

**CORRELAÇÃO ENTRE COMPONENTE
OLIGODENDROGLIAL, ANORMALIDADES
CROMOSSÔMICAS E PROGNÓSTICO NOS
GLIOBLASTOMAS**

LUCIANA WERNERSBACH PINTO

**Tese apresentada à Fundação Antonio Prudente
para a obtenção do Grau de Doutor em Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto Soares

**Co-Orientador: Dra Maria Betânia Mahler Araújo,
Dr André Luiz Vettore**

São Paulo

2007

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Pinto, Luciana Wernersbach

Correlação entre componente oligodendroglial, anormalidades cromossômicas e prognóstico nos glioblastomas / Luciana Wernersbach Pinto – São Paulo, 2007.

116p.

Tese (doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Fernando Augusto Soares

Descritores: 1. CÂNCER DO CÉREBRO. 2. GLIOBLASTOMA. 3. GENÉTICA
4. OLIGODENDROGLIA. 5. ANORMALIDADES.

AGRADECIMENTOS

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento deste projeto.

Ao meu orientador, Dr. Fernando Augusto Soares, pelo apoio e confiança em todas as etapas do desenvolvimento do projeto.

Ao Dr. André L. Vettore pela orientação na realização da análise genética molecular e a Dra. Maria Betânia Mahler Araújo pela orientação na formulação do projeto.

A professora Dra. Leila Maria Cardão Chimelli pelas sugestões e revisões dos relatórios, bem como pela contribuição com casos para a realização do estudo.

Aos membros da banca de qualificação, Dra. Denise Nogueira Rangel Pestana e Dr. Flávio Henrique da Silva, pela revisão do projeto original e relatórios.

A Dra. Liana Wernersbach Pinto pela realização da análise estatística.

A professora Dra. Nadia Montagna pelas sugestões no texto original da tese.

A todos os colegas e funcionários dos laboratórios de Genética do Câncer do Instituto Ludwig de Pesquisa e do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital AC Camargo pela amizade e apoio na resolução das dificuldades encontradas ao longo do desenvolvimento do projeto, em especial ao biólogo José Ivanildo Neves pelo empenho fundamental na realização das reações de FISH e ao biólogo Fabrício Carvalho pela infinita paciência ao me ensinar a rotina básica do laboratório de biologia molecular, bem como pela ajuda imprescindível na padronização das reações de PCR.

RESUMO

Pinto LW. **Correlação entre componente oligodendrogliol, anormalidades cromossômicas e prognóstico nos glioblastomas.** São Paulo; 2007. [Tese de Doutorado-Fundação Antonio Prudente].

Glioblastoma é a neoplasia glial mais comum e de maior agressividade nos adultos. Apesar do tratamento multimodal, o prognóstico é pobre e a média de sobrevida de menos de 1 ano. O padrão histológico é bastante variado e uma pequena fração destes tumores pode apresentar um componente oligodendrogliol. O significado clínico da distinção entre tais tumores e glioblastomas convencionais ainda permanece desconhecido, mas já foi sugerido que a presença do componente oligodendrogliol pode estar associada a uma maior sobrevida. Os estudos moleculares de glioblastomas com componente oligodendrogliol têm mostrado alterações genéticas heterogêneas, com frequências variadas na literatura de perda de heterozigosidade em 1p e 19q, alterações relacionadas com sobrevida prolongada e resposta à quimioterapia em tumores oligodendrogliais e que levaram a um interesse na investigação destas alterações em outros gliomas. A literatura apresenta dados controversos e ainda não foi possível estabelecer uma associação definitiva entre a maior sobrevida observada em alguns pacientes e o perfil genético/molecular. O objetivo deste estudo foi pesquisar as alterações cromossômicas associadas ao fenótipo oligodendrogliol em uma série de 88 glioblastomas, 24 deles com componente oligodendrogliol, utilizando duas técnicas complementares (FISH e análise quantitativa de microssatélites) para investigação de perdas alélicas, correlacionando os resultados com o prognóstico. Os resultados mostraram que deleções nos cromossomos 1p e 19q são infreqüentes nos glioblastomas com componente oligodendrogliol. Apesar do fenótipo híbrido, o padrão de alterações genéticas nos cromossomos 1p/19q foi semelhante aquele observado nos glioblastomas convencionais e não mostrou impacto na sobrevida. O presente estudo também confirmou a relação da idade e do tratamento adjuvante com o prognóstico nos pacientes com glioblastomas.

SUMMARY

Pinto LW. **[Correlation between oligodendroglial component, genetic abnormalities and prognosis in glioblastomas]**. São Paulo; 2007. [Tese de Doutorado-Fundação Antonio Prudente].

Glioblastoma is the most frequent and aggressive astrocytic tumor in adults. Despite the multimodal therapy, the prognosis remains poor and the mean survival is of less than a year. The histology of glioblastomas can be quite variable and a small fraction of the tumors may present an oligodendroglial component. The clinical significance of the distinction between these tumors and conventional glioblastomas remains uncertain, but the presence of an oligodendroglial component has been associated with longer survival. Molecular genetic studies of glioblastomas with oligodendroglial component have shown heterogeneous genetic alterations, with a variable frequency of LOH on chromosomes 1p and 19q. The presence of 1p/19q deletions has been related to prolonged survival and response to chemotherapy in oligodendrogliomas and led to a growing interest in search for the same genetic alterations in other gliomas. At present, literature data is not sufficient to establish a definite correlation between the longer survivals observed in some patients and the molecular genetic profile. The aim of this study was to identify chromosomal alterations related to oligodendrogliomas (1p/19q loss) in a series of 88 glioblastomas, 24 of them with an oligodendroglial component, through quantitative microsatellite analysis using real time PCR and fluorescent *in situ* hybridization, correlating genetic data with prognosis. Deletions on 1p and/or 19q were infrequent in glioblastomas with oligodendroglial component. Despite the hybrid phenotype observed, the pattern of genetic changes on chromosomes 1p and 19q wasn't different from that usually observed in conventional glioblastomas and showed no correlation with survival. Our study also confirmed the already known impact of young age and adjuvant treatment on prognosis.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Alterações genéticas e moleculares observadas nos gliomas astrocíticos infiltrantes.	14
Figura 2	<i>Tissue microarray</i> de glioblastomas.	47
Figura 3	Características morfológicas dos Glioblastomas com componente oligodendroglial.	56
Figura 4	Amplificação de fragmento do gene da albumina (141bp).	58
Figura 5	Curvas de amplificação com diluições sucessivas do DNA da linhagem celular SKBR3, utilizando o oligonucleotídeo D1S468.	59
Figura 6	Curva de eficiência para o oligonucleotídeo D1S514.	60
Figura 7	Tumores que mostraram perda no cromossomo 1p.	64
Figura 8	Tumores que mostraram perda no cromossomo 19q.	65
Figura 9	Resultado final da pesquisa de deleção nos cromossomos 1p e 19q.	68
Figura 10	Hibridizações <i>in situ</i> fluorescentes.	69
Figura 11	Estimativa da sobrevida global.	70
Figura 12	Curvas de sobrevida segundo a idade (até 45 anos e mais de 45 anos).	72
Figura 13	Curvas de sobrevida segundo o gênero.	73
Figura 14	Curvas de sobrevida segundo a localização do tumor(um lobo x localização combinada).	74
Figura 15	Curvas de sobrevida segundo a localização do tumor (frontal parietal, temporal, occipital, combinada).	75
Figura 16	– Curvas de sobrevida segundo o tratamento adjuvante.	76
Figura 17	Curvas de sobrevida segundo a extensão da ressecção.	77
Figura 18	Curvas de sobrevida segundo o diagnóstico histológico.	78
Figura 19	Curvas de sobrevida segundo o status de 1p.	79
Figura 20	Curvas de sobrevida segundo o status de 19q.	80

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1	Seqüência dos oligonucleotídeos.	45
Tabela 2	Características da população estudada.	54
Tabela 3	Características histológicas dos tumores.	55
Tabela 4	Risco de óbito para os grupos etários.	71
Tabela 5	Resultados da análise múltipla.	81
Tabela 6	Comparação entre as características dos glioblastomas convencionais e glioblastomas com componente oligodendroglial.	85

LISTA DE ABREVIATURAS

CDK	quinase dependente de ciclina
CGH	Hibridização genômica comparativa
DNA	ácido desoxirribonucléico
EGFR	receptor do fator de crescimento epidérmico
FISH	hibridização <i>in situ</i> fluorescente
GB	glioblastoma
GBO	glioblastoma com componente oligodendrogial
GFAP	proteína fibrilar ácida glial
LOH	perda de heterozigosidade
HE	hematoxilina-eosina
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	reação em cadeia da polimerase
PDGFR	receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas
QuMA	Análise quantitativa de microssatélites
QT	quimioterapia
RT	radioterapia
RT-PCR	PCR com transcriptase reversa
SNC	sistema nervoso central
SOE	sem outra especificação
TC	tomografia computadorizada
TMA	<i>tissue microarray</i>

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	A origem celular dos gliomas	1
1.2	Aspectos clínicos e anátomo–patológicos dos glioblastomas	3
1.2.1	Aspectos clínicos e fatores prognósticos	3
1.2.2	Aspectos anátomo patológicos dos glioblastomas	7
1.3	Genética molecular dos gliomas difusos	13
1.3.1	Genética molecular dos tumores astrocíticos	13
1.3.2	Genética molecular dos tumores oligodendrogliais	19
1.3.3	Glioblastomas com componente oligodendrogliar e o significado da perda em 1p e 19q nos tumores astrocíticos, oligodendrogliais e gliomas híbridos oligoastrocíticos	24
1.4	Hibridização <i>in situ</i> fluorescente e suas aplicações em neuropatologia	32
1.5	PCR em tempo real e análise quantitativa de microssatélites	35
2	OBJETIVOS	38
2.1	Objetivo Geral	38
2.2	Objetivos Específicos	38
3	MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1	Casuística	40
3.2	Preparação do DNA	41
3.3	Análise quantitativa de microssatélites	43
3.3.1	Reações de PCR em tempo real	45
3.4	Construção do <i>tissue microarray</i> (TMA)	46
3.5	Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	47
3.6	Análise estatística	50
4	RESULTADOS	52
4.1	Características clínicas	52

4.2	Características histológicas	54
4.3	Análise quantitativa de microssatélites	57
4.3.1	Extração do DNA	57
4.3.2	Avaliação da eficiência dos oligonucleotídeos	58
4.3.3	Resultado da pesquisa de perdas em 1p e 19q	60
4.4	Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	65
4.5	Resultados da análise estatística	70
5	DISCUSSÃO	86
6	CONCLUSÕES	104
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106

ANEXO

Anexo 1 Características dos pacientes incluídos no estudo

Anexo 2 Quantificação do DNA

Anexo 3 Eficiência dos oligonucleotídeos

Anexo 4 Média e desvio padrão (SD) para todos os *loci* obtidos com os controles

Anexo 5 Resultados da determinação do número de cópias dos loci pela análise quantitativa de microssatélites nas amostras de oligodendrogliomas, glioblastomas convencionais e glioblastomas com componente oligodendroglial

Anexo 6 Resultados da hibridização *in situ* fluorescente

Anexo 7 Classificação dos tumores astrocíticos e oligodendrogliais

Anexo 8 Resumo aceito no Congresso da United States and Canadian Academy of Pathology, 2007

1 INTRODUÇÃO

Glioblastoma (astrocitoma grau IV, OMS) é o tumor cerebral primário mais comum e de maior agressividade nos adultos, correspondendo a aproximadamente 12% a 15% de todos os tumores intracranianos. Além de ser o glioma mais comum, representa 50% a 60% dos tumores astrocíticos (KLEIHUES et al. 2000). Apesar do tratamento multimodal, incluindo cirurgia, radioterapia e quimioterapia, o prognóstico dos pacientes com glioblastoma é ruim e o tempo médio de sobrevida de menos de um ano. Entretanto, alguns pacientes apresentam sobrevida um pouco mais longa (DONAHUE et al. 1997). O melhor entendimento destes tumores e a identificação de marcadores biológicos que permitam subclassificá-los, vão ser importantes na determinação do prognóstico e resposta aos tratamentos.

1.1 A ORIGEM CELULAR DOS GLIOMAS

Apesar dos avanços recentes no entendimento dos mecanismos envolvidos na formação e progressão dos gliomas (entre os quais se inclui o glioblastoma), as células de origem destas neoplasias ainda permanecem indeterminadas. A maioria das classificações já propostas para os gliomas tem tradicionalmente postulado que astrocitomas surgem de astrócitos e oligodendrogliomas de oligodendrócitos, porém mais recentemente tem sido sugerida a origem a partir de células tronco/progenitoras neurais (LOUIS 2006; LOUIS et al. 2007). Células com características de células precursoras já foram identificadas em vários estágios dos gliomas, mas não está claro

ainda qual é a célula inicialmente transformada e quais são as vias de sinalização envolvidas neste processo. O esclarecimento do estágio em que ocorre o bloqueio da diferenciação pode ajudar a definir se os gliomas surgem de células tronco/progenitoras neurais ou de astrócitos e oligodendrócitos maduros (FAN et al. 2007). Os modelos experimentais em camundongos mostram diferenças nas características histológicas entre os tumores que surgem de células precursoras e aqueles que surgem de astrócitos maduros, assim como entre células precursoras que passam por diferentes eventos oncogênicos. Por exemplo, enquanto a superexpressão de Ras e Akt (proteína quinase B) nas células precursoras produz tumores astrocíticos como os glioblastomas, a superexpressão de PDGF na mesma célula produz tumores semelhantes à oligodendrogliomas. O entendimento do fenótipo dos gliomas também deve considerar as observações de que os tumores astrocíticos estão associados com mutação do *TP53*, enquanto os oligodendrogliomas estão associados com perda de 1p e 19q. É possível que astrocitomas e oligodendrogliomas tenham a mesma célula de origem, mas que eventos genéticos diferentes determinem fenótipos diferentes. Outra possibilidade é que astrocitomas e oligodendrogliomas poderiam surgir a partir de células com origem diferente, que seriam oncogenicamente permissivas para determinados eventos, ou seja, a ruptura da via do p53 só seria oncogênica em células precursoras astrocíticas (LOUIS 2006). Os modelos experimentais parecem ainda indicar que quando um número suficiente de vias críticas é rompido, os gliomas podem se originar de células em todos os estágios de diferenciação durante o desenvolvimento glial. Porém, as células precursoras parecem ser mais suscetíveis à transformação quando comparadas com as células gliais maduras. Embora a geração de astrócitos e oligodendrócitos possa persistir por

toda a vida, astrócitos e oligodendrócitos maduros humanos provavelmente não se dividem *in vivo*, o que desfavorece a hipótese de que sejam alvos para múltiplos eventos genéticos e subsequente seleção durante a gênese dos gliomas (FAN et al. 2007). Portanto, os fatores que determinam a diferenciação e o fenótipo nos gliomas ainda não estão totalmente compreendidos.

1.2 ASPECTOS CLÍNICOS E ANATOMO PATOLÓGICOS DOS GLIOBLASTOMAS

1.2.1 Aspectos clínicos e prognóstico

Os glioblastomas podem se desenvolver em qualquer idade, mas a grande maioria ocorre em pacientes adultos, com um pico de incidência entre 45 e 70 anos. A idade média no diagnóstico está em torno de 53 anos e os homens são mais afetados que as mulheres, com uma relação H:M de 1,5:1. Menos de 10% dos casos ocorrem em crianças e tumores congênitos são raros (KLEIHUES et al. 2000).

Assim como os demais astrocitomas, os glioblastomas têm localização preferencialmente supratentorial, ocorrendo mais frequentemente na substância branca subcortical dos hemisférios cerebrais. O sítio mais frequente é o lobo temporal (31%), seguido dos lobos parietal (24%), frontal (23%) e occipital (16%), com a combinação fronto-temporal sendo bastante típica. Glioblastomas no tronco cerebral são incomuns e afetam principalmente crianças.

Os glioblastomas podem se desenvolver a partir da progressão de um glioma menos agressivo (glioblastomas secundários) ou, mais frequentemente, se desenvolver rapidamente, sem evidência de uma lesão prévia de grau mais baixo

(glioblastomas primários). Estes tumores são morfológicamente indistinguíveis, apesar de evoluírem através de diferentes vias genéticas e dos glioblastomas secundários tender a ocorrer em pacientes mais jovens. O prognóstico é igualmente ruim para ambos (REIFENBERGER e COLLINS 2004). Nos estudos de base populacional, os glioblastomas secundários aparecem como tumores raros, correspondendo a apenas 5% de todos os glioblastomas (OHGAKI et al. 2004).

