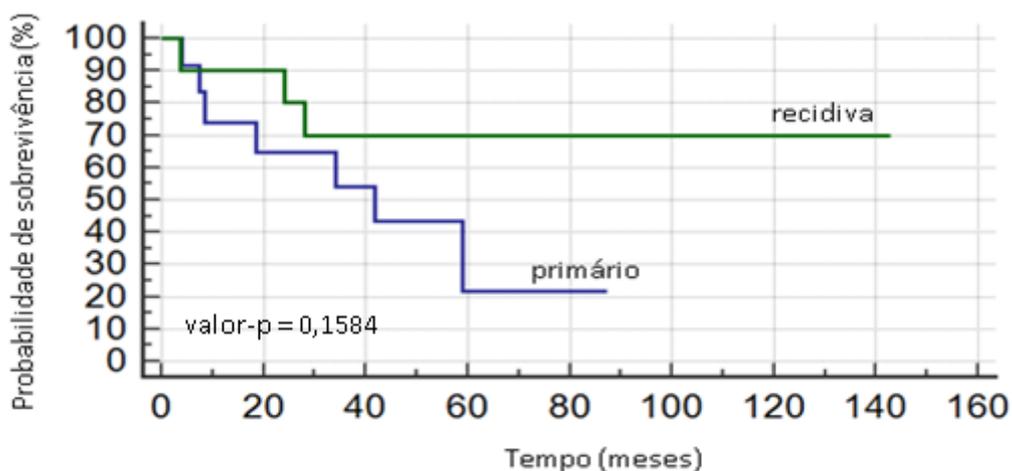
x – não avaliável; NA – não amplificado; A – amplificado; + - ganho; - -perda; N- normal

Foram realizados os testes estatísticos mencionados previamente e não houve associação significativa entre todos os dados clínicos e demográficos com os marcadores moleculares pesquisados.

Todos os dados coletados encontram-se disponíveis no Anexo 2.

#### 4.4 RESULTADOS DAS TAXAS DE SOBREVIDA GLOBAL

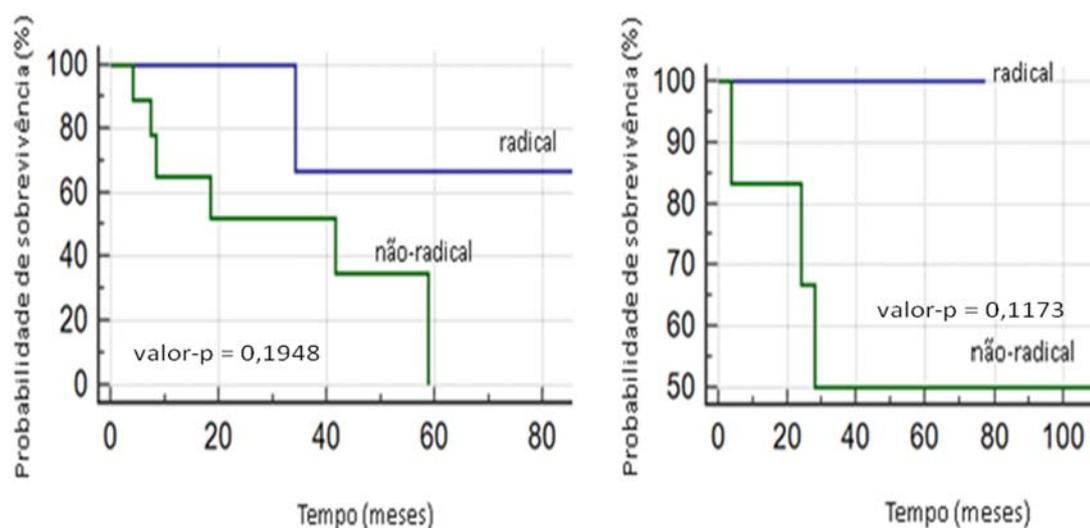
A média de sobrevida global dos pacientes foi de 1116,75 dias (3,11 anos) sendo a mediana de 1199,9 dias (3,33 anos) no período de seguimento avaliado, A taxa de sobrevida global foi menor em pacientes portadores de neoplasias primárias em comparação com portadores de neoplasias recidivadas. A probabilidade de sobrevivência em 5 anos nos pacientes com tumor primário foi de 20%, sendo esta taxa de 70% no grupo de pacientes com neoplasia recidivada ( $p = 0,15$ ).



**Figura 6** - Taxas de sobrevida global em relação ao tipo de material dos pacientes com astrocitoma anaplásico, com valor-p=0,1584.

A taxa de sobrevida global foi maior em pacientes submetidos a ressecções radicais do que nos outros pacientes, tanto no grupo de tumores primários quanto no grupo dos recidivados.

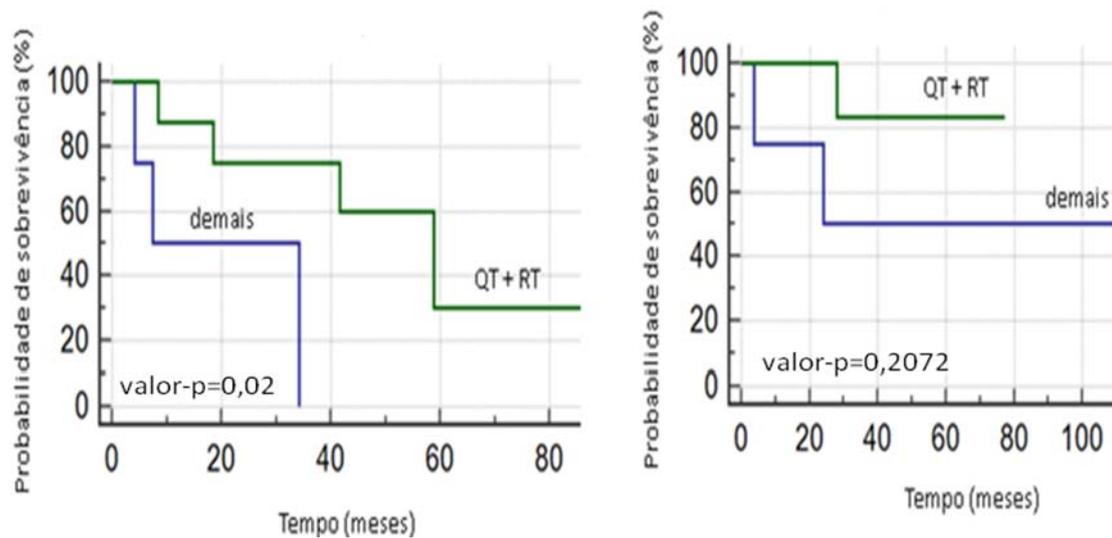
No grupo dos tumores primários, a probabilidade de sobrevivência em 5 anos foi de 0% para as ressecções não radicais e 70% para as radicais (valor-p = 0,19). No grupo de neoplasias recidivadas, a taxa de sobrevida global foi de 50% em 5 anos para os submetidos a ressecção não radical e 100% para ressecção radical (p = 0,11).



**Figura 7** - Taxas de sobrevida global em relação ao tipo de abordagem cirúrgica nos grupos de tumores primários (gráfico à esquerda) e recidivas (gráfico à direita), com valor-p de 0,19 e 0,11, respectivamente.

No grupo de tumores primários, a taxa de sobrevida global foi maior em pacientes submetidos a tratamento adjuvante (radio e quimioterapia combinadas) do que nos demais, com uma estimativa de sobrevivência de 30% e 0% em 60 meses de avaliação, respectivamente, com valor-p = 0,02. No grupo de tumores recidivados, as curvas das taxa de sobrevida global foram semelhantes, com probabilidade de

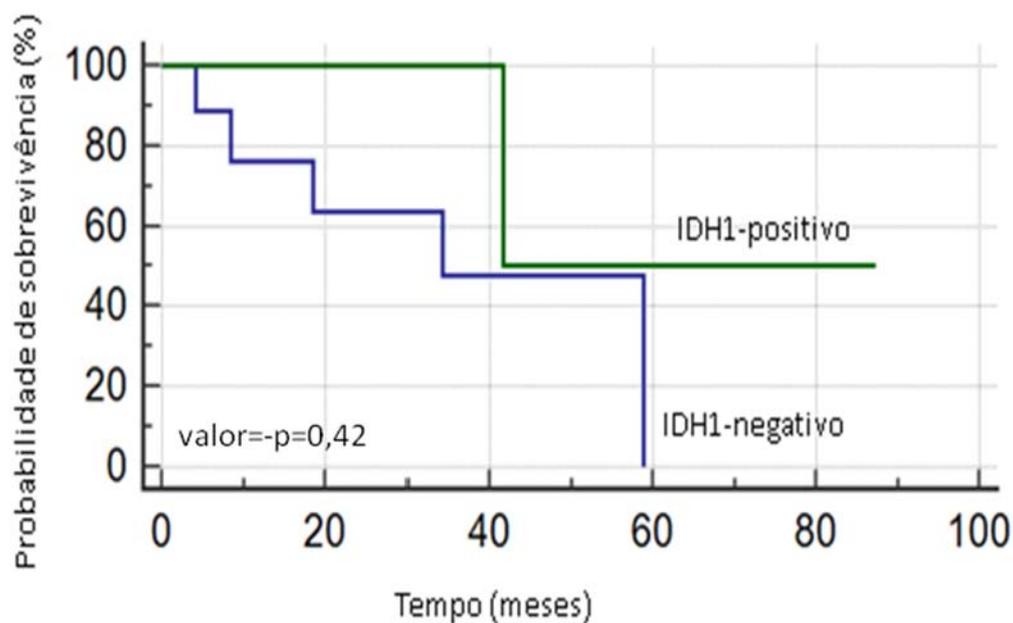
sobrevivência de 83,3% e 50% em 60 meses para os pacientes com tumores tratados com ou sem terapia adjuvante, respectivamente, porém com valor-p= 0,2072.



