

**AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE A
EXPRESSÃO DE RSK1 NO INFILTRADO
TUMORAL DO GLIOBLASTOMAS**

JUVANIER ROMÃO CRUZ

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação Interinstitucional em Oncologia da
Fundação Antônio Prudente em Parceria com a
Sociedade Pernambucana de Combate ao Câncer,
para obtenção do título de Mestre em Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientadora: Dra. Vilma Regina Martins

Co-Orientador: Dr. Martín Roffé

São Paulo

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Cruz, Juvanier Romão

Avaliação da relação entre a expressão de RSK1 no infiltrado tumoral do glioblastoma / Juvanier Romão Cruz - São Paulo, 2019.

59p.

Dissertação(Mestrado)-Programa de Pós-Graduação Interinstitucional em Oncologia da Fundação Antônio Prudente em parceria com o Hospital de Câncer de Pernambuco

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

Orientadora: Vilma Regina Martins

Descritores: 1. Glioblastoma/Glioblastoma. 2. Carcinogênese/Carcinogenesis. 3. Sistema Imunitário/Immune System 4. Sistema Nervoso Central/Central Nervous System. 5. Imuno-Histoquímica/Immunohistochemistry. 6. Estudos de Coortes/Cohort Studies

"Nós somos o que fazemos repetidamente, portanto, a primazia não é um feito, é um hábito"
Aristóteles

DEDICATÓRIA

*Dedico esta dissertação a minha mãe, **Dona Marieta (in memoriam)**, que me deixou no segundo ano do mestrado, deixando um grande vazio e um coração cheio de saudade.*

Foi e sempre será minha grande guerreira e inspiradora, exemplo de honestidade, perseverança, força, garra e constante busca pelo crescimento.

Seu maior desejo foi que seus filhos estudassem e não tivessem o mesmo destino que ela.

Teve coragem de se separar de mim aos sete anos de idade para que eu pudesse estudar, e foi assim que fui trilhando os caminhos da educação até a pós-graduação.

Meu muito obrigada minha mãe!

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por todas as oportunidades que me deu e pelos anjos que foi colocando ao longo do meu caminho, que me permitiram chegar até aqui e vivenciar todo aprendizado adquirido.

A minha orientadora **Dra Vilma**, pela dedicação, competência e por me permitir chegar até aqui.

Ao co-orientador **Dr Martín Roffé** pelo cuidado nas revisões e correções, foram muito importantes na melhoria deste trabalho.

Aos meus pais seu **José Cruz** e **Dona Marieta** que não mediram esforços para a nossa educação e aos meus irmãos, grandes guerreiros.

A minha avó **Dona Luiza** (*in memorian*) e minhas tias **Maria Luiza** e **Francy Cruz** (*in memorian*) por todo apoio que tive para estudar.

Ao meu esposo e maior incentivador, **Valnei Brito**, pelo apoio incondicional em todos os momentos de dificuldade. Seu bom humor e suas palavras de encorajamento foram essenciais nas horas em que pensei em desistir.

A **Dra. Leuridan Torres**, pelo apoio incondicional em todas as horas que precisei. Pela sua doação a pesquisa, ao ensino e a preocupação constante com o verdadeiro aprendizado do estudo. Juntas, enfrentamos muitas dificuldades. Meu muito obrigada.

A **Dra. Gláucia**, sua aluna **Fernanda Ferreira**, e **Mayarae**, pelo apoio no laboratório do CIPE – A.C.Camargo Center durante o período que estive em São Paulo. Seus ensinamentos e contribuições na realização da parte técnica da imunistoquímica foram muito importantes para a realização deste trabalho.

A **Italaney** e **Valéria**, pela colaboração na coleta dos blocos de parafina nos setores de patologia do Hospital do Câncer de Pernambuco - HCP e Hospital da Restauração - HR.

Ao **Dr. Igor** e **Dr Claudionor** pela parceria e colaboração com a coleta das amostras do Hospital da Restauração - HR.

Aos técnicos do setor de patologia do HCP e HR, **Cristina, Marciana e Vinícius** por toda ajuda que tive na separação dos blocos de parafina e confecção das lâminas.

Aos amigos que me acompanharam, ouviram meus dilemas, sofrimentos e que me deram a força que precisava nos momentos mais difíceis. Em especial as amigas **Eliane Leite** e **Laise** pelas inúmeras contribuições.

Aos amigos do meu esposo, **Casé, Terezinha, Feitosa, Val, Wanglers e Ivonete**, que me deram todo apoio nos finais de semana durante a minha estadia em São Paulo, para que eu não ficasse sozinha no hotel. A recepção calorosa de vocês foi muito importante.

A **Dr Iran Costa** e **Dr Hélio** que com coragem, esforço e determinação em fortalecer o ensino e pesquisa no HCP tornou possível a parceria com o A.C.Camargo para a realização deste mestrado.

Aos pacientes portadores de Glioblastoma, um tumor maligno extremamente letal, que de forma indireta contribuíram para a realização deste trabalho. Fica o grande desejo de ter contribuído de alguma forma na descoberta de caminhos que um dia possam modificar o panorama desta doença.

RESUMO

Cruz JR. **Avaliação da relação entre a expressão de RSK1 no infiltrado tumoral do glioblastoma**. São Paulo; 2019. [Dissertação de Mestrado-Programa de Pós-Graduação Interinstitucional em Oncologia da Fundação Antônio Prudente em parceria com Hospital de Câncer de Pernambuco].

Os glioblastomas (GBM) caracterizam-se como neoplasias agressivas e altamente invasivas. Estima-se que aproximadamente dois terços dos pacientes com GBM primário com rápido desenvolvimento dos sintomas tem uma história clínica inferior a três meses. As causas associadas ao GBM ainda não foram completamente elucidadas, mas pode-se atribuir seu desenvolvimento a uma rede complexa de diferentes alterações genéticas e moleculares, as quais promovem alterações nas vias de sinalização celular responsáveis pela proliferação celular, vasculogênese, apoptose e inflamação. O presente estudo teve como objetivo avaliar a expressão de RSK1, LAPT5 e de CD68 em amostras tumorais e correlacionar com a sobrevida global no GBM. Tratou-se de um estudo de coorte retrospectivo e analítico, realizado a partir de amostras da cirurgia de ressecção parcial ou total do tumor de glioblastoma, oriundos de pacientes atendidos no Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP) e no Hospital da Restauração (HR), ambos em Recife/PE. Foram coletadas as variáveis clínicas dos pacientes dos prontuários: sexo, idade, tipo e localização do tumor, data da cirurgia, tipo de cirurgia (total ou parcial), data da segunda cirurgia, tipos de tratamento (quimioterapia e/ou radioterapia), tempo de recidiva, sobrevida a partir do diagnóstico e Karnofsky Performance Status (KPS). Os fragmentos dos tumores foram submetidos a avaliação histológica e processados para imunohistoquímica e análise das expressões de RSK1, CD68, IDH1R132H e LAPT5. Foram excluídas do estudo amostras de pacientes com história clínica de imunodeficiência secundária, ausência de material biológico e/ou inadequado para análise. Participaram do estudo 52 pacientes, a maioria do sexo masculino (51,9%) e com média de idade de 53 anos. O lobo frontal foi a região de maior incidência de GBM (34,6%). Verificou-se uma redução de 84,0% para 32,7% de pacientes com

escala $\geq 70\%$ de KPS entre o pré e pós-cirúrgico, respectivamente ($p < 0,0001$). Estimou-se o intervalo de 9,4 mese como tempo médio de acompanhamento, foram registrados 32 óbitos, sendo a taxa de mortalidade geral de 6,82 óbitos a cada 100 pacientes acompanhados a cada mês (IC 95%: 4,82 – 9,64). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na expressão de RSK1, LAPTM5 e CD68 em relação às variáveis: idade, localização do tumor e KPS dos pacientes. As análises de correlação da sobrevida e expressão de RSK1, LAPTM5 e CD68 apontaram um maior risco de óbito dos pacientes com um maior nível de expressão dessas proteínas. Há alta correlação positiva entre as expressões de RSK1 e LAPTM5 ($r=0.63$; $p < 0,0001$) e RSK1 e CD68 ($r=0.57$, $p < 0,0001$) e baixa correlação entre CD68 e LAPTM5 ($r=0.40$, $p=0,005$). Os dados obtidos neste estudo mostram que a elevada expressão de RSK1, LAPTM5 e CD68 correlacionam a sobrevida global dos pacientes com glioblastoma, sendo possíveis marcadores de prognóstico.

Palavras chave: Glioblastoma. Carcinogênese. Sistema Imunitário. Sistema Nervoso Central. Imuno-Histoquímica. Estudos de Coortes

SUMMARY

Cruz JR. [Evaluation of the relationship between the expression of RSK1 in glioblastoma tumor infiltrate]. São Paulo; 2019. [Dissertação de Mestrado-Programa de Pós-Graduação Interinstitucional em Oncologia da Fundação Antônio Prudente em parceria com Hospital de Câncer de Pernambuco].

Glioblastomas (GBM) are characterized as aggressive and highly invasive neoplasms. Approximately two-thirds of patients with primary GBM have a poor prognosis of a few months with the rapid development of symptoms. The causes associated with GBM have not yet been fully elucidated, but their development can be attributed to a complex network of different genetic and molecular aberrations, which promote changes in cell signaling pathways responsible for cell proliferation, vasculogenesis, apoptosis, and inflammation. The present study aimed to evaluate the expression levels of RSK1, LPTM5 and CD68 in tumor samples and to correlate them to overall survival in GBM. This was a retrospective and analytical cohort study, based on samples from surgery for partial or total resection of the tumor from patients treated at Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP) and Hospital da Restauração (HR), both in Recife city in Pernambuco/Brazil. After the approval by ethics committee, we collected the clinical variables: sex, age, type and location of the tumor, date of surgery, type of surgery (total or partial), date of second surgery, types of surgery treatment (chemotherapy and/or radiotherapy), relapse time, survival from diagnosis and Karnofsky Performance Status (KPS) of patients. The fragments of the tumors were submitted to histological evaluation and processed for immunohistochemistry for the analysis of the expression of RSK1, CD68, IDH1R132H, and LPTM5. The patients with secondary immunodeficiency, absence of biological material and/or inadequate for analysis were excluded from the study. The study included 52 patients, 51,9% were men (51.9%), the mean age was 53 years. The highest incidence of GBM (34,6%) was found in the frontal lobe. The interval of 9.4 months was estimated as mean follow-up time, 32 deaths were recorded, with a general mortality rate of 6.82 deaths per 100 patients followed each

month (95% CI: 4.82 - 9,64). There was a reduction from 84.0% to 32.7% of patients with a $\geq 70\%$ KPS scale between the pre- and postoperative periods, respectively ($p < 0.0001$). No statistically significant differences were found in the differential expression of RSK1, LAPTM5 and CD68 related to the variables: age, tumor location and KPS of the patients. The correlation analyses of the survival and expression profile of RSK1, LAPTM5, and CD68 indicated an increased risk of death in patients with a higher level of expression of these proteins. There is a positive correlation between RSK1 e LAPTM5 ($r=0.63$; $p<0,0001$) e RSK1 e CD68 ($r=0.57$, $p<0,0001$) e baixa entre CD68 e LAPTM5 ($r=0.40$, $p=0,005$). The data obtained in this study shwon that overexpression of RSK1, LAPTM5, and CD68 has an impact in the overall survival of patients, being possible prognostic markers.

Keywords: Glioblastoma. Carcinogenesis. Immune System. Central Nervous System. Immunohistochemistry. Cohort Studies

LISTA DE FIGURAS QUADRO E TABELAS

Figura 1	Vias de sinalização envolvidas na tumorigênese do GBM	6
Figura 2	Vias de sinalização associadas ao fator de crescimento TKR.....	8
Figura 3	As vias de Ras-ERK1/2-RSK e PI3K-Akt-mTORC1	12
Figura 4	Representação do microambiente tumoral do glioblastoma.....	14
Figura 5	Fluxograma do desenho do estudo e coleta de dados.....	20
Figura 6	Características microscópicas de glioblastoma (GBM)	27
Figura 7	Análise comparativa dos valores de HSCORE de RSK1, LAPTM5 e CD68 pacientes com GBM e Karnofsky Perfomance Status (KPS) ≥ 70 (n=42) e <70 (n=8) no pré-cirúrgico	32
Figura 8	Análise comparativa dos valores de HSCORE de RSK1, LAPTM5 e CD68 pacientes com GBM e Karnofsky Perfomance Status (KPS) ≥ 70 (N=17) e <70 (n=33) no pós-cirúrgico.....	32
Figura 9	Análise dos níveis de HSCORE de RSK1, LAPTM5 e CD68 no entre os grupos de pacientes com GBM e idade <60 (n=33) e ≥ 60 anos.....	33
Figura 10	Análise dos níveis de HSCORE de RSK1, LAPTM5 e CD68 entre os grupos de pacientes com localização do tumor frontal (n=18), temporal (n=8) e parietal (n=17)	34
Figura 11	Análise de correlação entre os níveis de RSK1, CD68 e LAPTM5 nos tecidos dos pacientes com GBM.....	35

Figura 12	Sobrevida global (meses) dos pacientes com GBM de acordo com a expressão de RSK1lo (n=24) e RSK1hi (n=25)	36
Figura 13	Sobrevida global (meses) dos pacientes com GBM de acordo com a expressão de LAPT5lo (n=24) e LAPT5hi (n=25).....	37
Figura 14	Sobrevida global (meses) dos pacientes com GBM de acordo com a expressão de CD68lo (n=23) e CD68 hi (n=26).....	38
Figura 15	Imunomarcção das proteínas RSK1, CD68 e LAPT5.....	40
Quadro 1	Anticorpos utilizados nas reações de imunistoquímica.....	24
Tabela 1	Distribuição das frequências absoluta e relativa das características clínicas dos pacientes com glioblastoma atendidos no HCP e HR.2009-2017	29
Tabela 2	Associação da entre a escala de KPS com o pré e pós cirúrgico dos pacientes com glioblastoma atendidos no HCP e HR.2009-2017	30
Tabela 3	Análise univariada e multivariada de Cox para avaliar o risco de óbito dos pacientes com GBM(n=49)	39

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES

AKT	Proteína quinase B
CDK2	Proteína quinase dependente de ciclina 2
CDK4	Proteína quinase dependente de ciclina 4
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CIPE	Centro Internacional de Pesquisa
E2F	Fator de transcrição E2F
EGF	Fator de crescimento epidermal
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidermal
ERK1/2	Quinase regulada por sinalização extracelular
GBM	Glioblastoma
GDP	Guanosina difosfato
GTP	Guanosina trifosfato
H&E	Hematoxilina e eosina
HCP	Hospital de Câncer de Pernambuco
HR	Hospital da Restauração
IDH1	Isocitrato desidrogenase 1
IDH2	Isocitrato desidrogenase 2
IL10	Interleucina 10
IL12	Interleucina 12
IL6	Interleucina 6
KPS	Karnofsky Performance Status
LAPTM5	Proteína lisossômica transmembrana 5
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MDM2	Proteína MDM2
mTORC1	Complexo 1 da proteína alvo mecnstico da rapamicina
NAPD+	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NF1	Neurofibromatose tipo 1
NF-κB	Fator de transcrição nuclear kappa B
OMS	Organização Mundial de Saúde

PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PDGFR	Receptor do fator de crescimento de plaquetas
PI3K	Fosfatidilinositol 3 quinase
PTEN	Fosfatase homologa à tensina
Ras	Proteína Ras
RHEB	Proteína homóloga a Ras
RB	Proteína Retinoblastoma
RSK	p90 quinase ribossômica S6
SNC	Sistema Nervoso Central
TAM	Macrófagos associados a tumores
TCGA	Atlas genômico do câncer
TKR	Receptor de Tirosina quinase
TSC ½	Complexo da esclerose tuberosa
TMZ	Temozolomida
TMA	<i>Tissue Microarray</i>
TNFα	Fator de necrose tumoral
TP53	<i>Tumor protein p53</i> (Proteína tumoral p53)
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	O impacto clínico das alterações genéticas e moleculares no GBM.....	4
1.2	Vias de sinalização associadas ao fator de crescimento TKR	7
1.3	A família das proteínas quinases ribossomais p90.....	10
1.4	A proteína LAPTM5	12
1.5	Microambiente tumoral do GBM.....	13
1.5.1	Importância de macrófagos no microambiente do GBM.....	14
2	OBJETIVOS.....	17
2.1	Objetivo Geral.....	17
2.2	Objetivos Específicos.....	17
3	MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1	Aspectos éticos.....	18
3.2	Tipo do estudo.....	18
3.3	Local e Período do estudo	18
3.4	Casuística	19
3.5	Crítérios de elegibilidade	19
3.5.1	Crítérios de inclusão.....	19
3.5.2	Crítérios de exclusão.....	19
3.6	Procedimento para captação dos pacientes e coleta de dados.....	21
3.7	Abordagens experimentais	21
3.7.1	Avaliação histológica.....	21
3.7.2	Técnica de Tissue Microarray (TMA)	22
3.7.3	Imunoistoquímica.....	23
3.7.4	Leitura da reação de imunoistoquímica de RSK1, CD68 e LAPTM5.....	24
3.8	Análise Estatística	24
3.8.1	Análise descritivas e de associação.....	24

3.8.2	Análise de sobrevida	25
3.8.3	Análise de correlação	26
4	RESULTADOS	27
4.1	Avaliação histopatológica	27
4.2	Descrição das frequências absolutas e relativas das características clínicas e biológicas	28
4.3	Distribuição da performance status (KPS) antes e após a cirurgia de ressecção parcial ou total do glioblastoma.....	30
4.4	Análise dos níveis de HSCORE de RSK1, LAPTM5 e CD68 entre os grupos de pacientes com KPS ≥ 70 e < 70 no pré-cirúrgico.....	31
4.5	Análise dos níveis de HSCORE de RSK1, LAPTM5 e CD68 dos pacientes com GBM de acordo com a idade < 60 e ≥ 60 anos.	33
4.6	Análise dos níveis de HSCORE de RSK1, LAPTM5 e CD68 dos pacientes com GBM de acordo com a localização do tumor.....	34
4.7	Análise da correlação entre os níveis de HSCORE de RSK1, LAPTM5	35
4.8	Análise de sobrevida global	36
4.8.1	Sobrevida global entre os grupos de pacientes com expressão de RSK1 _{lo} e RSK1 _{hi}	36
4.8.1	Sobrevida global entre os grupos de pacientes com expressão de LAPTM5 _{lo} e LAPTM5 _{hi}	37
4.8.3	Sobrevida global entre os grupos de pacientes com expressão de CD68 _{lo} e CD68 _{hi}	38
4.8.4	Análise univariada e multivariada de Cox para estimar o risco de óbito dos pacientes com GBM.....	39
4.9	Imunohistoquímica de RSK1, LAPTM5 e CD68	40
5	DISCUSSÃO.....	41
6	CONCLUSÃO	48
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

APÊNDICES

Apêndice 1 Resultado da Imunoistoquímica para IDH1

Apêndice 2 Artigo submetido

Apêndice 3 Escala de Performance:Karnofsky

ANEXOS

Anexo 1 Aprovação do comitê de ética em pesquisa do Hospital de Câncer

Anexo 2 Aprovação do comitê de ética em pesquisa do Hospital da
Restauração

Anexo 3 Carta de anuência HCP

Anexo 4 Carta de Anuência HR

Anexo 5 Termo de autorização do uso de dados

Anexo 6 Termo de autorização do laboratório

Anexo 7 Termo de confidencialidade

Anexo 8 Dispensa do termo de consentimento livre e esclarecido

1 INTRODUÇÃO

Os gliomas são tumores de células gliais, correspondendo a cerca de 40 a 60% de todos os tumores primários do Sistema Nervoso Central (SNC), sendo mais comuns em adultos. Em geral, esses tumores são cirurgicamente incuráveis, além de possuírem resistência ao tratamento com radiação e/ou quimioterápicos (OSTROM et al. 2016). A atual classificação dos gliomas encontra-se nas diretrizes da Organização Mundial de Saúde-OMS. Esta classificação divide os gliomas em quatro graus (I, II, III, IV) de acordo com sua origem e características histopatológicas (LOUIS et al. 2016; PERRY e WESSELING 2016).

O glioblastoma (GBM) é um astrocitoma grau IV, representado na sua maioria por tumores primários que podem surgir em resposta a mutações. Em geral, caracterizam-se como neoplasias agressivas e altamente invasivas. Estima-se que a incidência de gliomas malignos é cerca de 17 mil casos por ano nos Estados Unidos (OMURO e DE'ANGELIS 2014). Os GBM são os mais frequentes tipos de gliomas malignos (82%). O GBM possui mau prognóstico com sobrevida estimada em torno de doze a quinze meses (OMURO e DE'ANGELIS 2014).

Aproximadamente dois terços dos pacientes com GBM primário tem rápido desenvolvimento dos sintomas com história clínica inferior a três meses. Por outro lado, os GBMs secundários são muito menos comuns e derivam da transformação ou progressão de astrocitomas de baixo grau. O GBM primário é mais comum em pacientes idosos, enquanto o GBM secundário é mais frequente em adultos com idade abaixo de 45 anos (BRENNAN et al. 2013; OHGAKI et al. 2004).

Os GBMs primários e secundários são geralmente indistinguíveis nas

características histológicas, mas são geneticamente distinguíveis, pois se originam por mecanismos diferentes (MAO et al. 2012). As alterações genéticas e moleculares encontradas no GBM tem impacto em várias vias de sinalização celular envolvidas no crescimento e progressão do tumor cerebral (DUNN et al. 2012; SANCHEZ-VEGA et al. 2018).

As vias de sinalização mais relevantes envolvidas no GBM incluem, entre outras, as vias relacionadas à ativação do receptor de crescimento da tirosina quinase (TKR), e a via das proteínas Ras. Assim como, alguns estudos apontam a participação das vias do fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), associada a fosfatase homóloga à tensina (PTEN) e proteína AKT. Destaca-se, também o papel fundamental da via mTOR que detém uma atuação estratégica como efetor *downstream* e um regulador *upstream* da PI3K no glioblastoma (MCLENDON et al. 2008; AKHAVAN et al. 2010). Outras alterações envolvem a função do gene que codifica a proteína retinoblastoma (RB) e a via de TP53 (CRESPO et al. 2015). A Figura 1 representa esquematicamente as principais vias relacionadas.

Nos GBMs, as vias RB/CDKN2A-p16INK4a desempenham um papel central na regulação do ciclo e proliferação celular. Em células quiescentes, a proteína RB está em um estado hipofosforilado (ativo) e ligado a E2F, efetuando um bloqueio da transcrição de genes importantes para a mitose, através da inibição do *checkpoint* do ciclo celular G1/S. Em contrapartida, nas células em proliferação, os fatores de crescimento levam à indução de ciclina D1, bem como à ativação de CDK2/ciclina E através da degradação do seu inibidor, p27Kip1. A ativação do complexo de CDK-ciclina desencadeia de forma tardia a fosforilação de RB na fase G1, que é mantida nas fases S, G2 e M do ciclo celular (GRZMIL e HEMMINGS 2010; KNUDSEN e

WANG 2010; MATHEU et al. 2008; SHANGARY e WANG 2008). As alterações na via RB foram encontradas em 78% dos 206 pacientes com GBMs primários, causadas diretamente por mutações, deleções ou metilação do promotor do locus do gene *RB* e indiretamente por meio de alterações nos reguladores positivos e negativos de RB (CRESPO et al. 2015). Por sua vez, a metilação do promotor RB e silenciamento dos genes são mais frequentemente encontrados no GBM secundário (43%) do que no primário (14%). As alterações na via RB incluem deleção homozigótica e mutação de *CDKN2A-p16INK4a* e RB em 52% e 11% dos pacientes avaliados, respectivamente. A deleção homozigótica de *CDKN2B-p15INK4b* e *CDKN2C-p18INK4c* foi encontrada em 47% e 2% dos pacientes com GBM, respectivamente. Por sua vez, a amplificação gênica de *CDK4*, *CDK6* e *CCND2* (ciclina-D2) foi encontrada em 18%, 1% e 2% dos GBMs, respectivamente (GRZMIL e HEMMINGGS 2010; PATIL et al. 2013).

Os fatores de transcrição TP53/MDM2/MDM4/*CDKN2A-p14ARF* relacionados ao ciclo celular também têm sido associados aos GBM. A proteína TP53 desempenha importante papel no ciclo celular, reparo do DNA, morte celular e diferenciação. Constitui-se num fator de transcrição nuclear que se liga a sítios específicos do DNA, afetando a transcrição de seus genes alvos, seja por ativação transcricional ou modulação da ativação de outras proteínas. A via TP53 é ativada em resposta às condições de estresse celular, pode induzir o reparo do DNA ou a morte celular evitando a sobrevivência de células que sofreram mutação ou foram danificadas (MELETIS 2005; VAN MEIR et al. 2010). A via de sinalização de TP53 é interrompida no GBM devido a sua mutação e/ou amplificação, superexpressão de MDM2 e/ou perda de expressão de *CDKN2A-p14ARF*. Essas alterações responsáveis

por bloquear a atividade da TP53 induz a proliferação celular descontrolada e formação de tumores. Estudos mostram que pelo menos uma alteração da via TP53/MDM2/CDKN2A-p14ARF é relatada em aproximadamente 50% dos pacientes com GBM primário e 70% nos pacientes com GBM secundários (ZAWLIK et al. 2009).

1.1 O IMPACTO CLÍNICO DAS ALTERAÇÕES GENÉTICAS E MOLECULARES NO GBM

Nas últimas décadas, várias alterações associadas ao GBM contribuíram para uma classificação diagnóstica mais precisa, estratificação prognóstica, e/ou previsão de resposta à terapia nestes tumores.

Os estudos de amplificação do gene EGFR, mutações nos genes da isocitrato desidrogenase 1 e 2 (IDH1/IDH2) e a hipermetilação do promotor do gene da Metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT) foram marcos relevantes do ponto de vista clínico. Destaca-se que o gene EGFR é o mais frequentemente superexpresso, principalmente no GBM primário, estando geralmente associado a malignidade. No entanto, há controvérsias sobre o significado prognóstico da amplificação de EGFR no GBM. Alguns estudos associam o EGFR a um pior prognóstico e sobrevida dos pacientes com GBM, porém outros afirmam que essa associação com a sobrevivência não é significativa (OHGAKI et al. 2004).

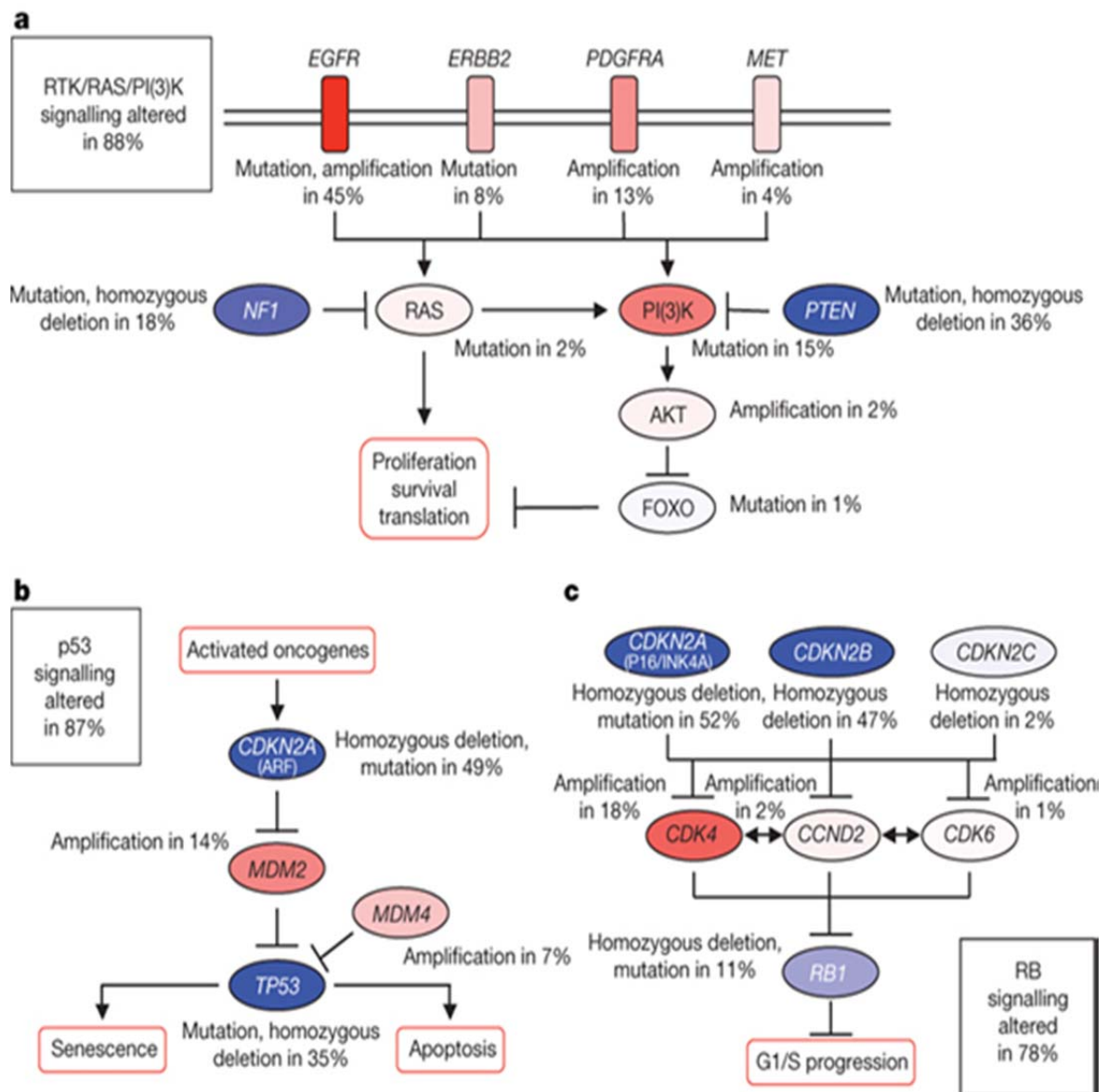
As mutações nas enzimas dependentes de NADP⁺, isocitrato desidrogenases codificadas pelas isoformas IDH1 e IDH2 ocorrem na maioria dos gliomas de baixo grau (YAN et al. 2009). O IDH1 é uma enzima localizada no citoplasma e

peroxissomos, enquanto a isoforma IDH2 está presente nas mitocôndrias. Ambas estão envolvidas na proteção contra o estresse oxidativo, metabolismo de lipídios e glicose. Dados de um estudo relatou a presença de mutações pontuais recorrentes no locus *IDH1* (12%) em 22 pacientes com GBMs (PARSONS et al. 2008).

Estima-se que mutações em IDH1 estão presentes em cerca de 80% dos casos de gliomas grau II-III da OMS e no GBM secundário. Apenas menos de 3% relacionam-se a mutações no IDH2 em todas as neoplasias gliais. No entanto, as mutações em IDH1 são pouco frequentes no GBM primário. A maioria das mutações em IDH1 está correlacionadas ao aminoácido arginina em R132 (REUSS et al. 2014; OLAR et al. 2015).

A ocorrência de mutações no gene *IDH1* nos gliomas difusos está fortemente associado à mutação no *TP53*. As mutações no gene *IDH1* estão presentes em maior percentual nos pacientes mais jovens, que também carregam mutações em TP53, sendo características típicas de GBM secundário (PARSONS et al. 2008; SANSON et al. 2009; WATANABE et al. 2009; WELLER et al. 2009; KLOOSTERHOF et al. 2011).

Os detalhes sobre as alterações genéticas frequentes em três vias importantes de sinalização RTK / RAS / PI3K, p53 e RB encontram-se na Figura 1.



Fonte: Cancer Genome Atlas Research Network (2008)

Figura 1 - Alterações genéticas frequentes em três vias importantes de sinalização.