A história clínica é geralmente de curta duração (poucos meses, exceto para os secundários) e os pacientes podem se apresentar após uma crise convulsiva, com sintomas neurológicos não específicos, cefaléia e alterações de personalidade ou ainda com desenvolvimento rápido de aumento da pressão intracraniana. As imagens obtidas por ressonância magnética revelam habitualmente uma massa irregular com sinal heterogêneo em todas as seqüências, áreas císticas ou necrose, com parede irregular impregnada pelo contraste. A TC habitualmente mostra uma lesão com um anel periférico de realce de contraste ao redor de uma área de necrose central, hipodensa. Esta área periférica com realce de contraste corresponde à periferia da neoplasia, altamente celular e vascularizada (KLEIHUES et al. 2000). O curso clínico dos glioblastomas é geralmente fatal e a sobrevida média de menos de um ano. Mesmo nas situações mais favoráveis, a maioria dos pacientes morre dentro de dois anos. O tratamento padrão atual para tumores recém diagnosticados consiste em ressecção cirúrgica tão extensa quanto possível seguida de radioterapia adjuvante. Em alguns centros, quimioterapia adjuvante com nitrosureas também é prescrita. Estudos cooperativos já investigaram a adição de vários esquemas quimioterápicos baseados em nitrosureas à radioterapia, porém uma melhora significativa da sobrevida não foi observada quando comparada com a radioterapia sozinha

(DEANGELIS 2005). Mais recentemente, a temozolamida, um agente alquilante oral, já empregado no tratamento de gliomas recorrentes, está sendo investigada para tratamento de pacientes com glioblastomas recém diagnosticados, concomitantemente à radioterapia. Os resultados vêm mostrando que a adição de temozolamida precocemente proporciona um benefício estatisticamente significativo na sobrevida (aumento médio na sobrevida de 2,5 meses) (STUPP et al. 2005).

Sobrevida longa é incomum nos pacientes com glioblastoma, mas é observada em alguns casos. Podem ser definidos como pacientes com sobrevida longa aqueles que apresentam sobrevida igual ou superior a três anos após o diagnóstico inicial. Num estudo de base populacional realizado com 279 pacientes do Alberta Cancer Registry, apenas cinco (1,8%) sobreviveram por um período igual ou superior a 3 anos. Sete casos inicialmente identificados como tendo sobrevida longa foram excluídos do estudo depois da revisão neuropatológica, que diagnosticou oligodendroglioma anaplásico na maior parte destes casos. Os 5 pacientes identificados como glioblastomas com longa sobrevida, apresentavam idade mais jovem (média 45 anos) e um *Karnofsky performance score* (KPS) mais alto ao diagnóstico. No entanto, a sobrevida longa estava freqüentemente acompanhada por demência grave induzida pelo tratamento (SCOTT et al. 1998). Da mesma forma, o estudo de OHGAKI et al. (2004) envolvendo 715 pacientes diagnosticados com glioblastoma no período entre 1980 e 1994 em Canton de Zurich, Suíça, demonstrou que 17,7% deles sobreviveram por período acima de 1 ano, 3,3% sobreviveram 2 anos e apenas 1,2% estavam vivos após 3 anos de diagnóstico.

Os fatores prognósticos clínicos têm sido amplamente estudados nos glioblastomas. Pacientes mais jovens (idade menor que 45 anos) tem um melhor

prognóstico, o que em parte pode ser explicado pela maior frequência de glioblastomas secundários nesta população, mas também parece ser devido a uma progressão mais rápida nos pacientes idosos (KLEIHUES et al. 2000). OHGAKI et al. (2004) demonstraram claramente que a idade foi o fator prognóstico mais significativo na análise univariada e multivariada e este efeito persistiu através de todos os grupos etários de uma maneira linear.

Também tem sido observado que o melhor *status* funcional na apresentação, medido pelo KPS e a realização de tratamentos adjuvantes têm impacto no prognóstico (LAWS et al. 2003).

A avaliação da extensão da ressecção como fator prognóstico é controversa, mas existe alguma evidência de que a ressecção total favorece uma maior sobrevida (KLEIHUES et al. 2000). A preocupação em relação aos estudos que envolvem a avaliação da extensão da ressecção é a sua natureza retrospectiva, que permite um significativo viés de seleção. LAWS et al. (2003) estudaram gliomas malignos grau III e IV e mostraram que, dentro de cada grau, pacientes submetidos à ressecção tiveram sobrevida maior que aqueles submetidos à biópsia. Uma das vantagens deste estudo foi a sua natureza prospectiva, sendo incluídos apenas pacientes com gliomas malignos recentemente diagnosticados. USHIO et al. (2005) estudaram retrospectivamente a relação entre a extensão da ressecção tumoral e a sobrevida livre de progressão, sobrevida global e qualidade de vida em 105 pacientes com glioblastomas hemisféricos supratentoriais. Todos os pacientes passaram por tratamentos multidisciplinares que incluíram ressecção do tumor e tratamento adjuvante pós-operatório com radioterapia e vários regimes de quimioterapia. A extensão da ressecção tumoral foi medida através da comparação entre a ressonância

magnética pré e pós-operatória. Entre os 105 pacientes, 35 foram submetidos à ressecção completa macroscópica, 57 à ressecção parcial e 13 somente à biópsia. A análise univariada mostrou que a sobrevida livre de progressão e a sobrevida global foram maiores em pacientes submetidos à ressecção total do que naqueles submetidos à ressecção parcial ou biópsia. A análise multivariada, ajustada para idade dos pacientes, KPS no momento da cirurgia, localização do tumor e terapia adjuvante, confirmou os achados da análise univariada. Outro fator prognóstico que mostrou ser significativo neste estudo foi a localização do tumor. Pacientes com tumores frontais tiveram sobrevida livre de progressão significativamente mais longa que aqueles que tinham tumores que envolviam mais de 2 lobos.

1.2.2 Aspectos anátomo patológicos dos glioblastomas

As classificações tradicionais, como aquelas propostas pela OMS, dividem os gliomas difusos do adulto em astrocitomas, oligodendrogliomas e tumores mistos oligoastrocíticos (**Anexo 7**). Em relação ao grau, os gliomas difusos do adulto podem ser divididos em três graus de malignidade: grau II, grau III (gliomas anaplásicos) e grau IV, reservado para os glioblastomas (KLEIHUES et al. 2000; LOUIS et al. 2007). Apesar do grande avanço ocorrido no entendimento das bases genéticas das neoplasias, a classificação dos gliomas continua baseada principalmente nos aspectos histopatológicos, o que determina um grau de subjetividade e falta de reprodutibilidade, tradicionalmente criticados na literatura (BRUNER et al. 1997; COONS et al. 1997; GUPTA et al. 2005). Este modelo de classificação é baseado na semelhança que é observada entre as células gliais normais (astrócitos e oligodendrócitos) e as células tumorais, tanto na microscopia óptica quanto no perfil

de expressão protéica (por exemplo, a expressão de GFAP), determinado pela imuno-histoquímica (LOUIS 2006). A utilização da classificação proposta pela OMS (recentemente atualizada em 2007) ainda tem um papel importante, por ser resultado de um consenso que atende a patologistas, oncologistas clínicos e geneticistas, embora esta classificação esteja cada vez mais sendo enriquecida pelos conhecimentos da genética molecular e da citogenética e esta tendência continue (KLEIHUES et al. 2002).

Os glioblastomas (astrocitomas grau IV, OMS) são tumores de crescimento rápido, anaplásicos. Eram anteriormente designados glioblastomas multiformes. O termo multiforme, que não mais acompanha a nomenclatura destes tumores, refletia a heterogeneidade da neoplasia, tanto em relação às características macroscópicas quanto aos aspectos histológicos variados. Macroscopicamente, pode-se observar edema e assimetria dos hemisférios cerebrais com achatamento dos giros sobre o tumor. Quando pequenos, os tumores podem estar restritos a um lobo, tendo um contorno melhor definido, mas à medida que crescem se tornam mais irregulares e invadem progressivamente o hemisfério, podendo atravessar o corpo caloso para o hemisfério contra lateral, criando uma imagem em forma de asa de borboleta que pode ser observada na tomografia computadorizada ou ressonância magnética. A região central do tumor é freqüentemente necrótica, amarelada, com áreas de hemorragia antiga e recente e circundada por uma periferia de tumor viável de coloração acinzentada. A invasão microscópica além dos limites observados na macroscopia é comum, mesmo quando o tumor parece macroscopicamente bem delimitado. A maioria dos tumores tem localização intra-parenquimatosa, com o epicentro na substância branca, porém alguns podem ser mais superficiais e estar em

contato com as leptomeninges e a dura máter. O efeito de massa criado pela neoplasia, associado ao edema e a necrose, pode distorcer os hemisférios cerebrais com desvio da linha média, compressão de ventrículos e herniação de giros. Dependendo da localização da neoplasia, outras áreas podem sofrer distorção e compressão (IRONSIDE et al. 2002). Apesar do crescimento rápido e infiltrativo, os glioblastomas não costumam invadir o espaço subaracnóide e raramente dão metástase via líquido cérebro espinhal. Embora possa ocorrer extensão ao longo de espaços perivasculares, a invasão do lúmen de vasos não é comum e a disseminação hematogênica para tecidos extra-neurais é muito rara. Tumores multifocais podem ocorrer, porém geralmente representam disseminação do tumor primário com formação de novas massas tumorais. Tumores múltiplos independentes verdadeiros ocorrem em aproximadamente 2,4% dos glioblastomas (KLEIHUES et al. 2000).

Histologicamente os glioblastomas são tumores celulares, constituídos por células neoplásicas com acentuada atipia nuclear e alto índice mitótico, com uma variedade de aspectos morfológicos, que pode incluir células pequenas anaplásicas, células fusiformes, células granulares, células astrócito gemistocítico e fibrilar símile e células gigantes pleomórficas multinucleadas. A presença de necrose e/ou proliferação microvascular exuberante, que freqüentemente resulta na formação de estruturas capilares semelhantes a um glomérulo, são características essenciais para o diagnóstico de glioblastoma. Trombose também é comum. A necrose pode apresentar-se como grandes áreas de necrose isquêmica macroscopicamente visível e/ou como focos pequenos, freqüentemente múltiplos e irregulares, circundados por células tumorais com padrão de pseudopaliçada. Linfócitos perivasculares formando um manguito ocorrem freqüentemente. O padrão histológico bastante variado ocorre

não somente entre diferentes pacientes, mas também dentro de um mesmo tumor (REIFENBERGER e COLLINS 2004).

Basicamente, duas variantes são reconhecidas na classificação da OMS, o glioblastoma de células gigantes e o gliossarcoma. Além disso, uma pequena fração dos glioblastomas (cerca de 15%) pode apresentar áreas com morfologia semelhante à de um oligodendroglioma e a nomenclatura “glioblastoma com componente oligodendroglial” tem sido proposta para estes tumores (LOUIS et al. 2007).

O glioblastoma de células gigantes é uma variante rara, que se caracteriza por apresentar células gigantes pleomórficas, multinucleadas e ter crescimento relativamente circunscrito, o que pode contribuir para o prognóstico um pouco melhor observado nesta variante. Os gliossarcomas correspondem a menos de 2% dos glioblastomas e apresentam um padrão bifásico, contendo áreas com características fenotípicas de glioma e outras de sarcoma. Os estudos de genética molecular indicam que ambos os componentes têm origem monoclonal. Áreas de metaplasia (diferenciação aberrante) são mais comuns nos gliossarcomas do que nos glioblastomas convencionais (KLEIHUES et al. 2000; REIFENBERGER e COLLINS 2004).

Os glioblastomas com componente oligodendroglial demonstram características óbvias de malignidade e um componente astrocítico predominante, com uma população menor de células com características oligodendrogliais, ou seja, áreas de diferenciação oligodendroglial estão presentes em um tumor que, no restante, é um glioblastoma típico. No entanto, os critérios histológicos para a classificação dos glioblastomas com componente oligodendroglial ainda estão pouco definidos, tornando difícil o diagnóstico diferencial com oligoastrocitomas e

glioblastomas convencionais (HE et al. 2001; REIFENBERGER e COLLINS 2004). KRAUS et al. (2001) definiram os glioblastomas com componente oligodendrogial como sendo tumores que se diferenciavam dos oligodendrogliomas anaplásicos por apresentarem um componente predominante astrocítico, porém reconhecem que a distinção dos oligoastrocitomas anaplásicos pode ser mais difícil e consideraram nesta série, como GBO, apenas tumores que apresentavam características óbvias de malignidade e que continham uma população menor de células tumorais (menos de 20% da amostra) com características oligodendrogiais conspícuas em adição a uma população predominante de células com características astrocíticas. A capacidade de distinguir diferenciação astrocítica de oligodendrogial nos cortes histológicos é um desafio, mesmo para patologistas experientes e a variabilidade entre observadores no diagnóstico dos gliomas difusos pode ser atribuída aos critérios diagnósticos subjetivos e sobreposição de características morfológicas (GUPTA et al. 2005). Características morfológicas associadas ao fenótipo oligodendrogial incluem células com halo claro perinuclear, membrana celular bem definida e núcleo central esférico, que dão origem ao aspecto clássico em colméia habitualmente descrito, lembrando que o halo claro perinuclear é atribuído a artefatos de fixação e pode ocorrer em tumores com diferenciação astrocítica. Outras características habitualmente descritas nos tumores oligodendrogiais são: a presença de uma rede de capilares ramificados e delicados, o envolvimento cortical, satelitose perineuronal, degeneração cística/mucóide e microcalcificações, porém estas características não são específicas. Tumores astrocíticos com predomínio de células gigantes ou gemistocitos, raramente são confundidos com oligodendrogliomas. No entanto, tumores com predomínio de células pequenas, por exemplo, podem ser mais problemáticos e mostrar

considerável sobreposição com os oligodendrogliomas. Os gliomas mistos oligoastrocíticos podem apresentar um padrão bifásico, com os componentes oligodendroglial e astrocítico separados ou um padrão misturado, tornando ainda mais difícil a reprodução e o estabelecimento de critérios para o diagnóstico (GUPTA et al. 2005). Como a distinção entre os gliomas difusos do adulto nem sempre é fácil, a busca por marcadores imuno-histoquímicos de diferenciação tem sido intensa, porém nenhum teve sua utilidade comprovada. Não existem até o momento, marcadores imuno-histoquímicos sensíveis e específicos capazes de reconhecer oligodendrócitos tumorais. Os oligodendrogliomas também expressam GFAP, em particular nos oligodendrócitos gliofibrilares e nos minigemistocitos. Além disso, os glioblastomas expressam GFAP em grau e extensão variáveis. Geralmente as células neoplásicas astrócito similar e gemistocitos são fortemente positivas, mas as células pequenas indiferenciadas tendem a ser negativas e as células gigantes multinucleadas têm expressão variável. Grandes proporções do tumor podem apresentar ausência de expressão de GFAP, além de haver uma tendência a uma diminuição da expressão na medida em que o tumor progride (KLEIHUES et al. 2000). Portanto, a expressão de GFAP não tem utilidade no diagnóstico diferencial dos gliomas difusos do adulto. Os fatores de transcrição Olig1 e 2 também já foram postulados como marcadores diagnósticos potenciais para tumores oligodendrogliais, porém esta hipótese não se confirmou (RIEMENSCHNEIDER et al. 2004). LIGON et al. (2004) demonstraram, através de imuno-histoquímica, que a proteína OLIG2 está altamente expressa em todos os gliomas difusos.

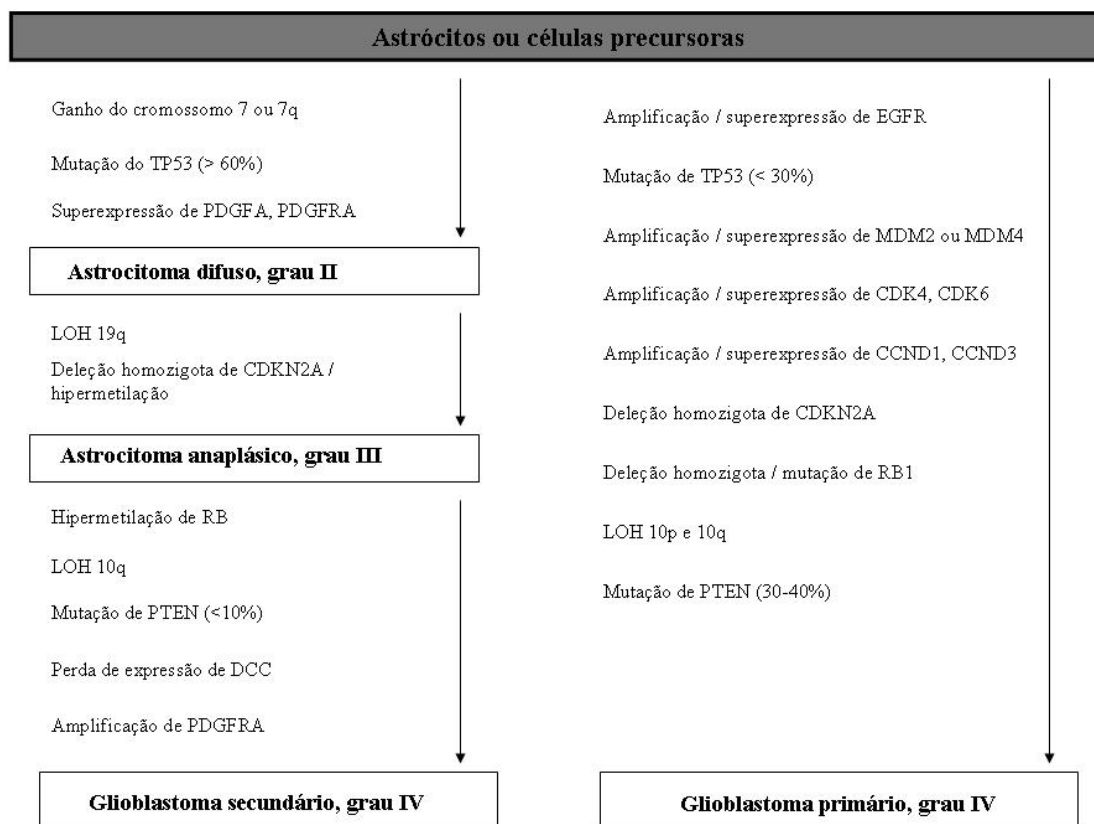
O significado clínico da distinção entre glioblastomas com áreas oligodendrogliais e glioblastomas convencionais ainda é pouco conhecido, mas tem

sido observado que a presença do componente oligodendroglial está associada com maior sobrevida pós-operatória (DONAHUE et al. 1997; KRAUS et al. 2001; PINTO e CHIMELLI 2004; HILTON et al. 2004).