QT – quimioterapia; RT - radioterapia

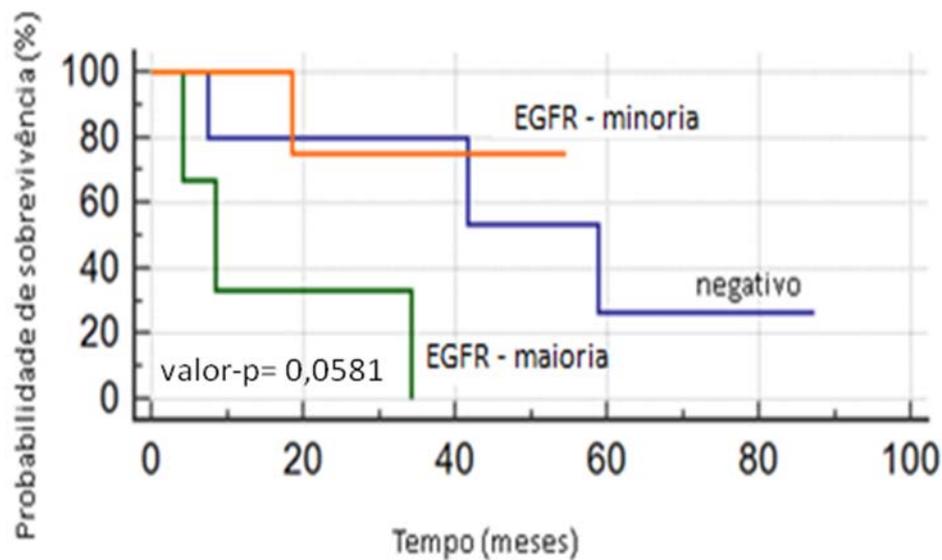
**Figura 8** - Taxas de sobrevida global em relação à associação de tratamento adjuvante nos grupos de tumores primários (gráfico à esquerda) e recidivas (gráfico à direita), com valor-p de 0,02 e 0,2072, respectivamente.

As taxas de sobrevida global foram maiores em pacientes com AAs IDH1-positivos, sendo a estimativa de sobrevida de 50% e 0% em 60 meses (valor-p= 0,42). No grupo das neoplasias recidivadas, não foram observadas diferenças significativas entre as curvas de sobrevida.



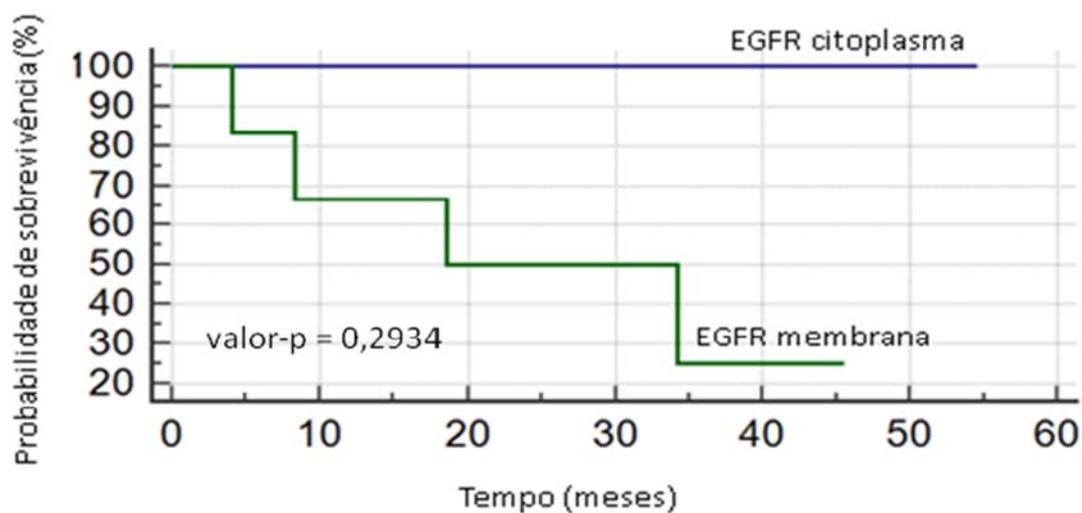
**Figura 9** - Taxas de sobrevida global em relação à positividade imuno-histoquímica para IDH1 em neoplasias primárias, com valor-p=0,42.

A positividade imuno-histoquímica para EGFR, quando presente na maioria das células neoplásicas (incluindo marcação difusa), teve associação com pior sobrevida, com uma taxa de mortalidade de 100% em 40 meses, comparado com uma sobrevida estimada de 75% (75 -80%) nos demais, com valor-p = 0,058.

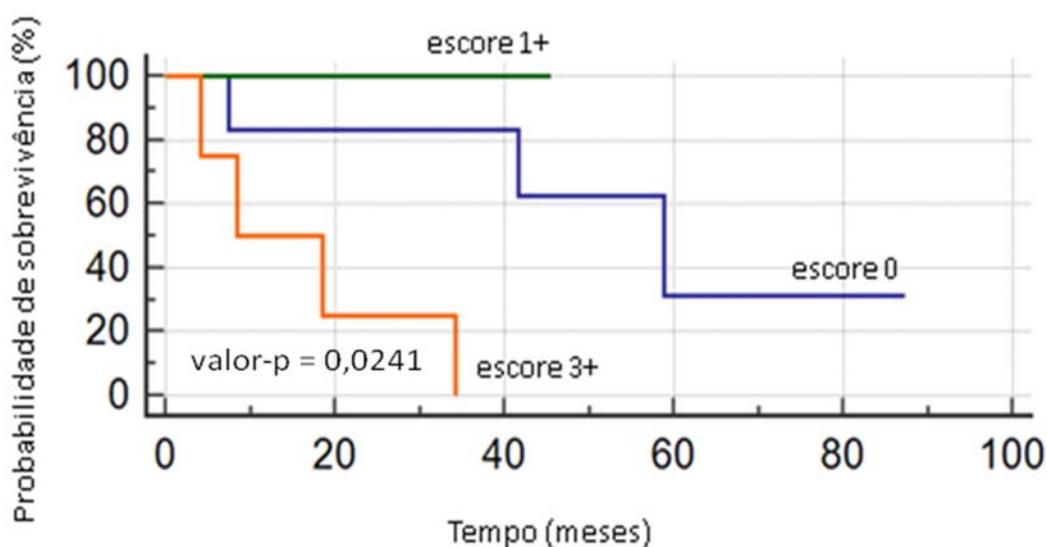


**Figura 10** - Taxas de sobrevida global em relação à extensão de positividade imuno-histoquímica de EGFR em neoplasias primárias, com valor-p= 0,058.

A marcação imuno-histoquímica tipo membrana para EGFR também teve associação com piores taxas de sobrevida, com estimativa de sobrevivência de 25% em 40 meses para os casos com este padrão de marcação contra 100% para os casos que apresentaram os demais padrões (valor-p = 0,29). Utilizando-se a classificação de positividade em escores, os casos com escore 3+ apresentaram piores taxas de sobrevida, com estimativa de sobrevivência de 0% em 60 meses para os casos com este resultado. Os casos foram classificados como escore 1+ e 30% para os casos escore 0 com valor-p= 0,024.



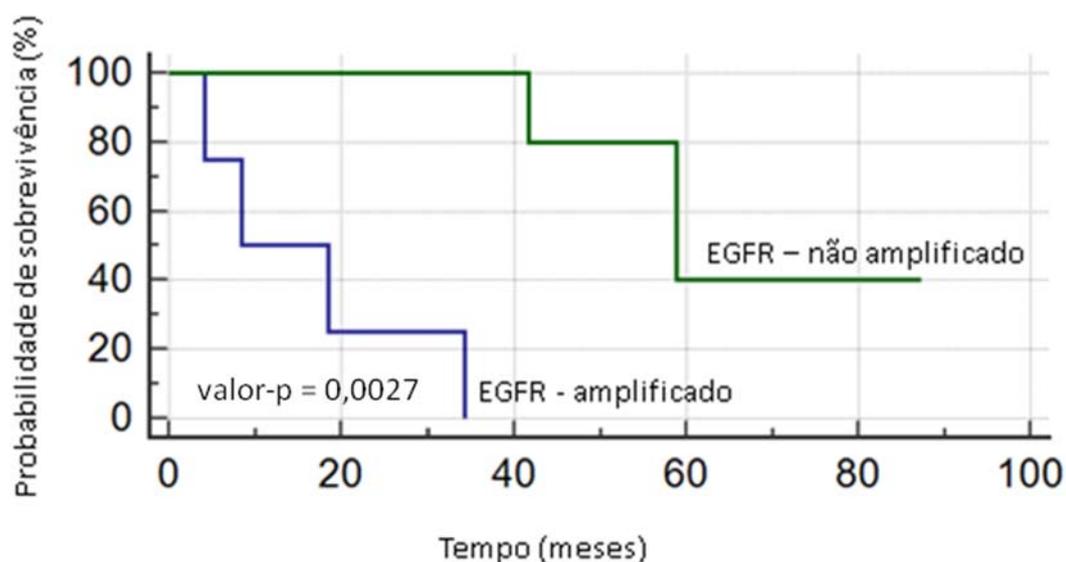
**Figura 11** - Taxas de sobrevida global em relação ao padrão de positividade imunohistoquímica de EGFR em neoplasias primárias, com valor-p = 0,2934.



**Figura 12** - Taxas de sobrevida global em relação ao escore de positividade imunohistoquímica de EGFR em neoplasias primárias, com valor-p=0,024.