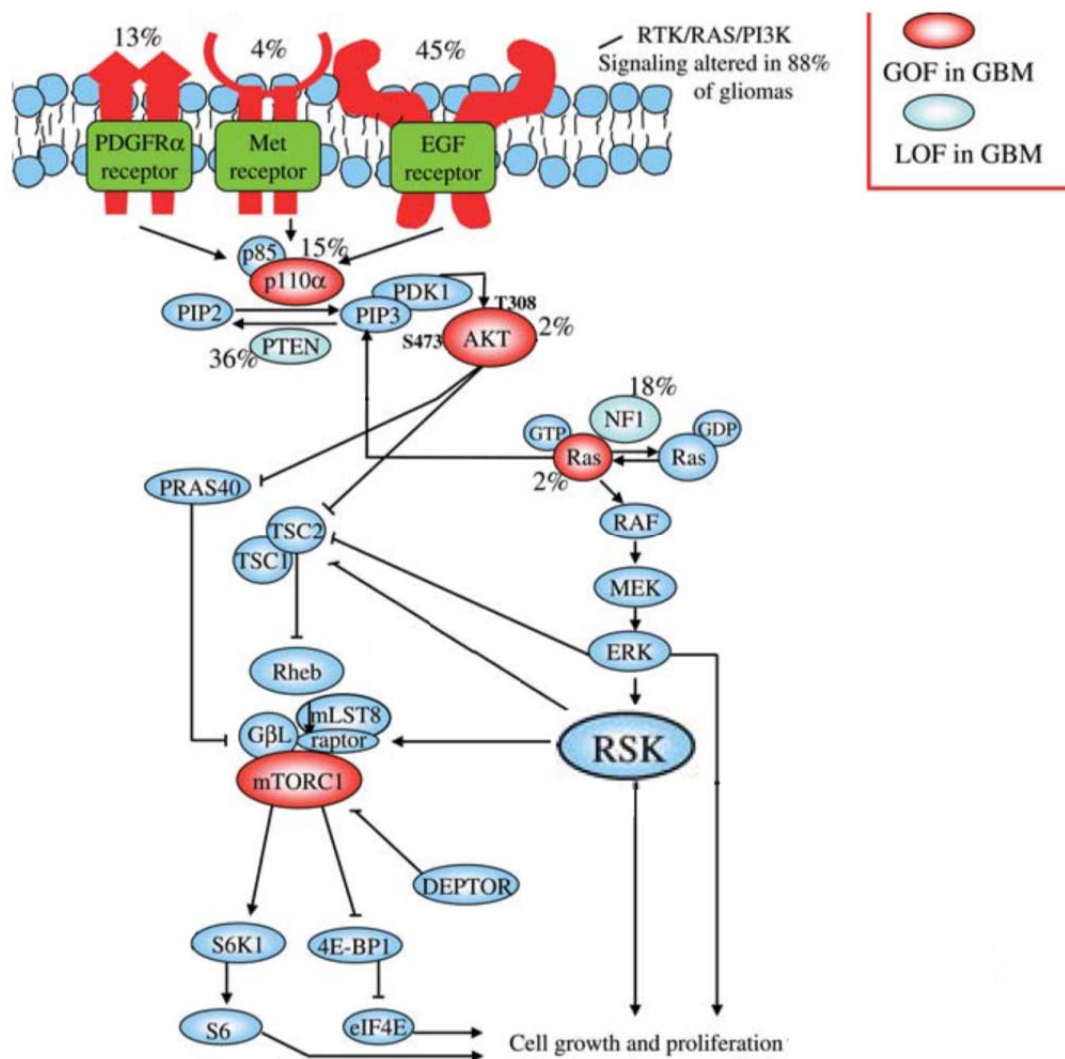
Alterações na sequência primária e alterações no número de cópias para componentes do RTK / RAS / PI3K (a), p53 (b) e RB (c). Ativação do gene/via (marcado em vermelho). Inativação do gene/via (marcado em azul). RTK: p90 quinase ribossômica S6. Fosfatidilinositol 3 quinase; RB: Rinoblastoma.

1.2 VIAS DE SINALIZAÇÃO DOS TYROSINE KINASE RECEPTORS (TKR)

O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento epidermal (EGF) regulam várias vias de sinalização celular em células normais e tumorais através da ativação do complexo de cascatas intracelulares via TKR. O aumento da expressão de PDGF e do receptor de EGF (EGFR) no GBM sugerem que essas vias de sinalização de TKR são alvos críticos na gliomagênese (ZHENG et al. 2013).

Alguns autores relataram que a co-expressão de PDGF e do seu receptor (PDGFR) desempenham um papel importante no desenvolvimento de tumores cerebrais, sendo expressos em astrocitomas de todos os graus. Um conjunto de gliomas caracterizado pela atividade desregulada de PDGFR, devido à amplificação e rearranjo do locus do gene *PDGFRA* e/ou superexpressão do ligante PDGF foi descrito pelo consórcio *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) (ALENTORN et al. 2012; CRESPO et al. 2015).

Os receptores de EGFR e seus ligantes são expressos de forma variável ao longo do desenvolvimento cerebral a partir da embriogênese até a idade adulta, sugerindo um papel crítico da sinalização do EGFR na proliferação, migração, diferenciação e sobrevivência de todos os tipos de células do sistema nervoso e de seus precursores. Em células de GBM, a sinalização da via EGFR pode ser ativada pelo ligante ou através da superexpressão e/ou mutação do gene do receptor, o qual pode induzir a ativação constitutiva do receptor na ausência do ligante, porém ambos os tipos de alterações podem coexistir no GBM (NICHOLAS et al. 2006; HUANG et al. 2009) (Figura 2).



Fonte: Cancer Genome Atlas Research Network (2008)

Figura 2 - Vias de sinalização associadas ao fator de crescimento TKR. O mTORC desempenha um papel fundamental na integração da transdução de sinal e vias metabólicas no glioblastoma. Representação esquemática mostra vias que regulam ou são reguladas pela sinalização mTOR no glioblastoma, com a conhecida frequência de alterações moleculares nesses genes.

As sinalizações por meio das vias PDGFR e EGFR podem promover a ativação da Ras, que é uma proteína ligada a proteína G. A Ras possui elevada frequência de mutações oncogênicas, as quais contribuem para o desenvolvimento e manutenção do fenótipo maligno nos tumores. Maior atividade da via Ras é observada em praticamente todos os GBMs. Entretanto, mutações do gene Ras raramente são encontradas no GBM (PATIL et al. 2013). Os pacientes com mutações no gene repressor tumoral NF1 em ambos alelos, portadores da síndrome autossômica dominante denominada neurofibromatose tipo 1 (NF1) possuem predisposição tumoral para desenvolvimento de gliomas (PHILPOTT et al. 2017). O gene NF1 codifica a proteína ativadora de GTPase denominada neurofibromina, a qual é um regulador negativo da Ras. A neurofibromina regula o crescimento e a sobrevivência da célula através de moléculas efetoras que aceleraram a conversão da forma ativa da Ras (ligada a GTP) para a forma inativa da Ras (ligada a GDP). Portanto, a perda da expressão de neurofibromina, ocasionada pela mutação em NF1, pode levar a hiperativação da Ras e a proliferação celular desordenada (D'ANGELO et al. 2019).

O aumento da sinalização celular mediada por PI3K tem sido implicada na patogênese do GBM (Figura 2). O recrutamento de PI3K para a membrana celular promove a fosforilação do PIP2 (fosfatidilinositol-bifosfato) para PIP3 (fosfatidilinositol-trifosfato) começando a sinalização de moléculas efetoras associadas a PIK3, como AKT, resultando em proliferação celular e aumento da sobrevivência celular pelo bloqueio da morte celular por apoptose (LANGHANS et al. 2017). PTEN é um gene supressor de tumor que regula negativamente a via de PI3K ao desfosforilar PIP3 para formar PIP2. Alguns autores relataram que o PTEN desempenha papel significativo na indução da parada do ciclo celular (fase G1), morte

celular programada por apoptose e regulação da diferenciação celular. No GBM a função inibitória do PTEN está frequentemente ausente devido à perda de heteroziguidade (LOH) no *locus* 10q23.3 ou a mutações no gene (15% a 40%). Consequentemente, a perda da função de PTEN ocasiona a ativação constitutiva da via PI3K e maiores níveis de AKT ativada nas células de GBM.

A via de PI3K/AKT desempenha um papel importante na gliomagenese (VOGT 2001; FURNARI et al. 2007; KOUL 2008).

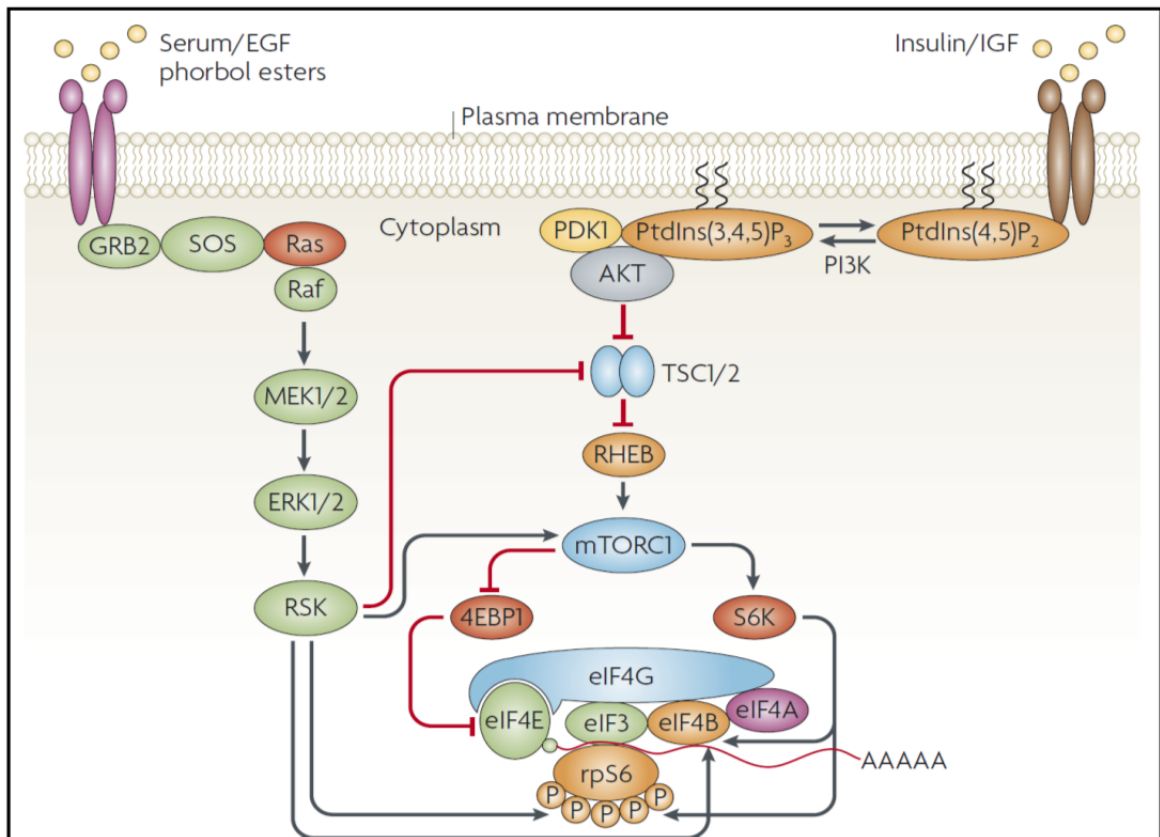
Em conjunto alterações moleculares nas vias de sinalizações EGFR/Ras/PI3K na via mTOR estão presentes em 88% de todos os pacientes com GBM (ONOFRIO et al. 2008). Classicamente, a via mTOR atua por dois complexos de sinalizações os quais possuem atividades distintas. O complexo formado de mTOR com PRAS40, raptor e mLST8 (mTORC1) atua como um efetor *downstream* da sinalização PI3K / Akt, ativando sinais de fatores de crescimento, proliferação e sobrevivência celular (AKHAVAN et al. 2010). Por outro lado, o complexo formado com rictor, mSIN1, protor e mLST8 (mTORC2) atua como *upstream* da Akt (GUERTIN et al. 2009).

1.3 A FAMÍLIA DAS PROTEÍNAS QUINASES RIBOSSOMAIS P90

A família da *p90 kDa ribosomal S6 kinase* (RSK) é um dos vários substratos da ERK1/2 (CARGNELLO e ROUX 2011). Em humanos, existem quatro isoformas de RSK com alto grau de homologia (RSK1 a RSK4). As RSKs podem regular diversas funções celulares, por exemplo, proliferação, crescimento celular, sobrevivência e migração. As RSKs também regulam a expressão gênica por meio da fosforilação

direta de fatores de transcrição e reguladores da tradução. Além disso, as RSKs têm uma função essencial no *cross-talk* entre as vias de sinalização de Ras/ERK e a via de mTORC1 (Figura 3). A regulação da via de mTORC1 pelas RSKs ocorre por meio da fosforilação da proteína raptor, que estimula a atividade de mTORC1, e a fosforilação e inativação do inibidor de mTORC1, “tuberin” (TSC2) (BALLIF et al. 2004; ANJUM e BLENIS 2008; CARRIÈRE et al. 2008; ROMEO et al. 2011). No entanto, resultados prévios demonstram que não há uma relação direta entre a fosforilação de TSC2 (S1798) e a atividade de mTORC1 (medida através da fosforilação de p70S6K), em linhagens celulares de GBM. Este fato levanta a questão da real relevância da fosforilação de TSC2 pelas RSKs no controle da tradução. Por outro lado, as RSKs também podem fosforilar alvos *downstream* de mTORC1/p70S6K como o fator de início da tradução eIF4B e a proteína ribossômica S6 (rpS6). Deste modo, as RSKs também poderiam atuar sobre o controle traducional pela regulação dos alvos de mTORC1 (SHAHBAZIAN et al. 2006; ROUX et al. 2007; ROFFÉ et al. 2015).

Além do seu papel em duas vias de sinalização essenciais em vários processos celulares vias Ras/ERK e PI3K/Akt/mTORC1 (Figura 3), a família das RSK tem um papel importante no controle da proliferação, sobrevivência, migração, invasão e metástase de vários tipos de células tumorais, como carcinoma de cabeça e pescoço, câncer de pulmão e melanoma. Assim, as RSKs podem ser consideradas como um potencial alvo terapêutico para o câncer. A função das RSKs nos GBMs ainda não foi totalmente elucidada, apesar das relações associadas às vias de Ras/ERK quanto a de PI3K/Akt/mTORC1 (EISINGER-MATHASON et al. 2010; SULZMAIER e RAMOS 2013) (Figura 3).



Fonte: ANJUM e BLENIS (2008).

Figura 3 - As vias de Ras-ERK1/2-RSK e PI3K-Akt-mTORC1. As vias de Ras-ERK1/2-RSK e PI3K-Akt-mTORC1. O fosfoinosítideo 3-quinase (PI3K) e a via AKT é o principal caminho que regula a tradução. O AKT/PKB regula a tradução via fosforilação e inativação da função supressora do complexo esclerose tuberosa (TSC 1/2) os quais regulam a proteína RHEB. O RHEB, por sua vez, associa-se ao mTORC1. O RHEB ativa a mTOR que sinaliza a S6 kinase-1/2 (S6K1 / 2) ribossômica S6 de 70 kDa e a Proteína 1 de ligação a 4E (4EBP1).

1.4 A PROTEÍNA LAPTMS5

A proteína *Lysosomal-associated protein multispinning transmembrane 5* (LAPTMS5) pertence a uma família de proteínas localizadas no endossomo e é responsável pela regulação do transporte de vesículas do endossomo para o complexo de Golgi no citoplasma (GLOWACKA et al. 2012).

A LAPTMS5 tem a função de promover a ativação das vias de sinalização de

NF- κ B e MAPK nos macrófagos após estimulação antigênica, o que leva a produção de citocinas pró-inflamatórias como interleucina (IL)6, Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF α) e IL12.

Um estudo demonstrou que nos macrófagos a LPTM5 funciona como componente essencial para produção de mediadores inflamatórios no início da resposta imune, estando sua deficiência atrelada a redução da ativação das vias do *nuclear factor- κ B* (NF- κ B) e *Mitogen- activated protein kinase* (MAPK) (GLOWACKA et al. 2012).

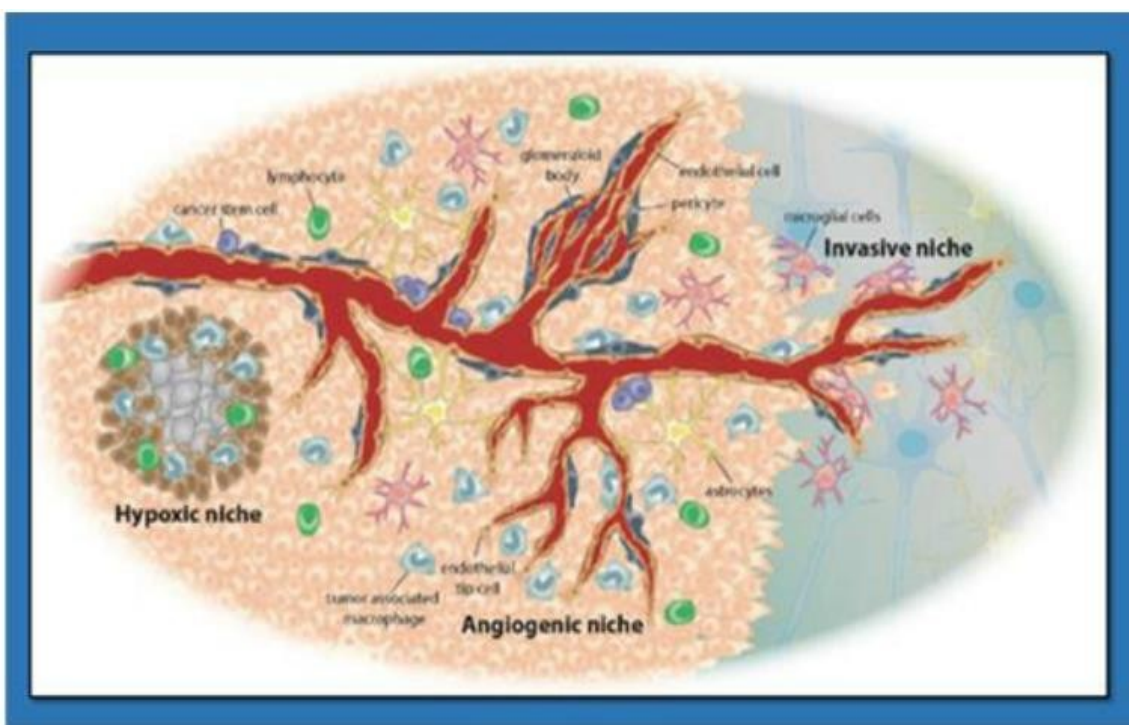
Além disso, LPTM5 pode inibir a expressão do receptor de antígenos das células T (TCR), das células pré-B (pré-BCR) e B (BCR) na superfície celular através clivagem dessas proteínas no interior dos lisossomos. A expressão de LPTM5 foi encontrada frequentemente diminuída no nível da transcrição em vários tipos de células tumorais humanas, como as células do neuroblastoma. Em particular, a regulação negativa do LPTM5 foi significativamente correlacionada com o mau prognóstico de pacientes. Dessa forma, a modulação de LPTM5 pode ser um mecanismo usado por gliomas que tem um papel inibitório na resposta antitumoral do sistema imune (OUCHIDA et al. 2010; NUYLAN et al. 2016).

1.5 MICROAMBIENTE TUMORAL DO GBM

O GBM e as células-tronco dos gliomas estão imersas num microambiente tumoral heterogêneo que não só é composto por diversas células estromais, incluindo células vasculares, os vários tipo de células imunes residentes no infiltrado tumoral e outros tipos de células gliais não neoplásicas, mas também é compartimentalizado

em regiões anatomicamente distintas, denominadas nichos tumorais. Esses nichos podem ser compostos por células morfológicamente diferentes umas das outras enquanto a vascularização permanece uma parte central. Esses nichos regulam o metabolismo, imunovigilância, sobrevivência, invasão e a manutenção das células-tronco do glioma.

No nicho do tumor angiogênico, as células-tronco se aninham próximas a vascularização anormal, enquanto no tumor vascular-invasivo, as células tumorais se associam aos vasos sanguíneos normais para migrar no parênquima cerebral. Nas regiões hipóxicas do tumor, pode haver áreas necróticas circundadas por uma fileira de células tumorais hipóxicas em paliçadas (Figura 4).



Fonte: DE VLEESCHOUWER e BERGERS (2017)

Figura 4 - Microambiente tumoral no glioblastoma.

1.5.1 Infiltrado de macrófagos no microambiente do GBM

A infiltração de macrófagos é uma característica comum dos GBMs e o microambiente tumoral inclui células inflamatórias que são de natureza dinâmica, possivelmente refletindo a biologia do tumor. Os macrófagos representam uma maior quantidade de população de células do infiltrado, contribuindo com cerca de um terço da massa tumoral total. Os glioblastomas geralmente contêm vários tipos celulares que expressam marcadores neurais, gliais e mielóides. Foi demonstrado, a partir da análise de tecidos de glioblastoma ressecados cirurgicamente, que 30% do tecido tumoral consiste em microglia/macrófagos associados a tumores (TAMs), os quais são derivados de microglia parenquimatosa no cérebro e macrófagos derivados de monócitos do sangue. Essas análises mostraram que o número de macrófagos associados ao microambiente tumoral correlaciona-se ao grau histológico dos gliomas (HEWEDI et al. 2013; LISI et al. 2014; LAPA et al. 2015).

Os macrófagos associados a tumores na presença de células de glioma promovem uma resposta anti-inflamatória aumentando a expressão e liberação de citocinas, como Interleucina-10 (IL-10) e VEGF, contribuindo para a sobrevivência e crescimento das células do glioblastoma. Foi observado que no tecido de pacientes com glioblastoma de grau IV, a presença de uma quantidade significativa de células CD68 positivas, que consistem num marcador de atividade fagocítica de macrófago (LISI et al. 2014).

Além disso, foi reportado em outro estudo que o infiltrado CD68 positivo foi maior em glioblastomas em comparação com astrocitomas anaplásicos, astrocitomas difusos e astrocitomas pilocíticos. Foi relatado ainda que o aumento de macrófagos associados ao tumor era característico do microambiente do glioblastoma uma vez que

uma densidade significativamente menor de infiltrado positivo para CD68 foi observada entre outros grupos de tumores astrocísticos estudados (LISI et al. 2014; CHOI et al. 2015; LAPA et al. 2015).

Diante da literatura supra citada e da elevada mortalidade dos pacientes com GBM, é de fundamental importância estudar as vias de ativação das proteínas reguladoras dos mecanismos envolvidos no GBM com objetivo de ampliar o conhecimento sobre possíveis alvos terapêuticos que possam melhorar a sobrevida global desses pacientes.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão de RSK1, LAPTM5 e de CD68 no tecido tumoral nos pacientes com GBM e associá-la com a sobrevida global.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar as frequências absoluta e relativa das características clínicas de pacientes com glioblastoma;
- Determinar a expressão das proteínas RSK1, LAPTM5 e CD68 no tecido tumoral;
- Associar os resultados de expressão dessas proteínas com a idade ao diagnóstico, performance status (KPS), localização do tumor e sobrevida global.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Pernambuco (CAAE: 5576716.3.0000.5205 e do Hospital da Restauração (CAAE: 55476716.3.3002.5198), constantes no Anexos 1 e 2.

3.2 TIPO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo de coorte retrospectivo.

3.3 LOCAL E PERÍODO DO ESTUDO

O estudo foi realizado com amostras provenientes de pacientes atendidos no Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP) e Hospital da Restauração (HR), ambos em Recife/PE. O Hospital da Restauração em Recife é um centro de referência em cirurgia neurológica do Estado de Pernambuco. Todos os pacientes foram atendidos durante o período de janeiro de 2009 a junho de 2017. Os dados clínicos foram coletados a partir dos dados dos prontuários. As análises imunohistoquímicas foram realizadas no laboratório do Centro Internacional de Pesquisa (CIPE) do A.C. Camargo Cancer Center em São Paulo.

3.4 CASUÍSTICA

Foram incluídos 52 pacientes com idade entre 13 e 79 anos que foram submetidos a cirurgia de ressecção parcial ou total do tumor de Glioblastoma, classificado pela OMS.

3.5 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE

3.5.1 Critérios de inclusão

Pacientes com Glioblastoma que realizaram cirurgia para retirada do tumor no Hospital de Câncer de Pernambuco e Hospital da Restauração no período de 2009 a junho de 2017.

3.5.2 Critérios de exclusão

Pacientes com história clínica de imunodeficiência secundária, ausência de material biológico e/ou inadequado para análise.

3.6 PROCEDIMENTO PARA CAPTAÇÃO DOS PACIENTES E COLETA DE DADOS

Foram identificados no Serviço de Arquivo Médico (SAME) de ambos hospitais, um total de 79 pacientes, atendidos entre 2009 a 2017, com Glioblastoma (GBM) que realizaram cirurgia de ressecção parcial ou total do tumor. Desse quantitativo foram excluídos três pacientes por ausência de informações nos

prontuários e vinte e quatro pacientes por ausência de material biológico. Portanto, foram incluídos 52 pacientes, sendo, 11 oriundos do HCP e 41 do HR. Para as análises das proteínas RSK1, LAPTM5 e CD68 houve perda de 03 pacientes por baixa qualidade da amostra.

Foram coletados dos prontuários as variáveis: sexo, idade, tipo e localização do tumor, data da cirurgia, tipo de cirurgia (total ou parcial), data da segunda cirurgia, tipos de tratamento (quimioterapia e/ou radioterapia), tempo de recidiva, sobrevida a partir do diagnóstico e *Karnofsky Performance Status* (KPS – Anexo 3). Na Figura 5, fluxograma de identificação dos pacientes.

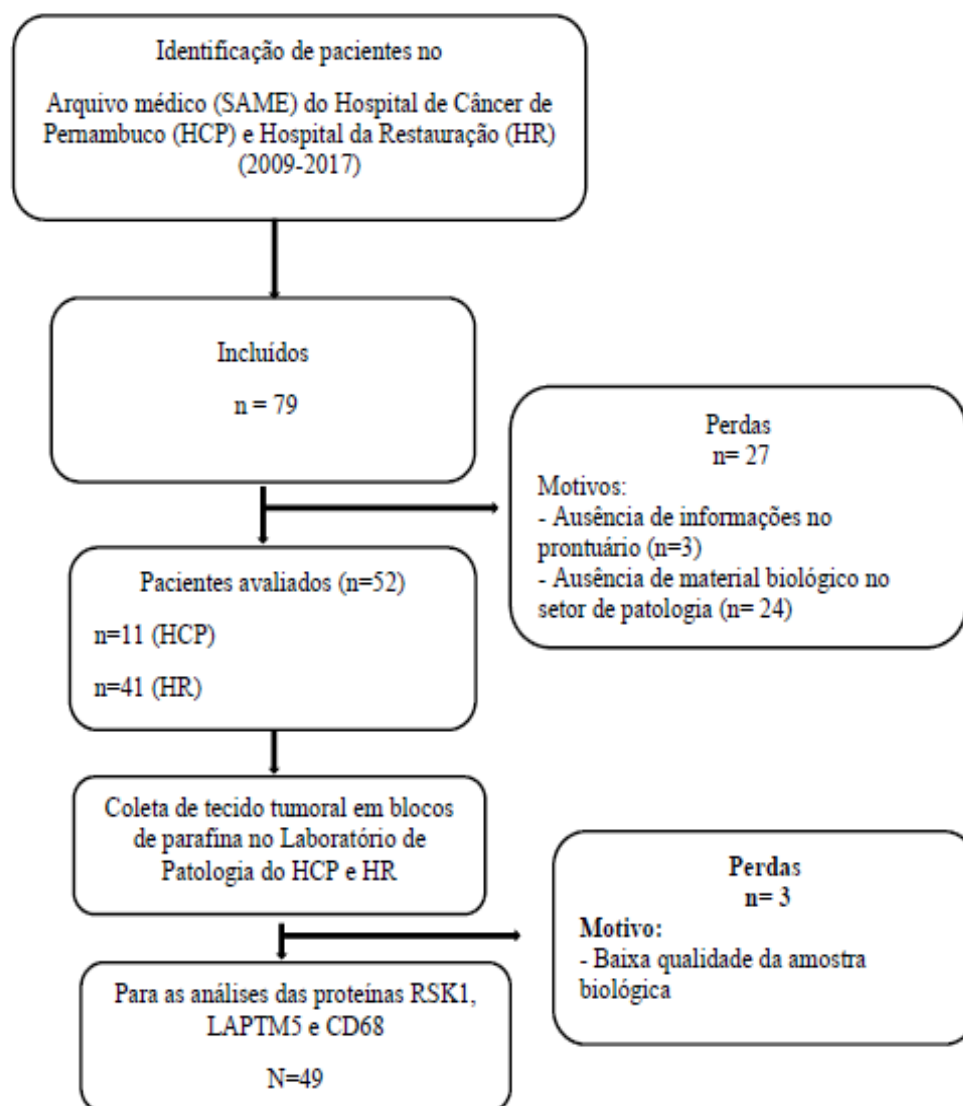


Figura 5 - Fluxograma de identificação dos pacientes com Glioblastoma do HCP e HR (2009-2017).

3.7 ABORDAGENS EXPERIMENTAIS

3.7.1 Avaliação histológica

Os blocos representativos do tumor foram selecionados após revisão do patologista. Foram realizados cortes de 2 µm de espessura com o micrótomo (JUNG RM 2025, LEICA). Em seguida, os cortes foram aderidos a lâminas silanizadas (FLEX IHC Microspore slides, REF: K8020, DAKO). As amostras foram processadas para coloração com Hematoxilina e Eosina (H&E). As lâminas com amostras destinadas a análise imunohistoquímica de RSK1, CD68, IDH1R132H e LAPTM5, foram mantidas silanizadas sem adição de corantes. As amostras foram analisadas microscopicamente para identificação das características histológicas no A.C.Camargo Cancer Center.

3.7.2 Técnica de Tissue Microarray (TMA)

Essa técnica possibilita o estudo da expressão proteica de tumores em larga escala através de ensaios de imunohistoquímica (GULMANN et al. 2003; MELENDEZ et al. 2003). A construção do TMA foi realizada após seleção e identificação da área mais representativa do tumor, através de uma marcação circular em cada nova lâmina. Utilizou-se o *tissue microarrayer* (Beecher Instruments, Silver Spring, Maryland) e a área de interesse foi retirada a partir de uma região circular de 0,6mm de cada bloco doador e transferida para um bloco receptor. Em seguida, a partir do bloco receptor foram preparados cortes histológicos seriados em lâminas de vidro cortadas por microtomia mecânica (4µm). Após análise no microscópio óptico, as amostras que representaram pelo menos 10% da área circular do core (0,6mm) foram

consideradas satisfatórias.

3.7.4 Imunoistoquímica

A imunohistoquímica foi realizada utilizando lâminas de *tissue microarray* (TMA) com cortes de 1 mm contendo todos os casos e controles. As lâminas com o corte de TMA foram desparafinizadas pela incubação a 60° C na estufa por 1 hora e meia e utilizando gradientes decrescentes de xilol. As lâminas foram sequencialmente hidratadas utilizando gradientes de etanol, água deionizada e tampão fosfato (PBS). A recuperação antigênica foi realizada por aquecimento em panela de pressão elétrica, durante 40 minutos para o RSK1 e IDH1_{R132H}, os quais foram incubados numa solução tampão Tris base + EDTA + Polisorbato (Tris-EDTA). Para a imunohistoquímica de CD68 e LAPTM5 foi reduzido o tempo de aquecimento para 20 minutos e utilizado a solução tampão de citrato + Polisorbato. Após resfriamento em temperatura ambiente, as lâminas foram lavadas com água deionizada e tampão fosfato (PBS). O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com a solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Utilizou-se a solução de 0,25% de caseína em tampão fosfato por 60 minutos em cuba escura para o bloqueio de ligações inespecíficas.

Em seguida, as lâminas foram incubadas com o anticorpo anti-RSK1 (sc-231, Santa Cruz Biotechnology) a uma diluição 1:200, anti-CD68 (sc-70761, Santa Cruz Biotechnology) na diluição 1:100, anti-LAPTM5 (ab108017, Abcam) na diluição 1:50 e anti-IDH1_{R132H} (DIA-H09, Dianova) diluição 1:100 em albumina de soro bovino a 1% em tampão fosfato por 18 horas a 4°C em câmara úmida.