1.3 GENÉTICA MOLECULAR DOS GLIOMAS DIFUSOS

1.3.1 Genética molecular dos tumores astrocíticos

Os estudos citogenéticos e moleculares de tumores astrocíticos como os glioblastomas, já identificaram vários genes e cromossomos freqüentemente alterados. O modelo atual sobre as alterações moleculares envolvidas com a iniciação e progressão dos gliomas astrocíticos difusos está esquematizado na Figura 1.



Fonte: Adaptado de REIFENBERGER e COLLINS (2004)

Figura 1 - Alterações genéticas e moleculares observadas nos gliomas astrocíticos infiltrantes.

A alteração cromossômica mais comum nos astrocitomas difusos (grau II da OMS) é a trissomia/polissomia do cromossomo 7 e os estudos empregando FISH ou CGH detectam ganhos no 7 ou 7q em mais de 50% dos casos. Mutações no gene supressor *TP53*, localizado na região 17p13.1 ocorrem em 60% dos casos e em até 80% dos tumores gemistocíticos. Os astrocitomas difusos que não exibem mutação do *TP53* devem ter o controle do crescimento dependente de p53 alterado por algum mecanismo alternativo, como por exemplo, metilação do promotor do gene *p14^{ARF}*. A proteína p53 tem um papel central no controle da resposta celular ao dano do

DNA. Ela é uma proteína multifuncional que promove a parada do ciclo celular em G1 e G2, estimula a produção de proteínas pró-apoptóticas e de enzimas do sistema de reparo do DNA. Tem também papel na diferenciação celular e angiogênese. O gene *p14^{ARF}* codifica uma proteína que tem papel de inibidor de Mdm2, esta última inibidora da função de p53. Além disso, os astrocitomas difusos frequentemente mostram expressão elevada do receptor α do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFRA), receptor com atividade tirosina quinase, e do seu ligante PDGF α .

Os astrocitomas anaplásicos, além de apresentarem ganhos no cromossomo 7 e mutações no *TP53*, apresentam deleções nos cromossomos 6, 9p, 11p, 19q e 22q. O cromossomo 9p contém, entre outros, os genes supressores *CDKN2A*, *CDKN2B* e *p14^{ARF}*, os dois primeiros codificam p16^{INK4a} e p15^{INK4b}, que agem como reguladores negativos da progressão do ciclo celular de G1 para S, através da inibição dos complexos entre ciclinas do tipo D e as quinases dependentes Cdk4 ou Cdk6. Mutações do gene supressor *PTEN* ocorrem em menos de 10% dos astrocitomas anaplásicos e quando ocorrem indicam um pior prognóstico.

Os glioblastomas mostram, na análise citogenética, cariótipos complexos com múltiplas alterações numéricas e estruturais, sendo frequentemente observadas deleções do cromossomo 10. As análises genéticas moleculares mostram que as alterações diferem entre glioblastomas primários (de novo) e secundários (que evoluem a partir de gliomas de baixo grau), conforme é mostrado na **Figura 1**. Os tumores primários mostram amplificação de *EGFR*, deleções homozigotas de *CDKN2A* e *p14^{ARF}*, amplificação de *CDK4*, amplificação de *MDM2* ou *MDM4*, mutação ou deleção de *RB1*, monossomia do cromossomo 10 e mutação do *PTEN*.

Embora a mutação do *TP53* seja observada em 30% dos glioblastomas primários, a via do p53 está alterada com frequência muito maior, podendo envolver não apenas a mutação de *TP53*, mas também alterações em *p14^{ARF}* e amplificações de *MDM2/MDM4* (REIFENBERGER e COLLINS 2004). A Mdm2 se liga a p53 inibindo sua função e promovendo sua degradação proteolítica, representando assim um mecanismo alternativo para a perda da função de p53. A proteína codificada pelo gene *RB1* controla um passo regulatório chave no ciclo celular, entre as fases G1 e S. A fosforilação desta proteína impede a sua associação com os fatores de transcrição E2F, permitindo que a E2F ative a transcrição de genes necessários para a entrada na fase S (HILTON e MELLING 2004). Mutações do gene *PTEN* ocorrem em cerca de 40% dos glioblastomas primários. Este gene está mapeado na região 10q23.3 e funciona antagonizando fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato quinase/proteína quinase B. Mutações do *PTEN* levam a uma ativação constitutiva da via fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato quinase. A proteína codificada pelo gene *PTEN*, além de ter função supressora de tumor, regula vários processos que têm um papel crítico na agressividade celular, como angiogênese, migração e invasão. A amplificação do proto-oncogene *EGFR* ocorre em aproximadamente 40% dos glioblastomas primários e além do seu papel na formação da neoplasia, o receptor de fator de crescimento codificado por este gene regula vários processos celulares que podem estar associados com o fenótipo dos gliomas de alto grau (KITANGE et al. 2003).

Os glioblastomas secundários apresentam mutações de *TP53* em 60% dos casos, sendo também mais comuns do que nos glioblastomas primários as perdas alélicas em 19q e 13q, hipermetilação do promotor de *RB1* e superexpressão de *PDGFRA*. Por outro lado, amplificação de *EGFR*, *MDM2/MDM4* ou mutação de

PTEN são raras nos tumores secundários. As alterações observadas nos glioblastomas primários e secundários vão ter consequências funcionais semelhantes e em última análise, resultam em alterações das vias do p53, Rb1, Pten/fosfatidilinositol 3-quinase/proteína quinase B e vias proteíno-quinases ativadas por mitógenos (REIFENBERGER e COLLINS 2004).

Estudos relacionando marcadores genéticos e o perfil de expressão gênica com a sobrevida nos glioblastomas já identificaram alguns indicadores prognósticos. O estudo de OHGAKI et al. (2004) envolveu uma população de 715 pacientes com diagnóstico de glioblastoma, dos quais 240 tiveram suas amostras pesquisadas para a presença de alterações genéticas. Nos glioblastomas de um modo geral e nos tumores primários, a alteração genética mais frequentemente observada foi a perda de heterozigosidade no cromossomo 10q (69%), seguida da amplificação de *EGFR* (34%), mutações de *TP53* (31%), deleção de *p16^{INK4a}* e mutação de *PTEN* (24%). Nos glioblastomas secundários as mutações de *TP53* (65%) e LOH em 10q (63%) foram freqüentes, enquanto as demais alterações foram incomuns. A análise univariada demonstrou que a ausência de mutação no *TP53* e a presença de LOH em 10q eram preditivas de menor sobrevida, no entanto, na análise multivariada apenas a LOH em 10q teve associação com sobrevida menor. Esta alteração mostrou ainda estar frequentemente combinada com uma das outras alterações genéticas estudadas, ou seja, amplificação de *EGFR*, mutação de *TP53* ou deleção de *p16^{INK4a}*. Este estudo sugere que a LOH em 10q associada a uma das outras alterações deve operar no desenvolvimento da maioria dos glioblastomas.

Estudos mais recentes envolvendo expressão gênica global, mostram grande diferença na expressão gênica entre os glioblastomas, particularmente em genes

envolvidos na angiogênese, infiltração de células imunes, remodelamento da matriz extracelular, migração celular e outros. LIANG et al. (2005) identificaram dois grupos molecularmente distintos de glioblastomas. Embora os dois grupos expressassem níveis semelhantes de muitos dos genes comumente associados aos glioblastomas (como aqueles envolvidos com angiogênese, por exemplo), mostraram uma diferença importante na expressão de um grupo de genes correlacionados com a sobrevida, mas não associados com as características diagnósticas conhecidas. A análise de sobrevida identificou um grupo de 70 genes mais expressos em tumores rapidamente progressivos. Entre os genes identificados foram observados aqueles envolvidos na migração celular, incluindo migração neuronal e adesão de células dos gliomas às proteínas da matriz extracelular (por exemplo, *BCAN*, *PTPRZ1*, *CRMP5* e *FABP7*). Um dos genes, *FABP7*, foi investigado adicionalmente e confirmada a associação da expressão protéica com a sobrevida em 2 grupos independentes de pacientes. As células que superexpressaram *FABP7* demonstraram índices de migração aumentados *in vitro*, o que poderia explicar um comportamento mais agressivo e infiltrativo e a menor sobrevida observada no grupo que apresentou suprexpressão deste gene. RICH et al. (2005), analisaram genes comumente mutados, amplificados ou deletados nos glioblastomas e dados de expressão gênica obtidos de microarranjos de DNA proveniente de glioblastomas de pacientes com mais de 50 anos, com sobrevida conhecida. As alterações genéticas em genes como *EGFR*, *TP53*, *CDKN2A* e *PTEN* não mostraram significado prognóstico. Apesar da sobrevida média dos pacientes com mutação de *PTEN* e deleção de *CDKN2A/p16^{INK4a}* ter sido um pouco menor, nenhum destes genes teve significado prognóstico isoladamente ou na análise multivariada ajustada para as outras

variáveis, sendo mais provável que estes genes estejam associados com a iniciação e progressão. A análise estatística dos dados de expressão gênica em conjunto com a sobrevida identificou um pequeno grupo de genes que tiveram associação com a sobrevida e os 3 genes dominantes identificados foram *SPARC* (osteonectina), *doublecortex* e *Semaphorin3B*, que tem papel chave no processo de migração celular.

1.3.2 Genética molecular dos tumores oligodendrogliais

Os tumores oligodendrogliais compreendem desde oligodendrogliomas, com crescimento relativamente lento (grau II), até tumores anaplásicos (grau III). As perdas no cromossomo 19q, que geralmente envolvem todo o braço, constituem a alteração genética mais comumente observada e estão frequentemente associadas às perdas de 1p, sendo detectadas tanto nos tumores grau II como grau III. Já foi observado que 50 a 70% dos tumores oligodendrogliais exibem perdas alélicas nos cromossomos 1p e 19q (REIFENBERGER et al. 1994; CAIRNCROSS et al. 1998; SMITH et al. 1999; CASKEY et al. 2000), embora os genes supressores tumorais envolvidos ainda estejam sendo investigados (FELSBERG et al. 2004, TEWS et al. 2006). A presença destas alterações já demonstrou forte associação com sobrevida mais prolongada e a perda de heterozigosidade envolvendo o 1p tem associação significativa com a resposta à quimioterapia com agentes como procarbazona, vincristina e lomustina, esquema denominado PCV (CAIRNCROSS et al. 1998; SMITH et al. 2000; INO et al. 2001). Recentemente, VAN DEN BENT et al. (2006) demonstraram num estudo multicêntrico randomizado que a quimioterapia adjuvante com PCV aumentou a sobrevida livre de progressão, mas não a sobrevida global em pacientes com oligodendrogliomas e oligoastrocitomas anaplásicos e a perda

combinada de 1p/19q identificou um subgrupo favorável de tumores oligodendrogliais. Além disso, estas alterações cromossômicas já mostraram correlação com a localização tumoral, sendo mais comuns nos tumores frontais do que nos temporais. As mutações do *TP53* ocorrem em 10 a 15% dos tumores oligodendrogliais e são observadas nos tumores sem LOH em 1p/19q (KLEIHUES et al. 2000; HILTON e MELLING 2004). Também são comuns nos tumores oligodendrogliais a hipermetilação de regiões promotoras de genes como *CDKN2A*, *CDKN2B*, *RB1*, *TP73* e *MGMT*, causando silenciamento transcricional, além de superexpressão de fatores de crescimento como EGF, PDGF e VEGF. O EGFR está superexpresso em 50% dos tumores grau II e III, porém o mecanismo para tal não está claro e, ao contrário do que ocorre nos glioblastomas, não há amplificação do gene. Os oligodendrogliomas anaplásicos (de forma semelhante aos tumores astrocíticos malignos) apresentam perdas no cromossomo 9p que resultam em perda de *p16^{INK4a}*, *p15^{INK4b}* e *p14^{ARF}*. A hipermetilação de *CDKN2A* é um mecanismo alternativo que leva à perda do ponto de verificação da Rb. Perda de 10q também é observada nos tumores anaplásicos, porém a mutação do *PTEN* ocorre numa minoria dos casos, sendo provável que outros genes estejam envolvidos. As perdas em 10q são mais comuns em tumores sem perda de 1p/19q (HILTON e MELLING 2004).

A hipótese de que os genes *OLIG1* e *OLIG2*, que codificam fatores de transcrição envolvidos no desenvolvimento oligodendrogliar, poderiam ser marcadores diagnósticos úteis nos tumores oligodendrogliais não tem se confirmado. Um estudo investigou a expressão do RNAm destes genes e de outros 4 genes envolvidos do desenvolvimento dos oligodendrócitos em um conjunto de 70 gliomas, sem que fosse observada diferença nos níveis de expressão gênica entre tumores

astrocíticos e oligodendrogliais, possivelmente porque os gliomas recapitulam fenótipos moleculares que correspondem a estágios precoces do desenvolvimento glial. Também não foi demonstrada correlação entre a expressão destes genes e as perdas alélicas em 1p e 19q. Portanto, a análise da expressão de genes como *OLIG1* e *OLIG2*, não substitui o teste da deleção de 1p/19q no diagnóstico dos tumores oligodendrogliais (RIEMENSCHNEIDER et al. 2004).

Diversos estudos foram realizados na última década tentando esclarecer melhor o papel das alterações genéticas no prognóstico e definição de conduta nos pacientes com tumores oligodendrogliais. INO et al. (2001) estudaram um grupo de 50 pacientes com oligodendrogliomas anaplásicos tratados com regimes quimioterápicos como terapia inicial principal e demonstraram que estes tumores podiam ser geneticamente divididos em 4 grupos relevantes do ponto de vista terapêutico e de prognóstico. Os pacientes com deleção combinada de 1p/19q isolada, apresentaram resposta significativa e durável à quimioterapia, associada com sobrevida longa. Outros 2 grupos de pacientes com perda em 1p ou mutação de *TP53* apresentaram um prognóstico intermediário e aqueles pacientes que não tinham alteração em 1p ou mutação de *TP53* foram os que tiveram o pior prognóstico, com pouca resposta ao tratamento.

MYAL et al. (2003) analisaram a presença de perdas alélicas nos cromossomos 1p e 19q numa série de 63 gliomas, incluindo 31 oligodendrogliomas, graus II e III, 21 glioblastomas e 11 gliomas de outros tipos, incluindo oligoastrocitomas. Observaram que as perdas ocorrem mais frequentemente nos oligodendrogliomas (18 entre 31 oligodendrogliomas grau II e 8 entre 14 grau III), sendo frequentemente perdas combinadas. Entre os glioblastomas, apenas 2

apresentaram perda combinada de 1p/19q. Deleções parciais foram observadas em 1 oligoastrocitoma anaplásico e 1 glioblastoma, mas não ocorreram nos oligodendrogliomas. Este estudo mostrou ainda que, entre os pacientes com oligodendrogliomas anaplásicos, aqueles com mais de 60 anos tiveram menos perdas em 1p/19q dos que os pacientes mais jovens. De forma semelhante JOHNSON et al. (2003) investigaram a presença de perdas alélicas nos cromossomos 1p, 19q e 17p em 33 tumores identificados como tendo um componente oligodendroglioma, incluindo oligodendrogliomas e oligoastrocitomas, graus II e III, tentando identificar subtipos moleculares. LOH nos cromossomos 1p e 19q foi mais freqüente nos oligodendrogliomas grau II. Os oligoastrocitomas exibiram mais frequentemente LOH no cromossomo 17, na região do gene *TP53*.

OKAMOTO et al. (2004), realizaram estudo de base populacional com gliomas difusos de baixo grau, incluindo pesquisa de perda de heterozigosidade em 1p e 19q, através de análise quantitativa de microssatélites. Observaram que perdas em 1p e 19q foram freqüentes nos oligodendrogliomas, menos comuns nos oligoastrocitomas e raras no astrocitomas. A análise multivariada mostrou que apenas a idade e tipo histológico, mas não as alterações genéticas, foram fatores preditivos da sobrevida.