No grupo das neoplasias primárias, a amplificação de EGFR também teve associação com pior sobrevida, com estimativa de 0% de probabilidade de sobrevivência para os casos amplificados (alta amplificação) e 40% para os casos

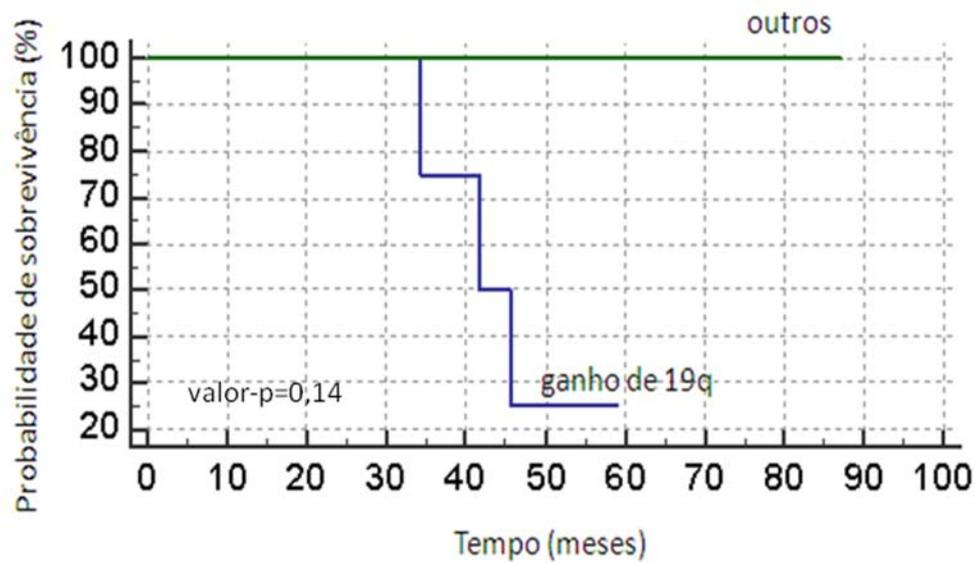
não amplificados no período de 60 meses (58,9 meses), com valor-p = 0,0027. No grupo de neoplasias recidivadas, a avaliação não foi possível devido à ausência de casos amplificados.



**Figura 13** - Taxas de sobrevida global dos pacientes com AAs primários com amplificação de EGFR por FISH, valor- p=0,0027.

As curvas de sobrevida global dos pacientes com AAs com escore 3+ e amplificação do gene EGFR foram semelhantes.

No grupo de neoplasias primárias, ganhos desbalanceados do braço longo do cromossomo 19q mostraram associação com piores taxas de sobrevida, com estimativa de 10% de sobrevida para os casos com ganho e 100% para os casos sem, no período de 50 meses, porém com valor-p = 0,14. No grupo de neoplasias recidivadas, esta associação não foi observada.



**Figura 14** - Taxas de sobrevida global em relação ao ganho de 19q por FISH em neoplasias primárias, com valor-p=0,14.

Não foram encontradas diferenças estatísticas na associação entre sobrevida global e gênero, idade (abaixo e acima de 40 anos), lateralidade, dimensões da neoplasia (abaixo e acima de 4,0cm), imunopositividade para INA e MGMT e outras alterações no status 1p e 19q. Não foi possível o cálculo das taxas de sobrevida livres de doença devido ao pequeno número de pacientes com recidivas após terapia.

## 5 DISCUSSÃO

O presente trabalho apresenta casuística restrita, com 22 pacientes, conforme esperado devido à raridade da neoplasia, porém superior a alguns trabalhos com proposta similar (BRAT et al. 2004). Este pequeno número de casos está associado a diversos fatores, dentre eles:

- Reclassificação diagnóstica dos casos inicialmente propostos (principal fator limitante), especialmente para identificação de critérios histológicos ou radiológicos para o diagnóstico de glioblastoma;
- Material biológico insuficiente para as avaliações (exiguidade da amostra representativa do tumor devido ao desgaste do material);
- Realização de tratamento sem revisão prévia do laudo anátomo-patológico ou devolução dos blocos de parafina para os pacientes para tratarem em outra instituição ou solicitarem nova impressão morfológica).

Os estudos com a mesma proposta (SMITH et al. 2001; VOGAZIANOU et al. 2010; WOEHRER et al. 2011; NUÑO et al. 2013) apresentavam maior casuística por incluírem bancos de dados nacionais ou multi-institucionais de maiores períodos de tempo de coleta de dados. Entretanto, o tamanho da amostra não inviabiliza a pesquisa, pois a casuística estudada foi rigorosamente selecionada e constituída somente por pacientes adultos, em bom estado geral (KPS igual ou acima de 80) ao início de tratamento, não submetidos a terapia radioquimioterápica prévia, praticamente uniformes quanto ao tipo de terapêutica adjuvante, com diagnóstico histológico revisto por dois patologistas (sendo um deles especialista em

Neuropatologia), com exames de imagem não compatíveis com glioblastoma, sem complicações pós-cirúrgicas ou pós-radioquimioterápicas, com representação satisfatória de grande quantidade de células (do “tumor bulk”) da neoplasia e com número equivalente aproximado de amostras representativas de tumores recidivados de astrocitomas difusos prévios e astrocitomas anaplásicos primários. Contudo, as informações clínico-radiológicas devem ser interpretadas com cautela, uma vez que o seguimento clínico foi limitado, restringindo-se em parte dos casos ao período de tratamento adjuvante. Alguns pacientes foram ainda operados e/ou realizaram exames de imagem pré-operatórios em outros serviços, fornecendo informações pré-cirúrgicas imprecisas, principalmente no que se refere à localização, quantidade e dimensão das lesões e ao tempo decorrente entre o início dos sintomas e o início do tratamento. Por exemplo, separamos os tumores em duas categorias baseadas no tamanho de 4,0cm devido aos dados pouco precisos contidos nos prontuários, alguns sem referências de medidas lineares exatas. Parte dos exames de imagem realizados nesta instituição também não estava disponível no sistema de dados hospitalares não sendo possível revê-los, o que também prejudicou a obtenção destas informações. O número pequeno de casos também não permitiu a realização das análises uni e multivariadas

A pesquisa de óbito realizada de maneira indireta em 02 casos (casos 7 e 12) também é um dado de confiabilidade duvidosa, pois se refere somente à data do óbito e não à sua causa. Porém, assumimos que todos morreram pela doença, uma vez que, de acordo com STUPP et al. (2007), todos os pacientes com gliomas infiltrativos terão recorrência e morrerão pela progressão da doença, direta ou indiretamente. O tempo médio de sobrevida e acompanhamento foi de 4,5 anos, sendo próximo ao

valor superior esperado (DAUMAS-DUPORT et al. 1988), mesmo com alguns pacientes com seguimento menor de 3 anos (casos 4, 5 e 10).

De acordo com BRAT et al. (2004), alguns fatores pré-analíticos como tempo e tipo de processamento histológico, tempo de fixação em formalina e a qualidade da formalina utilizada não foram controlados em todos os nossos casos estudados, podendo estes fatores terem contribuídos para a presença dos casos não avaliáveis. No nosso estudo, optamos pela utilização dos cortes histológicos inteiros e não pelas análises em *tissue microarray* devido à heterogeneidade tumoral (BURGER et al. 2002, 2007). A exclusão de gliomas mistos da nossa casuística também foi realizada em alguns estudos, como VAN DEN BENT et al. (2009) e NUÑO et al. (2013) e é justificada pela dificuldade de concordância diagnóstica morfológica desta entidade entre os neuropatologistas. Além disso, a existência desta entidade nosológica atualmente é questionável (SAHM et al. 2014; SAHM e VON DEIMLING 2015).

Dentre as variáveis histológicas utilizadas, o valor do índice mitótico estabelecido foi arbitrário, pois não há critérios definitivos sobre o número mínimo de figuras de mitose presentes (KLEIHUES et al. 2007). Os demais critérios, embora apresentassem subjetividade de interpretação, foram consensuais entre os dois patologistas.

Alguns termos utilizados neste estudo como recidiva e ressecção radical são questionáveis, pois a retirada completa de gliomas infiltrativos não é esperada (GUTHRIE e LAWS 1990), já que mais de 95% dos casos apresentam células neoplásicas a 2,0 ou 3,0 cm além da cavidade cirúrgica (BURGER et al. 1983; GASPAR et al. 1992). Apesar de alguns autores utilizarem a denominação total e

subtotal (SMITH et al. 2001), acreditamos que estes termos também não refletem a extensão ou intenção do procedimento cirúrgico.

Neste estudo, todas as neoplasias eram de localização encefálica, principalmente na região supratentorial e frontotemporal cerebral de pacientes com 40 - 50 anos de idade, semelhante às casuísticas utilizadas em outros estudos (LARJAVAARA et al. 2007; KLEIHUES et al. 2007). A maior parte dos gliomas infiltrativos acomete os lobos frontais (cerca de 40%), temporais (cerca de 30%), parietais (cerca de 20%) e occipitais (cerca de 10%), respectivamente, com preferência pelo lado direito (1,2: 1) independentemente do grau histológico (LARJAVAARA et al. 2007). O acometimento de porções mais profundas do cérebro, região periventricular, tronco encefálico e cerebelo são raros (LARJAVAARA et al. 2007). Neste estudo, parte das informações referentes à localização e à dimensão foi prejudicada devido à falta de informações dos exames de imagem, mas, nos nossos dados obtidos também observamos preferência nas localizações fronto-temporais cerebrais.

Os pacientes portadores de AAs tem taxas de sobrevida global influenciadas pelo tipo de tratamento realizado (BURGER et al. 2007; SHONKA et al. 2013; BARKER et al. 2014). A extensão da ressecção cirúrgica, em nosso estudo, apresentou associação com prognóstico dos pacientes, em concordância com dados prévios de literatura (NOMIYA et al. 2007; NUÑO et al. 2013).

Localização e dimensão tumores não são fatores prognósticos isolados, mas se correlacionam com ressecabilidade da lesão, sendo este o principal fator relacionado com as taxas de sobrevida global dos pacientes (STUPP et al. 2007; LARJAVAARA et al. 2007; NOMIYA et al. 2007). Tumores pequenos e periféricos,

em áreas acessíveis e passíveis de excisão radical apresentam melhor evolução clínica do que os pacientes com tumores maiores, localizados centralmente e irressecáveis (STUPP et al. 2007). Desta forma, lesões localizadas nos lobos frontal e parietal podem estar associadas a melhores taxas de sobrevida do que aqueles localizados nas demais regiões cerebrais (NOMIYA et al. 2007).