Após o período de incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram

lavadas com tampão fosfato e incubadas com anticorpo secundário conjugado com a peroxidase EnVision + Dual Link (Dako) por 30 minutos em cuba escura. Após nova lavagem em tampão fosfato foi aplicado 100 µl da enzima HRP (Dako, USA) durante 30 minutos em cuba escura.

A revelação das imunomarcações foi realizada utilizando o cromógeno 3,3-Diaminobenzidina (DAB, Dako) com diluição de 1 gota em 1000 µl de tampão (DAB, Dako) por 5 minutos. Como controles positivos foram incluídos tecidos com expressão proteica conhecida e o anticorpo primário foi omitido para os controles negativos. As lâminas foram contra coradas com hematoxilina durante 5 minutos, retirado o excesso com água corrente e aplicado meio de montagem rápida para microscopia isento de água (Etellan® - Merk).

3.7.4 Leitura da reação de imunoistoquímica de RSK1, CD68 e LAPTM5

A quantificação foi feita digitalmente pelo aparelho scanScope XT (Aperio versão:12.3.2.8013) da Leica Biosystems (Nussloch, Alemanha). A intensidade de marcação dos anticorpos foi avaliada na célula total e núcleo celular através da intensidade e porcentagem de pixels marcados. O algoritmo utilizado no ScanScope classificou cada pixel como 0 (negativo, intensidade variando de 256-220), 1 (fracamente positivo, intensidade variando de 220-175), 2 (positivo, intensidade variando de 175 -100) ou 3 (fortemente positivo, intensidade variando de 100 - 0) e quantificou o número de pixels em cada categoria. A partir destes dados o HSCORE, medida de pontuação que pode ser utilizada para atribuir valores, foi calculado de acordo com a fórmula, $HSCORE = \sum (i \times P_i)$, onde P_i = porcentagem de pixels positivos, com variação de 0% a 100% e intensidade de marcação do pixel $i = 0, 1, 2,$

ou 3. Ao final um escore (pontuação) de 0 a 300 foi obtido pela multiplicação da intensidade e porcentagem de acordo com a metodologia proposta por ALVARENGA et al. (2013).

A quantificação de CD68 foi realizada pela relação de porcentagem de pixels fortemente marcados por área do tecido ocupada pelas células do infiltrado inflamatório. Portanto, a intensidade da marcação não foi utilizada, somente a área dos pixels fortemente marcados dividido pela área total.

Os pacientes obtiveram níveis elevados de RSK1, LAPTM5 e CD68 na imunomarcção foram divididos em grupos e nomeados *high expression* (hi) e os grupos que expressaram níveis baixos de RSK1, LAPTM5 e CD68 foram nomeados *lowexpression* (lo).

Em relação à imunohistoquímica para IDH1^{R132H} não houve quantificação no Scancope, amostras sem coloração foram consideradas do tipo IDH1 selvagem e com coloração de qualquer intensidade foram consideradas IDH1 mutadas. A descrição dos anticorpos utilizados nas reações de imunohistoquímica está apresentada no Quadro 1.

Quadro 1 - Anticorpos utilizados nas reações de imunohistoquímica

<i>Anticorpo</i>	<i>Código</i>	<i>Título</i>	<i>Fabricante</i>
RSK1	sc-231	1:200	Santa Cruz
CD68	sc-70761	1:100	Santa Cruz
IDH1^{R132H}	DIA-H09	1: 100	Dianova
LAPTM5	ab108017	1:50	Abcam

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

3.8.1 Análise descritivas e de associação

A análise descritiva das variáveis quantitativas foi realizada por meio de medidas de tendência central (média ou mediana) e de dispersão (desvio padrão), valores mínimo e máximo), e para as variáveis qualitativas, foi realizada por meio das frequências absoluta e relativa. Para avaliar a associação entre a escala de KPS no pré e pós-cirúrgico foi realizado o teste exato de Fischer.

Para a avaliação da distribuição das variáveis quantitativas foi realizado o teste de *Shapiro-Wilk*. As variáveis quantitativas com distribuição não normal foram apresentadas em valores de mediana e intervalo interquartil (IQR: 25-75%). Teste não paramétrico de *Mann-Whitney* foram utilizados para comparação entre dois grupos. Foi adotado o nível de significância estatística de $p < 0.05$. A análise estatística foi realizada através do programa *graphpad prism v6.0* (Graphpad software, San Diego, CA).

3.8.2 Análise de sobrevida

Foi feita a análise de sobrevida global incluindo uma avaliação exploratória inicial utilizando o método de Kaplan-Meier com o objetivo de identificar possíveis diferenças entre as curvas para cada grupo de exposição. O teste de *Log-Rank* foi utilizado para comparação entre os grupos.

A partir da análise univariada do modelo dos riscos proporcionais de Cox, as variáveis com $p < 0,20$ foram selecionadas para a análise multivariada de Cox para estimar o risco proporcional (*Hazard Ratio*). Foram retidas no modelo final as

variáveis com $p < 0,05$. O tempo de seguimento utilizado para as análises de sobrevida foi de 8,5 anos.

Foi adotado o nível de significância estatística de $p < 0,05$. A análise estatística foi realizada através do programa *graphpad prism v6.0* (Graphpad software, San Diego, CA).

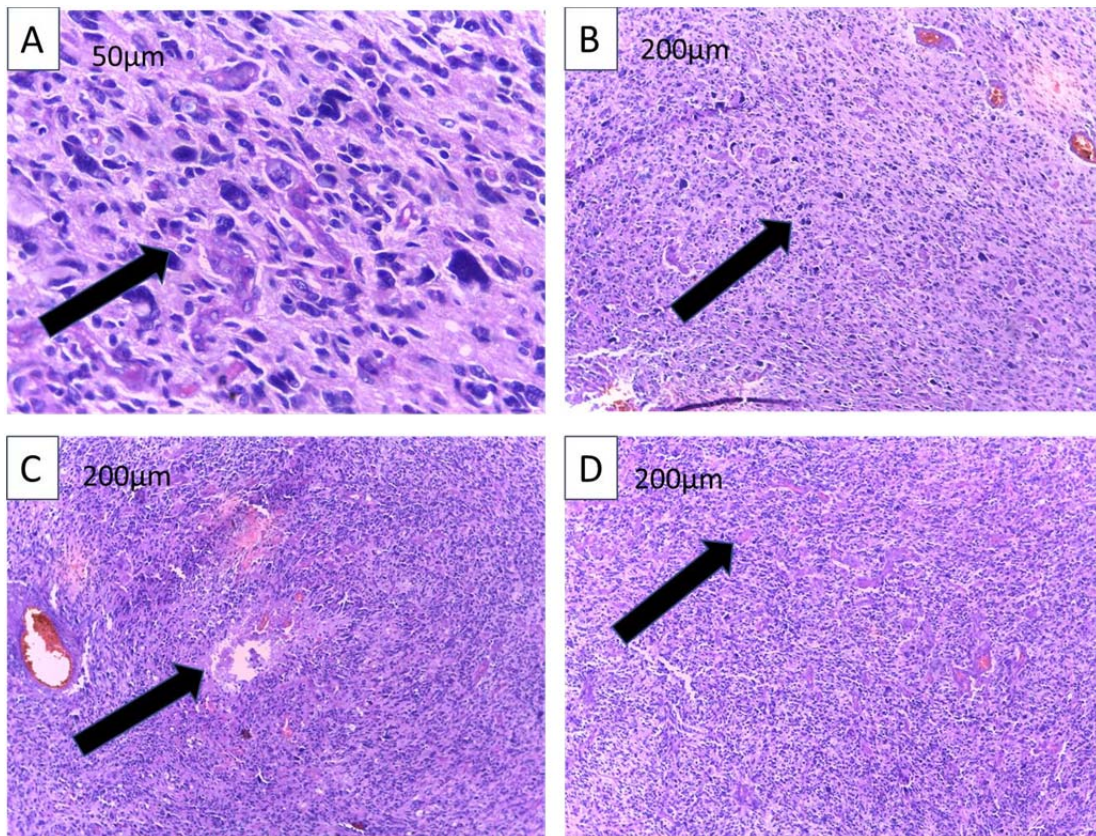
3.8.3 Análise de correlação

Para as análises de correlação, foi utilizado o teste não paramétrico de *Spearman* (distribuição não normal). Os níveis de correlação foram classificados segundo o valor do coeficiente (r) em desprezível (entre 0,00 e 0,3), baixo (entre 0,30 e 0,50), moderado (entre 0,50 e 0,70), alto (entre 0,70 e 0,90) e muito alto (entre 0,90 e 1,00), conforme ponto de corte descrito por MUKAKA (2012). Foi considerado significativo o valor de $p < 0,05$. A análise estatística foi realizada pelo programa *graphpad prism v6.0* (Graphpad software, San Diego, CA)

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Nas lâminas coradas com H&E do tecido tumoral foram identificados os principais aspectos histopatológicos dos casos de GBM, como atipia nuclear, hiper celularidade, áreas de necrose e de proliferação vascular, conforme descrito (Figura 6).



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 6 - Características microscópicas de glioblastoma (GBM). (A) Presença de atipia nuclear (seta). (B) Hiper celularidade. (C) Necrose em paliçada (seta). (D) proliferação vascular (seta).

4.2 DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ABSOLUTA E RELATIVA DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Participaram do estudo cinquenta e dois pacientes, um pouco mais da metade do sexo masculino (51,9%), a média de idade foi de 53,1 anos, idade mínima de 13 anos e máxima de 79 anos. O percentual de idosos na população de estudo foi de 21,2%. Considerou-se indivíduos idosos aqueles acima de 60 anos, conforme critério da Organização Mundial de Saúde (2002).

Quanto à localização do tumor, foram 34,6% lobo frontal, seguido de lobo parietal (32,7%) e lobo temporal (15,4%). Os tratamentos adjuvantes (pós-cirúrgicos) foram 65,4% radioterapia, 19,2% quimioterapia e 15,4% dos pacientes não realizaram tratamento pós-cirúrgico. Em 53,8% dos pacientes foram realizadas ressecção cirurgica total e 46,2% parcial. Detalhes na Tabela 1.

Tabela 1 - Distribuição das frequências absoluta e relativa das características clínicas dos pacientes com Glioblastoma atendidos no HCP e HR. 2009-2017

CARACTERÍSTICAS	N=52	%
IDADE		
Média ± DP	53,1 ± 16,6	
(Mínimo-Máximo)	(13 - 79)	
SEXO		
Masculino	27	51,9
Feminino	25	48,1
FAIXA ETÁRIA		
Menos de 50 anos	15	28,8
De 50 a 64 anos	26	50,0
65 anos e mais	11	21,2
LOCALIZAÇÃO		
Lobo frontal	18	34,6
Lobo temporal	8	15,4
Lobo Parietal	17	32,7
Outras	9	17,3
TRATAMENTO ADJUVANTE#		
Qimioterapia	10	19,2
Radioterapia	34	65,4
Não realizaram	8	15,4
TIPO DE CIRURGIA		
Parcial	24	46,2
Total	28	53,8

DP: Desvio Padrão; *outras: Lobo occipital direito, Região cervical, Atrioventricular, Mesencéfalo, Temporo-occipital e Corpo caloso. #Quimioterápico: temozolomida e bevacizumabe

4.3 ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO DA ESCALA DE KARNOFSKY PERFORMANCE STATUS (KPS) COM PRÉ E PÓS-CIRÚRGICO DOS PACIENTES COM GLIOBLASTOMA

Na análise, foi observado que houve uma alteração entre a escala de KPS com pré e pós-cirúrgico. Verificou-se uma redução de 84,0 para 32,7% de pacientes com escala $\geq 70\%$ de KPS entre o pré e pós-cirúrgico, respectivamente.

Tabela 2 - Associação entre a escala de KPS com o pré e pós cirúrgico dos pacientes com Glioblastoma atendidos no HCP e HR. 2009-2017

	PRÉ- CIRÚRGICO *N=50 (%)	PÓS- CIRÚRGICO N=52 (%)	valor p*
<i>KARNOFSKY PERFORMANCE STATUS</i> (KPS)			p<0,0001
$\geq 70\%$	42 (84,0)	17 (32,7)	
< 70%	8 (16,0)	35 (67,3)	

4.4 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE HSCORE DE RSK1, LAPTM5 E CD68 ENTRE OS GRUPOS DE PACIENTE COM KPS \geq 70% e $<$ 70% NO PRÉ- CIRÚRGICO E PÓS-CIRÚRGICO

Não foram observadas diferenças significativas dos níveis de HSCORE de RSK1, LAPTM5 e CD68 entre os grupos de pacientes com KPS \geq 70% e $<$ 70% no pré-cirurgico e pós-cirurgico (Figuras 7 e 8).

4.4.1 Avaliação da expressão diferencial de RSK1, LAPTM5 e CD68 de acordo com a idade $<$ 60 e \geq 60 anos

Foi realizada uma análise comparativa dos valores de HSCORE obtidos da marcação de RSK1, LAPTM5 e CD68 no tumor dos grupos de pacientes com idade $<$ 60 e \geq 60 anos. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos (Figura 8).

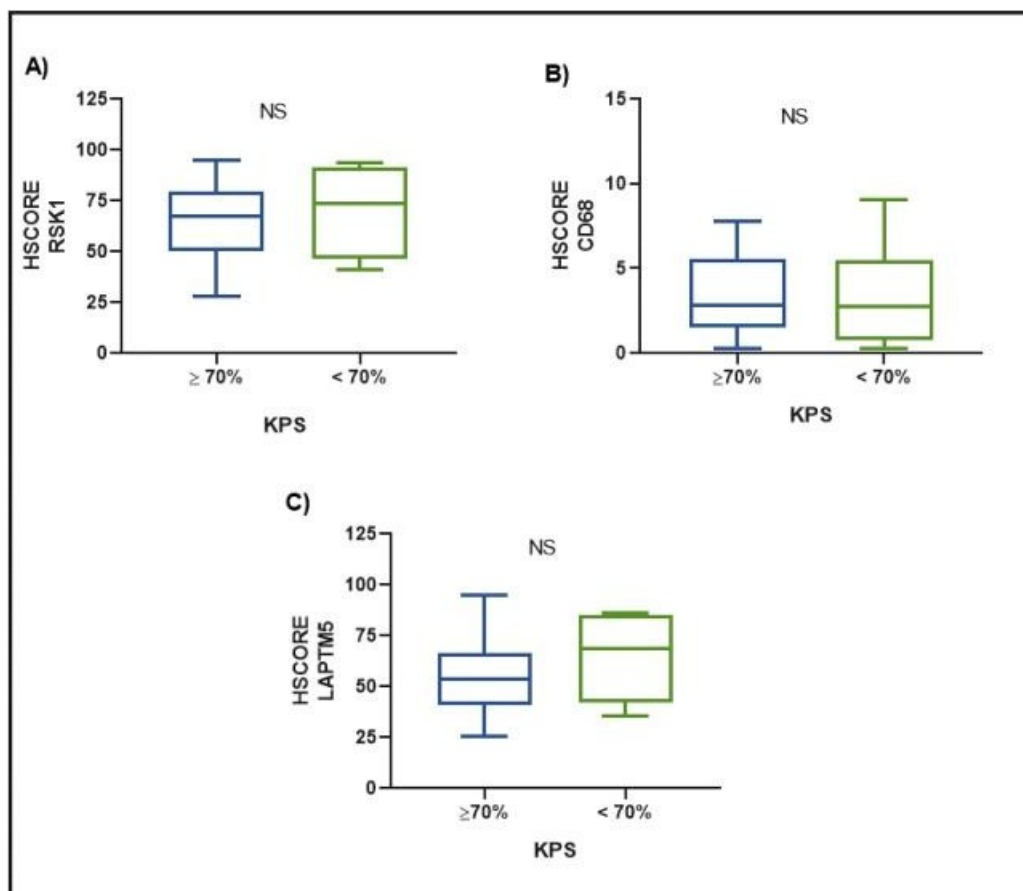


Figura 7 - Análise dos níveis de hscore de RSK1, LAPTMS e CD68 dos pacientes com GBM e Performance Status (KPS) $\geq 70\%$ (n=42) e $< 70\%$ (n=8) no pré-cirúrgico. Os gráficos estão representados em mediana e interquartil (25-75%). Teste Mann Whitney. Foi considerado significativo $p < 0.05$. NS: não significativo.

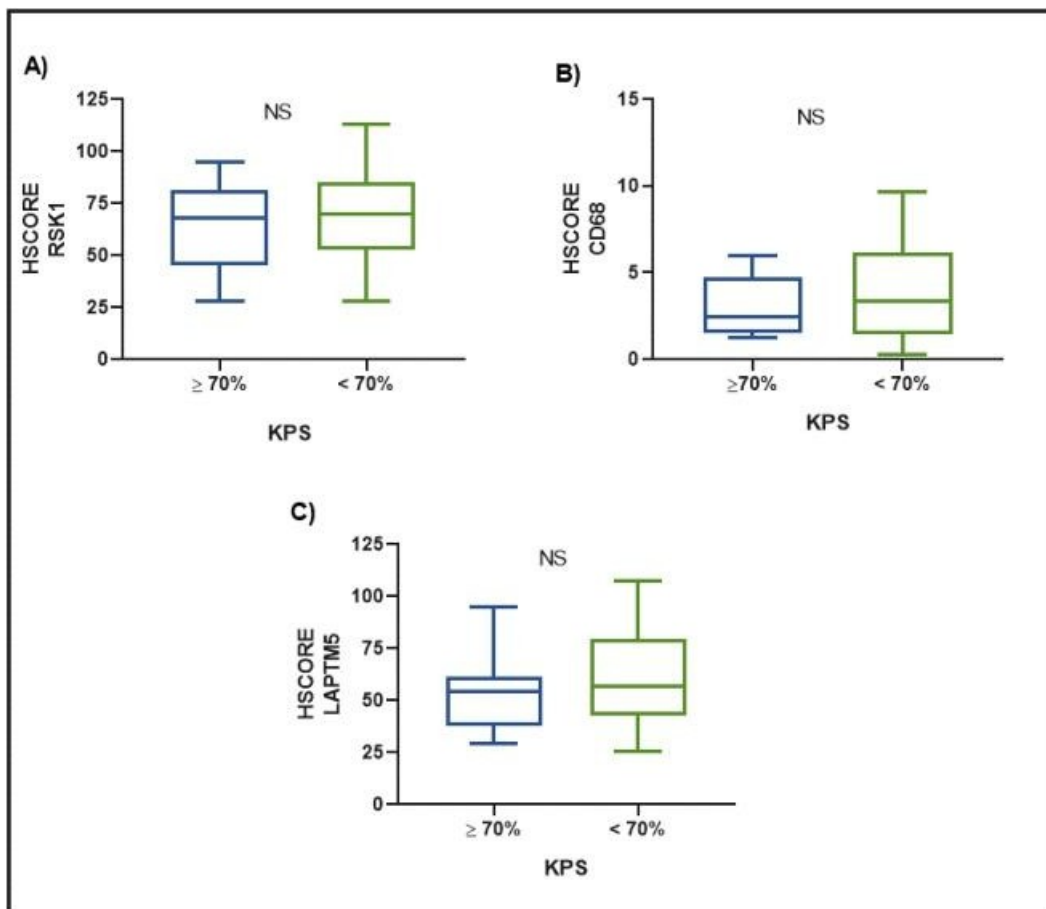


Figura 8 - Análise dos níveis de hscore de RSK1, LAPTMS e CD68 dos pacientes com GBM e Performance Status (KPS) $\geq 70\%$ (n=17) e $< 70\%$ (n=35) no pós-cirúrgico. Os gráficos estão representados em mediana e interquartil (25-75%). Teste Mann Whitney. Foi considerado significativo $p < 0.05$. NS: não significativo.

4.5 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE HSCORE DE RSK1, LAPTM5 E CD68 DOS PACIENTES COM GBM DE ACORDO COM A IDADE <60 E \geq 60 ANOS

Não foram observadas diferenças significativas dos níveis de HSCORE de RSK1, LAPTM5 e CD68 entre os grupos de pacientes com a idade <60 e \geq 60 anos (Figura 9).

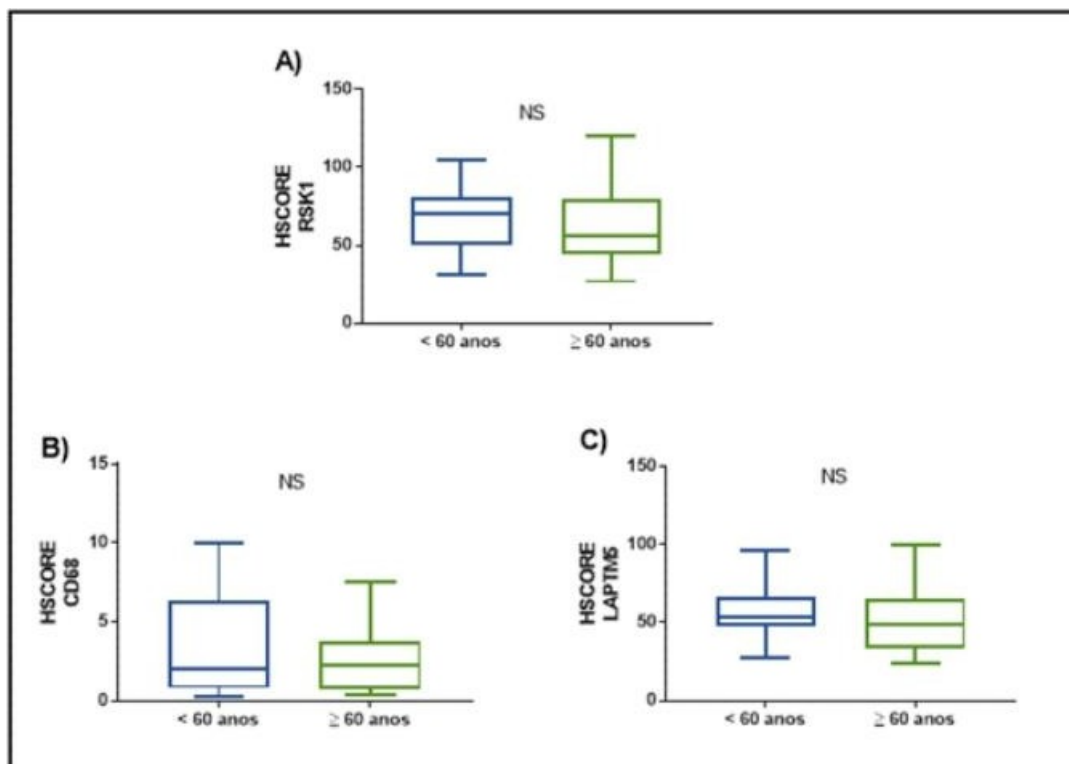


Figura 9 - Análise dos níveis de hscore de RSK1, LAPTM5 e CD68 entre os grupos de pacientes com GBM e idade <60 (n=33) e \geq 60 anos (n=19). Os gráficos estão representados em mediana e interquartil (25-75%). Teste Mann Whitney. Foi considerado significativo $p < 0.05$. NS: não significativo.

Foi realizada uma análise dos níveis de HSCORE obtidos da marcação de RSK1, LAPTM5 e CD68 no infiltrado tumoral dos grupos de pacientes que apresentaram tumores na regiões frontal, temporal e parietal. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos (Figura 10).

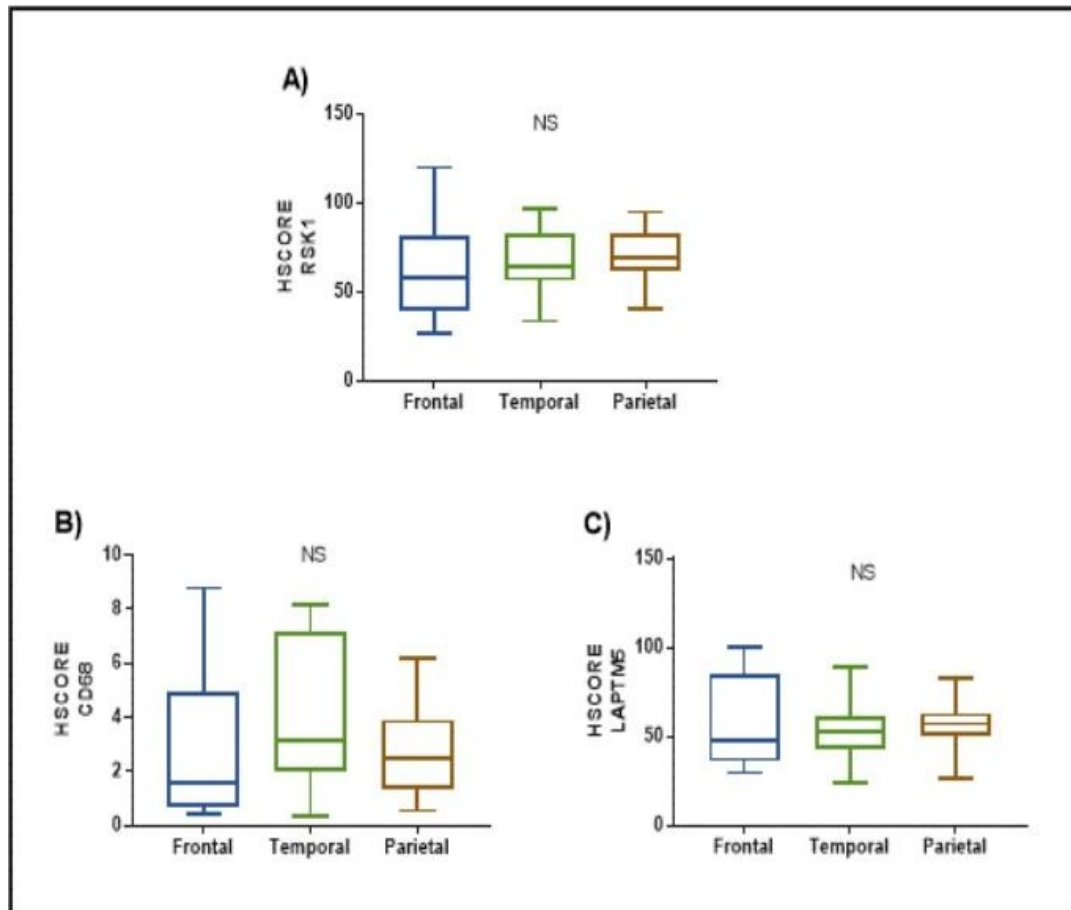


Figura 10 - Análise dos níveis de hscore de RSK1, LAPTM5 e CD68 entre os grupos de pacientes com localização do tumor frontal (n=18), temporal (n=8) e parietal (n=17). Os gráficos estão representados em mediana e interquartil (25-75%). Teste Mann Whitney. Foi considerado significativo $p < 0.05$. NS: não significativo.

4.7 ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE HSCORE DE RSK1, CD68 E LAPTM5

Na análise de correlação entre os níveis das proteínas, foi observado que existe correlação positiva moderada entre a expressão de RSK1 e LAPTM5 ($r=0.63$; $p<0,0001$) e RSK1 e CD68 ($r=0.57$, $p<0,0001$) e baixa entre CD68 e LAPTM5 ($r=0.40$, $p=0,005$), como mostra a Figura 11.

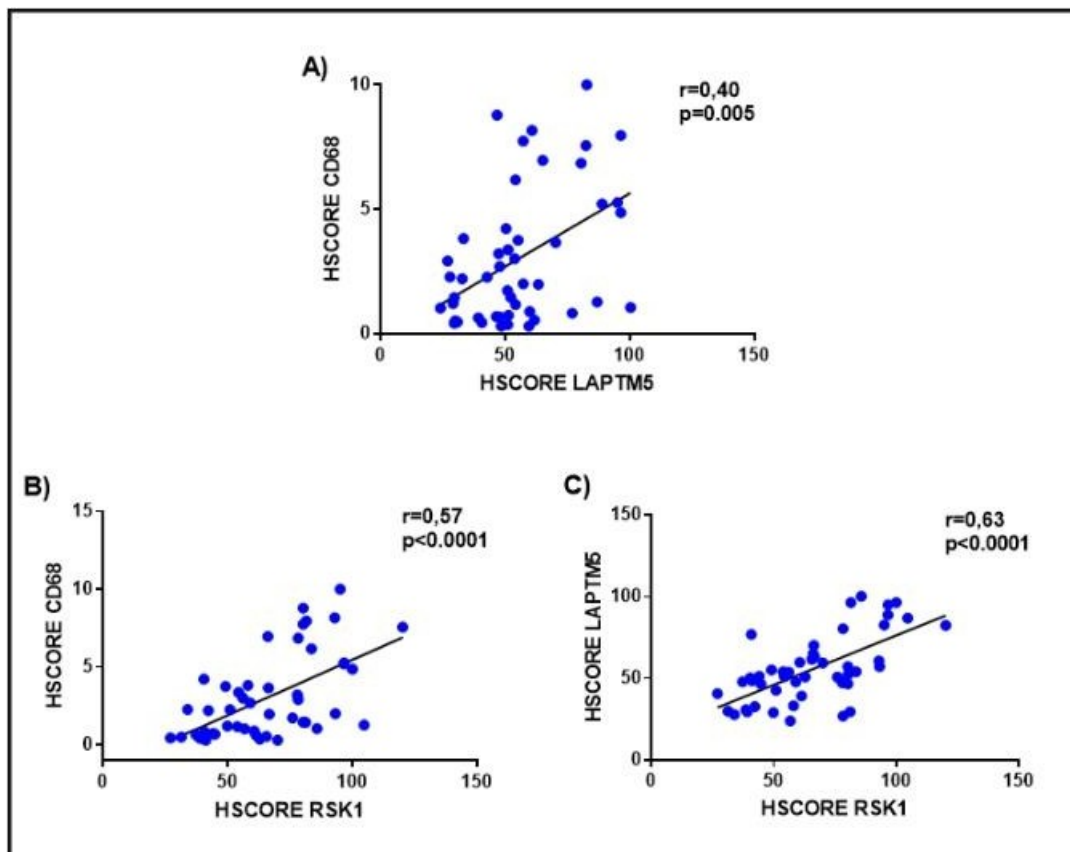


Figura 11 - Análise de correlação entre os níveis de RSK1, CD68 e LAPTM5 nos tecidos dos pacientes com GBM. Teste de correlação Pearson. Foi considerado significativo $p<0,05$.

4.8 ANÁLISE DE SOBREVIDA GLOBAL

4.8.1 Sobrevida global entre os grupos de pacientes com expressão de RSK1_{lo} e RSK1_{hi}

A mediana da sobrevida global em meses do grupo de pacientes com expressão de RSK1_{lo} foi de aproximadamente 17 meses, enquanto que o grupo com expressão RSK1_{hi} foi de aprox. 6 meses (Log-Rank $p < 0,001$), considerando o tempo de sobrevida entre o dia do diagnóstico e o último dia de seguimento (óbito ou última consulta) (Figura 12).