MCDONALD et al. (2005) estudaram 131 pacientes com gliomas de alto grau, incluindo 88 oligodendrogliomas anaplásicos, com o objetivo de verificar se a histologia era um fator prognóstico independente e se o status de 1p/19q era capaz de prever o prognóstico, independente da histologia. Outras variáveis foram correlacionadas com o status de 1p/19q neste estudo, incluindo deleção de 9p, de 10q, expressão de p53 e EGFR, localização do tumor, resposta ao tratamento

adjuvante. Foi observado que a associação do status de 1p/19q com a sobrevida tem relação com a presença da histologia clássica, ou seja, apenas nos pacientes que apresentaram tumores oligodendrogliais clássicos (assim considerados por pelo menos 4 entre 5 neuropatologistas que participaram do estudo), a deleção de 1p/19q foi um fator preditivo de prognóstico melhor. Associação negativa foi observada entre 1p/19q e as outras alterações genéticas. A deleção de 1p/19q sugere ser um poderoso fator preditivo de sobrevida, mesmo após recorrência (FALLON et al. 2004).

Já foi também observado que a enzima de reparo do DNA metil-guanina metiltransferase (MGMT) está diminuída nos tumores oligodendrogliais e que a metilação da região promotora do gene que codifica esta proteína está presente em até 50% dos tumores com perda de 1p/19q, podendo esta perda da enzima contribuir para a quimiossensibilidade observada nos tumores oligodendrogliais. Recentemente a expressão de MGMT foi investigada através de imuno-histoquímica em uma série de oligodendrogliomas (grau II e III) e um baixo índice de marcação foi detectado em 86% dos tumores, porém este dado não mostrou correlação com a sobrevida. Esta série também não demonstrou correlação entre o índice de marcação de MGMT e a LOH em 1p (MCLENDON et al. 2005).

Uma grande série de pacientes com tumores oligodendrogliais (63 grau II e 22 grau III) foi recentemente estudada por KANNER et al. (2006), reafirmando o papel da LOH em 1p na sobrevida mais prolongada observada nestes pacientes. Este resultado foi independente da modalidade terapêutica empregada ou do grau histológico do tumor. A perda de 1p esteve frequentemente associada com a LOH em 19q, como descrito habitualmente na literatura.

1.3.3 Glioblastomas com componente oligodendrogliol e o significado da perda em 1p e 19q nos tumores astrocíticos, oligodendrogliais e gliomas híbridos oligoastrocíticos

A relação das alterações cromossômicas descritas nos tumores oligodendrogliais (perda de 1p/19q) com a maior sobrevida e resposta ao tratamento observadas nestes tumores, levou a um interesse na identificação e determinação do significado da presença destas alterações nos tumores astrocíticos e nos gliomas híbridos oligoastrocíticos. Perdas nos cromossomos 1p e 19q também ocorrem nos astrocitomas e oligoastrocitomas, porém com menor frequência. Os glioblastomas apresentam perdas no 1p em cerca de 10% dos casos e perdas no 19q em 13 a 32 % dos casos (VON DEIMLING et al. 1992; INO et al. 2000). NAKAMURA et al. (2000) identificaram LOH no cromossomo 19q em 54% dos glioblastomas secundários (7 em 13 tumores), mas em apenas 1 entre 17 (6%) tumores primários. Além disso, observaram uma região comum de deleção situada em 19q13.3, o que permitiu aos autores sugerir a presença de um gene supressor tumoral localizado no cromossomo 19q, relacionado com a progressão dos astrocitomas de baixo grau para glioblastomas secundários. Neste estudo, foi também observada LOH no cromossomo 1p em 12% dos glioblastomas primários e em 15% dos secundários. INO et al. (2000), levantaram a hipótese de que a LOH em 1p também pudesse ter valor prognóstico para pacientes com gliomas de alto grau com componente astrocítico e investigaram a presença desta alteração genética em 7 pacientes com gliomas de alto grau, incluindo 4 glioblastomas, 2 oligoastrocitomas anaplásicos e 1 glioblastoma de células gigantes, que apresentaram sobrevida inexplicavelmente longa ou marcada resposta à terapia. Para determinar a frequência de LOH em 1p em

casos não selecionados, fizeram também esta análise numa série de 40 glioblastomas, 3 GBs de células gigantes e 9 astrocitomas anaplásicos, provenientes de um banco de tumores. Observaram que todos os 7 casos selecionados apresentavam LOH em 1p, três deles com perda associada de 19q. Entre os casos não selecionados (provenientes do banco) apenas 10% apresentaram perda de 1p. BURTON et al. (2002), caracterizaram as alterações genéticas presentes em 39 glioblastomas de pacientes com sobrevida longa (acima de 3 anos), comparando com as alterações observadas em 24 pacientes com sobrevida curta (menor que 1,5 anos, tipicamente observada nos glioblastomas). Utilizando CGH, os autores observaram que as alterações mais comuns em ambos os grupos foram ganhos no cromossomo 7 e perdas no cromossomo 10, semelhante ao que já havia sido descrito em outros estudos. Perdas no cromossomo 19q foram detectadas somente nos pacientes com sobrevida longa e ocorreram em 28% dos casos (11 entre 39), frequentemente em associação com perda de 1p. SCHMIDT et al. (2002) estudaram as características clínicas, morfológicas, imunofenóticas e perfil genético de uma série de 97 glioblastomas. A presença de mutação do *TP53* e a idade mais jovem mostraram ser fatores prognósticos favoráveis independentes na análise multivariada. Além disso, os autores observaram que os 5 pacientes que apresentaram perda combinada de 1p e 19q tiveram sobrevida significativamente mais longa quando comparados com aqueles que apresentaram apenas uma ou nenhuma destas alterações cromossômicas. No entanto, nenhum destes casos demonstrava áreas de diferenciação oligodendroglial na revisão histológica. FULLER et al. (2003) reviram 90 tumores de pacientes classificados como oligastrocitoma, gliomas mistos, gliomas SOE ou glioblastoma com características oligodendrogliais, utilizando hibridização *in situ*

fluorescente e detectaram codeleção de 1p e 19q em 9% dos casos, sem, no entanto, conseguir relacionar os padrões genéticos distintos observados com a morfologia dos tumores. Também já foi observado que a perda do cromossomo 14q é uma alteração precoce que ocorre em 20% dos gliomas, incluindo glioblastomas. No entanto, parece que este evento não mostra correlação com a sobrevida, grau e subtipo histológico ou mesmo com outras alterações genéticas, exceto as perdas em 1p (DICHAMP et al. 2004).

Os estudos de tumores designados como glioblastomas com componente oligodendroglial mostram que estes têm alterações genéticas heterogêneas, com frequências variadas na literatura de perdas em 1p e 19q, marcadores de tumores oligodendrogliais, e de marcadores envolvidos na progressão de tumores astrocíticos como amplificação de *EGFR*, deleção de *CDKN2A*, LOH em 10q, mutações do *TP53* e *PTEN*. Parece que estes tumores apresentam maior incidência de perda de 1p e 19q que os glioblastomas convencionais, mas as informações são controversas e ainda não foi possível estabelecer uma associação definitiva entre a maior sobrevida observada em alguns destes pacientes e o perfil molecular, diferente do que é observado nos tumores oligodendrogliais (HE et al. 2001; KRAUS et al. 2001). O estudo de KRAUS et al. (2001) compreendeu uma série de 13 pacientes com gliomas malignos classificados como glioblastoma com componente oligodendroglial, que foram pesquisados para alterações genéticas e/ou expressão de *TP53*, *CDKN2A*, *PTEN* e *EGFR*, assim como para LOH nos cromossomos 1p, 10q e 19q. Os resultados deste estudo mostraram menor frequência de LOH em 10q, mutação do *PTEN* e deleção de *CDKN2A* do que relatado nos glioblastomas convencionais, enquanto a LOH em 1p foi mais frequente (3 entre 13 pacientes). Apenas dois

pacientes desta série receberam quimioterapia adjuvante, com boa resposta. No entanto, nenhum deles apresentava LOH em 1p. HE et al. (2001) analisaram o perfil molecular de 25 glioblastomas com componente oligodendrogliol. Além de apresentarem as alterações genéticas comumente descritas no glioblastomas convencionais, foi observado, nesta série, um alto percentual de LOH em 1p e/ou 19q, com 40% dos tumores apresentando LOH em 1p e 60% em 19q. Estes autores postularam que como a LOH em 1p e 19q são considerados eventos precoces na tumorigênese dos oligodendrogliomas, seria possível sugerir a hipótese de que os GBO envolvem uma via molecular específica, caracterizada pela ocorrência de LOH em 1p e 19q como o passo inicial, seguindo-se por várias outras alterações como amplificação de *EGFR*, deleção de *CDKN2A*, mutação de *PTEN*, LOH em 10q e mutações do *TP53*, que permitiriam aos tumores oligodendrogliais progredir para o fenótipo de glioblastoma. Nesta série, a idade e sobrevida dos pacientes com GBO não foi diferente daqueles com GB clássico. Também não foi observada diferença na sobrevida entre os pacientes com e sem LOH em 1p. No entanto, os autores acreditam que o pequeno tamanho da amostra e a heterogeneidade dos tratamentos realizados não permitiram uma avaliação definitiva do valor prognóstico da presença do componente oligodendrogliol. Embora estes estudos preliminares tenham sugerido que as perdas alélicas em 1p e 19q são mais frequentes nos glioblastomas com componente oligodendrogliol dos que nos glioblastomas convencionais, o significado da presença destas alterações nos glioblastomas ainda precisa ser mais investigado. Um pequeno subgrupo de glioblastomas sem um componente oligodendrogliol identificável morfológicamente, também pode carregar perdas alélicas em 1p e 19 q e

estes tumores parecem ter um melhor prognóstico (REIFENBERGER e COLLINS 2004).

Embora a maior parte dos tumores oligodendrogliais apresente deleções quase completas de 1p e também de grandes porções de 19q, tentativas têm sido feitas para identificar regiões de deleção mínima que possam conter genes supressores tumorais candidatos para análise, principalmente utilizando os tumores astrocíticos que, em geral, apresentam deleções menores (SMITH et al. 1999). As perdas alélicas no cromossomo 1p também são comuns em vários outros tumores, incluindo neuroblastomas, carcinoma colorretal, carcinomas de mama, ovário e endométrio e as regiões de deleção usualmente observadas nos gliomas situam-se estão no intervalo 1p32-36. Os genes em 1p já submetidos à análise mutacional como candidatos a genes supressores em neuroblastomas e gliomas incluem *TP73*, *RAD54L*, *KIF1B*, *HKR3*, *UBE4B/UFD2*, *EXTL1* e *CHD5*, entretanto, nenhum candidato forte foi identificado entre estes genes (HUSEMANN et al. 1999; HASHIMOTO et al. 2003; BARBASHINA et al. 2005). As perdas alélicas no cromossomo 19 (região 19q13) têm sido observadas não apenas nos gliomas malignos difusos, mas também em carcinomas de ovário e neuroblastomas. O gene supressor em 19q também não foi identificado, porém alguns candidatos já foram propostos e é possível que mais de um gene supressor tumoral esteja contido na região 19q13.3 (HARTMANN et al. 2002; BARBASHINA et al. 2005; ALAMINOS et al. 2005).

SMITH et al. (1999) estudaram 115 gliomas difusos, incluindo 58 glioblastomas, 8 astrocitomas (graus II e III), 33 oligodendrogliomas (23 grau II) e 16 oligoastrocitomas, localizando as regiões de deleção comum e correlacionando-as

com o tipo histológico. Os tumores deste estudo apresentaram deleções no cromossomo 19 dentro de uma região de 1,5 Mb entre D19S412 e D19S596. Como vários tipos e graus histológicos estiveram representados nesta série, os autores sugerem que as deleções nesta região devem estar envolvidas no desenvolvimento tanto de tumores astrocíticos como oligodendrogliais. Para o cromossomo 1p foi definida uma região comum de perda em 1p36, entre D1S612 e D1S468 e esta região foi delineada principalmente pelos astrocitomas de alto grau, já que os oligodendrogliomas frequentemente perdem todo o braço 1p.

HUSEMANN et al. (1999) investigaram 35 oligodendrogliomas e 10 oligoastrocitomas para a presença de LOH em 21 loci no braço curto do cromossomo 1 e observaram duas regiões distintas de perdas alélicas comuns, localizadas em 1p36.3 e em 1p34-p35, candidatas a conter genes supressores tumorais. Um dos genes supressores localizados na região 1p36.3 é o *TP73*, porém a análise mutacional não mostrou mutações deste gene nos oligodendrogliomas. LOH em 1p foi identificada em 43 entre 46 tumores oligodendrogliais no estudo de IUCHI et al. (2002), que avaliaram também o significado clínico dos diferentes padrões de LOH em 1p. Seis destes casos mostraram pequenas deleções intersticiais e duas regiões de sobreposição foram identificadas em 1p36.11-p36.21 e 1p34.3-p35.2. No total, 91% dos tumores do estudo apresentaram deleções incluindo a região 1p36.11-p36.21, proximal àquela relatada por HUSEMANN et al. (1999). Deleção da região 1p34.3-p35.2 foi observada em 5 dos 6 tumores com deleções intersticiais. Os resultados mostraram ainda que deleções grandes terminais de 1p estiveram associadas com comportamento menos agressivo, enquanto os pacientes com pequenas deleções

intersticiais apresentaram sobrevida global e sobrevida livre de doença significativamente menor.

DONG et al. (2004) refinaram uma região crítica de deleção situada entre 1p36.31-36.32, onde mapearam duas regiões mínimas de deleção usando análise de microssatélites, contendo apenas 8 genes, dos quais 3 são conhecidos. FELSBURG et al. (2004) investigaram 30 *loci* em 1p em tumores oligodendrogliais de 89 pacientes. Cinco tumores desta série apresentaram deleções parciais que permitiram definir regiões candidatas em 1p36.31-pter, 1p36.22-p36.31 e 1p34.2-36.1. No braço longo do cromossomo 19 uma única região de deleção comum foi mapeada em 19q13.3. Este estudo também confirmou que a LOH combinada em 1p e 19 q está associada com tempo prolongado para a progressão, maior sobrevida global e maior sobrevida em 5 anos.

BARBASHINA et al. (2005) avaliaram o status de 1p/19q em um grande grupo de gliomas (112 casos) e definiram uma região de deleção mínima situada em 1p36. Entre os tumores estudados foram incluídos oligodendrogliomas, astrocitomas difusos e oligoastrocitomas de baixo e alto grau. As perdas alélicas em 1p e 19q, separadas ou combinadas, foram mais comuns nos oligodendrogliomas clássicos do que nos astrocitomas e oligoastrocitomas. Os oligodendrogliomas clássicos apresentaram perda de 1p em 83% dos casos e perda de 19q em 72%, sendo estas perdas combinadas em 69% dos casos. Não houve diferença no status de 1p/19q entre oligodendrogliomas de baixo grau e anaplásicos. Nenhum astrocitoma e apenas 20% dos oligoastrocitomas apresentaram perda combinada de 1p/19q. As perdas em 1p nos astrocitomas ocorreram em 17% dos casos e foram na grande maioria perdas segmentares (5 entre 6 astrocitomas). Os 11 tumores que apresentaram perdas

segmentares de 1p (6 oligodendrogliais e 5 astrocíticos puros) foram submetidos a um mapeamento mais detalhado usando 15 marcadores de microssatélites e mostraram LOH na região 1p36.23, sendo possível identificar uma região de deleção mínima com 150 Kb, na qual está mapeado o gene do fator de transcrição *CAMTA1* (*calmodulin-binding transcription activator gene*), normalmente expresso em tecido cerebral não neoplásico e que foi posteriormente submetido à análise mutacional. Mutações no gene *CAMTA1* não foram observadas nos 10 gliomas pesquisados, porém a expressão deste gene mostrou-se reduzida pela metade nos casos com LOH em 1p, sugerindo que uma haploinsuficiência deste gene pode ser funcionalmente significativa. IDBAIH et al. (2005) também mostrou que os gliomas apresentam 2 tipos de perda em 1p: a deleção completa, fortemente associada com a perda de 19q e o fenótipo oligodendrogliar e a deleção parcial, principalmente observada nos tumores astrocíticos e não associada à perda de 19q. Estes autores estudaram 108 gliomas utilizando CGH e observaram que a perda total de 1p foi associada com sobrevida global e sobrevida livre de progressão mais longa na população global do estudo. No grupo dos tumores astrocíticos um prognóstico pior foi observado para a perda parcial de 1p.