Além da ressecabilidade, as taxas de sobrevida global são influenciadas pela idade, independentemente do gênero dos pacientes (STUPP et al. 2007; NUÑO et al. 2013). Neste estudo, a média e a mediana de idade dos pacientes estudados foi de 40 anos, condizente com a literatura (KLEIHUES et al. 2007). Para os cálculos das taxas de sobrevida, categorizamos nossa amostra de acordo com a idade em 2 grupos (abaixo e acima de 40 anos), não observando significância estatística. Nossos resultados foram discordantes de SMITH et al. (2001), que usou uma categoria diferente no seu estudo, sendo os pacientes divididos em grupos abaixo ou acima de 50 e 60 anos.

Neste estudo, a terapia pós-operatória dos pacientes foi homogênea, com poucas modificações do protocolo estabelecido pelo departamento de oncologia clínica e radioterapia da instituição. Conforme esperado (NUÑO et al. 2013), a associação de RT e QT adjuvantes tiveram impacto positivo na sobrevida dos pacientes estudados. Entretanto, não foi possível avaliar o papel de cada modalidade isolada devido ao pequeno número de casos nestes grupos. Relata-se que a radioterapia, isoladamente, pode aumentar as taxas de sobrevida global em 7 a 14 meses, independentemente da extensão da ressecção cirúrgica (NUÑO et al. 2013; BAEHRING e MARKE 2012; BARKER et al. 2014). Entretanto, não há evidências conclusivas de benefícios com a quimioterapia isolada no tratamento dos AAs

(SMITH e JENKINS 2000). De acordo com nossos achados, as características clínicas e demográficas não estão associadas às alterações genéticas e, portanto, não substituem os testes moleculares complementares (HAGEN e TORP 2012).

Dentre os marcadores moleculares pesquisados na tentativa de determinar o comportamento biológico dos AAs, os achados mais interessantes foram os obtidos com EGFR, IDH1 e 19q.

Não observamos casos com codeleção 1p e 19q em nossa amostra. Sua presença não é descrita exclusivamente em oligodendrogliomas, mas também em astrocitomas, principalmente de alto grau (SMITH e JENKINS 2000; VOGAZIANOU et al. 2010). BRAT et al. (2004), utilizando o mesmo método e critérios para definição de deleção que nosso estudo, detectou codeleção 1p/19q em 17% dos astrocitomas, sendo apenas dois casos anaplásicos. Achados semelhantes foram obtidos por SMITH et al. (1999), onde a perda combinada 1p/19q foi encontrada em 11% dos astrocitomas de todos os graus. Entretanto, diferentemente do impacto prognóstico e preditivo favorável para os oligodendrogliomas (BRAT et al. 2004), a identificação da codeleção pode ser representativa de instabilidade cromossômica, comum em astrocitomas de alto grau, onde há perdas e/ou ganhos de outros cromossomos e pior prognóstico (SMITH e JENKINS 2000).

A maioria dos estudos relata a deleção isolada de 19q mais frequentemente do que a perda isolada de 1p em astrocitomas, considerando todos os graus (SMITH e JENKINS 2000, VOGAZIANOU et al. 2010). Baseado nisto, especula-se que a perda de 19q possa predispor à perda de 1p, mas não o inverso, principalmente nos casos com perda do braço cromossômico inteiro (SMITH e JENKINS 2000; VOGAZIANOU et al. 2010). O impacto dessas alterações isoladas é controverso.

Em alguns estudos, a perda isolada de 19q ou 1p não teve impacto estatisticamente significativo nas taxas de sobrevividas globais em qualquer grau ou tipo de gliomas, mas sugere que a perda de 1p possa ter associação com pior prognóstico e a perda de 19q com melhor prognóstico (SMITH e JENKINS 2000; BRAT et al. 2004), principalmente para glioblastomas (VOGAZIANOU et al. 2010). Entretanto, nestes estudos (SMITH e JENKINS 2000; BRAT et al. 2004), não foram realizadas técnicas complementares (como *comparative genomic hybridization array (CGH array)*) para avaliação da extensão da perda do braço (parcial ou total), o que torna a informação limitada. Estes também incluíram casos de pacientes da faixa etária pediátrica (SMITH e JENKINS 2000) ou apenas pacientes adultos abaixo de 60 anos (BRAT et al. 2004). A confirmação da perda total não é possível pela técnica de FISH (VOGAZIANOU et al. 2010). As sondas utilizadas identificam as regiões de perda mais comuns, mesmo em astrocitomas. Apesar dessas limitações, o FISH ainda é uma técnica de boa sensibilidade (detecta deleções presentes em pequena quantidade de células), é mais barato e necessita de amostras menos puras do que as técnicas mais sofisticadas (SMITH e JENKINS 2000).

Preconiza-se que os astrocitomas raramente apresentam perdas totais de 1p e 19q, mais sim ganhos ou perdas menores ao redor de 1p36 e/ou 19q13 (ICHIMURA et al. 2008, VOGAZIANOU et al. 2010), em várias combinações possíveis (SMITH e JENKINS 2000). Deleções intersticiais envolvendo 1p36 são praticamente específicas de astrocitomas (VOGAZIANOU et al. 2010).

A perda total de 1p foi associada à taxa de sobrevivida significativamente maior do que as perdas não-totais (ICHIMURA et al. 2008) e o estudo mais recente de VOGAZIANOU et al. (2010) aponta que outras combinações que não a codeleção

total de 1p e 19q estão associadas com pior sobrevida. Seus achados obtidos por hibridização foram corroborados com dados de *CGH array* e pesquisa de perda de heterozigosidade. Desta forma, interpretamos que a perda identificada pelo FISH não necessariamente é de todo o braço cromossômico o que pode explicar as divergências de achados. Além disso, as dificuldades de interpretação histológica e a variabilidade interobservador dificultam a correlação molecular-morfológica e podem contribuir para as discrepâncias de resultados (VAN DEN BENT et al. 2009). Os critérios utilizados para identificação da deleção pelo FISH também podem variar. A maior parte dos estudos preconiza a contagem de 100 núcleos de células neoplásicas (BRAT et al. 2004; VOGAZIANOU et al. 2010), mas contar entre 100 e 200 (WOEHRER et al. 2011) ou até 300 (SMITH e JENKINS 2000) pode ser considerado. No estudo de SMITH e JENKINS (2000), a definição de perda de 19q foi a razão  $19q/19p < 0,9$  e perda de 1p foi a razão  $1p/1q < 0,85$ . Esses dados foram obtidos após padronização interna, estabelecendo limiares com tecidos não-neoplásicos no próprio serviço e definindo os valores aceitáveis não-tumorais. Contudo, apesar das diferenças, os valores limites entre os pesquisadores são sempre próximos (por volta de razão  $< 0,8$  para deleções e razão  $> 1,2$  para ganhos). Dessa forma, optamos por não padronizar em tecidos normais e utilizar dados de outros trabalhos, escolhendo o valor mais restritivo encontrado na literatura, em SNUDERL et al. (2009). O uso simples da razão ajuda a caracterizar um desbalanço, mas não permite saber se houve perda um braço ou ganho de outro. Baseado nisto, neste estudo, utilizamos como limite o valor médio de sinais/núcleo acima de 2,4 para ganhos e abaixo de 1,4 para perdas.

O ganho de 19q é pouco comum e pouco discutido em gliomas, não sendo relatado em nenhum caso de VOGAZIANOU et al. (2010) e em apenas 8 neoplasias (5%) do estudo de SMITH e JENKINS (2000). Porém, este achado foi comumente observado em nossa casuística, principalmente no grupo de neoplasias primárias, e sugerindo correlação com pior prognóstico. Dados semelhantes foram encontrados por SNUDELL et al. (2009) em oligodendrogliomas anaplásicos (grau III). O gene CCNE1, responsável pela transcrição de ciclina E, localizado em 19q12, pode estar envolvido nesta maior agressividade biológica (VOGAZIANOU et al. 2010). A hiperexpressão de ciclina E por imuno-histoquímica em astrocitomas é descrita por TAMIYA et al. (2001), com positividade em maior número de células neoplásicas conforme o aumento do grau tumoral. A ciclina E é uma molécula envolvida no ciclo celular, expressa na fase G1 tardia e que inicia a síntese de DNA a partir da quinase dependente de ciclina-2 (CDK2). Quando anormalmente hiperexpressa, pode ativar a progressão do ciclo celular, fenômeno já descrito em várias neoplasias malignas (GURZOV e IZQUIERDO 2006). Desta forma, é possível que a maior ou menor agressividade biológica conferida por 19q esteja relacionada à hiperexpressão ou redução de expressão de ciclina E. As alterações numéricas diversas também podem representar instabilidade cromossômica.

A amplificação de EGFR é descrita em cerca de 10-20% dos AA (SMITH et al. 2001; PUPUTTI et al. 2006; KLEIHUES et al. 2007; HAGEN e TORP 2012). É um potente oncogene quando ativado permanentemente em diversas neoplasias, inclusive gliomas (MITSUDOMI e YATABE 2010). Dentre estes, a amplificação é descrita mais nas neoplasias de alto grau, em ordem crescente (grau II: 0-4%, grau III: 0-33% e grau IV: 34-64%) (HAGEN e TORP 2012). Nossa casuística identificou

30% dos casos com esta alteração (HAGEN e TORP 2012). HAGEN e TORP (2012) apresentam em sua revisão a dificuldade de comparação entre os estudos dado o uso de metodologias e parâmetros diversos para a definição de hiperexpressão e amplificação, as variações no clone utilizado e a heterogeneidade tumoral. Por exemplo, PUPUTTI et al. (2006) utilizou como critério apenas a quantidade de células positivas, sem avaliar intensidade ou compartimento celular marcado. A maior parte dos estudos utiliza clones que identificam o domínio extracelular da molécula, que é mais vulnerável à fixação. SMITH et al. (2001) utilizou a média EGFR/CEP7 acima de 1,2 ou mais de 10% das células com mais de 3 sinais de genes de EGFR, sem menção do mínimo de células avaliadas. Esses limiares, se aplicados em nossa casuística, classificariam todas as neoplasias como amplificadas. Baseado nisso, preferimos também utilizar os critérios para HER2 devido à similaridade morfofuncional entre as duas moléculas (JOHNSTON et al. 2006; SESHACHARYULU et al. 2012). Por exemplo, a mesma heterogeneidade descrita para o gene HER2 ao exame imuno-histoquímico e de FISH (WOLFF et al. 2013) também foi observada para o EGFR em nossos casos. A marcação de membrana também foi a única com significado biológico, com impacto nas taxas de sobrevida global.