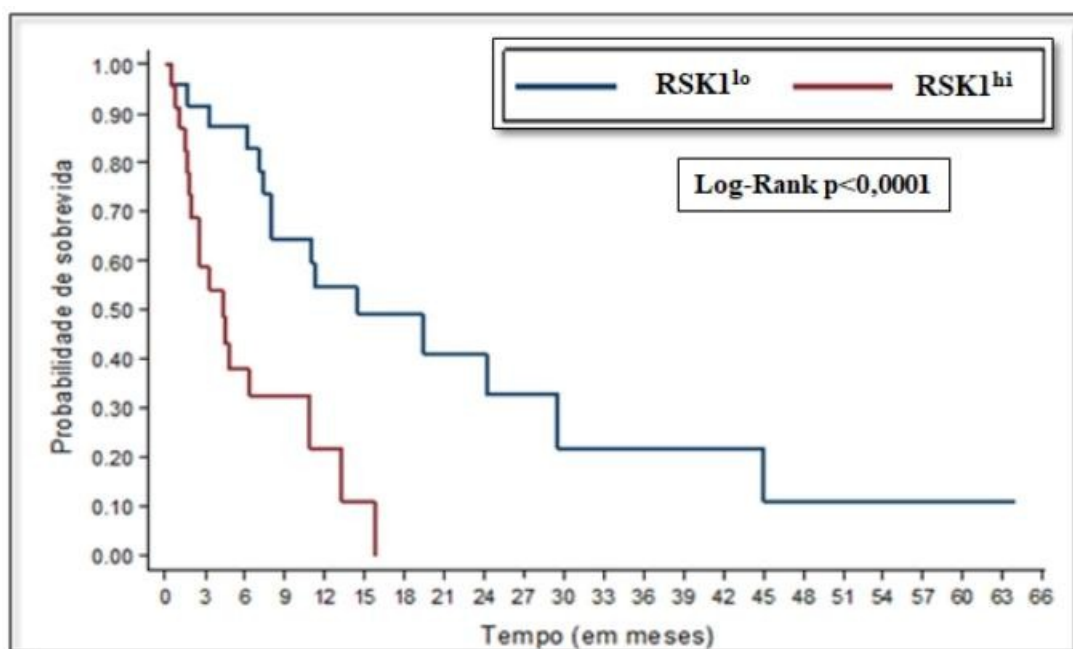


Figura 12 - Sobrevida global (meses) dos pacientes com GBM de acordo com expressão de RSK1_{lo} (n=24) e RSK1_{hi}(n=25). Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP) e Hospital da Restauração, Recife-PE 2015-2017. Teste de log-rank. Foi considerado significativo $p < 0,05$

4.8.2 Sobrevida global entre os grupos de pacientes com expressão de LAPT_{M5lo} e LAPT_{M5hi}

A mediana da sobrevida global em meses do grupo de pacientes com expressão de LAPT_{M5lo} foi de aproximadamente 12 meses, enquanto que o grupo com expressão LAPT_{M5hi} foi de aprox. 5 meses (Log-Rank $p < 0,025$), considerando o tempo de sobrevida entre o dia do diagnóstico e o último dia de seguimento (óbito ou última consulta) (Figura 13).

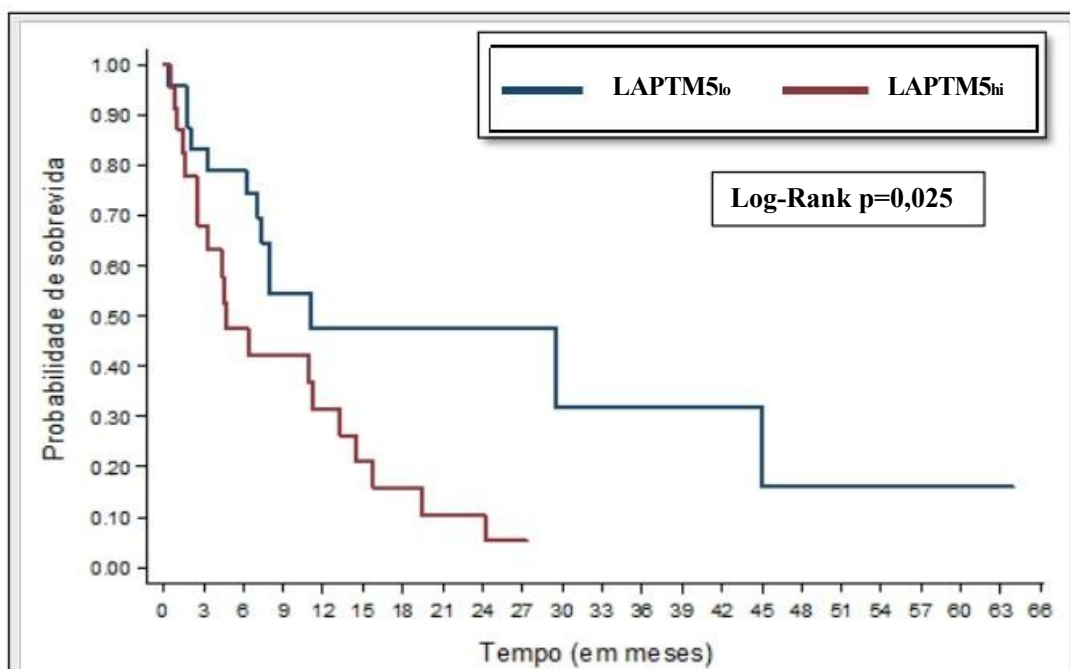


Figura 13 - Sobrevida global (meses) dos pacientes com GBM de acordo com expressão de LAPT_{M5lo} (n=24) e LAPT_{M5hi} (n=25) Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP) e Hospital da Restauração, Recife-PE 2015-2017. Teste de log-rank. Foi considerado significativo $p < 0,05$

4.8.3 Sobrevida global entre os grupos de pacientes com expressão de CD68^{lo} e CD68^{hi}

A mediana da sobrevida global em meses do grupo de pacientes com expressão de CD68^{lo} foi de aproximadamente 12 meses, enquanto que o grupo com expressão CD68^{hi} foi de aprox. 6 meses (Log-Rank $p < 0,027$), considerando o tempo de sobrevida entre o dia do diagnóstico e o último dia de seguimento (óbito ou última consulta) (Figura 14).

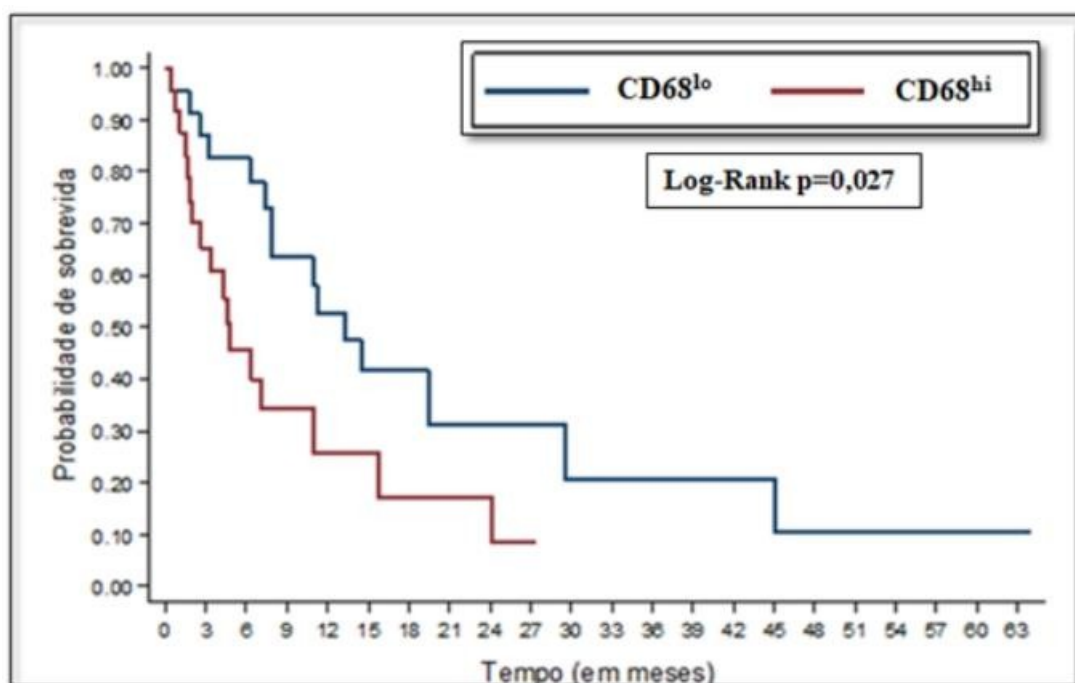


Figura 14 - Sobrevida global (meses) dos pacientes com GBM de acordo com expressão de CD68^{lo} (n=23) e CD68^{hi} (n=26) Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP) e Hospital da Restauração, Recife-PE 2015-2017. Teste de log-rank. Foi considerado significativo $p < 0,05$.

4.8.4 Análise univariada e multivariada de Cox para estimar o risco de óbito dos pacientes com GBM

Na análise de regressão múltipla, as variáveis RSK1, LPATM5 e CD68 foram avaliadas, uma vez que estas, dentre todas as variáveis analisadas, foram as que mantiveram $p < 0,2$ na análise univariada. Na análise de regressão múltipla, RSK1 (HR=4,08; IC 95%: 1,69-9,84; $p=0,002$), LAPTM5 (HR=2,28; IC 95%: 1,05-4,93; $p=0,037$) e CD68 (HR=2,04; IC 95%: 0,94-4,41; $p=0,032$) permaneceram no modelo, como variáveis de valor independente na análise de risco de óbito (Tabela 3).

Tabela 3 - Análise univariada e multivariada de Cox para estimar o risco de óbito dos pacientes com GBM (n=49). HCP/HR 2009-2017.

VARIÁVEIS	REGRESSÃO SIMPLES			p-valor	REGRESSÃO MÚLTIPLA			p-valor
	HR	IC 95%			HR	IC 95%		
RSK				0,001				0,002
RSK ^{lo} vs RSK ^{hi}	3,92	1,73	8,89		4,08	1,69	9,84	
LAPTM5				0,027				0,037
LAPTM5 ^{lo} vs LAPTM5 ^{hi}	2,31	1,10	4,88		2,28	1,05	4,93	
CD68				0,033				0,032
CD68 ^{lo} vs CD68 ^{hi}	2,22	1,06	4,64		2,04	0,94	4,41	

4.9 IMUNOHISTOQUÍMICA DE RSK1, LAPTM5 E CD68

A imagem da análise de imunohistoquímica mostra a intensidade de expressão das proteínas RSK1, LAPTM5 e CD68. Tiveram as amostras com alta expressão (high expression) e baixa expressão (low Expression). (Figura 15).

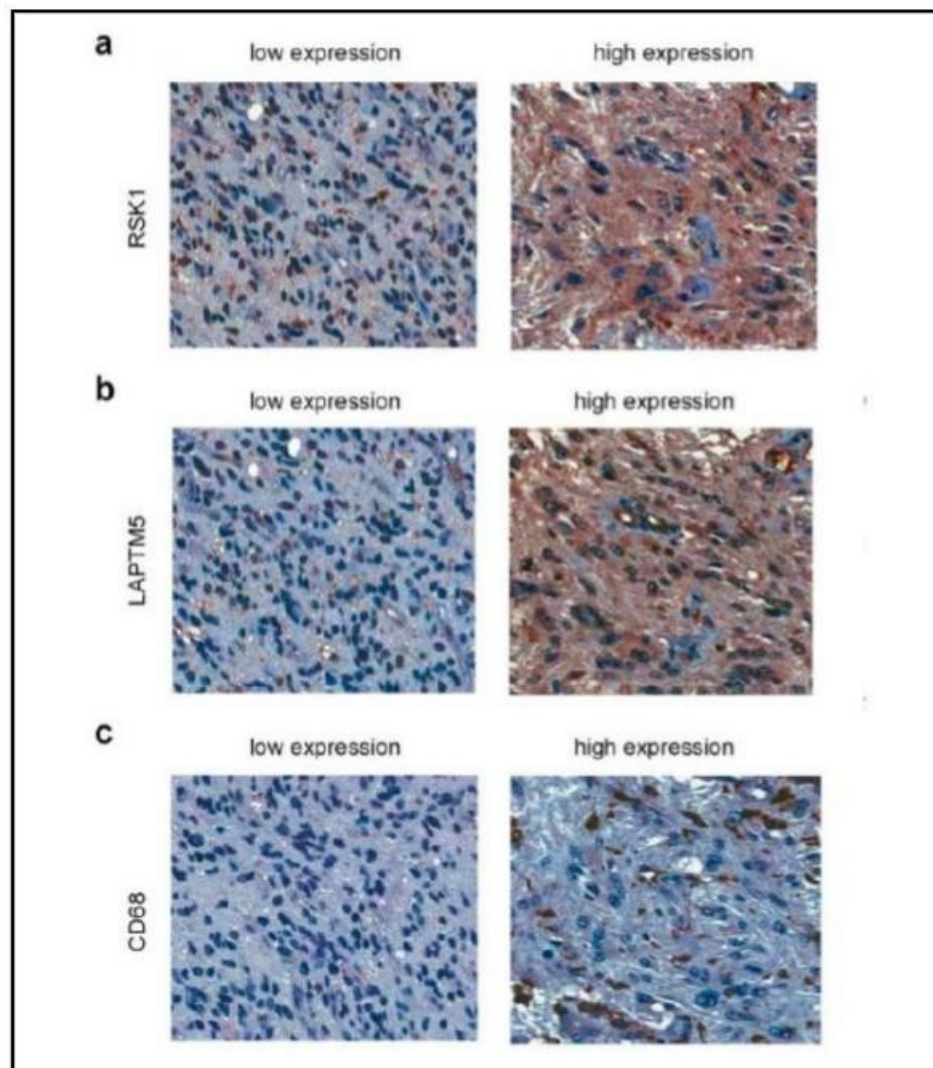


Figura 15 - Imunomarcação das proteínas RSK1, LAPTM5 e CD68. Baixa expressão – “low expression” (colunas á esquerda) e superexpressão – “high expression” (colunas á direita). A) RSK1 lo,RSK1hi, B)LAPTM5 lo, LAPTM5 hi, C) CD68 lo, CD68 hi.Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP) e Hospital da Restauração, Recife-PE 2015-2017.

5 DISCUSSÃO

O GBM corresponde a um dos tumores mais agressivos do SNC. A complexidade das vias envolvidas na tumorigênese e a grande capacidade dos GBMs de desenvolver resistência torna difícil a predição de sobrevida dos pacientes, assim como os potenciais alvos terapêuticos mais efetivos no controle da proliferação tumoral de alta malignidade no GBM (TAMIMI e JUWEID 2017). Dessa forma, este estudo investigou o possível envolvimento de três potenciais marcadores (RSK1, LAPTM5 e CD68) em relação com características clínicas do GBM, assim como o impacto da expressão desses marcadores associados a sobrevida global dos pacientes com GBM.

Nesse estudo observamos de forma geral que todos os pacientes selecionados possuíam alterações histológicas compatíveis com o diagnóstico de GBM. A análise histológica mostrou a presença de atipia celular, hiper celularidade, necrose tecidual com padrão serpiginoso de fita de células tumorais em torno de centros necróticos e proliferação vascular. Essa característica tecidual é conhecida como necrose pseudopalisante (ZHANG et al. 2016).

Com relação as características clínicas, observamos maior frequência de GBM em adultos acima de 50 anos, nesse estudo encontramos uma faixa etária mediana em torno de 58 anos de idade. Existem poucos estudos reportando a frequência de GBM em Recife, comparativamente (LUCENA et al. 2006) obteve perfil epidemiológico bastante similar ao encontrado no presente estudo em que o GBM acometeu a maioria adultos acima de 55 anos. Destaca-se também que o

presente estudo retratou similaridade aos estudos globais que indicam maior frequência de GBM em pacientes na faixa etária entre 55 a 60 anos (THAKKAR et al. 2014).

Nas análises de gênero, obtivemos maior número de pacientes do sexo masculino (51,9%). Esse resultado confirma as estimativas da maioria dos estudos epidemiológicos, nos quais existe uma prevalência maior em homens. Observa-se também que a diferença entre os gêneros nesse estudo foi pequena (homens: 51,9% e mulheres: 48,1%) em comparação aos estudos globais, nos quais a incidência de GBM é aproximadamente 1,6 vezes maior em homens (THAKKAR et al. 2014; TAMIMI e JUWEID 2017).

Em relação à localização do tumor, obtivemos maior frequência de GBM no lobo frontal esquerdo em 31,4% das amostras analisadas. Esse resultado corrobora a frequência comumente encontrada em vários estudos globais, assim como com a média encontrada na cidade de Recife segundo estudo realizado por LUCENA et al (2006) que retrata 40% de acometimento na região frontal. A maioria dos estudos indicam que o GBM é encontrado principalmente na região supratentorial (frontal, temporal, parietal e lobos occipitais) tendo a maior incidência no lobo frontal principalmente em idosos entre 62 a 64 anos (CHAKRABARTI et al. 2005; ENGELHARD et al. 2010; ADAMS et al. 2013).

O tipo prevalente de cirurgia foi a ressecção total em 53,8% dos casos analisados. Estudos apontam o procedimento cirúrgico como uma intervenção importante no GBM, pois além de fornecer a confirmação para o diagnóstico via análise histológica, promove um efeito descompressor (TAMIMI e JUWEID 2017). Pacientes submetidos a cirurgia, especialmente a ressecção total possuem maior

vantagem de sobrevida (STUMMER et al. 2008). No entanto, a cirurgia de ressecção total é contraindicada em pacientes com KPS < 70 e idade avançada (WILSON et al. 2014). Nossos dados demonstram que apenas 34% dos pacientes mantiveram índices de KPS acima de 70 após o procedimento cirúrgico.

Nesse estudo o tratamento adjuvante mais comumente adotado foi a radioterapia (66,7%). Recomenda-se a radioterapia associada a temozolomida (TMZ) por resultar em maior sobrevida comparada a radioterapia como monoterapia (STUPP et al. 2005). No entanto, apenas 15% dos pacientes desse estudo foram submetidos a tratamento com TMZ. Nesse aspecto, deve-se considerar que todas as amostras selecionadas para a análise foram provenientes de pacientes do SUS e a baixa utilização de TMZ pode ser um reflexo da falta de acesso ao medicamento. Em 2014, a comissão nacional de incorporação de tecnologias no SUS (CONITEC) decidiu pela não incorporação de TMZ para o tratamento pós-operatório de pacientes portadores de gliomas de alto grau no âmbito do Sistema Único de Saúde.

As causas associadas ao GBM ainda não foram completamente elucidadas, mas pode-se atribuir seu desenvolvimento a uma rede complexa de diferentes alterações genéticas e moleculares, levando a mudanças significativas nas vias de sinalização celular responsáveis pela proliferação celular, vasculogênese, apoptose e inflamação (LOMBARDI e ASSEM 2017). Em geral, as principais vias alteradas nos gliomas estão relacionadas a superexpressão de fatores de crescimento celular ou seus receptores. Estes fatores quando excessivamente estimulados, promovem a ativação da via MAPK quinase e a subsequentemente fosforilação de fatores transcricionais que afetam a expressão gênica e o crescimento celular (MAWRIN et al. 2013). Alguns estudos apontam que a via de ativação das quinases MAPKs está

associada a progressão dos gliomas e a pior prognóstico (MAWRIN et al. 2013). As quinases MAPKs, em especial as quinases ERK1/2, responde pela fosforilação e ativação das quinases RSKs, estas quando ativadas regulam a proliferação, transcrição e regulação da apoptose celular (HAUGE e FRÖDIN 2006; ROMEO et al. 2011). Poucos estudos analisaram a importância das RSKs para GBM. Nos mesmos, a isoforma principalmente estudada foi a RSK2. No entanto, esses estudos demonstram problemas metodológicos, por exemplo, o uso do inibidor de RSK, BI-D1870, o qual tem efeitos off-target na via de mTORC1 (SULZMAIER e RAMOS 2013; ROFFÉ et al. 2015).

No presente estudo avaliamos a expressão da isoforma RSK1 sobre a sobrevida global em amostras de GBM. Observamos que o grupo de pacientes com alta expressão de RSK1 obtiveram uma menor sobrevida que o grupo expressando baixos níveis de RSK1. Além disso, verificou-se que pacientes com alta expressão de RSK1 obtiveram cerca de quatro vezes mais probabilidade de óbito. Comparativamente, o estudo de SULZMAIER et al. (2016) demonstrou que a expressão da isoforma RSK2 em GBMs correlaciona-se a maior gravidade tumoral e a baixa sobrevida. Existem algumas vieses do estudo que tornam imprecisas a extrapolação dos resultados de SULZMAIER et al. (2016) para todos os pacientes com GBM, pois sua amostra incluía portadores de gliomas de vários graus. O artigo recém submetido de Hajj et al. (submetido) (Apêndice 2) demonstra que os efeitos mais importantes foram reportados mais a nível de expressão de RSK1, assim como o observado no presente estudo.

Além da avaliação de RSK1, avaliamos a expressão das proteínas LAPTM5 e CD68 nas amostras de GBM. Ambas possuem importância na ativação do processo inflamatório e infiltração da micróglia (LISI et al. 2014; NUYLAN et al. 2016). Essas

proteínas foram escolhidas baseado no estudo de Hajj et al. (submetido) (Apêndice 2), em que os GBMs apresentando maiores níveis de RSK1 tinham enriquecimento na expressão do mRNA codificando LAPT5 (associado com o subtipo mesenquimal do TCGA) e CD68 (associado com infiltrado imune).

A proteína LAPT5 é normalmente encontrada em vesículas intracelulares, seu acúmulo induz a morte celular via desestabilização lisossômica. Esse mecanismo está associado a regressão em neuroblastomas e portanto a um prognóstico favorável (NUYLAN et al. 2016). Entretanto, o efeito protetor relacionado a superexpressão de LAPT5 não foi relatado para o GBM. Dados de uma pesquisa recente mostram que o gene responsável pela expressão de LAPT5 está associado ao módulo de genes que sofrem regulação positiva e a pior prognóstico no GBM (DUNWOODIE et al. 2018). Comparativamente, no presente estudo as amostras de pacientes com alta expressão de LAPT5 também apresentaram pior sobrevida, em que o risco de óbito foi estimado em 2,28 vezes maior em pacientes com alta expressão de LAPT5.

A proteína CD68 é um importante marcador da presença de macrófagos associados a tumores, os quais respondem pela produção de citocinas anti-inflamatórias que beneficiam a sobrevivência de células no microambiente tumoral (LISI et al. 2014). No presente estudo identificamos que a alta expressão de CD68 esteve associada a menor sobrevida. Comparativamente, os dados de uma análise realizada a partir de bancos de dados genômicos também correlacionou a expressão aumentada de CD68 a pior prognóstico (WANG et al. 2017).

Neste estudo não foi possível detectar IDH1 mutado na R132H na imunohistoquímica, este aspecto pode ser decorrente do baixo índice de mutações para IDH1 nos tumores primários (5%) (KLOOSTERHOF et al. 2011). Assim como, o

quantitativo da amostra ser considerado pequeno para refletir esse índice para tumores primários que constitui a maioria da população deste estudo. No entanto, no artigo de Hajj et al. (submetido) (Apêndice 2) observamos que em tumores com níveis maiores de RSK1, IDH1R132H está menos representada, demonstrando que níveis aberrantes altos de RSK1 são em geral uma característica de GBMs primários.

Avaliou-se a possível correlação entre as expressões de RSK1, CD68 e LAPTM5. Nossos resultados mostram que a expressão de RSK1 esteve associada a LAPTM5 ($r=0,62$), $p<0,0001$ e CD68 ($r=0,62$), $p<0,0001$ em mesmo grau. Um coeficiente menor de correlação existiu entre LAPTM5 e CD68 ($r=0,58$) com $p<0,0005$. No presente estudo também investigamos a possível correlação de faixas etárias com a expressão de RSK1, LAPTM5 e CD68. No entanto, não obtivemos diferenças significativas da expressão desses marcadores entre os grupos etários analisados, sugerindo que o aumento da expressão destes marcadores não segue o aumento da faixa etária. De maneira similar, não foi encontrada associação entre a performance status (KPS) com as expressões dos marcadores RSK1, LAPTM5 e CD68 em pacientes com KPS >70 e abaixo de 70 antes e após o procedimento cirúrgico.

No aspecto localização do tumor obtivemos maior positividade de marcação de RSK1, LAPTM5 e CD68 no lobo frontal, constituindo-se também a região de maior frequência para os GBMs estudados. Em relação à expressão de CD68, observamos também alta expressão na região temporal. Dados de estudos anatômicos indicam que os gliomas originam-se principalmente de estruturas subcorticais, as quais detêm maior densidade de células gliais, especialmente nos lobos frontal e temporal (LARJAVAARA et al. 2007).

Com este estudo foi possível identificar outros marcadores envolvidos nos

mecanismos do glioblastomas e que poderiam ser alvos terapêuticos, além de possíveis marcadores de prognóstico nos pacientes. É uma doença grave com elevada mortalidade e estudos que ampliam o conhecimento científico sobre os mecanismos moleculares envolvidos oncogênese do GBM são fundamentais para o desenvolvimento de novas terapias alvos.

6 CONCLUSÃO

- A falta de tratamento quimioterápico com Temozolomida nos hospitais do SUS de Recife, pode ter favorecido para a redução do KPS em pacientes pós cirúrgicos, porém devido ao baixo quantitativo de pacientes em uso de TMZ não podemos avaliar essa correlação;
- Níveis altos de RSK1, LAPTM5 e CD68 estão correlacionados com pior sobrevida dos pacientes portadores de GBM e são indicativos de baixo prognóstico;
- A superexpressão de RSK1 detém maior impacto sobre a sobrevida dos pacientes com GBM;
- A expressão de RSK1 está também relacionada a LAPTM5 e CD68;
- Tratamentos que reduzam a expressão e/ou atividade de RSK1 podem ser um potencial alvo terapêutico, o que poderia estar relacionado com a modulação do infiltrado imune em GBMs com níveis aumentados de RSK1.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams H, Chaichana KL, Avendaño J, Liu B, Raza SM, Quiñones-Hinojosa A. Adult cerebellar glioblastoma: understanding survival and prognostic factors using a population-based database from 1973 to 2009. **World Neurosurg** 2013; 80:e237-43.

Akhavan D, Cloughesy TF, Mischel PS. mTOR signaling in glioblastoma: lessons learned from bench to bedside. **Neuro Oncol** 2010b; 12:882-9.

Alentorn A, Marie Y, Carpentier C, et al. Prevalence, clinico-pathological value, and co-occurrence of PDGFRA abnormalities in diffuse gliomas. **Neuro Oncol** 2012; 14:1393-403.

Alvarenga AW, Coutinho-Camillo CM, Rodrigues BR, et al. A comparison between manual and automated evaluations of tissue microarray patterns of protein expression. **J Histochem Cytochem** 2013; 61:272-82.

Anjum R, Blenis J. The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signalling. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2008; 9:747-58.

Ballif BA, Blenis J, Roux PP, Anjum R, Gygi SP. Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. **Proc Natl Acad Sci** 2004; 101:13489-94.

Brennan CW, Verhaak RGW, McKenna A, et al. The somatic genomic landscape of glioblastoma. **Cell** 2013; 155:462-77.

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

Cargnello M, Roux PP. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. **Microbiol Mol Biol Rev** 2011; 75:50-83.

Carrière A, Cargnello M, Julien LA, et al. Oncogenic MAPK signaling stimulates mTORC1 activity by promoting RSK-mediated raptor phosphorylation. **Curr Biol** 2008; 18:1269-77.

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

Chen Z, Hambardzumyan D. Immune microenvironment in glioblastoma subtypes. **Front Immunol** 2018; 9:1004.

Choi J, Stradmann-Bellinghausen B, Savaskan N, Regnier-Vigouroux A. Human monocyte-derived macrophages exposed to glioblastoma cells and tumor-associated microglia/macrophages differ in glutamatergic gene expressions. **Glia** 2015; 63:1205-13.

Crespo I, Vital AL, Gonzalez-Tablas M, et al. Molecular and genomic alterations in glioblastoma multiforme. **Am J Pathol** 2015; 185:1820-33.

D'Angelo F, Ceccarelli M, Tala, et al. The molecular landscape of glioma in patients with Neurofibromatosis 1. **Nat Med** 2019; 25:176-87.

De Vleeschouwer S, Bergers G. Glioblastoma: to target the tumor cell or the microenvironment?. In: De Vleeschouwer S, editor. **Glioblastoma**. Brisbane: Codon Publ; 2017. Chap. 16. Available from: <URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470004>> [2018 dez 13]

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

Dunwoodie LJ, Poehlman WL, Ficklin SP, Feltus FA. Discovery and validation of a glioblastoma co-expressed gene module. **Oncotarget** 2018; 9:10995-11008.

Eisinger-Mathason TSK, Andrade J, Lannigan DA. RSK in tumorigenesis: connections to steroid signaling. **Steroids** 2010; 75:191-202.

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

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

Glowacka WK, Alberts P, Ouchida R, Wang JY, Rotin D. LAPTM5 protein is a positive regulator of proinflammatory signaling pathways in macrophages. **J Biol Chem** 2012; 287:27691-702.

Grzmil M, Hemmings BA. Deregulated signalling networks in human brain tumours. **Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics** 2010; 1804:476-83.

Guertin DA, Sabatini DM, Medical H. The pharmacology of mTOR inhibition. 2009; 2:1-7.

Gulmann C, Butler D, Kay E, Grace A, Leader M. Biopsy of a biopsy : validation of immunoprofiling in gastric cancer biopsy tissue microarrays. **Histopathology** 2003; 42; 70-6.

Hauge C, Frödin M. RSK and MSK in MAP kinase signalling. **J Cell Sci** 2006; 119:3021-3.

Hewedi IH, Radwan NA, Shash LS, Elserry TH. Perspectives on the immunologic microenvironment of astrocytomas. **Cancer Manag Res** 2013; 5:293-9.

Huang PH, Xu AM, White FM. Oncogenic EGFR signaling networks in glioma. **Sci Signal** 2009; 2:re6.

Kloosterhof NK, Bralten LBC, Dubbink HJ, French PJ, Van den Bent MJ. Isocitrate dehydrogenase-1 mutations: A fundamentally new understanding of diffuse glioma? **Lancet Oncol** 2011; 12:83-91.

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

Koul D. PTEN signaling pathways in glioblastoma. **Cancer Biol Ther** 2008; 7:1321-5.

Langhans J, Schneele L, Trenkler N, et al. The effects of PI3K-mediated signalling on glioblastoma cell behaviour. **Oncogenesis** 2017; 6: 398.

Lapa C, Linsenmann T, Lückerath K, et al. Tumor-associated macrophages in glioblastoma multiforme: a suitable target for somatostatin receptor-based imaging and therapy? **PLoS One** 2015; 10:e0122269.

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

Lisi L, Navarra P, Stigliano E, Russo C DELLO, Lauriola L. Proinflammatory-activated glioma cells induce a switch in microglial polarization and activation status, from a predominant M2b phenotype to a mixture of M1 and M2a/B polarized cells. **ASN Neuro** 2014; 6:AN20130045.

Lombardi MY, Assem M. Glioblastoma genomics: a very complicated story. In: De Vleeschouwer S, editor. **Glioblastoma**. Brisbane: Codon Publ; 2017. Chap 1. Available from: <URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470004>> [2018 dez 13]

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

Lucena Rde C, de Mello RJ, Lessa JR Jr, Cavalcante GM, Ribeiro M. [Clinical topographic findings in glioblastoma multiforme and the relation with motor impairment]. **Arq Neuropsiquiatr** 2006; 64:441-5.

Mao H, Lebrun DG, Yang J, Zhu VF, Li M. Deregulated signaling pathways in glioblastoma multiforme: Molecular mechanisms and therapeutic targets. **Cancer Invest** 2012; 30:48-56.

Mawrin C, Dietsch S, Treuheit T, et al. Prognostic relevance of MAPK expression in glioblastoma multiforme. **Int J Oncol** 2003; 23:641-8.

Matheu A, Maraver A, Serrano M. The Arf/p53 pathway in cancer and aging. **Cancer Res** 2008; 68:6031-4

McLendon R, Friedman A, Bigner D, et al. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. **Nature** 2008; 455:1061-8.

Melendez ND, Smoller BR, Morgan M. VCAM (CD-106) and ICAM (CD-54) adhesion molecules distinguish keratoacanthomas from cutaneous squamous cell carcinomas. **Mod Pathol** 2003; 16:8-13.

Meletis K. p53 suppresses the self-renewal of adult neural stem cells. **Development** 2005; 133:363-9.

Mukaka M. Statistics corner: a guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. **J Med Assoc Malawi** 2012; 24:69-71.

Nicholas MK, Lukas R V., Jafri NF, Faoro L, Salgia R. Epidermal growth factor receptor-mediated signal transduction in the development and therapy of gliomas. **Clin Cancer Res** 2006; 12:7261-70.

Nuylan M, Tatsuyuki K, Inazawa J, Inoue J. Down-regulation of LAPTM5 in human cancer cells. **Oncotarget** 2016; 7:28320-8.

Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, et al. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. **Cancer Res** 2004; 64:6892-9.

Olar A, Wani KM, Alfaro KD, et al. IDH mutation status and role of WHO grade and mitotic index in overall survival in grade II - III diffuse gliomas. **Acta Neuropathol** 2015; 129:585-96.

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

Onofrio R, Shi X, Meyer R, et al. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. **Nature** 2008; 455:1061-8.