TEWS et al. (2006), utilizando as regiões previamente mapeadas por FELSBURG et al. (2004), numa tentativa de identificar novos genes envolvidos na patogênese dos tumores oligodendrogliais, avaliaram o perfil de expressão gênica em 35 gliomas utilizando cDNA *microarray*. Este *microarray* foi customizado de forma a conter, além dos genes câncer-relevante, todos os genes localizados dentro dos segmentos cromossômicos 1p36.13-p36.31 e 19q13.2-q13.33, previamente identificados pelo grupo. Gliomas (incluindo 8 astrocitomas grau II, 7

oligodendrogliomas grau II, 14 oligodendrogliomas anaplásicos e 6 oligoastrocitomas anaplásicos) com e sem LOH em 1p/19q tiveram o perfil de expressão gênica comparado. Oito genes foram identificados dentro de 1p36.13-p36.31 (*MGC4399*, *SRM*, *ICMT*) ou 19q13.2-q13.33 (*RPL18*, *FTL*, *ZIN*, *FLJ10781* E *DBP*), todos mostrando expressão significativamente menor em gliomas com perda de 1p/19q, quando comparados aos gliomas sem perda. Os achados de *microarray* foram validados por RT-PCR quantitativa em tempo real de candidatos selecionados, confirmando os achados do cDNA *microarray*. Um outro gene que mostrou diferença marcada na expressão entre gliomas com e sem LOH em 1p/19q foi *EMP3* (proteína epitelial de membrana 3, um gene relacionado à mielina envolvido na proliferação celular e interações célula-célula), localizado em 19q13.3 e que já demonstrou inativação por hipermetilação das ilhas CpG da região promotora em neuroblastomas e grupos de astrocitomas e oligodendrogliomas (ALAMINOS et al. 2005).

1.4 HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH) E SUAS APLICAÇÕES EM NEUROPATOLOGIA

Diversas técnicas têm sido utilizadas no estudo do perfil molecular dos tumores oligodendrogliais e astrocíticos. Uma das técnicas de mais fácil execução no estudo das alterações cromossômiais é a hibridização *in situ* fluorescente (FISH). Esta técnica consiste em aplicar sondas cromossomo específicas marcadas com fluorescência aos núcleos interfásicos ou em metáfase, resultando em coloração da região alvejada pela sonda de DNA, o que permite observar o número de cópias e a

localização da região cromossômica de interesse. Desta forma alterações como aneussomias, amplificações gênicas, deleções e translocações podem ser detectadas. Tem como vantagem importante para os patologistas o fato de poder ser aplicada em material fixado em formalina e incluído em parafina, preservando a morfologia e sem necessidade de tecido não tumoral para comparação, o que tem permitido o estudo de material proveniente dos arquivos de blocos de parafina e conseqüentemente a análise de séries maiores. Além disso, a técnica é de fácil execução e com protocolos semelhantes aos usados em imuno-histoquímica, é sensível, específica e permite quantificar os resultados. Com o armazenamento adequado das lâminas no freezer e protegendo-as de exposição à luz, os sinais podem permanecer visíveis por até um ano (FULLER e PERRY 2002).

Avanços técnicos recentes como o *tissue microarray* (TMA) tem aumentado a aplicabilidade do FISH, permitindo seu uso em estudos moleculares com alto rendimento. O TMA consiste na confecção de um bloco recipiente onde são depositados os cilindros de tecido tumoral de cada bloco doador usando um “tissue arrayer”, o qual realiza as perfurações no bloco doador e transfere os cilindros de tecido para o bloco receptor em coordenadas definidas pelo equipamento. Em seguida são preparadas lâminas a partir deste bloco. Desta forma o FISH pode ser aplicado em um grande número de casos simultaneamente, ao invés de lâmina por lâmina, o que permite economia de sondas e rápido acesso de centenas de amostras (FULLER et al. 2002).

Embora FISH seja uma técnica bastante sensível, é menos sensível do que a PCR para a detecção de alterações pequenas. A PCR pode ser desenhada para detecção de alterações tão pequenas como a mutação de uma base, o que não é

possível com a FISH. A PCR também é mais sensível que a FISH para detecção de transcritos anormais resultantes de translocações. Por outro lado, a FISH pode ser mais sensível que a PCR na detecção de deleções e amplificações gênicas em amostras com celularidade heterogênea, como por exemplo, amostras de neoplasias contaminadas com tecido não neoplásico. Outro problema que tem que ser considerado quando a técnica é usada em cortes de tecido provenientes de bloco de parafina é o artefato decorrente de transsecção dos núcleos, que acarreta uma subestimação do número de cópias alvo, devido à presença de complementos de DNA incompletos nos núcleos seccionados. Para minimizar este problema é importante estabelecer pontos de corte para deleção em cortes de tecido controle da mesma espessura. Problemas decorrentes de falha de hibridização podem ser contornados contando-se os sinais apenas em regiões onde a maioria das células tem sinais claros (QIAN et al. 1996; FULLER e PERRY 2002; GONZALES et al. 2006).

Na neuropatologia, uma das aplicações da FISH na prática clínica consiste na pesquisa da deleção de 1p/19q nos tumores oligodendrogliais. No entanto, mesmo esta aplicação, ainda está disponível num pequeno número de laboratórios. Outros marcadores de utilidade clínica na neuropatologia incluem a pesquisa de amplificação do EGFR para diagnóstico diferencial entre astrocitoma de pequenas células e oligodendroglioma e pesquisa da deleção do cromossomo 22q, presente no tumor teratóide rabdóide atípico.

PERRY et al. (2003) utilizaram a hibridização *in situ* fluorescente para investigar a presença de deleções nos cromossomos 1p e 19q em uma série de 246 gliomas, incluindo 109 oligodendrogliomas, 109 oligoastrocitomas/gliomas equívocos e 28 astrocitomas. Para avaliar a especificidade também foram analisados

41 tumores que mimetizam oligodendrogliomas. Este estudo foi parte de um programa de pesquisa e desenvolvimento de diagnóstico molecular da instituição e todas as biópsias cerebrais demonstrando características oligodendrogliais claras ou suspeitas, tiveram o status de 1p/19q avaliado pela técnica de FISH. Um dos motivos da escolha deste método foi o seu rápido tempo de execução, o que torna fácil sua aplicação na rotina. As hibridizações foram interpretáveis para 1p em 98,8% dos casos e para 19q em 93,9% dos casos. Assim como foi observado em outras séries, a codeleção de 1p/19q foi um padrão altamente relacionado ao fenótipo oligodendrogliol.

SCHEIE et al. (2006) avaliaram a confiabilidade da técnica de FISH na identificação de deleções de 1p/19q quando realizada em *imprints* de tumores oligodendrogliais. Este método elimina o problema do artefato de truncamento (transsecção dos núcleos), além de ser de mais fácil execução, já que não há necessidade de digestão do tecido, podendo ser facilmente realizada quando há disponibilidade de tecido tumoral fresco ou congelado.

1.5 PCR EM TEMPO REAL E ANÁLISE QUANTITATIVA DE MICROSSATÉLITES

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica que vem sendo melhorada e modificada com um aumento crescente de suas aplicações. Mais recentemente, a tecnologia da PCR tem possibilitado determinar não apenas a presença de uma sequência específica, mas também sua quantidade. Através de métodos e instrumentos automatizados e baseados em fluorescência é possível a

detecção dos produtos da PCR durante o curso dos ciclos de amplificação (PCR em tempo real). O método que vem sendo mais frequentemente utilizado é o sistema *TaqMan*[®], que é baseado na atividade 5'-3' exonuclease da Taq polimerase, que desloca e cliva uma sonda, desenhada para se ligar ao DNA molde entre 2 oligonucleotídeos de PCR. A sonda é marcada com 2 fluoróforos diferentes, um na extremidade 5' (o *reporter*) e o outro na extremidade 3' (*quencher*). Enquanto a sonda está intacta, ocorre transferência de energia entre os 2 fluoróforos. Durante a fase de extensão da PCR a sonda é clivada, separando o *reporter* do *quencher* e produzindo aumento da intensidade de emissão do *reporter* proporcional à quantidade de produto da PCR. Usando um instrumento que detecte os sinais fluorescentes a cada ciclo e seja também um termociclador, este sistema permite determinar a quantidade de produto em função do tempo, representado pelo número de ciclos da PCR. (ALDAPE et al. 2002).

Para detectar desequilíbrios alélicos em 1p/19q, também chamados perda de heterozigosidade (LOH), utiliza-se a análise de microssatélites. Nesta técnica, a PCR é utilizada para amplificar regiões de DNA que são altamente polimórficas entre os humanos, os chamados microssatélites. A técnica baseia-se na presença freqüente de repetições de microssatélites (mais freqüentemente repetições CA), que variam de tamanho entre os alelos. Os oligonucleotídeos são desenhados para flanquear a região de microssatélite. Assumindo-se a heterozigosidade do DNA constitutivo normal, é possível comparar o DNA tumoral com o normal para detectar uma alteração da heterozigosidade. O uso rotineiro da LOH para detectar alterações em *locus* específicos é limitado pela necessidade de tecido normal do mesmo paciente. Mais recentemente foi descrita a análise quantitativa de microssatélites, uma

aplicação da PCR em tempo real, que consiste numa técnica de alto rendimento e que permite uma quantificação altamente sensível do DNA, sem necessidade de DNA constitucional dos pacientes para pareamento (GINZINGER et al. 2000; NIGRO et al. 2001; MOCELLIN et al. 2003). Esta técnica utiliza uma única sonda com repetições GT, complementar a todos os *loci* de microssatélites estudados e um *pool* de referência de oligonucleotídeos para vários *loci* de microssatélites. O *pool* serve como uma referência contra a qual todos os *loci* são comparados. Como a análise quantitativa de microssatélites usa a mesma sonda para todos os *loci*, permite mapear alterações no número de cópias do DNA e identificar regiões cromossômicas que podem ser importantes no desenvolvimento do câncer, com um menor custo. Com esta técnica é possível observar pequenas deleções intersticiais de regiões que podem conter genes supressores tumorais ainda não identificados e que podem não ser detectadas com a hibridização *in situ* fluorescente. Uma desvantagem é a impossibilidade de correlação com a morfologia, o que pode ser contornado com a microdissecção das regiões de interesse do tumor (FULLER e PERRY 2002).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a frequência das alterações cromossômicas características dos oligodendrogliomas (deleção de 1p/19q) em glioblastomas com e sem componente oligodendroglial e correlacioná-las com a evolução clínica dos pacientes.

2.2 ESPECÍFICOS

1. Investigar a presença de deleções em 1p e 19q em todos os glioblastomas e em diferentes áreas do mesmo tumor nos casos que apresentarem componente oligodendroglial, utilizando a técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) aplicada em um *tissue microarray* (todos os casos) e em cortes convencionais (casos com componente oligodendroglial).
2. Investigar a presença de deleções nos cromossomos 1p e 19q usando análise quantitativa de microssatélites através de PCR em tempo real, nos glioblastomas que apresentarem componente oligodendroglial e em casos sem este componente (glioblastomas convencionais), tentando identificar as regiões cromossômicas envolvidas nas deleções e comparando os resultados com aqueles obtidos através da hibridização.

3. Correlacionar a presença do componente oligodendroglial com os dados clínicos e com as perdas alélicas, avaliando o valor prognóstico das variáveis estudadas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

Foram estudados tumores do SNC previamente classificados como glioblastomas pelos critérios da OMS, de pacientes atendidos no Hospital do Câncer no período entre 1982 a 2003. Um levantamento para outro projeto do departamento de anatomia patológica resultou em 85 casos disponíveis de glioblastomas, com prontuários acessíveis e tumor em quantidade suficiente no bloco de parafina para desenvolvimento deste projeto.

Os prontuários foram revistos e coletadas as seguintes informações: idade ao diagnóstico, gênero, data do diagnóstico, extensão da ressecção cirúrgica, tratamentos adjuvantes, incluindo radioterapia e quimioterapia, as drogas utilizadas nesta última e a data do óbito ou do último contato. Também foram anotados dados relevantes da história patológica pregressa e dos exames de imagem.

Foram ainda incluídos 7 casos de glioblastomas com componente oligodendroglioma identificados em um levantamento realizado na Universidade Federal do Rio de Janeiro e que foram cedidos para este estudo por gentileza da Dra Leila Chimelli.

As lâminas dos tumores coradas pela HE foram revistas por 2 patologistas com o objetivo de confirmar o diagnóstico inicial e identificar, nos glioblastomas, áreas com características oligodendrogliais (aspecto em colméia, capilares ramificados, halos claros perinucleares e, por vezes, calcificações) e, sempre que

possível, foi feita uma estimativa do percentual a que correspondem no tumor. Os glioblastomas escolhidos para a pesquisa de deleções tiveram as lâminas marcadas para identificação dos componentes astrocítico e oligodendroglial e para evitar que áreas de necrose ou de cérebro sem tumor fossem utilizadas para extração do DNA. Os blocos escolhidos para a extração do DNA e FISH foram encaminhados para a realização dos cortes necessários.

Além dos glioblastomas, foram selecionados 5 casos de oligodendrogliomas que foram utilizados como referência para os achados moleculares. Este tumor foi escolhido devido ao fato de inúmeros estudos já publicados relatarem a presença de um alto percentual de perdas alélicas em 1p e, principalmente, em 19 q nestes tumores.

Este projeto foi submetido à apreciação pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital do Câncer A C Camargo, que aprovou a realização do estudo em 31/08/2004 (Projeto de pesquisa nº 626/04).

3.2 PREPARAÇÃO DO DNA

Para esta etapa foram selecionados todos os glioblastomas com áreas oligodendrogliais (24 casos), 10 glioblastomas convencionais, 5 oligodendrogliomas e 8 amostras de tecido cerebral não neoplásico (extraído de áreas adjacentes aos tumores e de tecido cerebral proveniente de cirurgia para tratamento de epilepsia).

Inicialmente, a região de interesse nos cortes histológicos foi dissecada manualmente a partir de 6 cortes de 4 micra de espessura de cada bloco e o DNA foi

extraído utilizando o Kit Nucleon HT (Amersham) conforme as instruções do fabricante.

Um novo protocolo de extração de DNA de amostras emblocadas em parafina foi adaptado às condições do laboratório. Este protocolo tem duração de 4 dias. No primeiro dia realiza-se a dissecação manual e desparafinização do tecido raspado das lâminas a partir de 20 cortes de 4 micra, colocando as amostras em um tubo com xileno e incubando a 48°C por 2 horas. O xileno é retirado e as amostras são centrifugadas com concentrações decrescentes de etanol (100%, 70% e 50%), cada etapa com duração de 15 minutos. Em seguida as amostras são incubadas com proteinase K a 48°C por 48 horas, adicionado 5µl de PK 20% a cada 8 horas. Após esta etapa, as amostras são extraídas com fenol-clorofórmio e se recupera a fase aquosa, que contém o DNA, transferindo-a para um tubo novo. Adiciona-se etanol, acetato de amônia e glicogênio e armazena-se as amostras a -20°C para precipitação. No dia seguinte as amostras são lavadas com etanol a 70%, secam por 2 horas em temperatura ambiente e o DNA é solubilizado em água.

Os DNAs assim extraídos foram quantificados por espectrofotômetro (*GENEQUANT pro* - Amersham) e tiveram sua qualidade avaliada através de reação de PCR utilizando iniciadores desenhados nos íntrons localizados entre os exons 12 e 13 do gene *albumin* (NM_000477) (*Direto* - 5' GCTGTCATCTCTTGTGGGCTGT 3' e *Reverso* - 5' AAACATCATGGGAGCTGGTT 3'). Com o uso desses iniciadores intrônicos, a amplificação de um fragmento de 141pb pares de base indica a presença do DNA genômico na amostra. Essa reação foi realizada sob as seguintes condições: 1,5 mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTPs, 0,3µM de cada iniciador, 1X Tampão de PCR, 1,5U de TaKaRa Ex Taq (*TaKaRa Biomedicals*) e 1µl de DNA em um volume final

de reação de 25µl. O programa de PCR utilizado foi: 94°C por 5 minutos; 40 ciclos de 94°C por 1 minuto, 66°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto; seguidos por uma extensão final a 72°C por 7 minutos. Para a visualização dos produtos amplificados as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida a 8% e coradas com nitrato de prata.

3.3 ANÁLISE QUANTITATIVA DE MICROSSATÉLITES

Este experimento foi realizado conforme descrito por NIGRO et al. 2001, com algumas modificações. O método quantitativo utilizado foi o sistema *TaqMan*[®] (*Applied Biosystems*) de detecção que requer a utilização de uma sonda de hibridização interna a um par de oligonucleotídeos.

Todos os oligonucleotídeos utilizados nos experimentos de quantificação em tempo real no aparelho ABI 7500 encontram-se listados na **Tabela 1 e** foram selecionados a partir de dados da literatura (NIGRO et al. 2001). A sonda utilizada (5'-FAM-TGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT-TAMRA-3') é complementar a repetições CA e capaz de hibridizar com *loci* de microssatélites espalhados por todo o genoma humano. Os oligonucleotídeos podem ser trocados enquanto que a sonda permanece a mesma.

As reações de PCR em tempo real para cada uma das amostras foram feitas em triplicatas, em reações de 25µL utilizando-se o kit *TaqMan*[®] *Universal PCR Master Mix* (*Applied Biosystems*), seguindo as instruções do fabricante. Para normalizar as diferenças de DNA inicial de cada amostra, também é amplificado um *pool* referência de vários *loci* localizados em regiões cromossômicas comumente não

alteradas durante a tumorigênese dos gliomas (PCR multiplex). A opção por utilizar um *pool* de referência visa evitar o efeito de possíveis desvios do estado diplóide de um único *locus* no instável DNA tumoral (**Tabela 1**).