Alguns estudos relatam que a amplificação pode estar associada a pior prognóstico em pacientes abaixo de 60 anos e melhor prognóstico em paciente acima de 60 anos (SMITH et al. 2001), porém com comprovação controversa (HAGEN e TORP 2012). Conforme citado previamente, os critérios utilizados por SMITH et al. (2001) para definição de amplificação são questionáveis e não permitiram significância estatística com seus achados. PUPUTTI et al. (2006) associa a

amplificação de EGFR com pacientes acima de 60 anos, mas observamos em pacientes abaixo desta faixa (casos 8, 14 e 16).

Em nosso estudo, os casos definidos como amplificados apresentaram evolução clínica desfavorável, semelhante a um glioblastoma (sobrevida de, no máximo, 40 meses), em concordância com pesquisas similares (JÄRVELÄ et al. 2006; HAGEN e TORP 2012). PUPUTTI et al. (2006), entretanto, utilizando os mesmos critérios para definição de amplificação, não encontrou associação com sobrevida em AAs. Apesar disso, baseado em nossos achados, acreditamos que os casos amplificados para EGFR representem gliomas altamente agressivos, melhor interpretados como glioblastomas sem critérios radiológicos e histológicos para seu diagnóstico. Como todos foram gliomas IDH1-negativos e sem história de baixo grau prévio, estes são compatíveis com a via de tumorigênese dos glioblastomas primários.

A hiperexpressão de EGFR por imuno-histoquímica, por si só, é comumente associada com pior prognóstico (HAGEN e TORP 2012). Há relatos de casos em que a hiperexpressão não está relacionada à amplificação do gene (COULIBALY et al. 2010; HAGEN e TORP 2012), porém em estudos onde a avaliação imuno-histoquímica realizada foi distinta e de difícil comparação com nossa proposição de escores. Essa dissociação entre os achados de amplificação-hiperexpressão questionam se não há outras formas independentes da amplificação ou formas distintas de interpretação de hiperexpressão. Em nosso estudo, a associação entre os 2 achados foi concordante. Observamos também que a marcação de membrana, por si só, já teve impacto nas taxas de sobrevida global. Contudo, a associação com a avaliação da intensidade e a extensão da marcação refinou os achados. Observamos

também que as células imunopositivas para EGFR apresentavam citoplasma mais amplo e conformação menos ramificada e mais epitelióide. A transdiferenciação é um fenômeno já reconhecido em glioblastomas (KLEIHUES et al. 2007) e a positividade para EGFR pode representar um perfil de expressão gênica mais epitelial pela célula neoplásica. Ao mesmo tempo, astrócitos reativos também expressam EGFR após lesão cerebral, porém em intensidade inferior quando comparado às células neoplásicas (HAGEN e TORP 2012). Desta forma, a ativação de EGFR parece ser uma importante via proliferativa utilizada pela astroglia. A redução dos prolongamentos celulares observada no exame imuno-histoquímico pode refletir um astrócito em estado mais ativado, gemistocítico e/ou menos diferenciado.

Todos os casos de nossa casuística apresentaram imunopositividade para EGFR muito superior (pelo menos 70% das células) ao limiar utilizado de 10%. Consequentemente, não foi possível testar casos com quantidades intermediárias (entre 10 e 70%) de células marcadas. Apenas 1 caso (caso 3) foi classificado como escore 2+, mas não foi avaliável pelo FISH. Como estas situações compõem uma zona cinzenta de interpretação, recomendamos a realização de FISH após a imuno-histoquímica. Apesar dessas ressalvas, de acordo com nossos dados, o escore é clinicamente útil na identificação de casos amplificados. Estudos com gliomas *in vivo* e *in vitro* mostraram eficácia terapêutica com o uso de inibidores do tipo anticorpos monoclonais (cetuximab) em casos com hiperexpressão protéica e/ou amplificação gênica do EGFR (ELLER et al. 2005; COMBS et al. 2007).

A variante III do EGFR, forma mutada constitutivamente ativada descrita apenas em astrócitos neoplásicos – principalmente em astrocitomas de alto grau com

amplificação, apresenta descrição de associação com pior prognóstico em AAs (ALDAPE et al. 2004), mas não foi avaliada por este estudo.

A imunomarcção positiva para IDH1 (R132H) apresentou associao com maior sobrevida global e foi mais comumente observada em neoplasias recidivadas provenientes de astrocitomas difusos, conforme descrito na literatura. Seu papel prognóstico jรก é bem estabelecido na literatura e jรก é recomendada sua pesquisa em *guidelines* de especialistas (SANSON et al. 2009; LOUIS et al. 2014; APPIN e BRAT 2015). Assume-se que seu impacto positivo na sobrevida é devido ao aumento de produo de 2-hidroxiglutarato, que competitivamente inibe enzimas dependentes de alfa-cetoglutarato (como histona-metiltransferases e 5-metilcitosina hidroxilases) e parece interferir na adequada metilao de histonas e na regulao da expresso de genes no núcleo, sendo assim considerado um oncometab lito. Outros efeitos *downstream* no metabolismo incluem reduo de NADPH celular e alfa-cetoglutarato e, possivelmente, manuteno dos níveis de HIF-1-alfa mesmo na presença de aporte suficiente de oxig nio, predispondo a célula   leso pela hiperproduo de radicais livres (XU et al. 2011; BORODOVSKY et al. 2012; LU et al. 2012; GUPTA et al. 2013).

A porcentagem de casos IDH1-mutados em AAs varia entre 54 e 92,9% (ICHIMURA et al. 2009; HARTMANN et al. 2010; THOTA et al. 2012). O clone do anticorpo analisado (H09) para pesquisa de IDH1 detecta a proteína an mala sintetizada pela mutao mais frequente (p.R132H), com sensibilidade e especificidade acima de 90% (TAKANO et al. 2012). Não hรก relatos sobre casos falsos-negativos, mas sim de reao cruzada com outras formas de mutao da proteína (p.R132L) (6%) ou falsos-positivos (6%) (AGARWAL et al. 2013).

Entretanto, via de regra, a presença de outras mutações não pode ser identificada através deste método (AGARWAL et al. 2013). Assim, os casos IDH1-negativos ainda assim podem ser casos IDH1-mutados. Desse modo, não é possível assumir que todos os casos IDH1-imunonegativos não sejam provenientes de um astrocitoma de mais baixo grau, como nos casos 9, 13 e 19. Os AAs IDH1-positivos dentre os casos categorizados como primários podem ser falsos-positivos ou representar gliomas secundários erroneamente classificados pelas dificuldades anteriormente mencionadas, mas que não representaram uma grande parcela dos casos (3 casos: 1, 2 e 10). Concluímos, portanto, que a confirmação através das técnicas de sequenciamento é indicada nos casos negativos à imuno-histoquímica. Os casos EGFR-amplificados foram todos IDH1-negativos, e, baseando-se na tumorigênese proposta atualmente (APPIN e BRAT 2015), devem realmente representar gliomas IDH1-selvagem. Assim, a pesquisa da hiperexpressão e amplificação de EGFR pode representar uma alternativa para serviços que não disponham de tecnologia de sequenciamento nos casos imunonegativos para IDH1-mutado.

A positividade imuno-histoquímica para MGMT não apresentou poder prognóstico e foi identificada em praticamente todos os casos estudados. Em geral, os estudos reforçam que não há associação entre achados imuno-histoquímicos e status de metilação do promotor de MGMT, sobrevida e resposta a tratamento, inclusive em gliomas de alto grau (MELGUIZO et al. 2012). Entretanto, há dados recentes controversos. PIZZO (2013) relata a perda progressiva de expressão imuno-histoquímica de MGMT conforme o grau histológico, com apenas 2 casos (11,7%) de AA. OGURA et al. (2015) identificaram a imunopositividade de MGMT acima de 30% como associada a maiores taxas de sobrevida. Esta discrepância pode ser devido

a fatores pré-analíticos como fixação, clone utilizado, diluição e/ou método de revelação. A interpretação também fica dificultada devido à marcação indistinta de células não-neoplásicas. Dessa forma, a diversidade de variáveis envolvidas dificulta a padronização, ajuda a explicar a heterogeneidade de alguns resultados e contra-indica a imuno-histoquímica para este fim. Acreditamos que esta forma de detecção da proteína não reproduz sua funcionalidade e casos parcialmente silenciados, mesmo com níveis mais baixos da proteína, podem gerar marcação pela melhoria dos meios de revelação com polímeros. Também não é possível afastar reação cruzada com outras proteínas de estrutura similar. Concluimos, assim, que a pesquisa do silenciamento gênico por avaliação de metilação do promotor por meio do sequenciamento é a metodologia mais indicada. A maior parte dos casos encontra-se associada a IDH1-mutado, mas não em todos os casos (MOLENAAR et al. 2014; OGURA et al. 2015).

Nosso estudo não identificou marcação imuno-histoquímica para INA. TAKANO et al. (2012) relata positividade em mais de 60% de astrocitomas difusos e anaplásicos. DUCRAY et al. (2009) e SUH et al. (2013) relatam que a imunomarcação, quando acima de 10% das células neoplásicas, é detectada em no máximo 20% dos astrocitomas, considerando todos os graus. Desta forma, como TAKANO et al. (2012) não considerou a extensão da marcação, em conjunto com nossos achados, acreditamos que a negatividade ou a marcação de no máximo 10% das células neoplásicas corrobore o diagnóstico de astrocitoma em um contexto morfológico apropriado. Não foi possível confirmar a associação entre imunomarcação para INA e melhor prognóstico (DURAND et al. 2011; MOKHTARI et al. 2011; TAKANO et al. 2012).