Ostrom QT, Gittleman H, Xu J, et al. CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2009-2013. **Neuro Oncol** 2016; 18:v1-v75.

Ouchida R, Kurosaki T, Wang J-Y. A role for lysosomal-associated protein transmembrane 5 in the negative regulation of surface B cell receptor levels and B cell activation. **J Immunol** 2010; 185:294-301.

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

Patil CG, Nuño M, Elramsisy A, et al. High levels of phosphorylated MAP kinase are associated with poor survival among patients with glioblastoma during the temozolomide era. **Neuro Oncol** 2013; 15:104-11.

Perry A, Wesseling P. Histologic classification of gliomas. **Handb Clin Neurol** 2016; 134:71-95.

Philpott C, Tovell H, Frayling IM, Cooper DN, Upadhyaya M. The NF1 somatic mutational landscape in sporadic human cancers. **Hum Genomics** 2017; 21:11:13.

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

Roffé M, Lupinacci FC, Soares LC, Hajj GN, Martins VR. Two widely used RSK inhibitors, BI-D1870 and SL0101, alter mTORC1 signaling in a RSK-independent manner. **Cell Signal** 2015; 27:1630-42.

Romeo Y, Zhang X, Roux PP. Regulation and function of the RSK family of protein kinases. **Biochem J** 2011; 441:553-69.

Roux PP, Shahbazian D, Vu H, et al. RAS/ERK signaling promotes site-specific ribosomal protein S6 phosphorylation via RSK and stimulates cap-dependent translation. **J Biol Chem** 2007; 282:14056-64.

Sanchez-Vega F, Mina M, Armenia J, et al. Oncogenic Signaling Pathways in The Cancer Genome Atlas. **Cell** 2018; 173:321-337.e10.

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.

Shahbazian D, Roux PP, Mieulet V, et al. The mTOR/PI3K and MAPK pathways converge on eIF4B to control its phosphorylation and activity. **EMBO J** 2006; 25:2781-91.

Shangary S, Wang S. Small-molecule inhibitors of the MDM2-p53 protein-protein interaction to reactivate p53 Function: a novel approach for cancer therapy. **Annu Rev Pharmacol Toxicol** 2008; 49:223-41.

Sulzmaier FJ, Ramos JW. RSK isoforms in cancer cell invasion and metastasis. **Cancer Res** 2013; 73:6099-105.

Sulzmaier FJ, Young-Robbins S, Jiang P, et al. RSK2 activity mediates glioblastoma invasiveness and is a potential target for new therapeutics. **Oncotarget** 2016; 7:79869-84.

Stummer W, Reulen HJ, Meinel T, et al. Extent of resection and survival in glioblastoma multiforme: identification of and adjustment for bias. **Neurosurgery** 2008; 62:564-76; discussion 564-76.

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.

Tamimi AF, Juweid M. Epidemiology and outcome of glioblastoma incidence of glioblastoma. In: De Vleeschouwer S, editor. Source glioblastoma. Brisbane (AU): Codon Publications; 2017 Sep. Chapter 8. p.1-10.

Thakkar JP, Dolecek TA, Horbinski C, et al. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2014; 23:1985-96.

van Meir E, Hadjipanayis C, Norden A, Shu HK, Wen P, Olson J. Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. **CA Cancer J Clin** 2010; 60:166-93.

Vogt PK. PI 3-kinase, mTOR, protein synthesis and cancer. **Trends Mol Med** 2001; 7:482-4.

[WHO] World Health organization. **Fifty-Fifth World Health Assembly: ageing and health**. Geneva 13-18 May 2002. Available from: <<https://bit.ly/322Tyxp>> [2018 dez 15]

Wang Q, Hu B, Hu X, et al. Tumor evolution of glioma-intrinsic gene expression subtypes associates with immunological changes in the microenvironment. **Cancer Cell** 2017; 32:42-56.e6.

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

Weller M, Felsberg J, Hartmann C, et al. Molecular predictors of progression-free and overall survival in patients with newly diagnosed glioblastoma: a prospective translational study of the German Glioma Network. **J Clin Oncol** 2009; 27:5743-50.

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

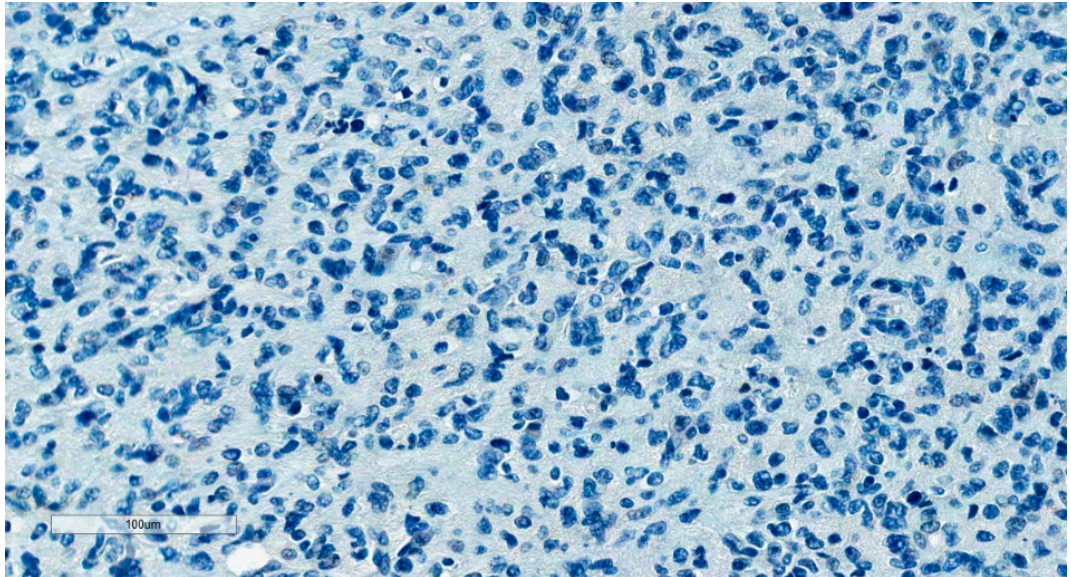
Yan H, Parsons W, Jin G. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas mutations in gliomas. **N Engl J Med** 2009; 360:765-73.

Zawlik I, Kita D, Vaccarella S, Mittelbronn M, Franceschi S, Ohgaki H. Common polymorphisms in the MDM2 and TP53 genes and the relationship between TP53 mutations and patient outcomes in glioblastomas. **Brain Pathol** 2009; 19:188-94.

Zhang M, Gulotta B, Thomas A, et al. Large-volume low apparent diffusion coefficient lesions predict poor survival in bevacizumab-treated glioblastoma patients. **Neuro Oncol** 2016; 18:735-43.

Zheng Y, McFarland BC, Drygin D, et al. Targeting protein kinase CK2 suppresses prosurvival signaling pathways and growth of glioblastoma. **Clin Cancer Res** 2013; 19:6484-94.

Apêndice 1 – Resultado da Imunoistoquímica para IDH1



Legenda: Negativo para imunomarcção de IDH1.

Aberrant isoform-specific expression of RSK1 is a hallmark of gliomas with immune infiltration

Glaucia N. Hajj, Maria D. Begnami, Bárbara Bellis, Fernanda Ferreira, Hermano M. Bellato, Juvanier R. Cruz, Leuridan Torres, Vilma R. Martins, and Martín Roffé

International Research Center, A.C.Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil (G.N.M., B.B., F.F., H.M.B., V.R.M., M.R.); Department of Pathology, A.C.Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil (M.D.B.); National Institute of Science and Technology in Oncogenomics (G.N.M., V.R.M., M.R.); Hospital do Câncer de Pernambuco, Recife, Brazil (J.R.C., L.T.)

Running Title: Characterization of gliomas that gained high RSK1 levels

Corresponding Author: Martín Roffé, PhD., International Research Center, A.C.Camargo Cancer Center, Rua Taguá 440, São Paulo, SP, Brazil, CEP: 01508-010, Telephone: 5511-2189-5000, (mroffe@accamargo.org.br).

Funding

This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (2015/15451-3 to M.R.), Affymetrix tumor-profiling grant 2015 (M.R.).

Conflict of interest statement. None declared.

Authorship

Conceived and designed the experiments: M.R., G.N.H.; Analyzed the data: M.R., G.N.H.; Performed the microarrays: M.R. Performed immunohistochemistry reactions: F.F., H.M.B.; Performed OPAL experiments: B.B., G.N.H.; Pathological anatomy: M.D.B.; Collected Recife's cohort: J.R.C., L.T.; Wrote the manuscript: M.R., G.N.H., V.R.M.

Total manuscript word count: 5907

Abstract

Background. The p90 ribosomal S6 kinase (RSK) family, a downstream target of the Ras/ extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway, can mediate a cross-talk with the mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) pathway. Due to its strategic position connecting to oncogenic pathways in gliomas, we investigated its expression at an isoform-specific level.

Methods. We analyzed protein levels of RSK1 and RSK2 isoforms, in normal brain (NB) and grade I-IV gliomas by immunohistochemistry (IHC). From overlapping tissue sections of glioblastomas (GBM) with known RSK1 levels, the transcriptome was identified by microarray. An RSK1 signature based on differentially expressed mRNAs was validated in public glioma datasets

Results. RSK1 isoform was expressed in a group of GBMs (RSK1^{hi}) at levels above those of NB or low-grade gliomas (LGG). Essentially no long-survivor was present in RSK1^{hi} and most GBMs of this group belonged to the mesenchymal subtype. RSK1 levels strongly correlated with the presence of immune infiltrate. An RSK1 signature was developed and associated with worse survival in GBM and LGG. We did not observe a difference in RSK2 median-expression among NB and gliomas, however, high levels of RSK2 in GBMs were associated with a worse survival.

Conclusions. RSK1 and RSK2 are associated with worse survival. Aberrant levels of RSK1 expression and activation were found in a group of GBMs. The association of high-RSK1 levels with poor survival, immune infiltrate, together with its aberrant expression in GBM but not in NB, suggests RSK1 as a potential therapeutic target.

Key words

glioma | p90 ribosomal S6 protein (RSK) | immune infiltrate | mesenchymal | RSK1 signature

Importance of the study

This study demonstrates that glioblastomas (GBM) gain high protein levels of the RSK1 isoform (RSK1^{hi}) that are not found in normal brain (NB) or lower-grade gliomas (LGG). Remarkably, long and very-long survivors were absent from RSK1^{hi}-GBMs. Transcriptome analysis indicated that RSK1^{hi}-GBMs express mesenchymal subtype and immune infiltrate genes. RSK1^{hi}-GBMs show enrichment for activated-natural killer and M2 macrophages genes, together with high CD68

protein levels. An mRNA-based RSK1 signature was obtained to infer RSK1 protein levels in other glioma datasets. GBMs showed an enrichment in the signature when compared to NB or LGG, and it was related to worse survival. Even in LGG, the RSK1 signature was associated with poor survival. This suggests that RSK1 expression might be gained during glioma progression in an immune infiltrate-related manner. Our results provide clinical and molecular basis to consider the kinase RSK1 as a promising biomarker and therapeutic target.

Introduction

Gliomas are tumors of the central nervous system resulting from the malignant transformation of glial cells.¹ Gliomas are classified according to their histological characteristics in different grades (I-IV).² High-grade gliomas, III and IV, are considered malignant.³ The incidence of malignant gliomas is 17,000 new cases per year.⁴ Astrocytomas are the most common type of gliomas. In particular, grade IV astrocytoma, also called glioblastoma (GBM, formerly called Glioblastoma Multiforme), represents 82% of malignant gliomas. GBM is highly lethal, giving the affected patient a survival of 12-15 months. Standard treatment involves surgical resection when possible, but because of its infiltrative nature, GBMs cannot be completely removed. Therefore, the first-line adjuvant treatment, consisting of radiotherapy and chemotherapy with the alkylating agent temozolomide, is performed after surgery. Nevertheless, almost all GBMs eventually recur and the mean disease progression time after treatment is 6.9 months.⁴

The Cancer Genome Atlas (TCGA) and other similar initiatives applied high-throughput genomic techniques to hundreds of GBMs and low-grade gliomas (LGG; grades II and III).⁵ These efforts resulted in numerous molecular classifications of gliomas. For GBMs, the TCGA proposed an initial classification in four molecular subtypes (classical, mesenchymal, proneural and neural) based on transcriptome data.⁶ The isocitrate dehydrogenase genes 1 and 2 (IDH1/IDH2) mutational status and the hypermethylator phenotype (G-CIMP), both characteristic of secondary GBMs and associated with longer survival times, were then considered to improve the TCGA classification.^{7,8} Finally, the analysis of GBMs together with LGG, essentially divided gliomas in IDH mutant (consisting of most LGG and secondary

GBMs), and IDH wild-type (mostly primary GBMs).⁵ Later on, the TCGA eliminated the neural subtype classification for GBMs. Despite all these efforts, only a limited amount of the generated information was indeed translated to the patients. In fact, a few markers are considered for GBM, such as, IDH1 mutation.⁷

It was observed that 88% of GBMs show alterations in at least one of the major components of the receptor tyrosine kinase (RTK)/phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)/Akt/mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) signaling pathways.⁹ The Ras/extracellular signal-regulated kinase (ERK) is also frequently altered in GBMs, and one of the main causes is the loss of neurofibromin 1 (NF1) in 18% of patients.⁹ One of the direct targets of ERK is the p90 kDa ribosomal protein S6 kinase family (RSK). In humans, there are four isoforms of RSK with high degree of homology (RSK1-4).¹⁰ RSKs can phosphorylate various substrates and it was proposed that RSKs can mediate a cross-talk between the Ras/ERK1 and mTORC1 pathways. RSKs have been involved as important players in different cancer types, controlling processes such as proliferation, mRNA translation and survival.¹¹ Despite its strategic position among two important oncogenic pathways in GBMs, very little is known about the RSK importance in gliomas. It was reported that mesenchymal subtype GBMs showed a marginal increase relative to proneural-GBMs in phosphorylated RSK1 (T359/S363).¹² RSK2 was suggested to be a target of the miR-218 and a regulator of migration/invasion in GBMs.^{13,14} However, the last article failed to exclude any involvement of the other isoforms.¹⁴ Moreover, the non-specific RSK inhibitor, BI-D1870¹⁵, was used to prove RSK2 functions. Considering the potential as an important modulator of oncogenic pathways, we aimed to comprehensively characterize the expression of RSK family isoforms in gliomas and underscore the implications.

Methods

Glioma Patient Cohorts

Astrocytomas treated at the A.C.Camargo Cancer Center (ACCCC), São Paulo, Brazil, from 1980 to 2004 were used for the construction of tissue microarrays (TMA). Additional GBM samples were included for the analysis of the transcriptome (Supplementary Table 1). A second cohort of GBMs was obtained from the Hospital

do Cancer de Pernambuco (HCP) and Hospital da Restauração (HR), Recife, Brazil. The study was approved by the Ethical Committee of the ACCCC (approval number 1485/10), HCP (CAAE: 5576716.3.0000.5205) and HR (CAAE: 55476716.3.3002.5198).

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed as previously described (details in the Supplement).¹⁶

HTA 2.0 Microarray Processing and Analysis

GeneChip Human Transcriptome Array 2.0 (Thermo) was used according to the manufacturer's instructions (details in the Supplement). Only for the unsupervised hierarchical clustering, differential gene expression analysis, the dataset was filtered to keep mRNAs with higher median intensity and standard deviation than RSK1-mRNA. A total of 4,562 genes were used for those analysis.

Determination of Signature Enrichment Scores by GSVA

The Gene Set Variation Analysis package for R was used (details in the Supplement).¹⁷

Profiling of Immune Infiltrate Based on Transcriptome Data

We used the *ESTIMATE* package to estimate the non-tumoral fraction, immune and stromal components for the 30 GBM samples.¹⁸ The profiling of 22 immune-related cell types was performed using the LM22 gene signatures for the CIBERSORT software (<https://cibersort.stanford.edu/>) (details in the Supplement).¹⁹

Statistical analysis

Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test was applied using the *dunn.test* package for R. Univariate survival analyses were performed using the Kaplan–Meier estimator and the log-rank test (Pvalues are indicated in the plots) and median survival in Supplementary Table 2. Survival information was used to define glioma-groups (Supplementary Material). Fisher's exact test was used for significance testing for experiments with a 2 x 2 contingency (Pvalues indicated in the graphs). Pearson and Spearman coefficients for correlations are indicated in the graphs along with the Pvalues in parenthesis. Values of $P < 0.05$ were considered significative. All statistical analysis was performed in RStudio with R version 3.5.1.

Results

RSK1, but not RSK2, Protein Levels are Higher in Grade IV Gliomas

Protein levels for RSK1 were evaluated by immunohistochemistry in a TMA containing non-tumoral brain (NB) and grade I-IV astrocytomas from the ACCCC. The median RSK1 protein expression was higher than the median of NB and grades I-III (Fig. 1A and Supplementary Fig. 1A). However, it was only about half of GBM (grade IV) cases which showed higher RSK1 levels than the low-grade gliomas (LGG) and NB. The other half of GBMs displayed expression levels comparable to the rest of the gliomas. IDH1 mutation is highly frequent in grade II and III gliomas, and as expected, when considering all the samples together, 83.02% of IDH1^{R132H} was associated with RSK1 levels below the third quartile (Supplementary Fig. 1D 2A). On the other hand, RSK2 protein expression did not change significantly among NB and the different grades of gliomas, showing overlapping distribution of intensities (Fig. 1B and Supplementary Fig. 1B). While some samples present very low or undetectable RSK1 levels, RSK2 can be easily detected in the lower-expressing samples. We included in our analysis an antibody that was raised to detect RSK1 when phosphorylated at S380 (Fig. 1C and Supplementary Fig. 1C). Nevertheless, it can also detect RSK2 when phosphorylated at a homologous serine (data not shown). This phosphorylation is necessary for RSK activation.¹⁰ The median RSK phosphorylation (S380) did not change significantly among NB and the different grades of gliomas (Fig. 1C). However, high-levels of P(S380)-RSK could be observed in a subgroup of GBMs, consistent with RSK1 levels. The TCGA included the analysis of phosphorylated RSK1 at T359/S363 by reverse phase protein array (RPPA). P(T359/S363)-RSK1, also necessary for activation,¹⁰ do not cross-react with RSK2. We analyzed P(T359/S363)-RSK1 in grades II-IV gliomas, revealing increased levels of activated RSK1 in GBMs (Supplementary Fig. 3A). In conclusion, a gain of RSK1 expression and activation is a feature that appears in a subgroup of GBMs.

High RSK1 and RSK2 Protein Levels in GBM are Associated with Worse Survival

RSK1 and RSK2 levels were analyzed relative to survival outcomes in GBMs (Fig. 1D-G). We found that the 27 (34.18%) GBMs expressing the highest levels of RSK1

did not survive more than 1.9 years (horizontal line in Fig. 1D) and named this group as RSK1^{hi}. The remaining 2/3 of GBMs (RSK1^{lo}-group) included 13/52 cases with survival times longer than 1.9 years, being 7 of them very long survivors (> 3 years). IDH1^{R132H}-GBMs can be found in the RSK1^{hi}-group, suggesting that secondary GBMs can also express high RSK1-levels (Supplementary Fig. 2B). The 29 GBMs expressing the highest RSK2-levels showed a significant worse survival than the remaining 44 (vertical line separates RSK2 groups, Fig 1F). While 15/27 (56%) of RSK2^{hi}-GBMs belong to RSK1^{hi} group, only 11/43 (26%) of RSK2^{lo}-GBMs were RSK1^{hi} (Fig. 1F). Distinctly to RSK1^{hi}-group (Fig. 1D), 3 of the 15 GBMs expressing the highest RSK2-levels showed survival > 1.9 years. Although not significant, we observed that while 9/40 (23%) of IDH1^{R132H}-GBMs were present in RSK2^{lo}-group, only 2/29 (7%) were in RSK2^{hi} (Supplementary Fig. 2C). P(S380)-RSK1 levels were more homogeneous and we defined a group of 17/74 GBMs showing the highest phosphorylation while excluding any very long-survivor (Fig. 1H, I). 10/14 (71%) of P(S380)-RSK^{hi}-GBMs were also RSK1^{hi}, but only 15/56 (27%) of P(S380)-RSK^{lo} were RSK1^{hi}. On the other hand, there was no significative contribution of RSK2^{hi}-GBMs for the P(S380)-RSK^{hi} cases: 8/15 (53%) of P(S380)-RSK^{hi} were RSK2^{hi} and 20/52 (38%) of P(S380)-RSK^{lo} were RSK2^{hi}. Albeit not-significant, P(T359/S363)-RSK1^{hi}-GBMs showed worse survival (Supplementary Fig. 3B, C). Only 1/14 of P(S380)-RSK^{hi} cases showed IDH1 mutation (Supplementary Fig. 2C).

Transcriptomic Characterization of RSK1^{hi}-Glioblastomas

Since RSK1^{hi}-group is composed of tumors that gained a new feature (high expression of RSK1), we further characterized them. We performed both IHC for RSK1 and microarray analysis in FFPE sections of 30 GBM cases. Twenty-two of these samples were originally included in the TMA and 8 were new samples (Supplementary Table 1). As expected from the results of the TMA (Fig. 1D), we defined a RSK1^{hi}-group consisting of 9/30 (30%) of the cases where none of the patients exceeded a survival time of 1.7 years (Fig. 2A). The mRNA levels for RSK1 obtained from the microarray correlated with protein levels (Fig. 2B). However, RSK1 mRNA expression did not allow for the determination of an RSK1-mRNA^{hi} group that excluded long survivors (Fig. 2C). The transcriptome data was used to

perform an unsupervised hierarchical clustering (Fig. 2D). Surprisingly, all of the RSK1^{hi}-GBMs clustered together, reinforcing that high levels of RSK1 are indeed associated with a distinctive characteristic. Intriguingly, two GBMs with low levels of RSK1 protein, clustered together with the RSK1^{hi}-GBMs and were labeled as RSK1^{lo*}. Using two different sets of signatures from the TCGA (2010 and 2016), we observed that most of the RSK1^{hi}-GBMs were classified as mesenchymal, however, not all the mesenchymal GBMs were RSK1^{hi} (Fig. 2D). Differential gene expression (DEG) among the RSK1^{hi} and RSK1^{lo}-groups was analyzed using the *limma* package (Supplementary Table 3).²⁰ RSK1^{lo*}-samples were excluded from this analysis due to their ambiguity. In Figure 2E, DEGs are shown as a heatmap and it is evident that the RSK1^{lo}-group could be further divided in two subclusters (Fig. 2E). The scores representing the enrichment of the TCGA signatures for each subtype (GSVA scores), demonstrate that all of the RSK1^{hi}-samples show a mesenchymal enrichment, even if the final classification differs, and the proneural signature is essentially absent (Fig. 2F, G).

Evidence of Immune Infiltration in RSK1^{hi}-Glioblastomas

We evaluated the biological processes associated with the RSK1^{hi} and RSK1^{lo}-groups using the DEGs as input for the *GOstats* package (Supplementary Table 4).²¹ While the RSK1^{hi}-group showed enrichment in immune system associated processes, RSK1^{lo}-GBMs showed enrichment in processes of the nervous system (Fig. 3A). We next applied the *ESTIMATE* algorithm to estimate the non-tumoral fraction of GBMs based on the transcriptome. Strikingly, RSK1 protein levels strongly correlated with the presence of non-tumor components (Fig. 3B), being mainly composed of immune infiltrate (Fig. 3C). Of note, only 5/30 GBMs showed a positive score for stromal component, and the two RSK1^{lo*}-GBMs were highly enriched in this component (Fig. 3D). This observation suggests that RSK1^{lo*}-tumors are different from both RSK1^{hi} and RSK1^{lo}-GBMs, reinforcing the need to exclude them from the DEG analysis. We performed a CIBERSORT analysis using the gene signature of 22 immune-cell types (LM22).¹⁹ The relative immune-cell composition was corrected by the fraction of non-tumor component from the *ESTIMATE* package to calculate the contribution of each cell type to the tumor (Fig. 3E-K and Supplementary Fig 4). RSK1 protein expression was strongly correlated with the % of activated natural

killer (NK) cells (Fig. 3E). Other cell types that were found to correlate with RSK1-levels were macrophage M2 (Fig. 3F), neutrophils (Fig. 3G), resting-memory CD4 T cells (Fig. 3H), eosinophils (Fig. 3I), activated-mast cells (Fig. 3J) and CD8 T cells (Fig. 3K). The RSK1^{lo*}-GBMs showed an exaggerated enrichment in resting-memory CD4 T cells pointing to a different type of infiltrate (Fig. 3H). Essentially no immune-cell type was enriched in the RSK1^{lo}-group.

RSK1 protein levels associate with LAPTM5 expression and CD68⁺ infiltrate

An independent cohort of GBMs was included to confirm our observations (Recife cohort, Supplementary Table 1). IHC for RSK1 resulted in the same distribution regarding survival than we observed in Figure 1D (Fig. 4A and Supplementary Fig. 5A). Thus, we defined an RSK1^{hi}-group (24/47 cases) that excluded long-survivors and showed worse survival than the RSK1^{lo}-group (23/47 cases, Fig. 4B). The mRNA for Lysosomal Protein Transmembrane 5 (*LAPTM5*) belongs to the TCGA-2010 mesenchymal (ME)-signature.⁶ Since most RSK1^{hi}-GBMs show ME-signature enrichment, we decided to analyze LAPTM5 protein levels by IHC (Supplementary Fig. 5B). We defined two groups according to LAPTM5 expression, where LAPTM5^{hi}-GBMs showed worse survival (Fig. 4C, D). Although RSK1 and LAPTM5 levels were highly correlated (Supplementary Fig. 5D), we found a fraction of RSK1^{lo}-GBMs being LAPTM5^{hi} (Fig. 4C), reinforcing our suggestion that not all RSK1^{hi}-GBMs are ME. CD68 is regarded a macrophage marker that in gliomas is mainly derived from M2 macrophages,²² however, CD68 can be expressed in other cell types.²³ We defined two groups according to CD68 expression, where CD68^{hi}-GBMs showed worse survival (Fig. 4E, F and Supplementary Fig. 5C). Distinctly to LAPTM5, almost all CD68^{hi}-GBMs belonged to the RSK1^{hi}-group. CD68 was also highly correlated with RSK1 levels and to a lesser degree with LAPTM5 (Supplementary Fig. 5E, F). One important question is whether immune infiltrate cells can contribute to RSK1 gain in GBMs. We performed a double-labeling for RSK1 and CD68 in GBM tissues (Fig. 4G). We found a general widespread RSK1 labeling, that included both CD68⁺ and CD68⁻. This suggests that RSK1 gain can be originated from both immune and GBM cells.

Validation of a RSK1 Signature to Explore Datasets of Glioblastomas

From the analysis of DEGs, we selected all up-regulated mRNAs (≥ 2 fold-change; FDR < 0.05 ; $n = 72$) in the RSK1^{hi} group (Fig. 5A). From the 547 LM22 genes, 6 were present in the RSK1 signature, including *CD68*. From the 216 genes in the TCGA-2010 ME-signature, 6 were present in the RSK1 signature, including *LAPTM5*. From the 50 genes in the TCGA-2016 ME-signature, 3 were present in the RSK1 signature. *C5AR1* and *CHI3L1* genes were present in both LM22 and TCGA-2010 ME-signatures (Fig. 5A), and *THBS1* was present in both TCGA-2010 and 2016 ME-signatures. We evaluated the RSK1 signature enrichment in the 30 GBM samples and obtained a GSVA score for each of them, which measures the signature enrichment. The GSVA score was linearly related to the RSK1 protein levels obtained by IHC (Fig. 5B) and as expected, correlated to a less degree with RSK1 mRNA levels (Fig. 5C). Comparison of the GSVA score with patient survival indicated that the samples with positive GSVA score (enriched in the signature) did not include any long survivor (Fig. 5D). Moreover, the survival of GBMs with positive GSVA score was significantly different when compared to the GBMs with negative GSVA score (underrepresented signature; Fig. 5E). Using the same approach, we explored two different previously published mRNA expression datasets of GBMs: TCGA^{6,12,24} and Gravendeel²⁵. The RSK1 signature (signRSK1) was correlated with RSK1 mRNA levels in both datasets (Fig. 5F, G). Furthermore, the GBMs with higher GSVA score showed worse survival (Fig. 5H, I) and very-long survivors were virtually excluded from the signRSK1^{enriched}-group. In the case of the Gravendeel dataset, cases with IDH1 mutation were present in GBMs with positive GSVA score, but with a low proportion (Supplementary Fig. 5A). However, in the TCGA dataset, cases with IDH1 mutation were practically excluded from GBMs with positive GSVA score (Supplementary Fig. 5B). It seems that IDH mutant-GBMs (i.e. secondary GBM) can belong to the signRSK1^{enriched}-group (or RSK1^{hi}-group, Fig. 1E), but it is less common than in signRSK1^{underrepresented} or RSK1^{lo}-GBMs. Accordingly, we observed that G-CIMP-GBMs (hypermethylator phenotype) were almost completely excluded from the signRSK1^{enriched}-group of GBMs in both datasets (Supplementary Fig. 5C, D).

The RSK1 Signature can Determine Poor Survival even in Low-Grade Gliomas

We further validated our RSK1 signature in LGG and GBM together. RSK1 signature was enriched in GBMs when compared to LGG from the TCGA (Fig. 6A). With the Gravendeel dataset, we further prove that RSK1 signature was enriched in GBMs when compared with NB (Fig. 6B). Thus, we demonstrated that the RSK1 signature recapitulated the results obtained with the RSK1 antibody in IHC (Fig. 1A). Accordingly, in both datasets we observed that RSK1 mRNA levels behaved in the same direction of the RSK1 signature (Fig. 6C, D). We also analyzed the enrichment of RSK1 signature (signRSK1) within grade II or grade III gliomas. In both datasets, signRSK1^{enriched}-grade III gliomas show poor survival (Fig. 6E, F). The same was found for grade II gliomas from the TCGA (Fig. 6G). We could not apply this analysis to the Gravendeel dataset due to insufficient number of samples. These observations suggest that the RSK1 signature can predict RSK1-associated events even when protein levels are low.

Discussion

Our data demonstrate that RSK1 protein levels above the expressed in normal brain defines a set of GBMs with well-defined features. Since high-levels of RSK1 are practically absent from gliomas of lower grade (I-III), it can be considered a hallmark of the more malignant GBMs. This proposal is further supported by the exclusion (total or partial, depending on the dataset) of long and very long survivors from the RSK1^{hi}-group. Most of the RSK1^{hi}-GBMs were classified as part of the mesenchymal subtype based on the TCGA signatures, which indicates that there exists an RSK-isoform preference that accompanies a specific gene expression program. Although, IDH mutant cases can be found in the RSK1^{hi}-group depending on the cohort, it is evident that RSK1^{hi}-group is mainly composed by IDH wild-type and non-G-CIMP GBMs. Furthermore, the great majority of grade II and III gliomas, where IDH mutation is prevalent, did not show high levels of RSK1.

One of the main findings of our work was the tight relationship among RSK1 protein expression and immune infiltrate. It was previously observed using the same set of 22 signatures for immune-cell types, LM22,¹⁹ that mesenchymal subtype GBMs showed enrichment in M2 macrophages, neutrophils and resting-memory CD4 T cells infiltrate.²⁶ Accordingly, we also observed a correlation of those cell

types with RSK1 protein levels, however, the most correlated cell type was activated-NK. This suggests that RSK1-associated tumor infiltration has a partial overlap with the one observed in the mesenchymal subtype. Confirming those observations, RSK1 protein levels highly correlated with the presence of CD68, in an independent GBM-cohort. The presence of M2 macrophages is further indicated by the increase in RSK1^{hi}-GBMs of CD163 and POSTN mRNAs (Supplementary Table 3), a M2 macrophage marker and a mediator of the recruitment of M2 tumor-associated macrophages, respectively.^{22,27} In view of these findings, one essential question was raised on the origin of the high-levels of RSK1 that appear in GBMs. Dual labeling of GBMs for RSK1 and CD68 showed that both CD68⁻ (majority of cells) and CD68⁺ cells within the tumor express RSK1, which implies that RSK1 can indeed derive from both tumor and immune infiltrate cells. Accordingly, we observed RSK1 expression in GBM-derived cell lines.¹⁵ Moreover, activated RSK1 can be observed in immune cells in vitro.^{28,29} A more detailed investigation at the single cell level of GBMs, assaying different molecular markers of immune cells, will help to define the origin of RSK1. The immune system infiltration seems to play a fundamental role in the aggressiveness of the gliomas, and accordingly, it has been proposed a signature composed by immune-related genes that can predict the risk of gliomas, however, none of those genes were included in our RSK1 signature.³⁰ In fact, the RSK1 signature that we used to infer RSK1 protein in datasets of GBM and LGG combines genes associated with immune infiltrate, such as *CD68*, with genes associated with mesenchymal subtype, such as *LAPTM5*. However, only 20/72 genes in our signature were shared with the signatures used to predict immune-cell types and GBM-subtypes. In this manner, our work provides a different set of genes that can be helpful for the analysis of novel features of gliomas.