A quantificação do número de cópias dos *loci* nas amostras tumorais foi calculada utilizando-se a equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK e SCHMITTGEN 2001). O valor inferido à ΔCt equivale à diferença entre a média dos valores de *Ct* obtidos com o DNA de cada amostra tumoral e a média dos valores obtidos com o *pool* de referência. Já o cálculo do $\Delta\Delta Ct$ envolve a subtração entre o valor de ΔCt para cada amostra de tecido neoplásico e a média dos valores de ΔCt em 8 amostras de tecido cerebral não neoplásico. O *Ct* é definido como o ciclo da PCR no qual a fluorescência excede o limiar (*threshold*) pela primeira vez e vai ser diretamente proporcional à quantidade de DNA molde presente na amostra.

Para determinar se o número de cópias calculado nas amostras tumorais difere significativamente do DNA normal de modo a ser considerado uma perda, o conjunto de desvios padrão para todos os *loci* nos DNAs normais foi usado para criar um intervalo de tolerância (TI) com confiança de 95 %, onde $TI = 2 \times 2^{\pm 2,25 \times \sqrt{\frac{\sum_i (n_i - 1) \times SD_i^2}{\sum_i (n_i - 1)}}}$, onde n_i = número de normais analisado por locus de microssatélite e 2,25 é um fator limitante de tolerância com 2 extremos para um total de 88 medidas (MEE 1990; PRINS et al. 2005). Com base neste TI, um número de cópias $< 1,1$ foi considerado deleção.

Tabela 1 - Sequência dos oligonucleotídeos

Oligonucleotídeos	Direto	Reverso
D1S468	TAAAATATTAGGTCAAACCATG	ATGGCTGCATATAATGTTG
D1S2736	TACCTCCAGGATATTCTTGG	TTTTTGAGGTGTGAGAGCAG
D1S514	TGAATGCGTGGTCCCAACAT	GACTCAGACTTCCATCTGGACT
D1S199	GGTGACAGAGTGAGACCCTG	CAAAGACCATGTGCTCCGTA
D1S2620	AAGAGTTGTCCAACCAAATTG	GAATCTGGGATGGGATGTG
D1S2892	GCCTGGGCAACATGGCAAG	CTGGGACCACAGAGCCACC
D1S224	CATAATCCTTTGGCCCAATC	CATCACACATTTTAGAATACAGTGC
D19S424	AGCTGGTTATCTTGAGGGAG	TAGGCCACATGGAGGAGT
D19S867	CAATGAAAATGCTTTGTAAAAC	CCTTCAGAGGTGACCAG
D19S418	ACCAGGCATCCAGTGTTC	CAACTATCCCGCCTTTGT
D19S408	AGCTCTATGGGGTGGTGCC	GCCTCTTAGAGTTTTGGGAG
Pool de Referência		
D2S385	AGCTGTCAGTAGAAATAAGCAGAGA	TCAATAACACGCCAAAAGAC
D3S1554	ATTCATCTTGTTACTGTTTCATTTGT	GGGCAAACCCCAAAGACT
D5S643	TGGGCGACAGAGCCATC	TGTGGTGTGCCATTTATTGACT
D8S1800	CCATCAAATGTCTGAACACTG	GTCCACCAATGCGTTAAAG
D12S1699	ACCTCATGCCTGTTAGG	TTCGTTACATCCTGG
D21S1904	ATGAGTTCAGTGTTTCATGGACATC	AGCAAGATTACTGTCTGGTTTCCC

3.3.1 Reações de PCR em tempo real

As reações de PCR em tempo real (25µl) foram realizadas em triplicata, utilizando-se para os *loci* alvo 12,5 µl de PCR *Master Mix* (*Applied Biosystems*), 2,0 µl de cada oligonucleotídeo direto e reverso (5µM), 0,15 µl da sonda FAM-TAMRA complementar às repetições CA (10µM) e 20 a 40 ng de DNA. Para o *locus* referência (pool de microsatélites colocados em um único poço) utilizou-se 0,5 µl de cada oligonucleotídeo direto e reverso (20 µM), 0,15 µl da sonda FAM-TAMRA e 20 a 40 ng de DNA. Os parâmetros de ciclagem foram: 1 ciclo de 95° C por 12 minutos e 40 ciclos de 95° C por 20 segundos, 55° C por 20 segundos, 72° C por 45 segundos.

3.4 CONSTRUÇÃO DO TMA

Foi construído um *tissue microarray* (TMA) com os todos os casos que preencheram os critérios de inclusão (acesso aos dados clínicos, disponibilidade de bloco de parafina representativo do tumor). Cada bloco selecionado teve as áreas de interesse marcadas na lâmina correspondente. Dois cilindros de tecido com 1,0 mm de diâmetro, representando as áreas com aspecto de glioblastoma convencional foram retirados de cada bloco doador pelo tubo de aço do *tissue micro arrayer* (Beecher Instruments, Silver Spring, MD) e transferidos para o bloco recipiente na coordenada definida, pelo mesmo equipamento. O bloco resultante, contendo amostras dos casos do estudo, foi submetido à microtomia e os cortes seqüenciais de 5 µm colocados em lâminas previamente tratadas com película aderente. Lâminas coradas pela HE foram confeccionadas a partir de cortes obtidos no mesmo nível que aqueles utilizados para a hibridização *in situ* fluorescente, de modo que pudesse ser averiguada a adequada representação dos tumores (**Figura 2**). Os glioblastomas com áreas oligodendrogliais tiveram estas áreas representadas separadamente em cortes convencionais. Os casos cedidos pela UFRJ e os oligodendrogliomas utilizados como referência também não entraram na construção do TMA, sendo analisados também nos cortes convencionais.

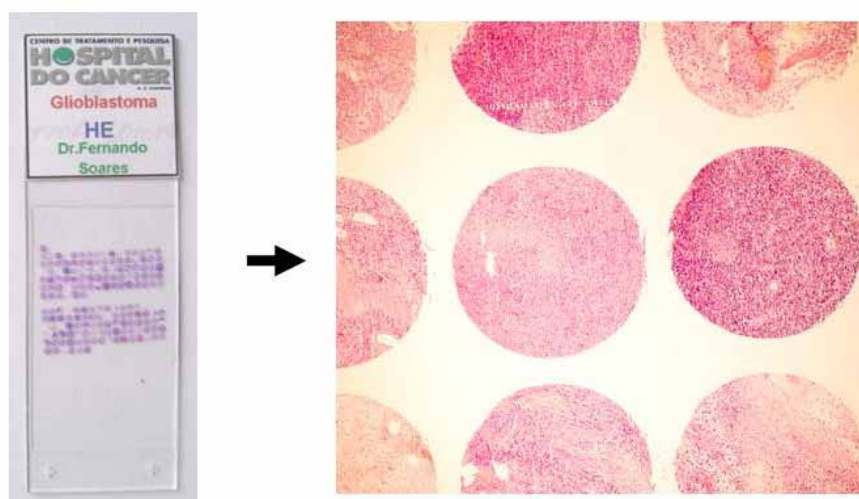


Figura 2 – *Tissue microarray* de glioblastomas.

3.5 HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH)

Hibridização *in situ* fluorescente foi realizada nos glioblastomas com componente oligodendrogliol, em cortes convencionais representando preferencialmente as áreas com aspecto oligodendrogliol. Também foram estudados por esta metodologia os 5 oligodendrogliomas utilizados como controle positivo nas reações de PCR em tempo real e o TMA de glioblastomas. Sondas locus específicas para os cromossomos 1p e 19q (conjuntos de sondas LSI 1p36/1q25 e LSI 19q13/19p13, Vysis[®]) foram aplicadas aos cortes de tecido obtidos a partir dos blocos de parafina. Este conjunto de sondas consiste de 2 misturas de sonda separadas, uma contendo LSI 1p36 (espectro *orange*) e LSI 1q25 (espectro *green*) e a outra contendo LSI 19q13 (espectro *orange*) e LSI 19p13 (espectro *green*). A sonda LSI 1p36 tem 400 kb e contém seqüências que se estendem de um ponto próximo ao locus SHGC57243, englobando os genes *TP73* e *EGFL3* e terminando em um ponto

telomérico ao locus de EGFL3, localizado na região 1p36.32. A sonda LSI 19q13 também tem 400kb e contém seqüências que se estendem de um ponto telomérico ao locus do gene *CRX*, através dos genes *CRX*, *GLTSCR2* e *GLTSCR1* e termina proximalmente em um ponto centromérico ao locus do gene *GLTSCR1*. Estes genes estão mapeados na região 19q13.32, que tem cerca de 3,62 Mb.

As hibridizações foram realizadas em ensaios com dois dias de duração. Os cortes histológicos de 5 µm de espessura foram colocados em lâminas de vidro cobertas com material adesivo. Em seguida foram submetidos à desparafinização com xileno quente (70° C) e frio (temperatura ambiente) por 20 minutos cada, seguindo-se de 3 passagens adicionais em xileno a temperatura ambiente, 5 minutos cada. Após 3 passagens em álcool absoluto e lavagem com água corrente, as lâminas foram colocadas por 10 minutos na solução de pré-tratamento (kit HER2 – DAKO®), pré-aquecida no banho Maria a 96° C. Em seguida foram deixadas esfriando por 15 minutos em temperatura ambiente. Após este procedimento, foram realizadas 3 passagens no tampão de lavagem (kit HER2 – DAKO®), cada uma com duração de 3 minutos. Os cortes foram então submetidos à digestão enzimática com pepsina (kit HER2 - DAKO®, concentração não fornecida pelo fabricante) por 25 minutos em temperatura ambiente, lavados com tampão de lavagem (3 trocas, 3 minutos cada passagem), desidratados com etanol em concentrações crescentes (70%, 85% e 96%, 2 minutos cada) e deixados secando na temperatura ambiente por cerca de 45 minutos. Em seguida foi realizada a aplicação da sonda (10 µl, previamente diluída em tampão de hibridização pelo fabricante) sobre os cortes de tecido, cobertos com lamínula e vedados com material selante. As lâminas foram colocadas no hibridizador (Hybridizer - DAKO®) e realizou-se a codenaturação da sonda e

espécime por 5 minutos a 80^o C, seguindo-se de hibridização a 37^o C por 16 horas. No segundo dia, os cortes foram retirados do hibridizador e, após remoção do selante, colocados por 10 minutos em uma solução adstringente (kit HER2 – DAKO[®]) pré-aquecida a 65^o C, lavados com tampão de lavagem (3 passagens de 3 minutos cada), desidratados com passagens em etanol (70%, 85% e 96%, 2 minutos cada) e deixados secando por cerca de 1 hora em local escuro. A seguir foi feita a contra coloração com 20 µl de DAPI (meio de montagem contendo DAPI, kit HER2 - DAKO[®]) e montagem com lamínula. Após 15 minutos, as lâminas foram levadas para observação no microscópio trinocular com fluorescência de mercúrio (Olympus[®] BX41-FL-III), equipado com objetiva de imersão e com os filtros adequados. As imagens obtidas foram capturadas com uma câmera colorida digital refrigerada (5.1 megapixel) acoplada ao microscópio acima, usando o programa para análise de imagem Image Pro[®]Plus versão 6.0 (Olympus[®]). A contagem dos sinais foi feita diretamente no microscópio com o auxílio de um contador manual.

Em cada caso, sinais fluorescentes foram contados em um mínimo de 100 núcleos, para cada conjunto de sondas, estabelecendo um *ratio* entre o locus cromossômico de interesse (espectro *orange*) e o locus referência (espectro *green*). Embora a abordagem mais simples seja a interpretação de perdas absolutas (< 2 cópias) ou ganhos (>2 cópias), o delineamento de perdas e ganhos relativos (comparados com uma ploidia de referência) e a utilização de um *ratio* parece ser mais adequado, já que neoplasias malignas freqüentemente apresentam aneuploidias e poliploidias, o que pode gerar contagens confusas (FULLER e PERRY 2002). Para estabelecer os valores de corte, sinais fluorescentes foram contados em 500 núcleos normais (5 amostras contendo tecido nervoso não tumoral ou endotélio). A partir dos

valores obtidos nestas amostras, foi possível estabelecer um intervalo de confiança e, desta forma, um *ratio* entre os braços p e q menor ou igual a 0,86 (limite inferior do intervalo) foi considerado deleção, tanto para o cromossomo 1 quanto para o cromossomo 19.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A data do diagnóstico foi considerada a data da cirurgia inicial, quando disponível, ou a data da reoperação no Hospital AC Camargo, considerando que o intervalo entre a biópsia prévia e a ressecção foi muito curto. O tempo de sobrevida dos pacientes foi definido como o tempo transcorrido entre a data do diagnóstico e a data do óbito ou do último contato.

As análises estatísticas foram realizadas no programa SPSS versão 13.0. Na análise univariada empregou-se o estimador de Kaplan-Meier com estratificação. Este procedimento foi realizado no intuito de permitir comparações entre os diferentes grupos que compunham cada uma das variáveis independentes. Para verificar se a diferença entre as curvas era significativa, empregou-se o Teste Log-rank. Este teste compara a distribuição da ocorrência dos eventos observados em cada estrato com a distribuição que seria esperada se a incidência fosse igual em todos os estratos (KLEINBAUM e KLEIN 1997). Foram considerados significativos valores-p inferiores a 0,05.

Na análise multivariada foi utilizado o modelo de regressão semiparamétrico de Cox. Foram inseridas neste modelo as covariáveis para as quais foi verificada significância estatística pelo teste do log-rank e variáveis de importância clínico-

epidemiológica. Desta forma, foram empregadas as seguintes variáveis independentes: *idade* (menor que 45 anos ou maior que 45 anos), *gênero*, *diagnóstico histopatológico* (glioblastoma ou glioblastoma com componente oligodendroglial), *localização* (mais de um lobo ou apenas um lobo), *extensão da ressecção* (total ou subtotal) *deleção de 1p* (presente ou não), *deleção de 19q* (presente ou não) e *tratamento adjuvante* (nenhum tratamento, radioterapia ou radioterapia mais quimioterapia). Os coeficientes do modelo de regressão de Cox podem ser usados para determinar o risco relativo associado a cada variável independente e variável resposta. Assim, por meio deste modelo foi possível estimar os efeitos das covariáveis no tempo de sobrevida. A razão de risco é o efeito de uma variável explanatória no risco do evento. Sua interpretação é a seguinte: valores acima de 1 representam sobre-risco e valores abaixo de um, proteção.

As correlações entre as variáveis independentes foram verificadas por meio do teste do χ^2 , do teste exato de Fisher e do Coeficiente de Contingência (para variáveis com respostas compreendendo mais de duas categorias), sendo considerados significativos valores-p inferiores a 0,05. Ainda no intuito de verificar associação das variáveis independentes, ajustou-se um modelo de Regressão Logística.

4 RESULTADOS

4.1 ASPECTOS CLÍNICOS

Entre os 85 pacientes atendidos no Hospital AC Camargo, inicialmente identificados para o desenvolvimento deste projeto, foram excluídos quatro casos, sendo três casos pediátricos (um paciente com diagnóstico de ependimoma grau III prévio tratado com radioterapia, um lactente de 6 meses e um paciente com tumor localizado no bulbo). Também foi excluído um adulto jovem, para o qual a data do diagnóstico inicial não pôde ser determinada com precisão.

Aos 81 pacientes elegíveis foram acrescentados os 7 pacientes provenientes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, resultando numa população global de 88 pacientes (**Anexo 1**). Destes, apenas um tem diagnóstico de astrocitoma de baixo grau prévio, sendo caracterizado, portanto, como glioblastoma secundário. Os demais, incluindo os 7 casos provenientes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, são glioblastomas primários. Dois pacientes foram reoperados no Hospital AC Camargo, porém as cirurgias iniciais foram ressecções parciais e os pacientes encaminhados para complementação do tratamento. Foram também identificados 3 pacientes submetidos à irradiação prévia de cabeça e pescoço para tratamento de outras neoplasias e estes tumores podem ser caracterizados como glioblastomas induzidos por radiação. Quatro óbitos ocorreram dentro do primeiro mês de pós-operatório e em 3 destes pacientes não chegou a ser realizado tratamento adjuvante.

A população do estudo (constituída por 88 pacientes) apresentou idade entre 6 e 81 anos, sendo 23 pacientes com idade inferior a 45 anos e 65 com idade superior a 45 anos. Trinta e seis pacientes eram do gênero feminino e 52 do gênero masculino.

A localização mais freqüente foi o lobo frontal (19 casos), seguido pelo lobo temporal (16 casos) e combinações de mais de um lobo (a mais freqüente parieto-temporal, com 14 casos). Três pacientes apresentaram tumores multifocais.

Todos os pacientes foram submetidos à ressecção cirúrgica do tumor, 41 deles à ressecção macroscópica total e 40 à ressecção subtotal (dados obtidos a partir dos relatos cirúrgicos contidos nos prontuários). Para 7 pacientes não foi obtida a informação sobre a extensão da ressecção.