Desta forma, uma vez confirmado o diagnóstico de astrocitoma anaplásico histologicamente, sugere-se a realização da pesquisa do estatus do EGFR, IDH1 e de 19q, principalmente na ausência de exames de imagem para glioblastomas, sem antecedente clínico de ressecções prévias e negativo para IDH1-mutado à imunohistoquímica.

## 6 CONCLUSÕES

- 1 A amplificação gênica de EGFR é encontrada em 30% dos astrocitomas anaplásicos primários, tendo esses casos expressão proteica imuno-histoquímica intensa e de padrão membrana;
- 2 Os astrocitomas anaplásicos não apresentam codeleção 1p/19q e não expressam INA por imuno-histoquímica. O ganho de 1p é mais comum em astrocitomas anaplásicos recidivados.
- 3 A expressão proteica citoplasmática de IDH1 (R132H) é encontrada em 50% das lesões, sendo principalmente observada em lesões recidivadas;
- 4 A expressão proteica nuclear de MGMT é sempre presente em astrocitomas anaplásicos, com raras exceções;
- 5 Não houve associação estatística significativa entre todos os dados clínicos e demográficos com os marcadores moleculares pesquisados;
- 6 O estatus de EGFR, IDH1 e 19q, tipo de cirurgia e de tratamento adjuvante podem ser fatores prognósticos em AAs.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agarwal S, Sharma MC, Jha P, et al. Comparative study of IDH1 mutations in gliomas by immunohistochemistry and DNA sequencing. **Neuro Oncol** 2013; 15:718-26.

Aldape KD, Ballman K, Furth A, et al. Immunohistochemical detection of EGFRvIII in high malignancy grade astrocytomas and evaluation of prognostic significance. **J Neuropathol Exp Neurol** 2004; 63:700-7.

Appin CL, Brat DJ. Molecular pathways in gliomagenesis and their relevance to neuropathologic diagnosis. **Adv Anat Pathol** 2015; 22:50-8.

Asiaf A, Ahmad ST, Malik AA, et al. Protein expression and methylation of MGMT, a DNA repair gene and their correlation with clinicopathological parameters in invasive ductal carcinoma of the breast. **Tumour Biol** 2015 Mar 29. [Epub ahead of print]

Baehring JM, Marks PW. Treatment-related myelodysplasia in patients with primary brain tumors. **Neuro Oncol** 2012; 14:529-40.

Barker CA, Chang M, Beal K, Chan TA. Survival of patients treated with radiation therapy for anaplastic astrocytoma. **Radiol Oncol** 2014; 48:381-6.

Behin A, Hoang-Xuan K, Carpentier AF, Delattre JY. Primary brain tumours in adults. **Lancet** 2003; 361:323-31.

Borodovsky A, Seltzer MJ, Riggins GJ. Altered cancer cell metabolism in gliomas with mutant IDH1 or IDH2. **Curr Opin Oncol** 2012; 24:83-9.

Brat DJ, Seiferheld WF, Perry A, et al. Analysis of 1p 19q, 9p, and 10q as prognostic markers for high-grade astrocytomas using fluorescence *in situ* hybridization on tissue microarrays from Radiation Therapy Oncology Group trials. **Neuro Oncol** 2004; 6:96-103.

Burger PC, Dubois PJ, Schold SC, et al. Computerized tomographic and pathologic studies of the untreated, quiescent, and recurrent glioblastoma multiforme. **J Neurosurg** 1983; 58:159-69.

Burger PC, Scheithauer BW, Vogel FX. **Surgical pathology of the nervous system and its coverings**. 4<sup>th</sup> ed. New York: Churchill Livingstone; 2002. Brain: tumors; p.177-98.

Burger PC, Scheithauer BW. Tumor of neuroglia and choroid plexus. In: Silverbertg SG, Sobin LH, editors. **AFIP atlas of tumor pathology**. Washington: ARP Press; 2007. p.50-77.

[CBTRUS] Central Brain Tumor Registry of the United States Statistical report. **Primary brain tumors diagnosed in the United States in 2004-2008**. 2012. Available from: <URL:[http://www.cbtrus.org/2012-NPCR-SEER/CBTRUS\\_Report\\_2004-2008\\_3-23-2012.pdf](http://www.cbtrus.org/2012-NPCR-SEER/CBTRUS_Report_2004-2008_3-23-2012.pdf)> [2015 mar 4].

Compostella A, Tosoni A, Blatt V, Franceschi E, Brandes AA. Prognostic factors for anaplastic astrocytomas. **J Neurooncol** 2007; 81:295-303.

Combs SE, Schulz-Ertner D, Roth W, Herold-Mende C, Debus J, Weber KJ. In vitro responsiveness of glioma cell lines to multimodality treatment with radiotherapy, temozolomide, and epidermal growth factor receptor inhibition with cetuximab. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2007; 68:873-82.

Coons SW, Johnson PC, Scheithauer BW, Yates AJ, Pearl DK. Improving diagnostic accuracy and interobserver concordance in the classification and grading of primary gliomas. **Cancer** 1997; 79:1381-93.

Costa BM, Caeiro C, Guimarães I. Prognostic value of MGMT promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide-based chemoradiation: a Portuguese multicentre study. **Oncol Rep** 2010; 23:1655-62.

Coulibaly B, Nanni I, Quilichini B, et al. Epidermal growth factor receptor in glioblastomas: correlation between gene copy number and protein expression. **Hum Pathol** 2010; 41:815-23.

Dang L, White DW, Gross S, et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. **Nature** 2010; 465:966.

Daumas-Duport C, Scheithauer B, O'Fallon J, Kelly P. Grading of astrocytomas: a simple and reproducible method. **Cancer** 1988; 62:2152-65.

Deangelis LM. Anaplastic glioma: how to prognosticate outcome and choose a treatment strategy. **J Clin Oncol** 2009; 27:5861-2.

Dey M, Lin Y, Melkonian S, Lam S. Prognostic factors and survival in primary adult high grade brainstem astrocytoma: a population based study from 1973-2008. **J Clin Neurosci** 2014; 21:1298-303.

Ducray F, Crinière E, Idhah A, et al. Alpha-Internexin expression identifies 1p19q codeleted gliomas. **Neurology** 2009; 72:156-61.

Durand K, Guillaudeau A, Pommepuy I, et al. Alpha-internexin expression in gliomas: relationship with histological type and 1p 19q 10p and 10q status. **J Clin Pathol** 2011; 64:793-801.

Eller JL, Longo SL, Kyle MM, Bassano D, Hicklin DJ, Canute GW. Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody cetuximab augments radiation effects in glioblastoma multiforme in vitro and in vivo. **Neurosurgery** 2005; 56:155-62.

Fallon KB, Palmer CA, Roth KA, et al. Prognostic value of 1p 19q, 9p 10q, and EGFR-FISH analyses in recurrent oligodendrogliomas. **J Neuropathol Exp Neurol** 2004; 63:314-22.

Ferrer-Luna R, Mata M, Núñez L, et al. Loss of heterozygosity at 1p-19q induces a global change in oligodendroglial tumor gene expression. **J Neurooncol** 2009; 95:343-54.

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.

Huse JT, Holland EC. Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. **Nat Rev Cancer** 2010; 10:319-31.

Gaspar LE, Fisher BJ, MacDonald DR, et al. Supratentorial malignant glioma: Patterns of recurrence and implications for external beam local treatment. **Int J Radiat Oncol** 1992; 24:55-7.

Gresner SM, Rieske P, Wozniak K, et al. Gliomas: association of histology and molecular genetic analysis of chromosomes 1p 10q, and 19q. **Acta Neurobiol Exp (Wars)** 2007; 67:103-12.

Guthrie BL, Laws ER Jr. Supratentorial low-grade gliomas. **Neurosurg Clin N Am** 1990; 1:37-48.

Gupta R, Flanagan S, Li CC, et al. Expanding the spectrum of IDH1 mutations in gliomas. **Mod Pathol** 2013; 26:619-25.

Gurzov EN, Izquierdo M. Cyclin E1 knockdown induces apoptosis in cancer cells. **Neurol Res** 2006; 28:493-9.

Hagen KW, Torp SH. Prognostic significance of EGFR gene amplification and overexpression in diffuse astrocytomas-a literature study. **Open J Pathol** 2012; 2:71-80.

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.

Ichimura K, Vogazianou AP, Liu L, et al. 1p36 is a preferential target of chromosome 1 deletions in astrocytic tumours and homozygously deleted in a subset of glioblastomas. **Oncogene** 2008; 27:2097-108.

Ichimura K, Pearson DM, Kocialkowski S, et al. IDH1 mutations are present in the majority of common adult gliomas but rare in primary glioblastomas. **Neuro Oncol** 2009; 11:341-7.

Ino Y, Zlatescu MC, Sasaki H, et al. Long survival and therapeutic responses in patients with histologically disparate high-grade gliomas demonstrating chromosome 1p loss. **J Neurosurg** 2000; 92:983-90.

Järvelä S, Helin H, Haapasalo J, et al. Amplification of the epidermal growth factor receptor in astrocytic tumours by chromogenic *in situ* hybridization: association with clinicopathological features and patient survival. **Neuropathol Appl Neurobiol** 2006; 32:441-50. Erratum in: **Neuropathol Appl Neurobiol** 2006; 32:568.

Jiang M, Dong X, Li J, Li J, Qi J. [IDH1 mutation and MGMT expression in astrocytoma and the relationship with prognosis after radiotherapy] [abstract]. **Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi** 2014; 43:668-72.

Johnston JB, Navaratnam S, Pitz MW, et al. Targeting the EGFR pathway for cancer therapy. **Curr Med Chem** 2006; 13:3483-92.