This article shows for the first time that high protein levels of *LAPTM5* associate with worse survival in GBMs. *LAPTM5* is a transmembrane receptor associated with lysosomes and can function as a modulator of the immune system. It has been proposed that *LAPTM5* downregulates the expression of T and B cell receptors at the plasma membrane.^{31,32} In that manner, *LAPTM5* might be a mechanism used by gliomas that negatively modulates the anti-tumoral response of the immune system. Moreover, *LAPTM5* was found to be a proinflammatory

regulator of macrophages.³³ However, a recent report suggested that LAPTM5 is downregulated in human cancers, such as neuroblastoma, and that low levels of LAPTM5 were associated with poor prognosis.³⁴ Our data suggest that LAPTM5 in GBMs show an opposite function to other cancers.

Although we did not find differences in RSK2 expression in NB and gliomas I-IV, it was reported that GBMs express more RSK2 protein than normal brain.¹³ However, in that article it was only shown two images, one for NB and one for GBM, with no further analysis, which poorly supports that finding. In the GBMs from our study, RSK2 protein levels were associated with worse survival and this might be related with their proposed role in migration/invasion in GBM-derived cell lines.¹⁴ It is important to note, that RSK2^{hi}-GBMs were mostly RSK1^{hi}. We previously showed that RSK3 and RSK4 isoforms are not expressed/detected in two GBM-derived cell lines.¹⁵ Although this observation does not imply the lack of RSK3 and RSK4 in GBM from patients, it was suggested that they can have tumor suppressor roles.³⁵ The overall levels of P(S380)-RSK were low and homogeneous, however, the few cases with high phosphorylation corresponded to RSK1^{hi}-GBMs. The analysis of the RPPA data for P(T359/S363)-RSK1 further suggested that, in GBMs, RSK1 not only increases in expression but also in activity. The TCGA also used an antibody that detects RSK1, RSK2 and RSK3 (RSK1/2/3) and our analysis showed that GBMs present reduced RSK1/2/3 levels when compared to LGG (Supplementary Fig 7A). One possibility is that RSK3 might be present in LGG and reduced in GBMs, however, without knowing the real contribution of each isoform for the final signal, it is impossible to derive any conclusion. Moreover, in GBMs, the RSK1/2/3 antibody from the RPPA showed no relationship with survival (Supplementary Fig 7B). In any case, our results point to the necessity of analyzing the RSK family at an isoform-specific level.

Our results have important implications that can eventually be translated to the clinic. First, RSK1 protein expression can be used as a molecular marker to define a group of GBMs with worse survival. Since, RSK1 appears to be increased in GBM but not NB, an appropriate NB control could be used as a reference for IHC reactions. Moreover, the RSK1 signature can be used in LGG to predict cases with poor survival. Since the increase in RSK1 is accompanied by high levels of immune

infiltration, its kinase activity might have a role in immune system modulation for GBM and LGG. While RSK2 is expressed at comparable levels in NB and gliomas I to IV, gain of RSK1 is a feature that was only observed in GBMs. From a therapeutic point of view, RSK1 specific inhibition might only target GBM cells but not non-tumoral cells in RSK1^{hi}-GBMs.

Supplementary Material

Supplementary material is available at Neuro-Oncology online.

References

1. Huse JT, Holland EC. Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(5):319-331.
2. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System : a summary. *Acta Neuropathol*. 2016.
3. Meyer MA. Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med*. 2008; 359:1850..
4. Omuro A, DeAngelis LM. Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review. *JAMA*. 2013;310(17):1842-1850.
5. Ceccarelli M, Barthel FP, Malta TM, et al. Molecular Profiling Reveals Biologically Discrete Subsets and Pathways of Progression in Diffuse Glioma. *Cell*. 2016;164(3):550-563.
6. Verhaak RGW, Hoadley K a., Purdom E, et al. Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*. 2010;17(1):98-110.
7. Turkalp Z, Karamchandani J, Das S. IDH mutation in glioma: New insights and promises for the future. *JAMA Neurol*. 2014;71(10):1319-1325.
8. Noushmehr H, Weisenberger DJ, Diefes K, et al. Identification of a CpG Island Methylator Phenotype that Defines a Distinct Subgroup of Glioma. *Cancer Cell*. 2010;17(5):510-522.
9. Akhavan D, Cloughesy TF, Mischel PS. mTOR signaling in glioblastoma:

- lessons learned from bench to bedside. *Neuro Oncol.* 2010;12(8):882-889.
10. Anjum R, Blenis J. The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(10):747-758.
 11. Houles T, Roux PP. Defining the role of the RSK isoforms in cancer. *Semin Cancer Biol.* 2018;48:53-61.
 12. Brennan CW, Verhaak RGW, McKenna A, et al. The Somatic Genomic Landscape of Glioblastoma. *Cell.* 2013;155(2):462-477.
 13. Mathew LK, Huangyang P, Mucaj V, et al. Feedback circuitry between miR-218 repression and RTK activation in glioblastoma. *Sci Signal.* 2015;8(375):ra42-ra42.
 14. Sulzmaier FJ, Young-Robbins S, Jiang P, et al. RSK2 activity mediates glioblastoma invasiveness and is a potential target for new therapeutics. *Oncotarget.* November 2016.
 15. Roffé M, Lupinacci FC, Soares LC, Hajj GN, Martins VR. Two widely used RSK inhibitors, BI-D1870 and SL0101, alter mTORC1 signaling in a RSK-independent manner. *Cell Signal.* 2015;27(8):1630-1642.
 16. Alvarenga AW, Coutinho-Camillo CM, Rodrigues BR, et al. A comparison between manual and automated evaluations of tissue microarray patterns of protein expression. *J Histochem Cytochem.* 2013;61(4):272-282.
 17. Hänzelmann S, Castelo R, Guinney J. GSVA: Gene set variation analysis for microarray and RNA-Seq data. *BMC Bioinformatics.* 2013;14.
 18. Yoshihara K, Shahmoradgoli M, Martínez E, et al. Inferring tumour purity and stromal and immune cell admixture from expression data. *Nat Commun.* 2013;4.
 19. Newman AM, Liu CL, Green MR, et al. Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles. *Nat Methods.* 2015;12(5):453-457.
 20. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(7):e47.
 21. Falcon S, Gentleman R. Using GOSTats to test gene lists for GO term association. *Bioinformatics.* 2007;23(2):257-258.
 22. Prosniak M, Harshyne LA, Andrews DW, et al. Glioma grade is associated

- with the accumulation and activity of cells bearing M2 monocyte markers. *Clin Cancer Res.* 2013;19(14):3776-3786.
23. Gottfried E, Kunz-Schughart LA, Weber A, et al. Expression of CD68 in Non-Myeloid Cell Types. *Scand J Immunol.* 2008;67(5):453-463.
 24. McLendon R, Friedman A, Bigner D, et al. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature.* 2008;455(7216):1061-1068.
 25. Gravendeel LAM, Kouwenhoven MCM, Gevaert O, et al. Intrinsic gene expression profiles of gliomas are a better predictor of survival than histology. *Cancer Res.* 2009;69(23):9065-9072.
 26. Wang Q, Hu B, Hu X, et al. Tumor Evolution of Glioma-Intrinsic Gene Expression Subtypes Associates with Immunological Changes in the Microenvironment. *Cancer Cell.* 2017;32(1):42-56.e6.
 27. Zhou W, Ke SQ, Huang Z, et al. Periostin secreted by glioblastoma stem cells recruits M2 tumour-associated macrophages and promotes malignant growth. *Nat Cell Biol.* 2015;17(2):170-182.
 28. Lin JX, Spolski R, Leonard WJ. Critical role for Rsk2 in T-lymphocyte activation. *Blood.* 2008;111(2):525-533.
 29. Zaru R, Ronkina N, Gaestel M, Arthur JSC, Watts C. The MAPK-activated kinase Rsk controls an acute Toll-like receptor signaling response in dendritic cells and is activated through two distinct pathways. *Nat Immunol.* 2007;8(11):1227-1235.
 30. Cheng W, Ren X, Zhang C, et al. Bioinformatic profiling identifies an immune-related risk signature for glioblastoma. *Neurology.* 2016;86(24):2226-2234.
 31. Ouchida R, Yamasaki S, Hikida M, et al. A Lysosomal Protein Negatively Regulates Surface T Cell Antigen Receptor Expression by Promoting CD3 ζ -Chain Degradation. *Immunity.* 2008;29(1):33-43.
 32. Ouchida R, Kurosaki T, Wang J-Y. A Role for Lysosomal-Associated Protein Transmembrane 5 in the Negative Regulation of Surface B Cell Receptor Levels and B Cell Activation. *J Immunol.* 2010;185(1):294-301.
 33. Glowacka WK, Alberts P, Ouchida R, Wang JY, Rotin D. LAPTM5 protein is

a positive regulator of proinflammatory signaling pathways in macrophages. *J Biol Chem*. 2012;287(33):27691-27702.

34. Nuylan M, Tatsuyuki K, Inazawa J, Inoue J. Down-regulation of LAPTM5 in human cancer cells. *Oncotarget*. 2016;7(19):28320-28328.
35. Romeo Y, Zhang X, Roux PP. Regulation and function of the RSK family of protein kinases. *Biochem J*. 2012;441(2):553-569.

Figure Legends

Fig. 1 Expression of RSK isoforms in gliomas and its relationship with survival. (A) RSK1 and (B) RSK2 protein and (C) P(S380)-RSK levels in astrocytomas and non-tumoral brain (NB) from the ACCCC cohort are expressed as HSCORE. The dashed line indicates the 3rd quartile for all the samples. Graphs for (D) RSK1 and (F) RSK2 protein levels and (H) P(S380)-RSK levels in relationship with survival in GBMs. The vertical line indicates the separation of high and low groups. The horizontal line indicates the longest survival time for RSK1^{hi}. The colors indicate whether the samples belong to RSK1^{hi} or RSK1^{lo} groups. Overall survival plots comparing (E) RSK1^{hi} and RSK1^{lo}, (G) RSK2^{hi} and RSK2^{lo}, and (I) P(S380)-RSK^{hi} and P(S380)-RSK^{lo} groups. Sample number is indicated in parenthesis. Status: 1 = dead; 0 = censored.

Fig. 2 RSK1-associated transcriptome in GBM. (A) RSK1 protein levels (HSCORE) for 30 GBM samples (ACCCC) in relationship with patient survival. The horizontal line indicates the longest survival time for RSK1^{hi}-group. (B) Comparison of protein and mRNA (microarray) RSK1 levels. (C) Relationship among RSK1 mRNA levels and survival. Median survival (days): RSK1-mRNA^{hi} = 275.5, RSK1-mRNA^{lo} = 975. The Pvalue of the Fisher's exact test for the presence of RSK1^{hi}-samples defined based on protein levels is indicated. (D) Unsupervised hierarchical clustering based on the transcriptome of the GBM samples. (E) Heatmap showing the differentially expressed genes (DEG) between RSK1^{hi} and RSK1^{lo} groups (FDR < 0.01 and |logFC| ≥ 1). The clustering was performed using the DEGs. The GSEA score indicating the enrichment for each subtype is shown in (F) for TCGA 2010 and (G) TCGA 2016 signatures. Status: 1 = dead; 0 = censored. CL: classical; ME: mesenchymal; PN: proneural; NL: neural; nd: not determined.

Fig. 3 RSK1 protein expression is associated with immune infiltrate in GBMs. (A) Biological processes enriched in RSK1^{hi} and RSK1^{lo} glioblastomas, obtained with the *GOstats* package. (B-D) Relationship between RSK1 protein expression (HSCORE) and (B) non-tumor fraction, (C) immune component and (D) stromal component of GBMs. The *ESTIMATE* package was used. (E-K) The fraction of immune-related cells for each GBM was estimated by CIBERSORT using the LM22 signature. The cell types that correlated with RSK1 protein expression are shown.

Fig. 4 RSK1 protein expression is associated with LAPTM5 and CD68 expression in GBMs. Protein levels for (A) RSK1 (HSCORE), (C) LAPTM5 (HSCORE) and (E) CD68 (% of labeled area) from the Recife cohort in relationship with patient survival. The horizontal line indicates the longest survival time for RSK1^{hi}. The colors indicate whether the samples belong to RSK1^{hi} or RSK1^{lo} groups. Overall survival plots comparing (B) RSK1^{hi} and RSK1^{lo}, (D) LAPTM5^{hi} and LAPTM5^{lo}, and (F) CD68^{hi} and CD68^{lo} groups. The number of samples is indicated in parenthesis. Status: 1 = dead; 0 = censored. (J) Multiplex immunohistofluorescence detection of RSK1, CD68 and nuclei labeling (DRAQ5) in a RSK^{hi}-GBM tissue. Arrowhead points to a CD68⁻ RSK1⁺ cell. Arrow points to a CD68⁺ RSK1⁺ cell.

Fig. 5 RSK1 signature can infer RSK1 levels from transcriptome data from GBM. (A) The 72 genes of the RSK1 signature. Genes of the RSK1 signature shared by the mesenchymal subtype signature from TCGA (2010 and 2016) and/or LM22 signatures are indicated. (B) RSK1 protein (HSCORE) and (C) RSK1 mRNA (microarray) levels correlate with GSVA scores for RSK1 signature in the 30 GBM originally used to obtain the signature (ACCCC). (D) Relationship between GSVA scores for the RSK1 signature and patient survival. The colors indicate whether the samples belong to RSK1^{hi} or RSK1^{lo} groups defined in Figure 2A. (E) Overall survival plot comparing GBMs with GSVA score > 0 (signRSK1^{enriched}) and < 0 (signRSK1^{underrepresented}). The number of samples is indicated in parenthesis. (F-G) The RSK1 signature correlates with RSK1 mRNA levels from two public cohorts: (F) Gravendeel and (G) TCGA. The dashed line indicates the GSVA scores limits for the survival curve (see below). Overall survival plots for (H) Gravendeel and (I) TCGA. The number of samples is indicated in brackets.

Fig. 6 The RSK1 signature is enriched in grade IV gliomas. GSVA scores for the enrichment in RSK1 signature (signRSK1) were obtained for gliomas of different grades from (A) TCGA and (B) Gravendeel datasets. NT = non-tumor. (C-D) Graphs showing the RSK1 mRNA levels for gliomas of different grades from (C) TCGA and (D) Gravendeel datasets. Overall survival plots for (E) grade III (TCGA), (F) grade III (Gravendeel) and (G) grade II (TCGA) gliomas, comparing signRSK1^{enriched} vs signRSK1^{underrepresented}. The number of samples is indicated in parenthesis.