Em relação aos tratamentos adjuvantes, 58 pacientes foram tratados com radioterapia após a cirurgia e 12 pacientes com radioterapia e quimioterapia. As drogas utilizadas foram PCV - procarbazona, lomustina (CCNU) e vincristina (2 pacientes), temozolamida (2 pacientes) e carmustina (BCNU - 2 pacientes). Quatro pacientes receberam várias drogas e em 2 casos não havia relato das drogas empregadas no tratamento quimioterápico. Nenhum paciente foi tratado apenas com quimioterapia adjuvante. Dezesesseis pacientes não receberam tratamento adjuvante com RT ou QT e em 2 casos não havia informações sobre tratamentos adjuvantes. A Tabela 2 apresenta um resumo das informações clínicas.

Tabela 2 – Características clínicas da população estudada.

	Número de casos
Idade	
< 45 anos	23
≥45 anos	65
Gênero	
Feminino	36
Masculino	52
Localização	
Frontal	19
Parietal	10
Temporal	16
Occipital	5
Combinada	35
Multifocal	3
Extensão da Ressecção	
Total	41
Subtotal	40
Sem informação	7
Tratamento Adjuvante	
Radioterapia	58
Radio e quimioterapia	12
Nenhum	16
Sem informação	2

4.2 CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS

Foi realizada a revisão das lâminas (HE) de todos dos casos para identificação das características histológicas e classificação dos tumores (**Tabela 3**).

Entre os 81 tumores de pacientes do Hospital AC Camargo previamente classificados como glioblastomas, foram identificados 17 casos com áreas de aspecto morfológico oligodendrogliol (aspecto em colméia, capilares ramificados, halos claros perinucleares e, por vezes, calcificações). Este componente correspondeu a percentuais que variaram entre menos de 5% da superfície tumoral (focal) até cerca de 40% da superfície em um dos tumores. A estes 17 casos somaram-se 7 casos

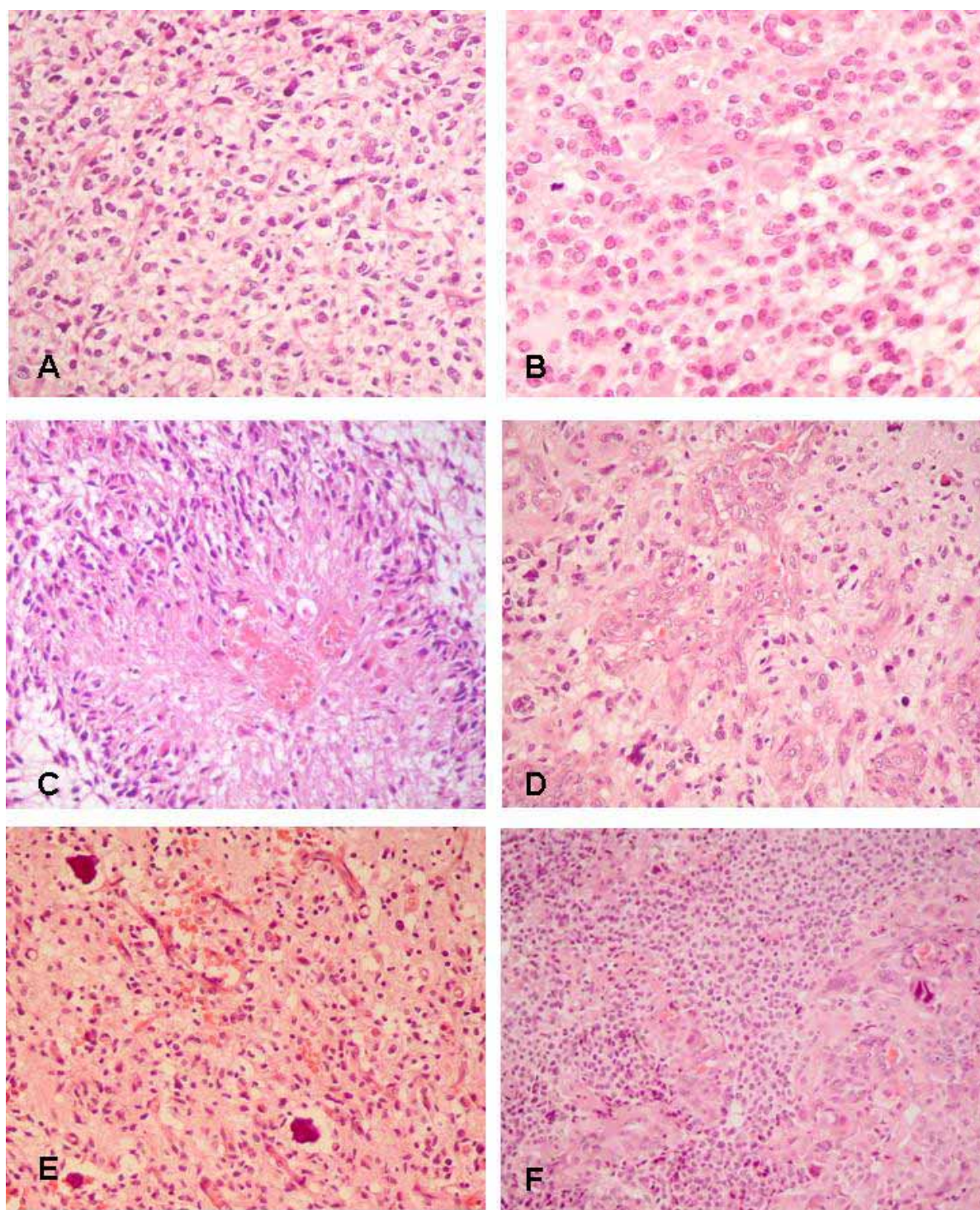
procedentes da UFRJ, que já haviam sido identificados em um estudo prévio como tendo um componente oligodendroglial e que também apresentaram extensão variável deste componente (**Figura 3**). Uma separação precisa dos componentes astrocítico e oligodendroglial nem sempre foi possível.

Além das áreas com aspecto oligodendroglial identificadas em parte dos glioblastomas, os tumores mostraram-se compostos por proporções variadas de células pequenas, células fusiformes, células gigantes e células astrócito gemistocítico símile. Proliferação endotelial e/ou necrose foi identificada em todos os tumores. Nenhum tumor desta série foi classificado como glioblastoma de células gigantes.

As lâminas dos glioblastomas com componente oligodendroglial tiveram as áreas dos componentes astrocítico e oligodendroglial marcadas, para possibilitar a dissecação e separação dos dois componentes antes da extração do DNA. Em 4 tumores não foi possível fazer esta separação, por dificuldade de individualização dos componentes. Também foi realizada uma seleção e revisão de 5 oligodendrogliomas, sendo 3 casos grau II e 2 grau III, utilizados como controles positivos nos experimentos para investigação de deleção em 1p e 19q.

Tabela 3 – Características histológicas dos tumores.

DIAGNÓSTICO	NÚMERO DE CASOS
Glioblastomas com componente oligodendroglial	24
Glioblastomas convencionais	64
TOTAL	88



Legenda: **A e B** – áreas com morfologia semelhante a um oligodendroglioma, com halos claros perinucleares e capilares ramificados. **C e D** – necrose e proliferação endotelial. **E** – calcificações. **F** – transição de componente oligodendroglial para área com aspecto astrocítico (A a F - Hematoxilina-eosina, aumentos originais x200 ou x 400).

Figura 3 – Características morfológicas dos Glioblastomas com componente oligodendroglial.

4.3 ANÁLISE QUANTITATIVA DE MICROSSATÉLITES

4.3.1 Extração do DNA

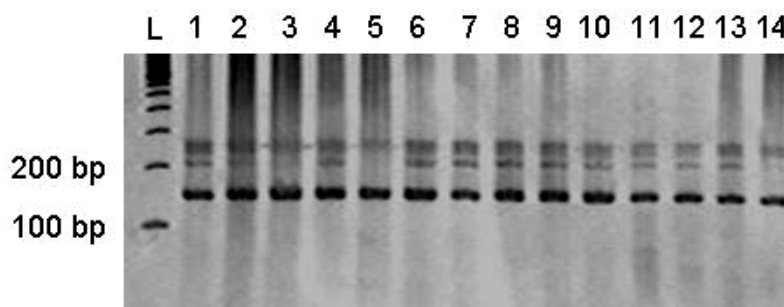
DNA foi extraído de 67 amostras, sendo 10 glioblastomas, 24 glioblastomas com áreas oligodendrogliais (20 destes com separação das áreas astrocíticas e oligodendrogliais, o que gerou 44 amostras de glioblastomas com áreas oligodendrogliais), 8 amostras de tecido cerebral de borda tumoral ou proveniente de cirurgia para tratamento de epilepsia (controles normais) e 5 oligodendrogliomas.

Inicialmente foi feito um teste de extração do DNA em 13 casos utilizando o Kit Nucleon HT (Amersham). Com as amostras extraídas foram feitas reações de PCR convencional utilizando oligonucleotídeos para o gene da albumina. O produto das PCRs foi analisado em gel de poliacrilamida a 8% e em todos os 13 casos foi visualizado um fragmento com o tamanho esperado (dados não apresentados), atestando a viabilidade de se obter DNA das amostras emblocadas em parafina.

Um novo protocolo de extração de DNA de amostras emblocadas em parafina foi avaliado. Uma vez que este protocolo substituiu o uso do Kit Nucleon HT (Amersham), permitindo a obtenção de uma maior quantidade de DNA e uma diminuição do custo do experimento, ele foi adotado para a extração do DNA de todas as amostras incluídas neste estudo.

Os DNAs de todas as amostras selecionadas para este estudo foram extraídos e quantificados. As quantidades variaram de 2,85 a 78,9 μg (**Anexo 2**). Para confirmar a qualidade do DNA obtido, um fragmento do gene da albumina (141 pb) foi amplificado por PCR conforme descrito acima. Produtos de PCR puderam ser

amplificados a partir de todas as amostras de DNA, o que demonstra a eficiência do protocolo de extração de DNA utilizado (**Figura 4**).



Legenda: A figura mostra gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata onde se observa a presença de produtos de PCR obtidos a partir de amostras de DNA extraído de oligodendrogliomas (1 a 5) e de glioblastomas convencionais (6 a 14). L - marcador de peso molecular (*Laedder 100bp* - *Invitrogen*). Controle negativo não exibido na foto.

Figura 4 – Amplificação de fragmento do gene da albumina (141bp).

4.3.2 Avaliação da eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos iniciadores que foram utilizados para a pesquisa das deleções (**Tabela 1**) tiveram suas seqüências localizadas e conferidas utilizando-se os dados disponíveis nos bancos de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e o programa Gene Runner.

A eficiência de amplificação de cada par de oligonucleotídeos iniciadores foi avaliada através da confecção de uma curva padrão utilizando-se diluições sucessivas do DNA da linhagem celular SKBR3 (800, 80, 8, 0,8 e 0,08 ng) (**Figura 5**). Ao final, os resultados foram analisados e através dos ângulos (Slope) obtidos com a confecção destas curvas (valor fornecido pelo programa do equipamento SDS 7500) foi possível calcular a eficiência das reações através da equação $E=10^{(-1/S)}-1$ (**Figura**

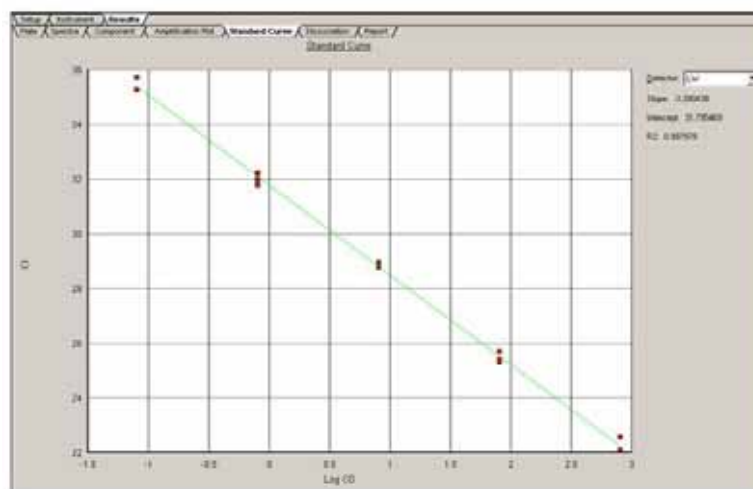
6). Todos os oligonucleotídeos incluídos neste estudo apresentaram valores de eficiência dentro do intervalo de $100\% \pm 10\%$, conforme recomendado pela *Applied Biosystems* (Application note 127AP05-01) (**Anexo 3**).

O *pool* de referência também foi testado e atingiu o *threshold* 1 a 4 ciclos antes dos demais oligonucleotídeos. Este fato já era esperado e também foi observado nos experimentos de NIGRO et al. (2001) que serviram de base para este estudo.

Além dos oligonucleotídeos listados neste estudo, outros 7 testados não foram incluídos por problemas relacionados à eficiência ou por apresentarem valores de ΔC_t ou SD muito diferentes dos demais, quando testados nos controles normais.



Figura 5 – Curvas de amplificação com diluições sucessivas do DNA da linhagem celular SKBR3, utilizando o oligonucleotídeo D1S468.



Legenda: Os valores de Ct para cada quantidade de DNA (diluições da linhagem SKBR3) são marcados como função do log da concentração inicial de DNA, gerando uma linha. O ângulo resultante desta linha é usado para determinar a eficiência.

Figura 6 – Curva de eficiência para o oligonucleotídeo D1S514.

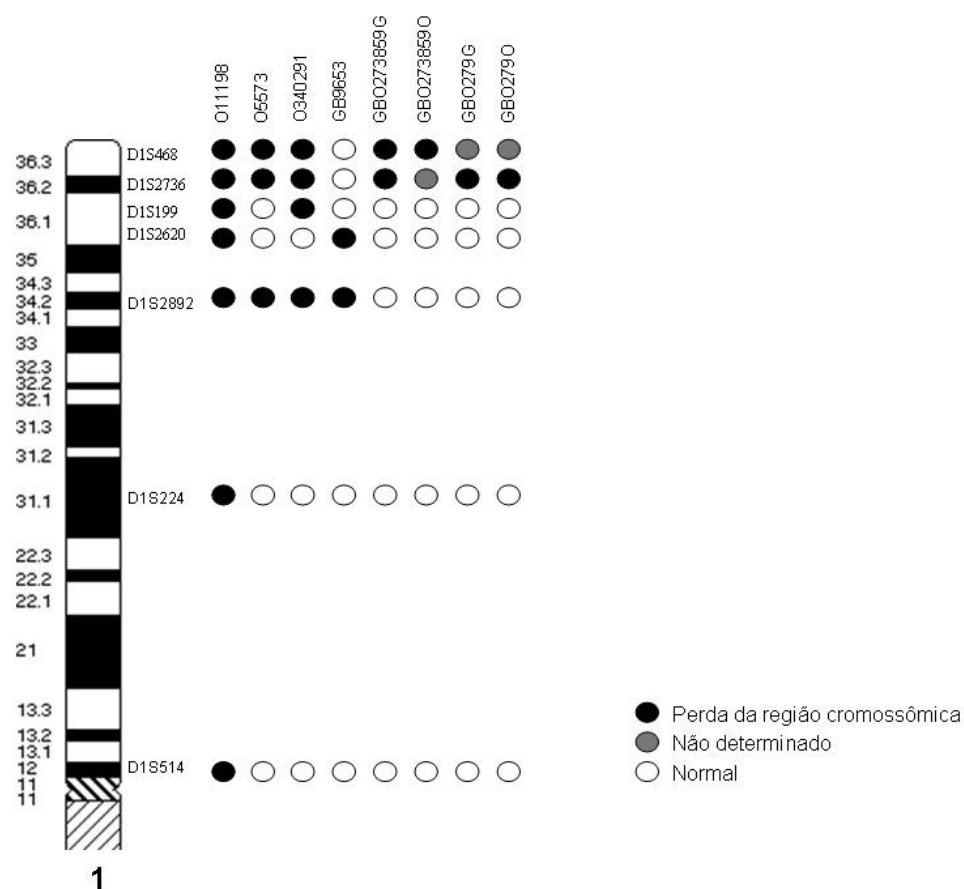
4.3.3 Resultado da pesquisa de perdas em 1p e 19q

Inicialmente foram realizadas as reações de PCR em tempo real com as amostras dos controles. Para cada conjunto de triplicatas foram escolhidos os 2 valores de Ct mais próximos e calculada a média destes Cts. Em seguida foi calculada a média dos valores de ΔCt medidos para cada *locus* nos 8 controles (normais) e estes valores foram usados para os cálculos em todos os experimentos subsequentes ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ tumor} - \Delta Ct \text{ normal}$). A média e o desvio padrão obtidos com os valores de $\Delta\Delta Ct$ dos controles (*pool* dos desvios para todos os *loci* analisados-**Anexo 4**) foram utilizados para determinar o intervalo de tolerância, estabelecendo que um número de cópias menor que 1,1 será considerado deleção, porém apenas quando detectado em 2 ou mais *locus* consecutivos (NIGRO et al. 2001; OKAMOTO et al. 2004).