Kleihues P, Burger PC, Rosenblum Mk, Paulus W, Scheitauer BW. **WHO Classification of tumours of the central nervous system**. 4<sup>th</sup> ed. Lyon: IARC; 2007. Anaplastic astrocytoma; p.30-2. (WHO Classification of Tumours, v. 1, IARC WHO Classification of Tumours, n° 1)

Larjavaara S, Mäntylä R, Salminen T, et al. Incidence of gliomas by anatomic location. **Neuro Oncol** 2007; 9:319-25.

Liu L, Bäcklund LM, Nilsson BR, et al. Clinical significance of EGFR amplification and the aberrant EGFRvIII transcript in conventionally treated astrocytic gliomas. **J Mol Med (Berl)** 2005; 83:917-26.

Louis DN, Perry A, Burger P, et al. International Society of Neuropathology-Haarlem consensus guidelines for nervous system tumor classification and grading. **Brain Pathol** 2014; 24:429-35.

Lu C, Ward PS, Kapoor GS, et al. IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. **Nature** 2012; 483:474-8.

Melguizo C, Prados J, González B, et al. MGMT promoter methylation status and MGMT and CD133 immunohistochemical expression as prognostic markers in glioblastoma patients treated with temozolomide plus radiotherapy. **J Transl Med** 2012; 10:250.

Mischel PS, Shai R, Shi T, et al. Identification of molecular subtypes of glioblastoma by gene expression profiling. **Oncogene** 2003; 22:2361-73.

Mitsudomi T, Yatabe Y. Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer. **FEBS J** 2010; 277:301-8.

Mokhtari K, Ducray F, Kros JM, et al. Alpha-internexin expression predicts outcome in anaplastic oligodendroglial tumors and may positively impact the efficacy of chemotherapy: European organization for research and treatment of cancer trial 26951. **Cancer** 2011; 117:3014-26.

Nakamura M, Shimada K, Ishida E, et al. Molecular pathogenesis of pediatric astrocytic tumors. **Neuro Oncol** 2007; 9:113-23.

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** 2014; 16:1263-73.

Nomiya T, Nemoto K, Kumabe T, Takai Y, Yamada S. Prognostic significance of surgery and radiation therapy in cases of anaplastic astrocytoma: retrospective analysis of 170 cases. **J Neurosurg** 2007; 106:575-81.

Nuño M, Birch K, Mukherjee D, Sarmiento JM, Black KL, Patil CG. Survival and prognostic factors of anaplastic gliomas. **Neurosurgery** 2013; 73:458-65.

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 May 6.

Pizzo PH. **Determinação das principais alterações proteicas associadas à progressão das neoplasias gliais do sistema nervoso central**. São Paulo; 2013. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente]

Puputti M, Tynninen O, Sihto H, et al. Amplification of KIT, PDGFRA, VEGFR2, and EGFR in gliomas. **Mol Cancer Res** 2006; 4:927-34.

Rao RD, Scheithauer BW, Giannini C, et al. Prognostic significance of histologic subtyping in high grade astrocytoma: North Central Cancer Treatment Group (NCCTG) results. In: **Proceedings of the 38<sup>th</sup> ASCO Annual Meeting**; 2002 May 18-21; Orlando, FL.

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

Sahm F, Reuss D, Koelsche C, et al. Farewell to oligoastrocytoma: *in situ* molecular genetics favor classification as either oligodendroglioma or astrocytoma. **Acta Neuropathol** 2014; 128:551-9.

Sahm F, von Deimling A. Farewell to oligoastrocytoma: response to letters. **Acta Neuropathol** 2015; 129:155.

Sanghvi D. Post-treatment imaging of high-grade gliomas. **Indian J Radiol Imaging** 2015; 25:102-8.

Sanson M, Marie Y, Paris S, et al. Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas. **J Clin Oncol** 2009; 27:4150-4.

See SJ, Gilbert MR. Anaplastic astrocytoma: diagnosis, prognosis, and management. **Semin Oncol** 2004; 31:618-34.

Seshacharyulu P, Ponnusamy MP, Haridas D, Jain M, Ganti AK, Batra SK. Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy. **Expert Opin Ther Targets** 2012; 16:15-31.

Shonka NA, Theeler B, Cahill D, et al. Outcomes for patients with anaplastic astrocytoma treated with chemoradiation, radiation therapy alone or radiation therapy followed by chemotherapy: a retrospective review within the era of temozolomide. **J Neurooncol** 2013; 113:305-11.

Smith JS, Alderete B, Minn Y, et al. Localization of common deletion regions on 1p and 19q in human gliomas and their association with histological subtype. **Oncogene** 1999; 18:4144-52.

Smith JS, Jenkins RB. Genetic alterations in adult diffuse glioma: occurrence, significance, and prognostic implications. **Front Biosci** 2000; 5:D213-31.

Smith JS, Tachibana I, Passe SM, et al. PTEN mutation, EGFR amplification, and outcome in patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme. **J Natl Cancer Inst** 2001; 93:1246-56.

Snuderl M, Eichler AF, Ligon KL, et al. Polysomy for chromosomes 1 and 19 predicts earlier recurrence in anaplastic oligodendrogliomas with concurrent 1p/19q loss. **Clin Cancer Res** 2009; 15:6430-7.

Sonoda Y, Kumabe T, Nakamura T, et al. Analysis of IDH1 and IDH2 mutations in Japanese glioma patients. **Cancer Sci** 2009; 100:1996-8.

Stupp R, Mason WP, Van Den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. **N Engl J Med** 2005; 352:987-96.

Stupp R, Reni M, Gatta G, Mazza E, Vecht C. Anaplastic astrocytoma in adults. **Crit Rev Oncol Hematol** 2007; 63:72-80.

Suh JH, Park CK, Park SH. Alpha internexin expression related with molecular characteristics in adult glioblastoma and oligodendroglioma. **J Korean Med Sci** 2013; 28:593-601.

Takano S, Kato Y, Yamamoto T, et al. Immunohistochemical detection of IDH1 mutation, p53, and internexin as prognostic factors of glial tumors. **J Neurooncol** 2012; 108:361-73.

Tamiya T, Mizumatsu S, Ono Y, et al. High cyclin E/low p27Kip1 expression is associated with poor prognosis in astrocytomas. **Acta Neuropathol** 2001; 101:334-40.

Thota B, Shukla SK, Srividya MR, et al. IDH1 mutations in diffusely infiltrating astrocytomas: grade specificity, association with protein expression, and clinical relevance. **Am J Clin Pathol** 2012; 138:177-84.

Ushio Y, Tada K, Shiraishi S, et al. Correlation of molecular genetic analysis of p53, MDM2, p16, PTEN, and EGFR and survival of patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma. **Front Biosci** 2003; 8:281-8.

van den Bent MJ, Dubbink HJ, Sanson M, et al. MGMT promoter methylation is prognostic but not predictive for outcome to adjuvant PCV chemotherapy in anaplastic oligodendroglial tumors: a report from EORTC Brain Tumor Group Study 26951. **J Clin Oncol** 2009; 27:5881-6.

Vogazianou AP, Chan R, Bäcklund LM, et al. Distinct patterns of 1p and 19q alterations identify subtypes of human gliomas that have different prognoses. **Neuro Oncol** 2010; 12:664-78.

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.

Wick W, Hartmann C, Engel C, et al. NOA-04 randomized phase III trial of sequential radiochemotherapy of anaplastic glioma with procarbazine, lomustine, and vincristine or temozolomide. **J Clin Oncol** 2009; 27:5874-80.

Woehrer A, Sander P, Haberler C, et al. FISH-based detection of 1p 19q codeletion in oligodendroglial tumors: procedures and protocols for neuropathological practice - a publication under the auspices of the Research Committee of the European Confederation of Neuropathological Societies (Euro-CNS). **Clin Neuropathol** 2011; 30:47-55.

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 W, Yang H, Liu Y, et al. Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenases. **Cancer Cell** 2011;19:17-30

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

Zhao S, Lin Y, Xu W, et al. Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1alpha. **Science** 2009; 324:261-5.

**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, 16 de julho de 2013.

A

**Dra. Maria Dirlei de Souza Begnami.**

**Aluno: Luiz Guilherme Cernaglia Aureliano de Lima (Mestrado).**

**Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1780/13**

**“Avaliação gênica do isocitrato desidrogenase 1, alfa-internexina, fator de crescimento epidérmico e deleção 1p/19q como fator prognóstico em astrocitomas anaplásicos”.**

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 21/05/2013, **aprovaram** a realização do projeto do estudo em referência (datado de 2013) 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 Sobre o Uso e Destino do Material Biológico, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica do AC Camargo Cancer Center;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Oncologia Clínica do AC Camargo Cancer Center;
- Declaração de Infraestrutura e Instalações do Departamento de Anatomia Patológica do AC Camargo Cancer Center;
- Orçamento Financeiro Detalhado;