Fig. 1

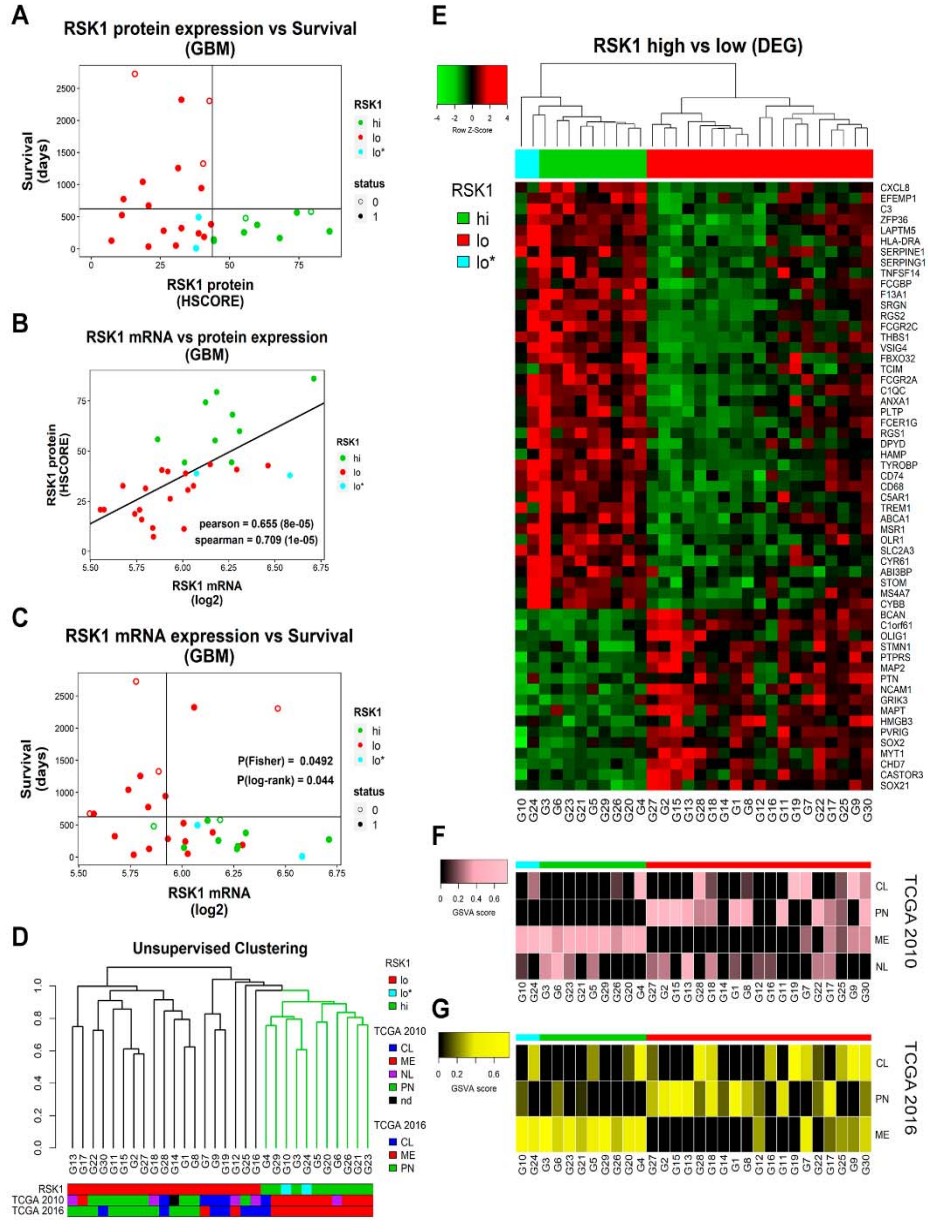


Fig. 2

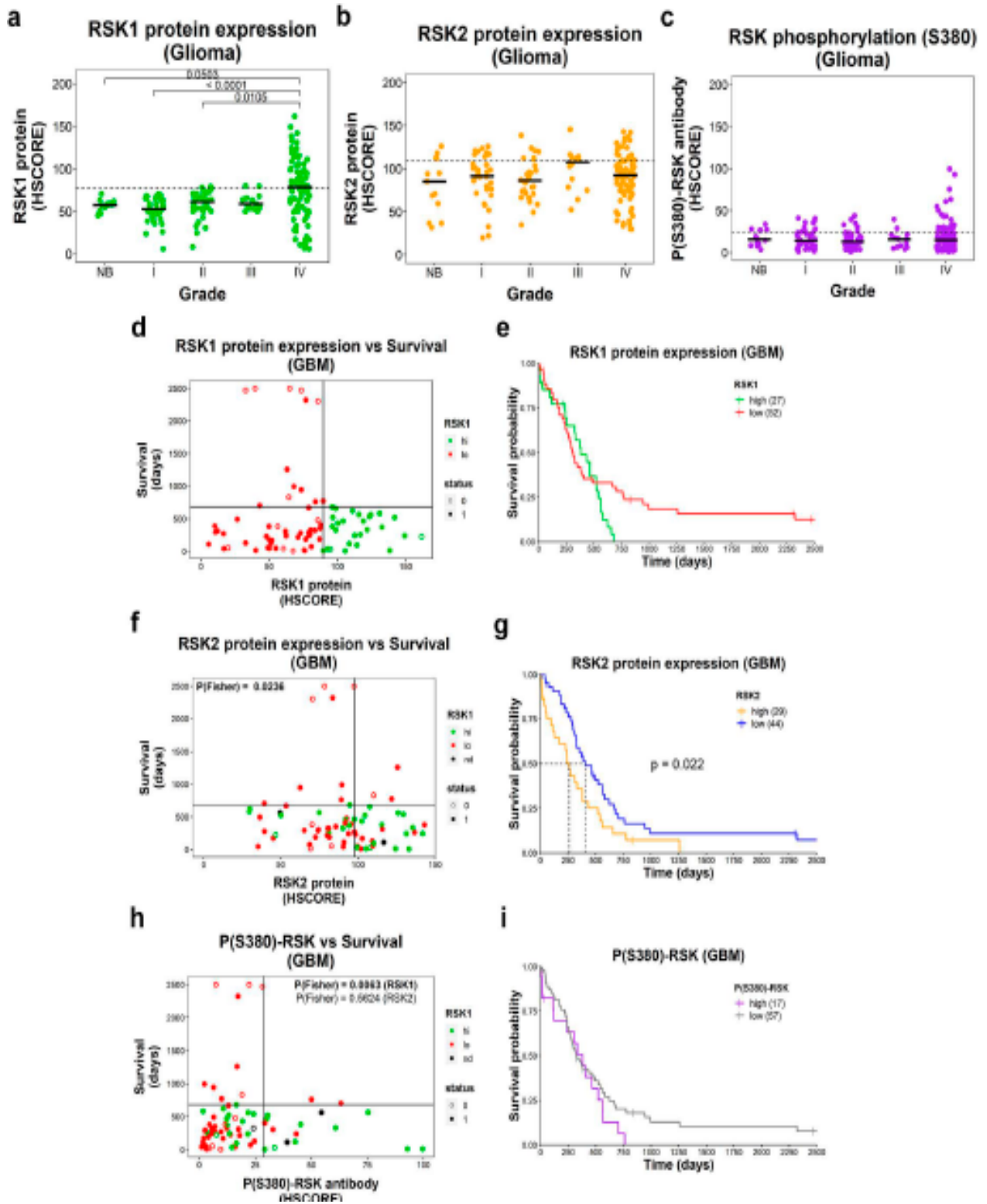


Fig. 3

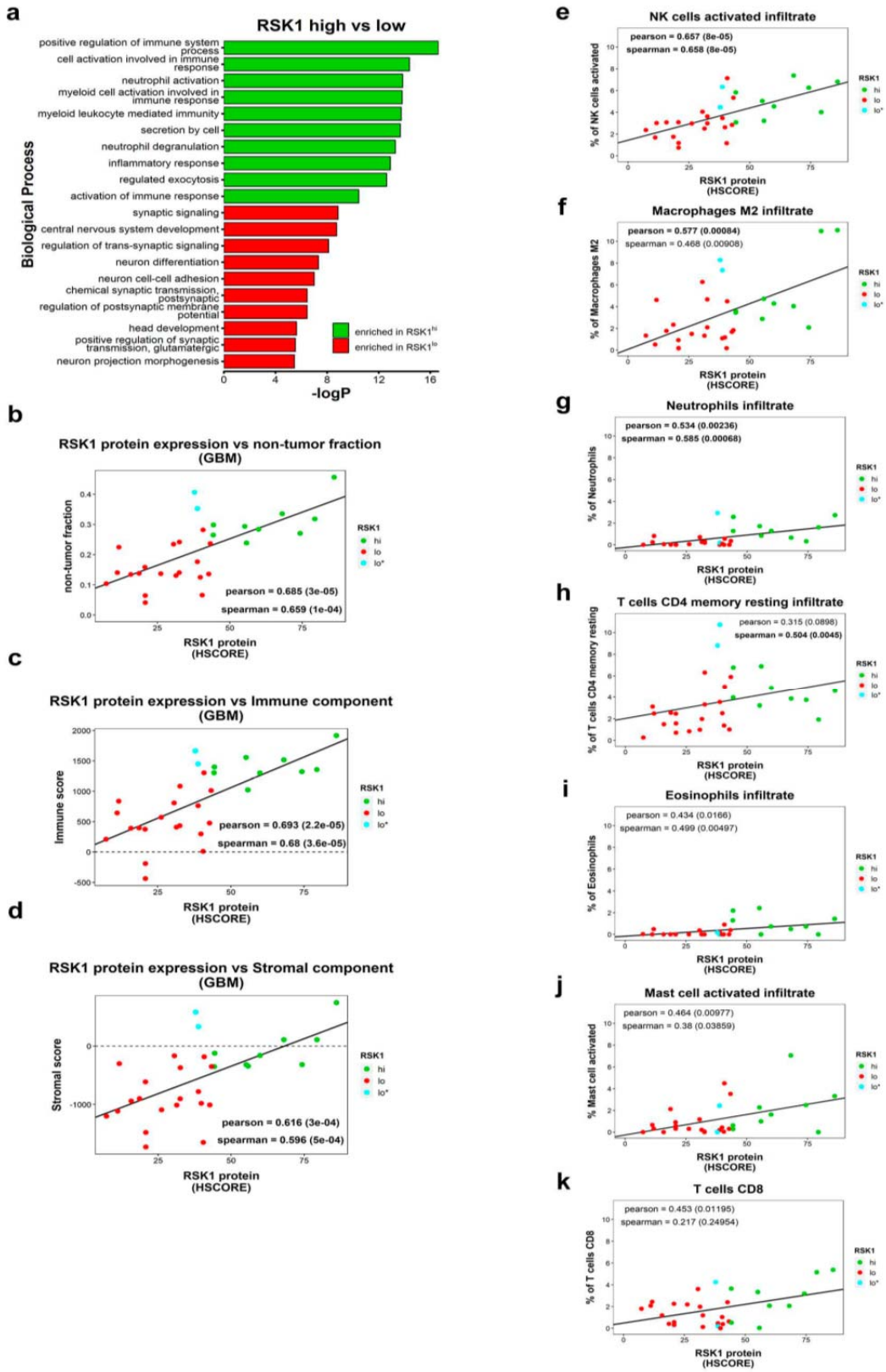


Fig. 4

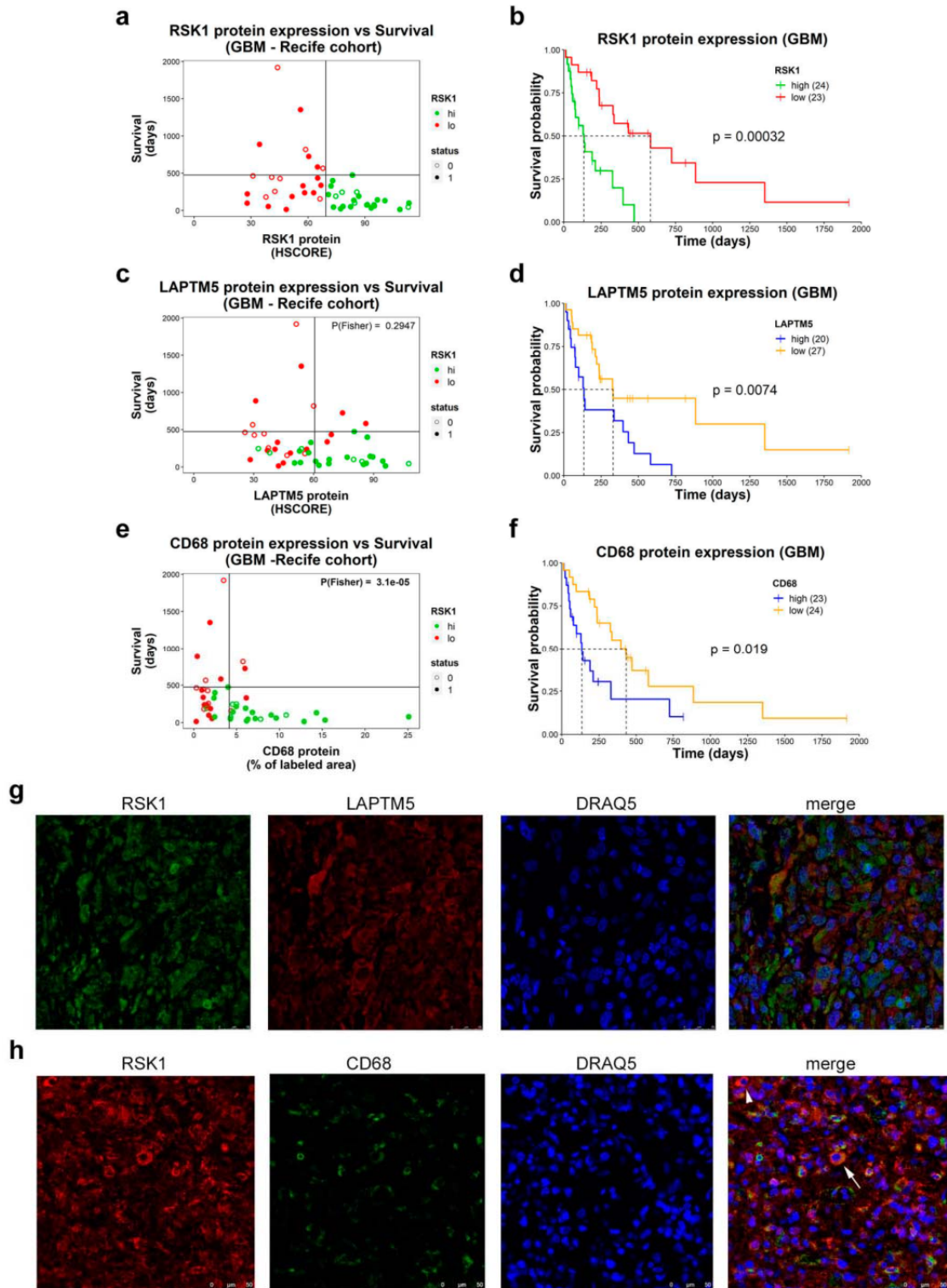


Fig. 5

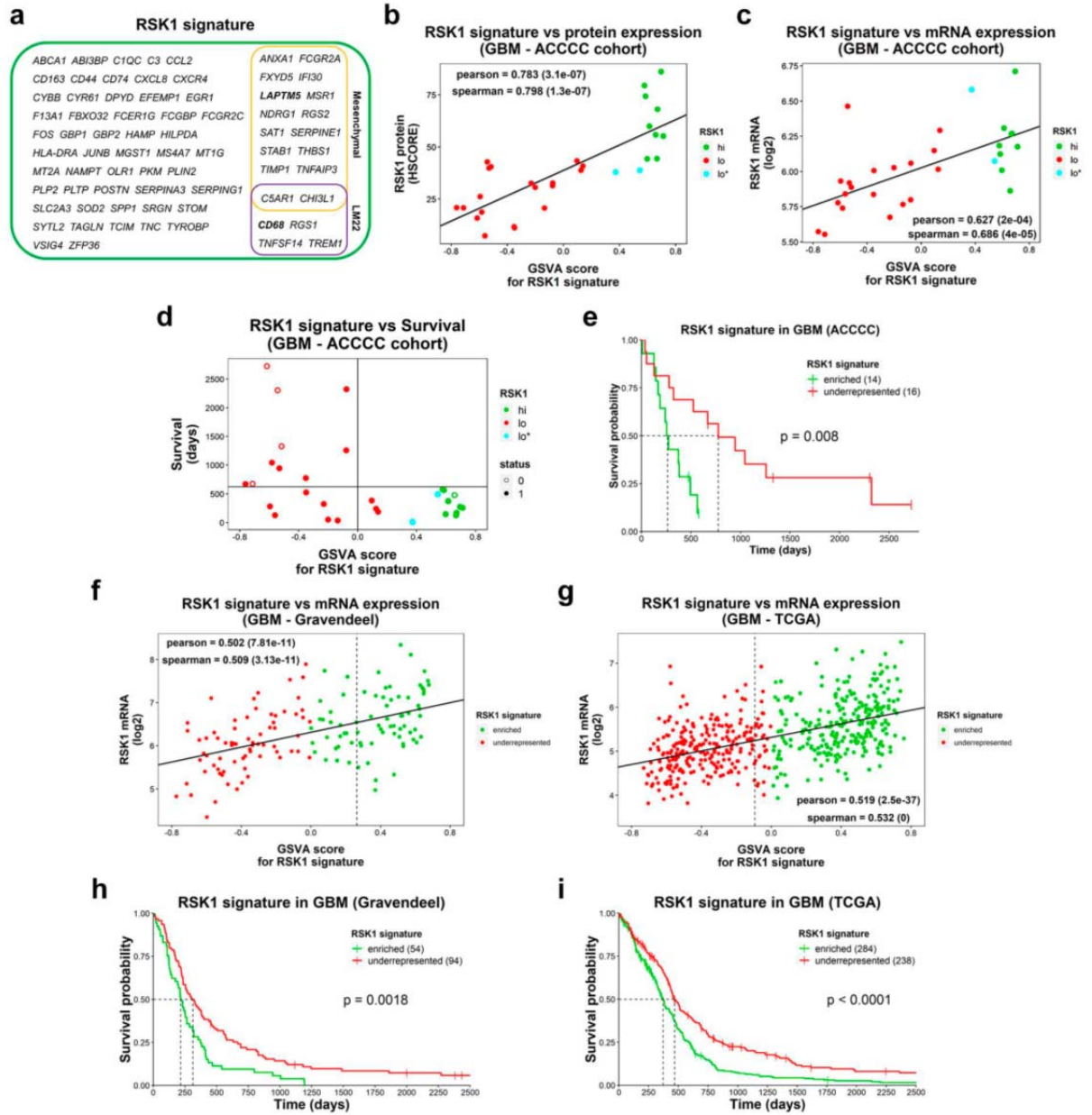
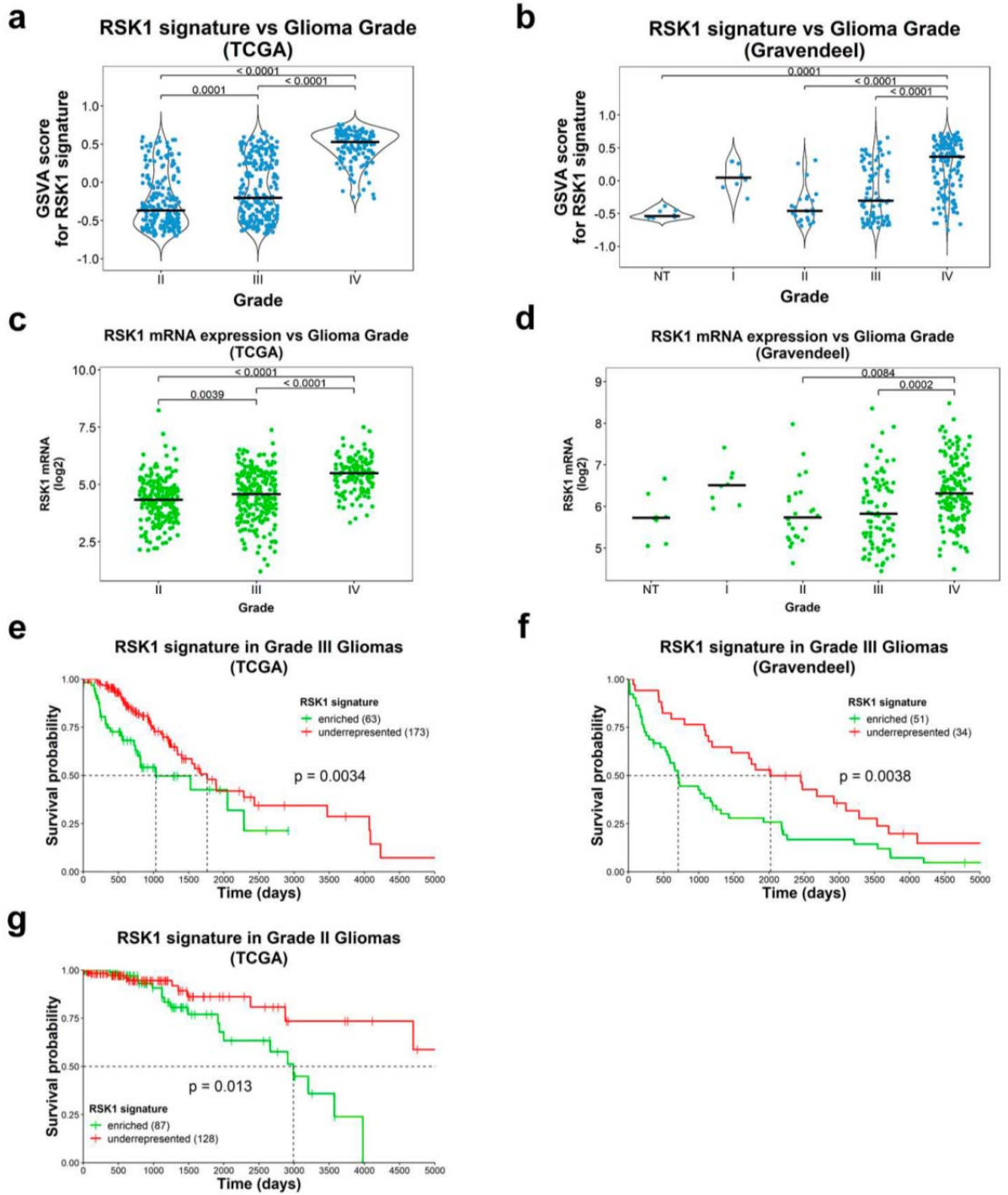


Fig. 6



Supplementary Material

Supplementary Methods

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed as previously described.¹ Briefly, sections were deparaffinized and hydrated. Non-specific staining was blocked by the use of Dako Protein Block (Dako). Sections were incubated with anti-RSK1 (sc-231, Santa Cruz Biotechnology) at 1:200 dilution, anti-RSK2 (#9340, Cell Signalling) at 1:50 dilution, anti-P(S380)-RSK1 (#9341, Cell Signalling) at 1:25 dilution, anti-CD68 (sc-70761, Santa Cruz Biotechnology) at 1:100 dilution, anti-LAPTM5 (ab108017, Abcam) at 1:50 dilution and anti-IDH1^{R132H} (DIA-H09, Dianova) at 1:100 dilution in 1% bovine serum albumin in PBS for 18 h at 4°C in a humidity chamber. Secondary antibody staining was performed using EnVision+ Dual Link (Dako). Color was developed by DAB. As positive controls, we included tissues with known protein expression and the primary antibody was omitted for negative controls. Quantification of HSCORE was digitally made by ScanScope XT (Aperio) as previously described.¹ Briefly, each pixel was classified as negative (0), weakly positive (1), positive (2) or strongly positive (3). The number of pixels in each category was then counted and a HSCORE was calculated according to the formula $HSCORE = \sum(i \times P_i)$, where P_i = percentage of positive pixels, varied from 0% to 100%, and pixel staining intensity $i = 0, 1, 2,$ or 3 .² For IDH1^{R132H} immunohistochemistry, samples with no staining were considered wild-type and when staining of any intensity was observed, the samples were considered IDH1 mutant.³ For CD68 staining, the % of strongly labeled pixels was measured.

Overall Patient Survival Analysis

The calculation of overall survival differs for both cohorts. Survival for ACCCC cohort was calculated using the date of the surgery as initial time, due to the lack of the date of image diagnostic for some of the samples. For the Recife cohort, consisting of recent cases, the image diagnosis date was available and used as initial time for survival calculation. The analysis and survival curves were performed using *survminer* and *survival* packages for R packages. For the definition of high and low

expressing groups (or enriched and underrepresented RSK1 signature groups), we determined the lower log-rank test Pvalues for the all the set of two groups that can be formed according to expression (or signature enrichment) levels. Then the distribution of samples that allowed more members in each group and maximized the median-average survival differences were chose. The separation in groups was indicated with a vertical line in the graphs of expression (or RSK1 signature enrichment) vs survival.

HTA 2.0 Microarray Processing and Analysis

The mRNA from the 30 GBM samples from the ACCCC cohort was extracted from formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) slices using the ReliaPrep™ FFPE Total RNA Miniprep System (Promega) and processed using the SensationPlus™ FFPE Amplification and 3' IVT Labeling Kit (Thermo), followed by GeneChip Human Transcriptome Array 2.0 (Thermo) according to the manufacturer's instructions (details in the Supplement). The CEL files were normalized and summarized at the gene level using SST-RMA algorithm from the Transcriptome Analysis Console software (Thermo). Normalized expression and DABG (detection above background) values were retrieved from the CHP files using the *affxparser* package. Five of the 30 FFPE-blocks were newer and a batch effect was observed for them. Thus, ComBat algorithm was used to remove batch effects.⁴ Transcripts clusters with DABG ≥ 0.05 for all of the samples were excluded. The data was annotated according to the *hta20transcriptcluster.db* package for R. Only transcript clusters with a corresponding RefSeq ID for protein ("NP") were kept, and transcript clusters for the same gene were collapsed (based on max intensity) using the *WGCNA* package.⁵ Only for the unsupervised hierarchical clustering, differential gene expression (DEG) analysis and signature obtention, the dataset was filtered to keep mRNAs with higher median intensity and standard deviation (sd) than the RSK1 mRNA. A total of 4,562 genes were used for those analysis. DEG was obtained using the *limma* package for R.⁶ For this analysis, the RSK1^{lo*}-GBMs were not included. The DEGs were used as input for the GOstats package to determine the biological processes (BP) enriched in RSK1^{hi} and RSK1^{lo}-groups.⁷ As universe for GOstats, all the mRNAs from the filtered dataset were used and the hypergeometric test was applied with a

pvalueCutoff = 0.001. BP with sizes of more than 500 or less than five genes were excluded for being low informative.

Determination of Signature Enrichment Scores by GSVA

The Gene Set Variation Analysis package for R was used with the following parameters: mx.diff=T, method="gsva".⁸ Before using *GSVA*, mRNAs with a median intensity and sd below any mRNA from the signature were excluded. The GBM molecular subtype was determined using the gene sets provided in the GSEA webpage (<http://software.broadinstitute.org/gsea>) corresponding to the TCGA-2010 signature.⁹ A newer (2016) set of signatures was reported by the TCGA for IDH wild-type GBMs, where the neural subtype was eliminated.¹⁰

Profiling of Immune Infiltrate Based on Transcriptome Data

We used the *ESTIMATE* package to estimate the non-tumoral fraction, immune and stromal components for the 30 GBM samples.¹¹ The profiling of 22 immune-related cell types was performed using the LM22 gene signature for the CIBERSORT software (<https://cibersort.stanford.edu/>).¹² For CIBERSORT, the normalized transcriptome data was transformed by applying 2^{data} . We disabled quantile normalization and 1000 permutations were carried on. The relative formula of the immune cells was corrected with the tumor purity estimation from the *ESTIMATE* analysis, to allow the determination of the fraction of tumor represented by each cell type.

TCGA Datasets for Gliomas

CEL files from glioblastomas (GBM) microarrays (GeneChip® HT Human Genome U133 Array Plate Set, Affymetrix) were obtained from the TCGA portal (<https://portal.gdc.cancer.gov/>) and processed using the *affy*¹³ package for R. Arrays were normalized and summarized by RMA (robust multi-array average) and the ComBat algorithm was used to remove batch effects (batch information was obtained from the TCGA batch effects website: <https://bioinformatics.mdanderson.org/tcgambatch/>). Only batch effects for batch 1 and 79 were adjusted. GBMs from the same patients were averaged. Present/absent calls were obtained by the mas5calls function and probes classified as absent for all

the samples were filtered out. The data was annotated according to the *hthgu133a.db* package for R. Only probes with a corresponding RefSeq ID for protein (“NP”) were kept, and probes for the same gene were collapsed (based on max intensity) using the *WGCNA* package. 527 GBM samples were included in the analysis. For the analysis of the RSK1 signature among different grades gliomas, RNAseq data from the TCGA portal (<https://portal.gdc.cancer.gov/>) was obtained for low-grade gliomas (LGG, grades II and III) and grade IV (GBM). The data was annotated according to the *org.Hs.eg.db* package for R. Only probes with a corresponding RefSeq ID for protein (“NP”) were kept, and reads for the same gene were collapsed (based on max intensity) using the *WGCNA* package. We kept mRNAs with a maximum of 16 samples with 0 counts to maintain the RSK1 signature genes. The data was normalized by “Trimmed Mean of M-values” (TMM) from the *edgeR*¹⁴ package and voom transformed (*limma* package) before analysis. The number of samples of the dataset: grade II = 216; grade III = 237 and GBM = 137. Normalized level 4-data from the reverse phase protein array (RPPA) technique were downloaded from The Cancer Proteome Atlas (TCPA, <https://tcpaportal.org/tcpa/index.html>) for GBM. A total of 175 samples with corresponding RPPA and microarray data was used. For the analysis of P(T359/S363)-RSK1 and RSK1/2/3 in gliomas of different grades, we used normalized level 4-data for the pan-cancer study. The number of samples of the dataset: grade II = 123; grade III = 134 and GBM = 171.

Gravendeel Dataset for Gliomas

CEL files from microarrays (GeneChip™ Human Genome U133 Plus 2.0 Array, Affymetrix) associated with the study from Gravendeel et al. were obtained (GSE16011) and processed using the *affy* package for R. Only primary samples were analyzed. Arrays were normalized and summarized by RMA and the ComBat algorithm was used to remove batch effects. GBMs from the same patients were averaged. Present/absent calls were obtained by the *mas5calls* function and probes classified as absent for all the samples were filtered out. The data was annotated according to the *hgu133plus2.db* package for R. Only probes with a corresponding RefSeq ID for protein (“NP”) were kept, and probes for the same gene were

collapsed (based on max intensity) using the *WGCNA* package. The dataset contains: non-tumor (NT) = 8, grade I = 8, grade II = 24, grade III = 85, GBM = 152.

Immunohistofluorescence

For the multiplex immunohistofluorescence, the Opal™ 4-Color Manual Kit (Perkin Elmer) was used according to the manufacturer's instructions. Briefly, slides were de-parafinized and rehydrated and epitope retrieval was performed by microwave in AR6 buffer. Endogenous peroxidase activity and nonspecific binding were blocked. Incubation with primary antibodies (CD68, Santa Cruz, sc-70763 1:5000; RSK1 Santa Cruz, Sc-231 1:5000; LAPTM5 Abcam, ab108014 1:500), diluted in Tris-HCl (50 mM) pH 7.5 + 1% BSA, were performed at 4 °C, overnight. After washing, secondary antibody HRP-Link (Dako®-K4068) was used. The fluorophore of the Opal Working Solution diluted 1:1000 in 1X Amplification Diluent was applied and the slides were incubated for 10 minutes. Removal of the antibodies was performed with AR6 buffer in microwave, followed by a second round of primary and secondary antibodies. Nuclear staining was performed with Draq5 (Thermo Fisher). Images were acquired by confocal microscopy (Leica SP5).

Graphics

All the graphs were performed in R version 3.5.1 in RStudio. Most of them were designed using the *ggplot2* package. For the unsupervised hierarchical clustering we used Pearson's distance and average linkage. The dendrogram was optimized with the *dendextend* package.¹⁵ For the heatmap of the DEGs, the *heatmap.2* function for R was used. In this case, we used the default options for the clustering.

Additional R packages citation

1. Bengtsson H, Bullard J, Hansen K (2018). *affxparser: Affymetrix File Parsing SDK*. R package version 1.54.0, <https://github.com/HenrikBengtsson/affxparser>.
2. MacDonald JW (2017). *hta20transcriptcluster.db: Affymetrix hta20 annotation data (chip hta20transcriptcluster)*. R package version 8.7.0.
3. H. Wickham. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York 2016.

4. herneau T (2015). *A Package for Survival Analysis in S.* version 2.38, <https://CRAN.R-project.org/package=survival>.
5. Carlson M (2018). org.Hs.eg.db: Genome wide annotation for Human. R package version 3.7.0
6. Carlson M (2016). hthgu133a.db: Affymetrix HT Human Genome U133 Array Plate Set annotation data (chip hthgu133a). R package version 3.2.3.
7. Carlson M (2016). hgu133plus2.db: Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array annotation data (chip hgu133plus2). R package version 3.2.3.

Supplementary References

1. Alvarenga AW, Coutinho-Camillo CM, Rodrigues BR, et al. A comparison between manual and automated evaluations of tissue microarray patterns of protein expression. *J Histochem Cytochem.* 2013;61(4):272-282.
2. Hatanaka Y, Hashizume K, Nitta K, Kato T, Itoh I, Tani Y. Cytometrical image analysis for immunohistochemical hormone receptor status in breast carcinomas. *Pathol Int.* 2003;53(10):693-699.
3. Machado LE, Alvarenga AW, da Silva FF, et al. Overexpression of mTOR and p(240–244)S6 in IDH1 Wild-Type Human Glioblastomas Is Predictive of Low Survival. *J Histochem Cytochem.* 2018.
4. Leek JT, Johnson WE, Parker HS, Jaffe AE, Storey JD. The SVA package for removing batch effects and other unwanted variation in high-throughput experiments. *Bioinformatics.* 2012;28(6):882-883.
5. Langfelder P, Horvath S. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics.* 2008;9(1):559.
6. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(7):e47.
7. Falcon S, Gentleman R. Using GOstats to test gene lists for GO term association. *Bioinformatics.* 2007;23(2):257-258.
8. Hänzelmann S, Castelo R, Guinney J. GSEA: Gene set variation analysis for microarray and RNA-Seq data. *BMC Bioinformatics.* 2013;14.
9. Verhaak RGW, Hoadley K a., Purdom E, et al. Integrated Genomic Analysis

- Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*. 2010;17(1):98-110.
10. Ceccarelli M, Barthel FP, Malta TM, et al. Molecular Profiling Reveals Biologically Discrete Subsets and Pathways of Progression in Diffuse Glioma. *Cell*. 2016;164(3):550-563.
 11. Yoshihara K, Shahmoradgoli M, Martínez E, et al. Inferring tumour purity and stromal and immune cell admixture from expression data. *Nat Commun*. 2013;4.
 12. Newman AM, Liu CL, Green MR, et al. Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles. *Nat Methods*. 2015;12(5):453-457.
 13. Gautier L, Cope L, Bolstad BM, Irizarry RA. Affy - Analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. *Bioinformatics*. 2004;20(3):307-315.
 14. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*. 2009;26(1):139-140.
 15. Galili T. dendextend: An R package for visualizing, adjusting and comparing trees of hierarchical clustering. *Bioinformatics*. 2015;31(22):3718-3720.

Supplementary Figure Legends

Supplementary Fig. 1 Expression of RSK isoforms in gliomas of the ACCCC cohort. Immunohistochemistry reactions for (A) RSK1, (B) RSK2, (C) P(S380)-RSK and (D) IDH1^{R132H}. Representative images are shown.

Supplementary Fig. 2 Expression of RSK isoforms in gliomas and its relationship with survival and IDH1 mutation status. (A) RSK1 protein levels and IDH1^{R132H} mutation status were determined in astrocytoma (grades I to IV) and non-tumoral brain samples (NB) from the ACCCC cohort and expressed as HSCORE. The horizontal dashed line indicates the 3rd quartile for all the samples. (B-D) Graphs for (B) RSK1 and (C) RSK2 protein levels and (D) P(S380)-RSK levels, and their relationship with survival times in GBMs (grade IV glioma). The horizontal line indicates the longest survival time for RSK1^{hi}. IDH1^{R132H} mutation status and the

Pvalue of the Fisher's exact test for the presence of IDH1^{R132H} in high and low groups are indicated. Status: 1 = dead; 0 = censored.

Supplementary Fig. 3 Analysis of RPPA data (TCGA) for P(T359/S363)-RSK1 antibody in LGG and GBM. (A) P(T359/S363)-RSK1 levels were compared for grade II, grade III and grade IV (GBM). (B) P(T359/S363)-RSK1 levels and their relationship with survival times in GBM. The horizontal line indicates the longest survival time for RSK1^{hi} from Figure 1D. (C) Overall survival plot comparing P(T359/S363)-RSK1^{hi} and P(T359/S363)-RSK1^{lo}. The number of samples is indicated in parenthesis.

Supplementary Fig. 4 Immune-cell composition of RSK1^{hi}-GBMs. The transcriptome data from the 30 samples of the ACCCC cohort were used as input for the CIBERSORT algorithm using the LM22 signature to estimate the fraction of immune-related cells. (A-L) cell types that did not correlate with RSK1 protein levels. Signatures not present in GBM samples: T cells CD4 naive, T cells CD4 memory activated and T cells gamma delta.

Supplementary Fig. 5 Expression of RSK1, LAPTM5 and CD68 in GBMs of the Recife cohort. Immunohistochemistry reactions for (A) RSK1, (B) LAPTM5 and (C) CD68. Representative images are shown. Graphs showing the relationship among (G) RSK1 and LAPTM5, (H) RSK1 and CD68, and (I) LAPTM5 and CD68.

Supplementary Fig. 6 IDH1 mutation and G-CIMP status in RSK1 signature-enriched GBMs. (A, B) RSK1 signature, IDH mutation status and patient survival for (J) Gravendeel and (K) TCGA datasets. Pvalues for the Fisher's exact test for the presence of IDH mutation and log-rank test when groups are defined according to GSVA score > 0 or < 0 are shown. The horizontal line indicates the longest survival time for RSK1^{hi}-group observed in Figure 1D. (C, D) Graphs showing the RSK1 signature enrichment and the survival times for (C) Gravendeel and (D) TCGA datasets, together with the CIMP status. Pvalue of the Fisher's exact test for the presence of G-CIMP in groups with a GSVA score > 0 and < 0 is indicated. The Pvalue for the log-rank test when the groups are defined according to GSVA score > 0 or < 0 is also shown. For reference, the horizontal line indicates the longest survival time for RSK1^{hi}-group observed in Figure 1D. Status: 1 = dead; 0 = censored.

Supplementary Fig. 7 Analysis of RPPA data (TCGA) for RSK1/2/3 antibody in LGG and GBM. (A) RSK1/2/3 levels were compared for grade II, grade III and grade IV (GBM). (B) RSK1/2/3 levels and their relationship with survival times in GBM. The horizontal line indicates the longest survival time for RSK1^{hi}-group from Figure 1D.

Supplementary Table Legends

Supplementary Table 1 Clinical information of cohorts used in the present study (excel file). Tab 1 – ACCCC cohort of astrocytomas used for TMA. Tab 2 – 30 samples of GBMs from the ACCCC cohort used for the transcriptome analysis. The HSCORE for RSK1 was obtained from the immunohistochemistry on a slide and not in a spot of TMA. Thus, HSCORE might differ. Samples in bold were used both for TMA and microarray. Tab 3 – Recife cohort.

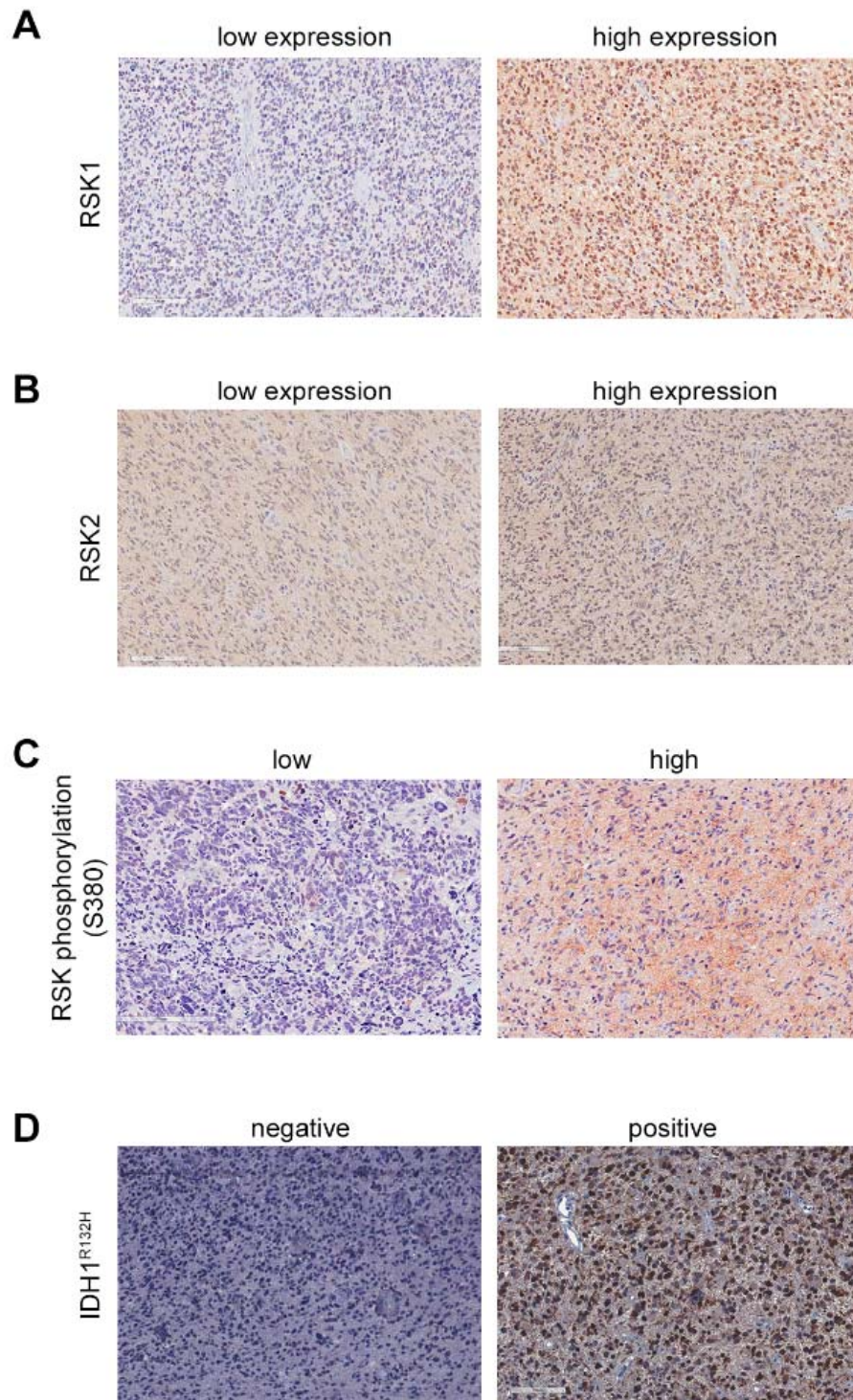
Supplementary Table 2 Median survival information for the overall-survival plots in the article.

Supplementary Table 3 Differentially expressed genes between RSK1^{hi} and RSK1^{lo}-glioblastomas (excel file). *Limma* package was used and the table represents the output. Positive logFC (log fold-change) refers to mRNAs expressed at higher levels in the RSK1^{hi}-group.

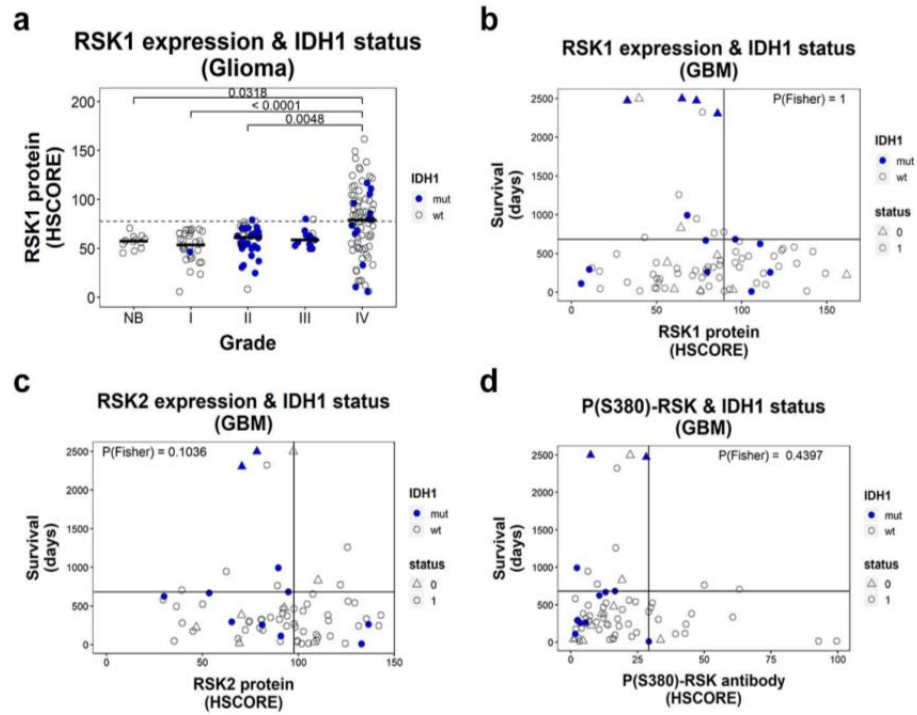
Supplementary Table 4 Complete list of biological processes obtained by the GOstats package (excel file). The first tab shows the processes enriched in RSK1^{hi} - GBMs and the second tab shows the processes enriched in RSK1^{lo}-GBMs.

Supplementary figure 1

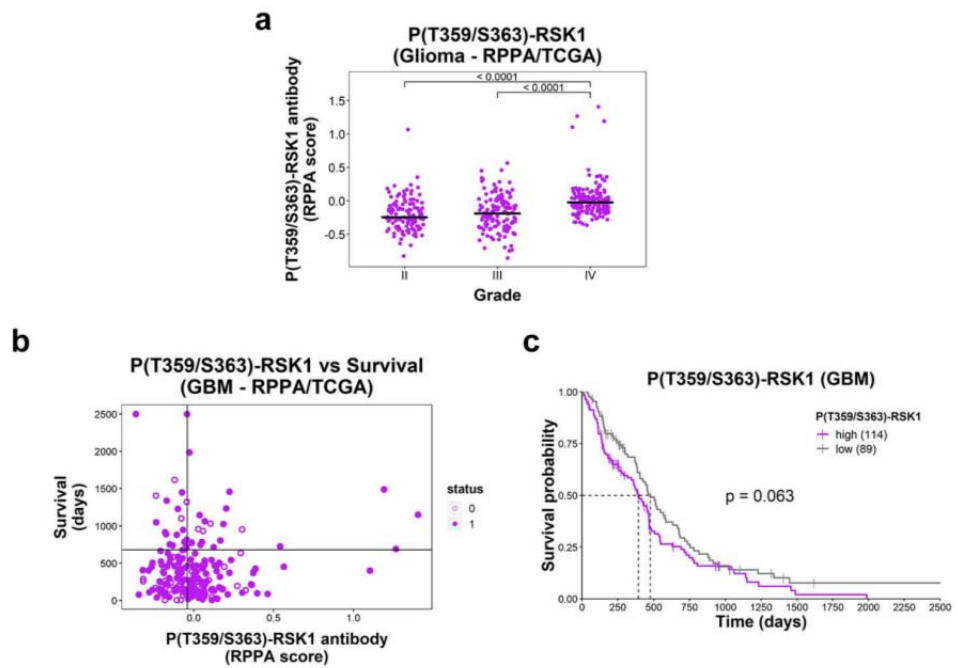
ACCCC Cohort



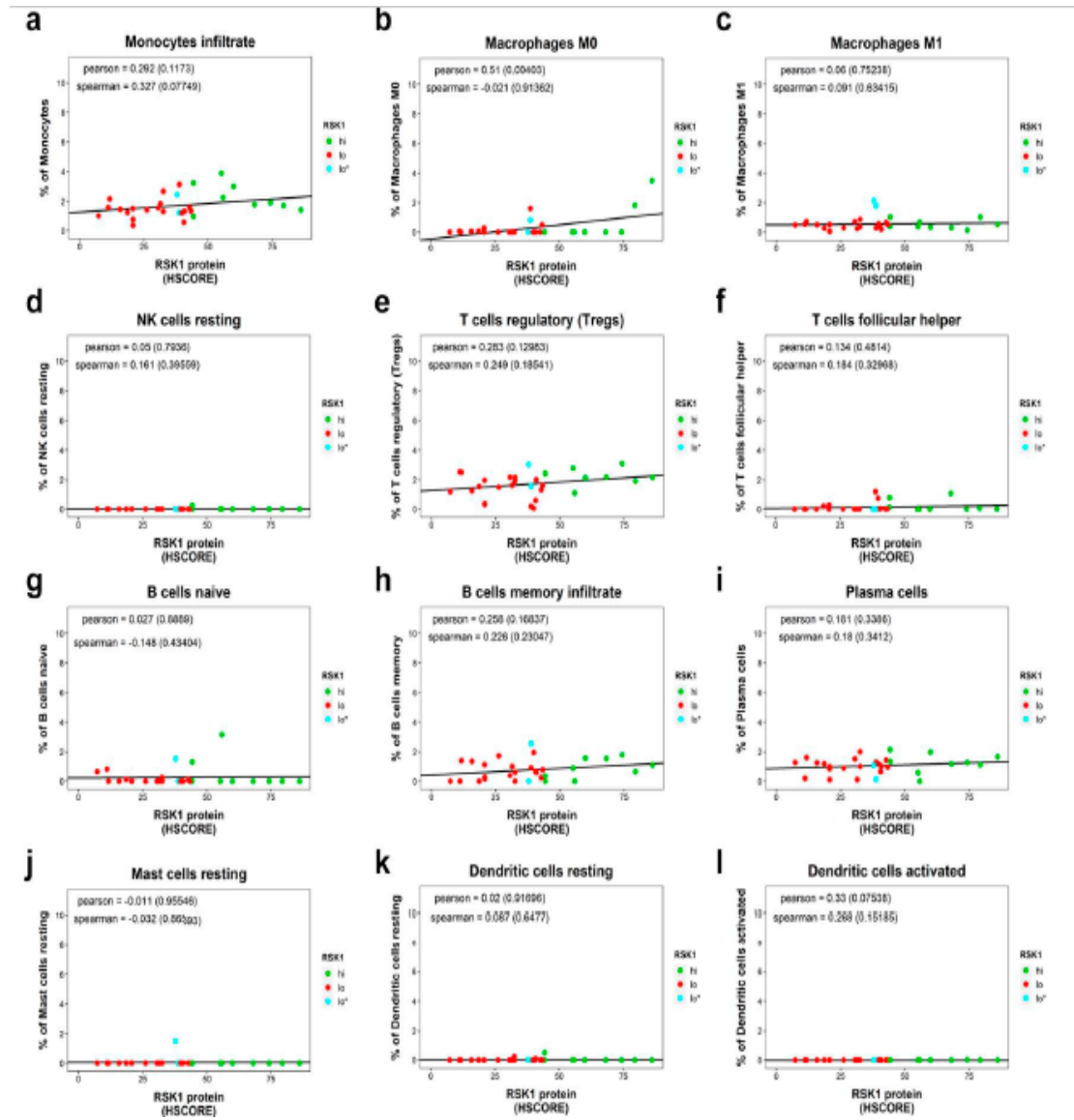
Supplementary figure 2



Supplementary figure 3

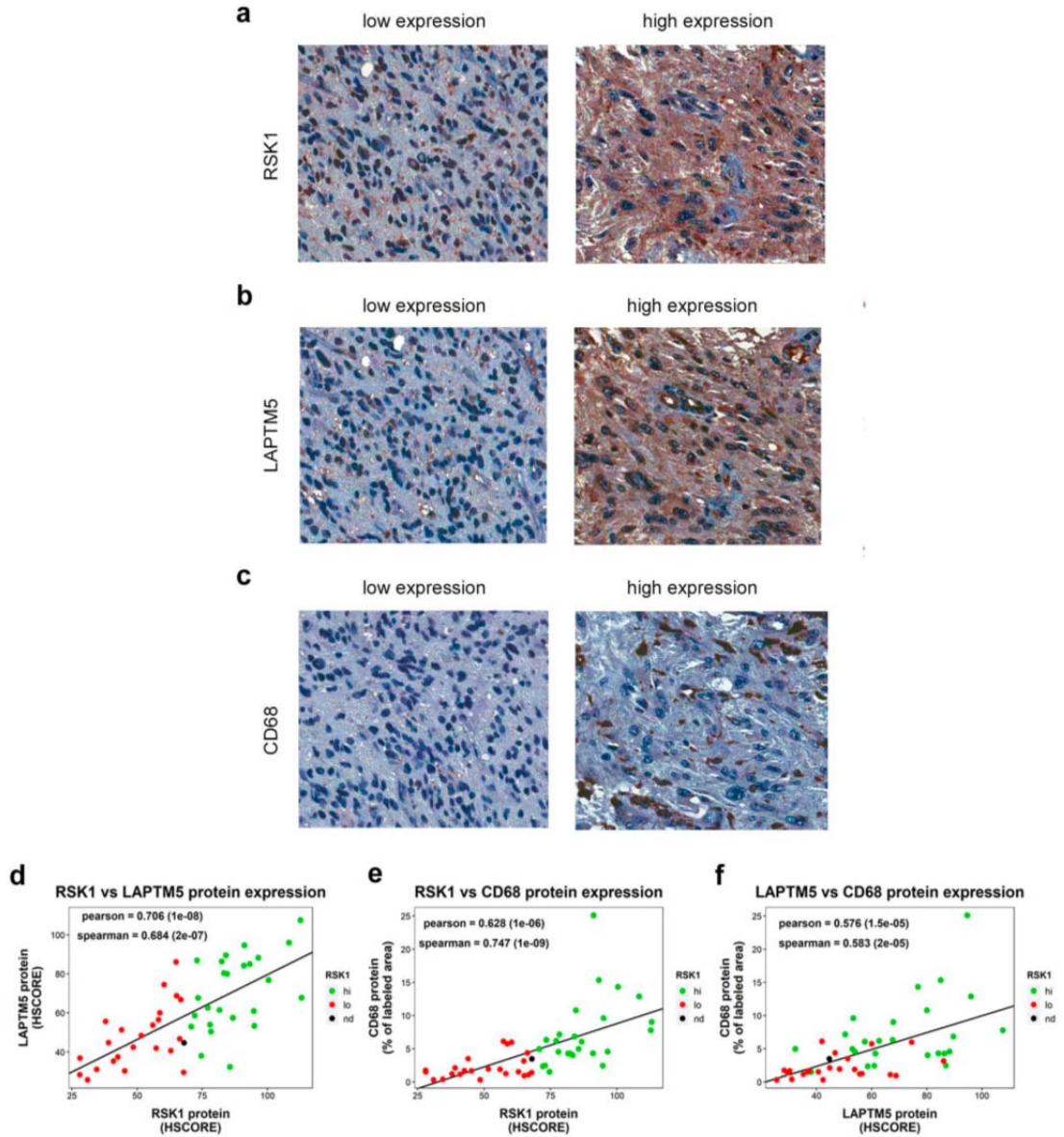


Supplementary figure 4

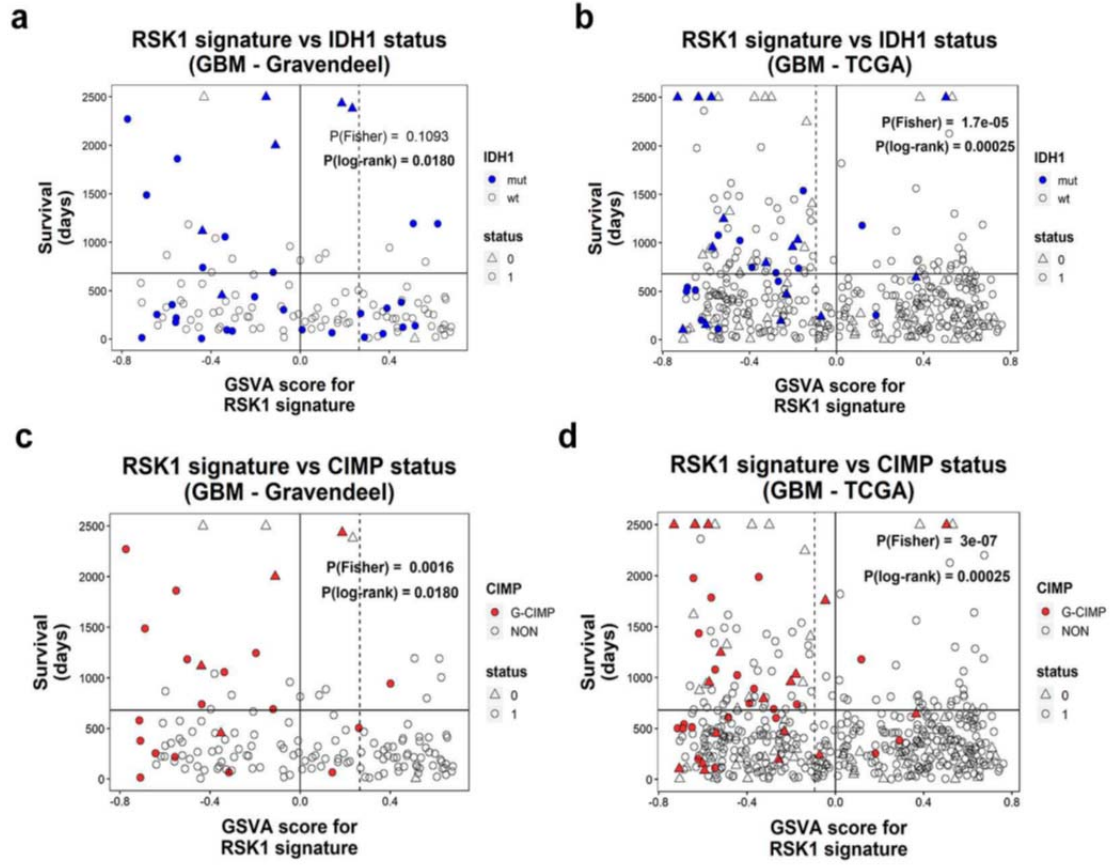


Supplementary figure 5

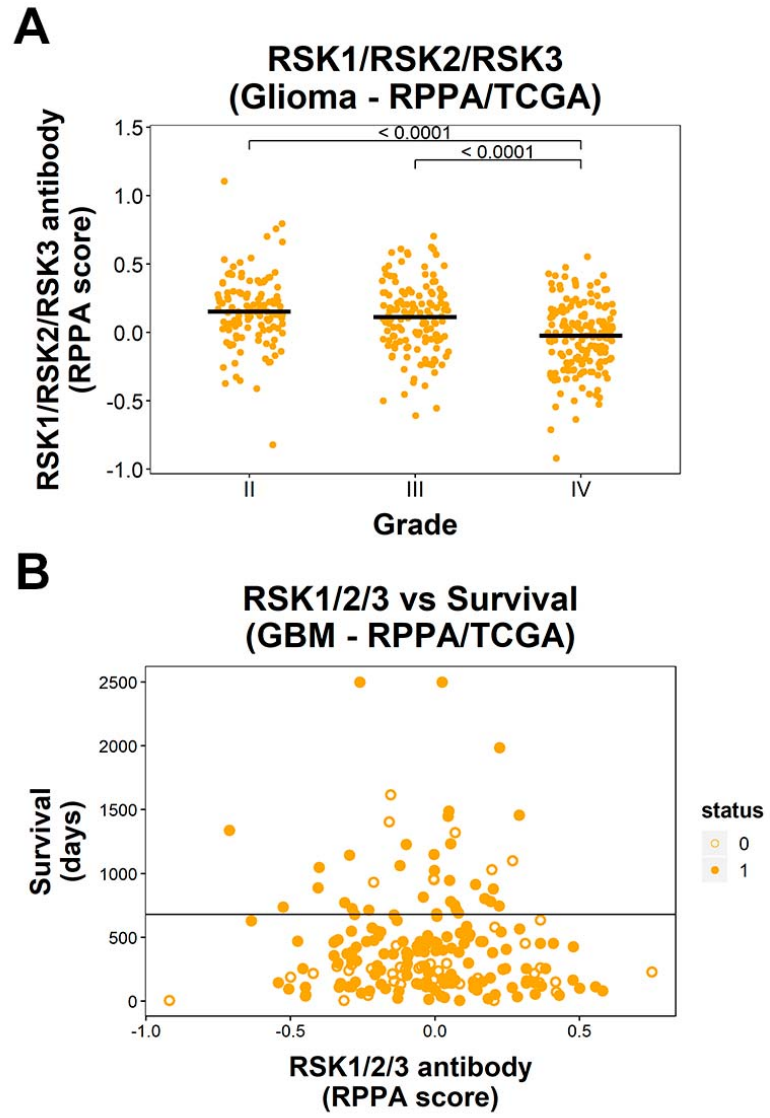
Recife Cohort



Supplementary figure 6



Supplementary figure 7



Supplementary table

Figure	Groups	Survival (days)	N^o of samples	P (log-rank)
1G	RSK2 ^{hi}	260	29	0.022
	RSK2 ^{lo}	405	44	
2C	RSK1-mRNA ^{hi}	275.5	18	0.044
	RSK1-mRNA ^{lo}	975	12	
4B	RSK1 ^{hi}	135	24	0.00032
	RSK1 ^{lo}	583	23	
4D	LAPTM5 ^{hi}	135	20	0.0074
	LAPTM5 ^{lo}	330	27	
4F	CD68 ^{hi}	135	23	0.019
	CD68 ^{lo}	434	24	
5E	signRSK1 ^{enriched}	263.5	14	0.008
	signRSK1 ^{underrepresented}	774	16	
5H	signRSK1 ^{enriched}	216	54	0.0018
	signRSK1 ^{underrepresented}	312	94	
5G	signRSK1 ^{enriched}	372	284	< 0.0001
	signRSK1 ^{underrepresented}	468	238	
6E	signRSK1 ^{enriched}	1033	63	0.0034
	signRSK1 ^{underrepresented}	1762	173	
6F	signRSK1 ^{enriched}	708	51	0.0038
	signRSK1 ^{underrepresented}	2022	34	
6G	signRSK1 ^{enriched}	2988	87	0.013
	signRSK1 ^{underrepresented}	5166	128	
Supplementary 3C	P(T359/S636)-RSK1 ^{hi}	394	114	0.063
	P(T359/S636)-RSK1 ^{lo}	476	89	

Anexo 1 – Aprovação do comitê de ética em pesquisa do Hospital de Câncer

SOCIEDADE PERNAMBUCANA
DE COMBATE AO CÂNCER-
SPCC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DE ROK1 E A PRESENÇA DE INFILTRADO DE CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE EM GLIOBLASTOMAS NO HOSPITAL DO CÂNCER DE PERNAMBUCO

Pesquisador: JUVANIER ROMÃO CRUZ

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 55476716.3.0000.5205

Instituição Proponente: SOCIEDADE PERNAMBUCANA DE COMBATE AO CÂNCER -SPCC

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.269.616

Apresentação do Projeto:

Sabe-se que a incidência dos gliomas malignos é de 17.000 novos casos por ano 4. Em particular o astrocitoma de grau IV, também denominado glioblastoma (GBM; anteriormente denominado Glioblastoma Multiforme), representa 82% dos gliomas malignos 4. Apesar do tratamento, quase todos os GBMs, eventualmente, apresentam recorrência e o tempo médio de progressão da doença após o tratamento é de 6,9 meses 6. Deste modo é necessário um melhor conhecimento do processo patológico do GBM. Será realizado um estudo de corte transversal, descritivo e retrospectivo no período de junho de 2016 a fevereiro 2018, após aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa do HCP. Serão analisadas 30 amostras composta por pacientes que realizaram cirurgia de Glioblastoma no HCP no período de 2009 a 2015. Os dados clínicos e patológicos serão obtidos e marcadores associados com células do sistema imune será utilizada a técnica de imuno-histoquímica a partir de lâminas preparadas dos blocos de parafina

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo principal deste trabalho será avaliar a relação entre a expressão de ROK1 e a presença de infiltrado de células imunes em GBM no Hospital de Câncer de Pernambuco.

Endereço: Av. Cruz Cabugá, 1597

Bairro: Santo Amaro

CEP: 50.040-000

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)3217-8005

Fax: (81)3217-8005

E-mail: cep@hcp.org.br

SOCIEDADE PERNAMBUCANA
DE COMBATE AO CÂNCER-
SPCC



Continuação do Parecer: 2.208.616

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Trata-se de estudo descritivo e translacional, não havendo qualquer risco a integridade dos sujeitos participantes desta pesquisa

Benefícios: O potencial benefício advindo das informações geradas na pesquisa pode contribuir para o manejo de casos semelhantes no futuro

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos presentes

Recomendações:

Sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências. Foi apresentada a emenda: carta de anuência do Hospital da Restauração

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_983655_E1.pdf	30/08/2017 15:55:45		Aceito
Outros	CARTEDEANUENCIA_HR.pdf	30/08/2017 15:53:14	JUVANIER ROMÃO CRUZ	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investidor	ProjetoMestradojuvanierFinal.doc	22/08/2017 14:53:32	JUVANIER ROMÃO CRUZ	Aceito
Orçamento	orcamentoalterado.docx	26/05/2016 17:54:52	JUVANIER ROMÃO CRUZ	Aceito
Outros	termodolaboratorioaccamargo.jpg	26/05/2016 17:50:26	JUVANIER ROMÃO CRUZ	Aceito
Outros	CurriculoMartins.docx	26/05/2016 17:46:49	JUVANIER ROMÃO CRUZ	Aceito
Outros	ProjetoDetalhadoalterado.docx	26/05/2016 17:46:21	JUVANIER ROMÃO CRUZ	Aceito
Outros	respostadocronograma.pdf	14/04/2016 17:37:18	JUVANIER ROMÃO CRUZ	Aceito

Endereço: Av. Cruz Cabugá, 1597

Bairro: Santo Amaro

CEP: 50.040-000

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)3217-8005

Fax: (81)3217-8005

E-mail: cep@hcp.org.br

SOCIEDADE PERNAMBUCANA
DE COMBATE AO CÂNCER-
SPCC



Continuação do Parecer: 2.268/616

Outros	termodolaboratorio.pdf	14/04/2016 17:21:17	JUVANIER ROMÃO CRUZ	Aceito
Outros	cartadeanuenciadohpc.pdf	14/04/2016 17:20:48	JUVANIER ROMÃO CRUZ	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	14/04/2016 17:16:33	JUVANIER ROMÃO CRUZ	Aceito
Outros	termoregistrocancer.pdf	14/04/2016 17:13:31	JUVANIER ROMÃO CRUZ	Aceito
Outros	termodosame.pdf	14/04/2016 17:13:09	JUVANIER ROMÃO CRUZ	Aceito
Outros	AC_Camargo_dados_clinicos_tabela.xls x	04/04/2016 20:21:49	JUVANIER ROMÃO CRUZ	Aceito
Outros	TERMODECONFIDENCIALIDADE.docx	04/04/2016 20:20:38	JUVANIER ROMÃO CRUZ	Aceito
TCE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	DISPENSADOTCE.doc	04/04/2016 20:18:46	JUVANIER ROMÃO CRUZ	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.docx	04/04/2016 20:07:46	JUVANIER ROMÃO CRUZ	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projetodetalhado.docx	04/04/2016 19:57:36	JUVANIER ROMÃO CRUZ	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.docx	04/04/2016 19:49:55	JUVANIER ROMÃO CRUZ	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 12 de Setembro de 2017

Assinado por:
ISABEL CRISTINA LEAL
(Coordenador)

Endereço: Av. Cruz Cabugá, 1597
Bairro: Santo Amaro CEP: 50.040-000
UF: PE Município: RECIFE
Telefone: (01)3217-8005 Fax: (01)3217-8005 E-mail: cep@hpc.org.br

Anexo 2 - Aprovação do comitê de ética em pesquisa do Hospital da Restauração

HOSPITAL DA RESTAURAÇÃO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DE RSK1 E A PRESENÇA DE INFILTRADO DE CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE EM GLIOBLASTOMAS NO HOSPITAL DO CÂNCER DE PERNAMBUCO

Pesquisador: JUVANIER ROMÃO CRUZ

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 55476716.3.3002.5198

Instituição Proponente: Hospital da Restauração - PE

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.371.195

Apresentação do Projeto:

Projeto bem apresentado, contendo os termos obrigatórios. Linguagem simples, com nível de entendimento.

Objetivo da Pesquisa:

Bem descrito, uso correto dos verbos, entende-se claramente o que se pretende com a pesquisa.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A descrição dos riscos é pobre uma vez que informa risco mínimo, no entanto, sugere-se descrever esses riscos, uma vez que apesar de serem dados secundários, existe sim o risco e esse precisa ser bem descrito para tomar o projeto em conformidade com a Resolução 466/2012 do CONEP.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Para adequação do projeto, faz-se necessário atualizar o cronograma, pois a coleta de dados encontra-se descrita iniciando antes da submissão/aprovação do projeto por este CEP; Precisa-se incluir os currículos lattes de todos os envolvidos com a pesquisa; Descrever os Risco; Incluir na folha de Rosto a Instituição coparticipante,

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Necessita adequações. Vide lista de pendências

Endereço: Av. Agamenon Magalhães, s/nº 5ª Andar

Bairro: Derby

CEP: 52.010-040

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (01)3181-5603

Fax: (01)3181-5603

E-mail: joelmariooliveira@terra.com.br

Continuação do Parecer: 2.371.195

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante da análise do Projeto, lista-se as seguintes pendências, que após serem cumpridas, deve-se reenviar os documentos a este CEP para posterior Análise:

- 1- Cronograma: Não é permitido colher os dados após a aprovação do CEP, e no cronograma a coleta já foi iniciada desde 2016.
- 2-Em todos os documentos como termo de confidencialidade, e outros, deve constar que a pesquisa será realizada no Hospital da Restauração também. E assim, avaliada pelo CEP-HR;
- 3-Descrever os riscos. Não existe pesquisa isenta de riscos, os menores que hajam, devem ser bem descritos.
- 4-Incluir os Currículos lattes de todos os pesquisadores;
- 5-Incluir na folha de Rosto como Instituição Co-Participante o Hospital da Restauração com assinatura do Responsável pelo HR.

Considerações Finais a critério do CEP:

Cumprir as Recomendações e reenviar para o CEP/HR, via plataforma brasil. É o parecer, salvo melhor juízo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_983655_E1.pdf	30/08/2017 15:55:45		Aceito
Outros	CARTEANUENCIA_HR.pdf	30/08/2017 15:53:14	JUVANIER ROMÃO CRUZ	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investidor	ProjetoMestradojuvanierFinal.doc	22/08/2017 14:53:32	JUVANIER ROMÃO CRUZ	Aceito
Orçamento	orcamentoalterado.docx	26/05/2016 17:54:52	JUVANIER ROMÃO CRUZ	Aceito
Outros	termodolaboratorioaccamargo.jpg	26/05/2016 17:50:26	JUVANIER ROMÃO CRUZ	Aceito
Outros	CurriculoMartins.docx	26/05/2016 17:46:49	JUVANIER ROMÃO CRUZ	Aceito
Outros	Projetodetalhadoalterado.docx	26/05/2016 17:46:21	JUVANIER ROMÃO CRUZ	Aceito
Outros	respostadocronograma.pdf	14/04/2016 17:37:18	JUVANIER ROMÃO CRUZ	Aceito
Outros	termodolaboratorio.pdf	14/04/2016 17:21:17	JUVANIER ROMÃO CRUZ	Aceito

Endereço: Av. Agamenon Magalhães, s/nº 5º Andar
 Bairro: Derby CEP: 52.010-040
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (01)3181-5803 Fax: (01)3181-5803 E-mail: joamariooliveira@hrra.com.br

Continuação do Parecer: 2.371.195

Outros	cartadeanuenciadohcp.pdf	14/04/2016 17:20:48	JUVANIER ROMÃO CRUZ	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	14/04/2016 17:16:33	JUVANIER ROMÃO CRUZ	Aceito
Outros	termoregistrocancer.pdf	14/04/2016 17:13:31	JUVANIER ROMÃO CRUZ	Aceito
Outros	termodosame.pdf	14/04/2016 17:13:09	JUVANIER ROMÃO CRUZ	Aceito
Outros	AC_Camargo_dados_clinicos_tabela.xls x	04/04/2016 20:21:49	JUVANIER ROMÃO CRUZ	Aceito
Outros	TERMODECONFIDENCIALIDADE.docx	04/04/2016 20:20:38	JUVANIER ROMÃO CRUZ	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	DISPENSADOTCLE.doc	04/04/2016 20:18:46	JUVANIER ROMÃO CRUZ	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.docx	04/04/2016 20:07:46	JUVANIER ROMÃO CRUZ	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projetodetalhado.docx	04/04/2016 19:57:36	JUVANIER ROMÃO CRUZ	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.docx	04/04/2016 19:49:55	JUVANIER ROMÃO CRUZ	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 08 de Novembro de 2017

Assinado por:
elizandra oaccia da silva oliveira
(Coordenador)


Anexo 3 – Carta de anuência HCP



CARTA DE ANUÊNCIA

Declaramos para os devidos fins, que aceitaremos a pesquisadora **Juvanier Romão Cruz**, a desenvolver o seu projeto de pesquisa intitulado: **AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DE RSK1 E A PRESENÇA DE INFILTRADO DE CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE EM GLIOBLASTOMA NO HOSPITAL DO CÂNCER DE PERNAMBUCO**, que está sob a orientação de Dra Vilma Regina Martins Co-orientação do Dr Martin Roffé, cujo objetivo é avaliar a relação entre a expressão de RSK1e a presença de infiltrado de células imunes em Glioblastomas no HCP. Será realizado no setor de Patologia do Hospital do Câncer e no Laboratório do Centro Internacional de Pesquisa (CIPE) do AC Camargo. A aceitação está condicionada ao cumprimento do (a) pesquisador (a) aos requisitos da Resolução 466/12 e suas complementares, comprometendo-se a utilizar os dados e materiais coletados, exclusivamente para os fins da pesquisa.

Recife, 05/04/2016.

 Dr. José Peixoto
Superintendente Ensino e Pesquisa
Hospital de Câncer de Pernambuco

Anexo 4 - Carta de Anuência HR



GOVERNO DO ESTADO DE PERNAMBUCO
SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DE PERNAMBUCO
HOSPITAL DA RESTAURAÇÃO GOV. PAULO GUERRA



HOSPITAL DA RESTAURAÇÃO

CARTADE ANUÊNCIA

Eu, Dr. Miguel Arcanjo dos Santos Júnior, RG 1.861.808 / SDS, declaro estar ciente da pesquisa intitulada "Avaliação da relação entre a Expressão de RSK 1 e a presença de Infiltrado de células do sistema imune em Glioblastomas no Hospital do Câncer de Pernambuco. Pesquisador (a) Juvanier Romão Cruz, Sob a orientação da Prof. Vilma Regina Martins. Em relação à pesquisa supracitada, informamos que o acesso do pesquisador ao local da pesquisa e a manipulação dos dados, será autorizado somente após a emissão do parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.

Declaro conhecer e cumprir com as resoluções Éticas Brasileiras em especial a resolução CNS 466/12.

Esta instituição está ciente de suas responsabilidades como instituição participante do presente projeto de pesquisa e de seu compromisso no resguardo da infraestrutura, segurança e bem-estar dos sujeitos de pesquisa nela recrutados, junto aos profissionais, nesta Unidade Hospitalar.

Recife 25 agosto de 2017


Dr. Miguel Arcanjo dos Santos Júnior
Diretor Geral - HR (6)
CRM 8830

Hospital da Restauração
Av. Agamenon Magalhães, s/nº - Derby - Recife/PE - CEP 52.010-040
Fone: (81) 3181-5407 / Fax: (81) 3181-5586
hrdiger@gmail.com

Anexo 5 - Termo de autorização do uso de dados



TERMO DE AUTORIZAÇÃO DO USO DE DADOS


Declaramos para os devidos fins, que cederemos à pesquisador/a **Juvanier Romão Cruz**, o acesso aos dados de número do registro de todos os pacientes para serem utilizados na pesquisa: **Avaliação da relação entre a expressão de RSK1 e a presença de infiltrado de células do sistema imune em Glioblastomas no Hospital do Câncer de Pernambuco**, que está sob a orientação da **Dra Vilma Regina Martins**.

Esta autorização está condicionada ao cumprimento do (a) pesquisador (a) aos requisitos da Resolução 466/12 e suas complementares, comprometendo-se o (a) mesmo (a) a utilizar os dados pessoais dos sujeitos da pesquisa, exclusivamente para os fins científicos, mantendo o sigilo e garantindo a não utilização das informações em prejuízo das pessoas e/ou das comunidades.

Antes de iniciar a coleta de dados o/a pesquisador/a deverá apresentar o Parecer Consubstanciado devidamente aprovado, emitido por Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, credenciado ao Sistema CEP/CONEP.

Recife, 08 de abril de 2016.

Nome/assinatura e carimbo do responsável pelo Setor Registro Hospitalar


M^{te} Aparecida B. de Lima
Coordenadora do Núcleo de RHC e Estatística
HCP-Hospital de Câncer de Pernambuco
E-mail: registrodecancer@hcp.org.br

Anexo 6 – Termo de autorização do laboratório



Termo de Autorização do Laboratório

Eu, **Fernando soares**, chefe da Anatomia patológica do AC Camargo, venho através desta declarar estar ciente e de acordo com o desenvolvimento do projeto de pesquisa intitulado: **Avaliação da relação entre a expressão de RSK1 e a presença de infiltrado de células do sistema imune em Glioblastomas no Hospital do Câncer de Pernambuco** da pesquisadora: **Juvanier Romão cruz**. Orientado por **Vilma Regina Martins**, facultando-lhe o uso das instalações e do setor de patologia deste laboratório.

A aceitação esta condicionada ao cumprimento do pesquisador aos requisitos da Resolução 466/12 CNS/CONEP que trata de pesquisa envolvendo seres humanos.

São Paulo, 28 de Abril de 2016

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Juvanier Romão Cruz', written over a horizontal line.

Assinatura do Responsável pelo Laboratório

Anexo 7 – Termo de confidencialidade



TÉRMO DE CONFIDENCIALIDADE

Título do Projeto: avaliação da relação entre a expressão de RSK1 e a presença de infiltrado de células do sistema imune em Glioblastoma no Hospital do Câncer de Pernambuco

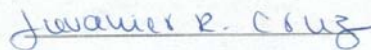
Pesquisador responsável: Juvanier Romão cruz

Instituição/Departamento: Hospital do Câncer de Pernambuco

Telefone de Contato:081-3217-8231

A pesquisador Juvanier Romão Cruz, a orientadora do presente projeto, Dra Vilma Regina Martins e o co-orientador Dr Martin Roffé se comprometem a preservar a privacidade dos dados coletados e disponibilizados para a pesquisa. Os dados serão acessados exclusivamente pela equipe de pesquisadores e a informação arquivada em papel não conterá a identificação dos nomes dos sujeitos elencados. Este material será arquivado de forma a garantir acesso restrito aos pesquisadores envolvidos, e terá a guarda por cinco anos, quando será incinerado. Concordam, igualmente, que essas informações serão utilizadas únicas e exclusivamente para a execução do presente projeto. As informações somente poderão ser divulgadas de forma anônima e serão mantidas (nos computadores/arquivos das salas) dos grupos de pesquisa da (instituição envolvida) sob a responsabilidade de (fulano/a de tal). Este projeto está em avaliação/aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, do Hospital de Câncer de Pernambuco.

Recife, 05 / 04 / 2016



Pesquisadora responsável



Orientadora



Co-orientador

Anexo 8 – Dispensa do termo de consentimento livre e esclarecido



DISPENSA DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Venho por meio desta informar ao Comitê de Ética em Pesquisa que o projeto de pesquisa intitulado: **AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DE RSK1 E A PRESENÇA DE INFILTRADO DE CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE EM GLIOBLASTOMA NO HOSPITAL DO CÂNCER DE PERNAMBUCO**, não utilizará o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido por que a pesquisa será realizada em prontuário de pacientes. A autora da pesquisa dos seus dados pessoais e informar que estes serão utilizados apenas para alcançar os objetivos do trabalho exposto acima, incluídos sua aplicação na literatura científica especializada e apresentação em eventos científicos.

Recife, 04 de abril de 2016


Juvaniel Romão Cruz
Médico Chefe HCP

Pesquisador(a) responsável