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

Atenciosamente,

**Dr. Antônio Hugo José Frões Marques Campos  
2º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa**

## Anexo 2 - Quadro Geral de Dados Coletados

ID CASO	Gênero	Idade	Tipo de material	Localização cerebral	Extensão da cirurgia	Tratamento	Recidiva	Tratamento da recidiva	Status final	Sobrevida global (dias)	IDH1	INA	MGMT
1	feminino	34	primário	fronto-parietal	parcial	temodal + 60Gy	não	não se aplica	morto	1250 (3,5 anos)	IDH1	negativo	negativo
2	masculino	37	primário	parieto-occipital	radical	temodal + 60Gy	não	não se aplica	vivo	2617 (7,3 anos)	IDH1	negativo	positivo
3	masculino	46	recidiva	frontal	radical	temodal + 61Gy	não	não se aplica	vivo	2314 (6,42 anos)	IDH1	negativo	positivo
4	masculino	70	primário	parietal	parcial	40Gy	não	não se aplica	vivo	247 (0,68 anos)	IDH1	negativo	positivo
5	masculino	62	primário	occipital	parcial	temodal + 60Gy	não	não se aplica	vivo	901 (2,5 anos)	IDH1	negativo	positivo
6	masculino	31	primário	frontal	radical	temodal + 60Gy	não	não se aplica	vivo	1636 (4,5 anos)	IDH1	negativo	positivo
7	masculino	43	recidiva	frontal	parcial	carmustin + 48Gy	não	não se aplica	morto	840 (2,3 anos)	IDH1	negativo	positivo
8	feminino	42	primário	frontal	radical	não	sim	temozolamida + 60Gy	morto	1026 (2,85 anos)	IDH1	negativo	positivo
9	masculino	24	recidiva	frontal	parcial	temozolamida	não	não se aplica	vivo	2426 (6,7 anos)	IDH1	negativo	positivo
10	feminino	41	primário	fronto-temporal	parcial	não informado	não	não se aplica	vivo	404 (1,12 anos)	IDH1	negativo	positivo
11	masculino	62	primário	temporo-occipital	parcial	temodal + 62Gy	não	não se aplica	morto	251 (0,69 anos)	IDH1	negativo	positivo
12	masculino	74	primário	fronto-temporal	parcial	temodal+ 60Gy	não	não se aplica	morto	1767 (4,9 anos)	IDH1	negativo	positivo
13	masculino	36	recidiva	mesencéfalo	parcial	54Gy	não	não se aplica	morto	724 (2 anos)	IDH1	negativo	positivo
14	feminino	52	primário	temporal	parcial	temodal + 60Gy	não	não se aplica	morto	555 (1,54 anos)	IDH1	negativo	positivo
15	feminino	47	recidiva	temporal	radical	temodal + 54Gy	não	não se aplica	vivo	1789 (5 anos)	IDH1	negativo	positivo
16	masculino	37	primário	temporal	parcial	54Gy	não	não se aplica	morto	122 (0,33 anos)	IDH1	negativo	positivo
17	feminino	40	recidiva	frontal	radical	temodal + 35Gy	sim	acompanhamento	vivo	1149 (3,19 anos)	IDH1	negativo	positivo
18	feminino	41	primário	fronto-temporal	radical	temodal + 60Gy	não	não se aplica	vivo	404 (1,12 anos)	IDH1	negativo	positivo
19	masculino	29	recidiva	fronto-parietal	parcial	temozolamida	não	não se aplica	vivo	1630 (4,5 anos)	IDH1	negativo	positivo
20	masculino	23	recidiva	temporal	parcial	temodal/bevacizumab + 59,4Gy	não	não se aplica	vivo	1269 (3,5 anos)	IDH1	negativo	positivo
21	masculino	26	primário	tálamo	parcial	nizotonumabe/temozolamida	não	não se aplica	morto	222 (0,61 anos)	IDH1	negativo	positivo
22	feminino	20	primário	tálamo	parcial	temodal + 54Gy	não	não se aplica	vivo	1365 (3,8 anos)	IDH1	negativo	positivo
23	feminino	47	recidiva	temporal	radical	temodal + 54Gy	não	não se aplica	vivo	1784 (4,9 anos)	IDH1	negativo	positivo

ID CASO	EGFR IHQ - escore	razão EGFR/CEP7	(EGFR) CEP - média	EGFR - média	conclusão EGFR FISH	razão 1p/1q	1p - média	1q - média	conclusão 1p - 1q	razão 19q/19p	19q - média	19p - média	conclusão 19p - 19q
1	0	1,13	2,16	2,45	não amplificado	1,24	2,39	1,93	normal	1,07	1,57	1,67	normal
2	0	1,1	2,96	3,28	não amplificado	0,97	2,28	2,35	normal	1,39	3,65	2,63	ganho de 19q e ganho (menor) de 19p
3	2+	1,35	1,2	1,63	não amplificado	1,33	1,95	1,47	normal	1,01	1,62	1,60	normal
4	0	não avaliável	não avaliável	não avaliável	não avaliável	1,94	1,65	0,85	perda de 1q	não avaliável	não avaliável	não avaliável	não avaliável
5	1+	não avaliável	não avaliável	não avaliável	não avaliável	não avaliável	não avaliável	não avaliável	não avaliável	1,46	1,22	0,84	perda (maior) de 19p e perda de 19q
6	0	0,88	2,2	1,94	não amplificado	1,82	3,53	1,94	ganho de 1p	1,31	3,75	2,86	relação normal - ganho de 19p e 19q
7	0	1,15	1,98	2,28	não amplificado	1,38	3,18	2,30	ganho de 1p	não avaliável	não avaliável	não avaliável	não avaliável
8	3+	20	1	20	alta amplificação	não avaliável	não avaliável	não avaliável	não avaliável	1,14	1,93	1,69	normal
9	0	não avaliável	não avaliável	não avaliável	não avaliável	1,31	2,38	2,12	normal	1,01	3,02	2,99	relação normal - ganho de 19p e 19q
10	0	não avaliável	não avaliável	não avaliável	não avaliável	não avaliável	não avaliável	não avaliável	não avaliável	não avaliável	não avaliável	não avaliável	não avaliável
11	3+	20	1	20	alta amplificação	não avaliável	não avaliável	não avaliável	não avaliável	não avaliável	não avaliável	não avaliável	não avaliável
12	0	1,21	1,98	2,41	não amplificado	1,67	2,1	1,26	perda de 1q	1,35	2,06	1,53	normal
13	0	0,97	3,89	3,79	não amplificado	1,83	3,16	1,73	ganho de 1p	1,87	2,48	1,33	ganho de 19q e perda de 19p
14	3+	6,77	1,47	9,94	alta amplificação	1,35	2,43	1,80	ganho de 1p	1,33	2,21	1,66	normal
15	0	não avaliável	não avaliável	não avaliável	não avaliável	2,48	3,23	1,30	ganho de 1p e deleção de 1q	1,17	1,92	1,64	normal
16	3+	20	1	20	alta amplificação	2,17	3	1,38	ganho de 1p e deleção de 1q	1,47	3,95	2,69	relação normal - ganho de 19p e ganho (menor) de 19q
17	0	1,12	3,15	3,52	não amplificado	1,65	3,28	1,99	ganho de 1p	0,76	2,39	3,16	ganho de 19p
18	0	1,11	3,1	3,44	não amplificado	não avaliável	não avaliável	não avaliável	não avaliável	não avaliável	não avaliável	não avaliável	não avaliável
19	1+	1,57	2,14	3,37	não amplificado	1,47	2,48	1,69	ganho de 1p	1,19	3,02	2,54	relação normal - ganho de 19p e 19q
20	0	1,27	2,19	2,8	não amplificado	1,45	3,32	2,29	ganho de 1p	0,68	2,7	3,97	ganho de 19p e ganho (menor) de 19q
21	0	não avaliável	não avaliável	não avaliável	não avaliável	1,4	1,88	1,34	deleção de 1q	1,23	2,2	1,79	normal
22	1+	1,76	2,21	3,88	não amplificado	não avaliável	não avaliável	não avaliável	não avaliável	1,02	1,22	1,20	relação normal - perda de 19p e 19q
23	0	1,48	2,25	3,35	não amplificado	1,3	1,9	1,46	normal	1,16	2,09	1,80	normal

### Anexo 3 - Protocolo de Exame Imuno-histoquímico

As lâminas foram identificadas com etiquetas de códigos de barras e processadas no equipamento Benchmark XT (Ventana) 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% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), seguido de lavagem em solução apropriada (Wash-buffer). Em seguida, os cortes foram incubados com anticorpo primário (IDH1 –clone H09, Dianova®; INA – clone 2E3, Novus Biologicals®; MGMT – clone MT3.1, Thermo Scientific ®; EGFR – clone 3C6, 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)). 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:

Informações importantes sobre o protocolo de cada marcador

<b>marcador</b>	<b>recuperação antigênica</b>	<b>tempo de incubação</b>	<b>método de revelação</b>
MGMT	40 minutos, EDTA, pH9,0	32min	DAB, com kit Optiview
IDH1	60 minutos, EDTA, pH9,0	32min	DAB, com kit Ultraview
EGFR	30 minutos, EDTA, pH9,0	32min	DAB, com kit Ultraview
INA	30 minutos, EDTA, pH9,0	30min	DAB, com kit Ultraview

#### Anexo 4 - Protocolo de Hibridização *in situ* Fluorescente

As lâminas foram identificadas e submetidas à desparafinização através de 3 banhos de 10 minutos em xilol, seguidos de 3 banhos de 5 minutos em álcool absoluto e 3 banhos de 2 minutos em água destilada. A seguir, foram submetidos a banho em solução 0.2N HCl por 20 minutos à temperatura ambiente, para depois, em banho-maria a 80°C e pH6,0 (tampão citrato), permanecerem por 1 hora. Seguiu-se com a digestão enzimática com pepsina por cerca de 8 minutos à temperatura ambiente, sendo o tempo variável de acordo com o tipo de tecido. Foi realizada lavagem em solução 2X SSC por 2 minutos à temperatura ambiente, com posterior desidratação com banhos de 2 minutos em alcoóis de concentrações progressivas (75% - 80% - 100%). As lâminas secaram ao ar e seguiu-se a aplicação da sonda de 10µl (1p/19q-Vysis ® e EGFR – Zytovision ®) (10µL), com aplicação de lamínula (22,0 x 22,0mm) e vedação com selante, seguido de incubação no hibridizador para denaturação e hibridização conforme orientação pelo fabricante, conforme abaixo. No dia seguinte, as lâminas saídas do hibridizador tiveram suas lamínulas retiradas e foram mergulhadas por 30 minutos em solução pré-aquecida de 1,5M UREA/0,1 x SSC em banho-maria a 45°C. As lâminas foram lavadas em 2xSSC por 2 minutos à temperatura ambiente, seguidas de desidratação com banhos de 2 minutos em alcoóis de concentrações progressivas (75% - 80% - 100%). As lâminas foram secas ao ar e seguiram a aplicação de 15µl de DAPI, para depois finalizar a montagem das lâminas com colocação de lamínula.

Informações importantes sobre o protocolo de cada marcador

marcador	denaturação	hibridização
EGFR	75°C por 10 minutos	37°C por 20 horas
1p	80°C por 5 minutos	37°C por 20 horas
19q	80°C por 5 minutos	37°C por 20 horas