A determinação do número de cópias para os 7 *loci* em 1p e para os 4 *loci* em 19q foi realizada em seguida nos 5 oligodendrogliomas, em 10 glioblastomas convencionais 24 glioblastomas com componente oligodendrogliar (20 destes com separação dos componentes astrocítico e oligodendrogliar), selecionados para análise quantitativa de microssatélites. Em 8 das 44 amostras de glioblastomas com áreas oligodendrogliais não foi possível determinar o número de cópias para a os *loci* analisados, provavelmente por problemas relacionados à qualidade do DNA obtido. O **Anexo 5** mostra os valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (que é multiplicado por 2 quando a amostra é um DNA diplóide normal), calculados a partir dos valores de Ct resultantes da amplificação dos *loci* estudados. A análise destes resultados demonstra deleção de todo o braço 1p em 1 entre 5 oligodendrogliomas (20%). Este mesmo tumor mostra uma deleção envolvendo todos os marcadores utilizados para 19q (região 19q13). Outros 2 oligodendrogliomas (40%) mostraram deleções de 1p36 em 2 ou mais marcadores sequenciais, porém não mostraram deleções no cromossomo 19. No total, 3 entre 5 oligodendrogliomas (60%) apresentaram deleções de 1p detectadas por este método (O11198, O5573 e O340291), um deles com deleção associada de 19q. Os glioblastomas convencionais mostraram perda em 19q em 2 entre 10 casos (20%), um deles envolvendo todos os marcadores para o braço longo do cromossomo (GB 6632) e no outro (GB 5920) apenas os dois marcadores mais distais, D19S867 e D19S418 (19q13.33 e 19q 13.42, respectivamente). Perdas no braço curto do cromossomo 1 foram observadas em apenas 1 glioblastoma convencional (GB 9653, 10% dos casos) envolvendo os marcadores D1S2892 (1p34.2) e D1S2620 (1p36. l2), sem perda dos marcadores mais teloméricos e sem perda associada de 19q. Como o número de oligonucleotídeos utilizado para estas regiões foi pequeno, não foi

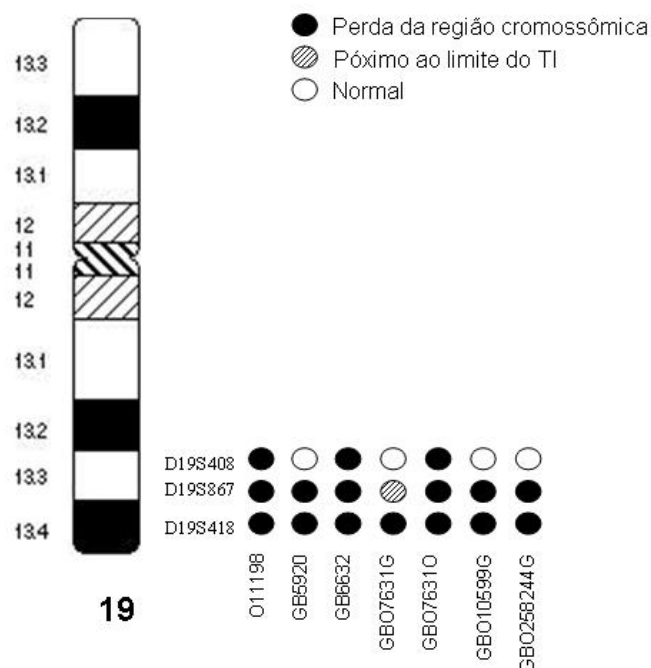
possível verificar a existência de deleções intersticiais pequenas. Nenhum glioblastoma convencional apresentou perda simultânea de 1p e 19q. Perdas em 1p tem sido descritas em cerca de 10% dos glioblastomas convencionais e perdas em 19q em 13 a 32% dos casos (INO et al. 2001, VON DEIMLING et al. 1992), portanto, os resultados observados estão de acordo com o esperado. Para as amostras de glioblastomas com componente oligodendroglial, foi possível obter resultado em 20 dos 24 pacientes. Entre estes 20 pacientes (36 das 44 amostras iniciais), apenas 4 (20%) mostraram perda em 1p ou 19q. Três mostraram deleção exclusiva em 19q (GBO 10599, GBO 258244 e GBO 7631), sendo dois deles apenas no componente astrocítico. Um dos casos (GBO 7631) mostrou deleção no componente oligodendroglial, envolvendo os três marcadores para 19q. Os resultados observados no componente astrocítico, no entanto, mostraram deleção do *locus* 19q13.42 e, no locus adjacente (19q13.33), valor próximo ao limite inferior determinado pelo intervalo de tolerância (TI), o que sugere a presença de deleção nos 2 componentes do tumor. Um dos tumores (GBO 273589) apresentou deleção nos 2 marcadores mais distais de 1p36 (1p36.32 e 1p36.22), observada no componente astrocítico e possivelmente também presente no componente oligodendroglial, que mostrou deleção do *locus* 1p36.32 e foi indeterminado no locus adjacente. Deve ainda ser notado que um dos tumores estudados (GBO 279) apresentou deleção do *locus* mais telomérico de 1p (1p36.32), tanto no componente astrocítico quanto no oligodendroglial, porém não pode ser considerado como deletado pelo critério empregado de 2 *locus* consecutivos deletados, já que o locus adjacente (1p36.22) foi indeterminado em ambos os componentes. Nenhum glioblastoma com componente oligodendroglial demonstrou perda simultânea de 1p e 19q por este método. Embora

o componente astrocítico dos tumores tenha apresentado mais freqüentemente deleções por este método (total de 3 casos no componente astrocítico versus 1 caso com deleção no componente oligodendrogial, considerando apenas os tumores que se encaixaram rigorosamente no critério adotado de 2 *locus* deletados consecutivos, tanto para o cromossomo 1 quanto para o 19), estes resultados não podem ser valorizados devido a pouca freqüência de tumores com deleções e por haver tumores que não tiveram todos os *locus* determinados. A correlação com os resultados de FISH foi considerada fundamental para a avaliação destes resultados e será apresentada a seguir. As **Figuras 7 e 8** mostram de forma esquemática as deleções observadas nos cromossomos 1 e 19. Os tumores sem perdas não estão representados.



Legenda na parte inferior da figura. Abreviaturas: O – Oligodendroglioma, GB – glioblastoma, GBO – glioblastoma com componente oligodendroglial, onde **G** no final indica o componente astrocítico e **O** o componente oligodendroglial.

Figura 7 - Tumores que mostraram perda no cromossomo 1p.



Legenda na parte superior da figura. Abreviaturas: O – Oligodendroglioma, GB – glioblastoma, GBO – glioblastoma com componente oligodendroglial, onde **G** no final indica o componente astrocítico e **O** o componente oligodendroglial.

Figura 8 - Tumores que mostraram perda no cromossomo 19q.

4.4 HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH)

A hibridização *in situ* fluorescente utilizou as sondas LSI 1p36/1q25 e LSI 19q13/19p13, Vysis®) para as regiões 1p36.32 e 19q13.32. O **Anexo 6** contém os valores obtidos através do ratio entre os braços dos cromossomos 1 e 19. Em um total de 116 amostras de tecido analisadas com ambas as sondas, não incluindo os controles de tecido nervoso sem tumor, não foi possível obter resultado com a sonda

LSI 1p36 em 23 amostras e com a sonda LSI 19q13 em 24 amostras, mesmo após repetições das hibridizações. A grande maioria destas amostras que apresentaram falhas nas hibridizações foi proveniente de blocos de parafina antigos, que possivelmente possuem problemas na qualidade do DNA. A observação destes tecidos mostrou um aspecto mal digerido dos mesmos e mesmo após testes com aumento do tempo de digestão, não foi possível obter hibridizações com qualidade suficiente para contagem dos sinais. Em 10 amostras a contagem dos sinais foi feita em menos de 100 núcleos. Este fato ocorreu predominantemente em amostras do TMA com baixa celularidade. Mesmo assim, estas amostras foram consideradas desde que apresentassem uma boa qualidade das hibridizações.

Observou-se através do método de FISH a presença de codeleção em 1p e 19q em todos os 5 oligodendrogliomas utilizados como referência. Três glioblastomas convencionais (GB 317337, GB 1077 e GB 9318) apresentaram deleção em 1p36, nenhum deles com perda associada de 19q. Estes glioblastomas não foram estudados por análise quantitativa de microssatélites. Deleções em 19q foram observadas em 4 glioblastomas convencionais (GB 526, GB 4412, GB 6632, GB 317836). Destes, apenas o GB 6632 foi submetido à análise quantitativa de microssatélites, que também mostrou a presença de perda em 19q. Entre os glioblastomas com componente oligodendroglioma foi observado um caso com codeleção de 1p/19q (GBO 325356), além de 3 casos com deleção exclusiva de 1p (GBO 4780, GBO 6062 e GBO 279) e 1 caso com deleção apenas de 19q (GBO 7631). Destes, apenas o GBO 7631 mostrou perda em 19q pela análise quantitativa de microssatélites. O caso GBO 279, embora não tenha sido considerado como tendo deleção na análise quantitativa de microssatélites (critério de 2 *locus* consecutivos deletados adotado na análise),

também pode ser visto como um resultado coincidente entre os 2 métodos, já que não foi obtido resultado para a região 1p36.32 na QuMA, que corresponde a região mapeada pela sonda, mas houve perda no *locus* adjacente 1p36.22. Nas análises realizadas por hibridização *in situ* fluorescente não houve diferença quando comparados os componentes oligodendroglial e astrocítico nos glioblastomas com componente oligodendroglial.

Nos casos com discordância entre FISH e QuMA, tiveram que ser feitas considerações em relação a sensibilidade dos métodos para cada situação, como será apresentado na discussão. De um modo geral, no entanto, a FISH teve um resultado mais consistente, além de ser uma técnica mais amplamente utilizada na pesquisa de deleção em 1p/19q. Os resultados fornecidos pelas duas técnicas foram utilizados, portanto, de forma complementar.

Assim, chegamos a um resultado consenso sobre o *status* de 1p e 19q, que está demonstrado na **Figura 9** e que foi utilizado para a análise estatística. De acordo com este resultado, 75 entre os 88 pacientes do estudo tiveram o *status* de 1p determinado. Destes, 8 apresentaram tumores com deleção de 1p (10,5%). Para 13 pacientes não foi possível obter resultado na análise do cromossomo 1, seja por FISH ou por QuMA. Entre os casos com deleção de 1p, 4 são glioblastomas convencionais e 4 glioblastomas com componente oligodendroglial. Deleção no braço longo do cromossomo 19 foi observada nos tumores de 9 entre 73 pacientes (12,3%) que tiveram o *status* de 19q determinado e incluíram 5 glioblastomas convencionais e 4 glioblastomas com componente oligodendroglial, um deles com perda associada de 1p. Para 15 pacientes (17% entre os 88 pacientes incluídos no estudo) não foi possível determinar o *status* de 19q por nenhuma das técnicas empregadas. Quando a

freqüência de deleções em 1p e/ou 19q nos glioblastomas com e sem componente oligodendroglial foi avaliada separadamente, observamos que entre os glioblastomas com componente oligodendroglial (24 tumores), deleção de 1p foi observada em 19% deles e deleção de 19q em 20%, incluindo um caso com codeleção de 1p/19q. Os glioblastomas convencionais (64 tumores) apresentaram deleção de 1p em 7,4% dos casos e deleção de 19q em 9,4%. A **Figura 10** ilustra os aspectos morfológicos e hibridizações de alguns dos casos estudados.

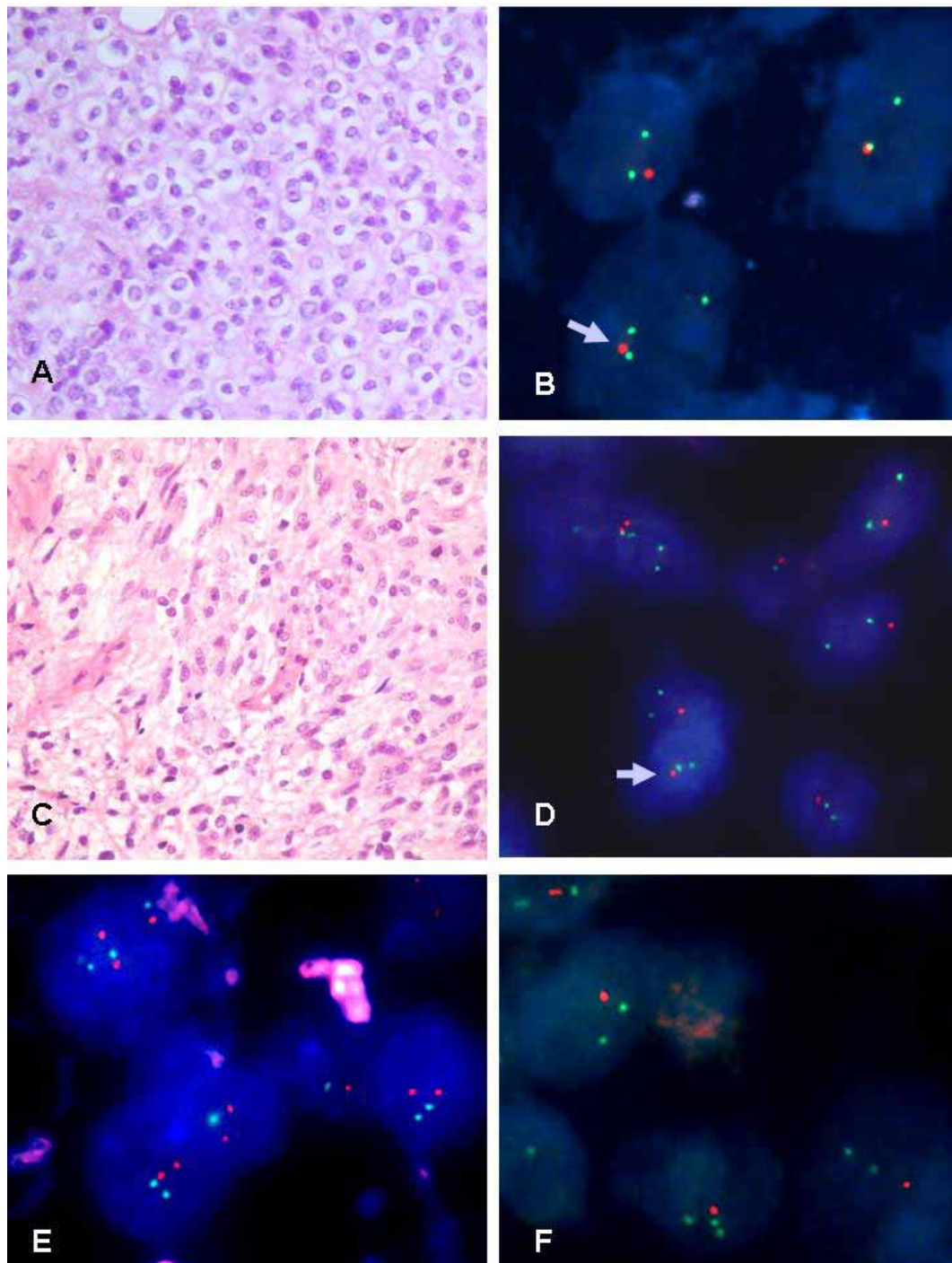
Amostra	1p	19q
GB 158561		
GBO 159421		
GBO 174263		
GB 176895		
GBO 184868		
GB 185013		
GB 186766		
GB 223620		
GB 226925		
GB 236627		
GB 249096		
GB 253062		
GBO 258244		
GB 261870		
GBO 267621		
GBO 273859		
GB 274824		
GBO 281033		
GB 284094		
GB 284877		
GB 285072		
GB 299532		
GBO 301859		
GB 315590		
GB 317337		
GB 317836		
GB 320992		
GB 322619		
GB 323284		
GBO 325356		

Amostra	1p	19q
GB 332629		
GB 332981		
GB 338397		
GB 175233		
GBO 692		
GB 789		
GB 838		
GB 3171		
GB 4409		
GBO 4780		
GB 4412		
GB 7122		
GB 7360		
GB 7501		
GB 7645		
GB 9057		
GB 526		
GB 891		
GB 263		
GB 4045		
GB 9756		
GB 9856		
GB 1252		
GBO 4222		
GBO 4249		
GB 4689		
GB 6206		
GB 9318		
GB 9591		
GB 9925		

Amostra	1p	19q
GB 784		
GB 1868		
GB 5920		
GB 8075		
GB 9008		
GB 9441		
GBO 10599		
GB 1077		
GB 2040		
GB 5585		
GB 5775		
GB 5814		
GBO 6062		
GB 6632		
GBO 7631		
GB 592		
GB 1768		
GB 3015		
GB 4277		
GBO 5908		
GB 9653		
GBO 3366		
GBO 10271		
GBO 1392		
GBO 15284		
GBO 19260		
GBO 4835		
GBO 279		

Legenda: Caixas preenchidas em preto – representam deleções detectadas por FISH ou análise quantitativa de microssatélites. **Abreviaturas:** GB – glioblastoma, GBO - glioblastoma com componente oligodendroglial.

Figura 9 – Resultado final da pesquisa de deleção nos cromossomos 1p e 19q.



Legenda: **A** – Oligodendroglioma grau II com o aspecto clássico das células com halos claros perinucleares (HE x 200). **B** - Sua respectiva hibridização mostrando deleção de 1p36 (1 sinal vermelho, seta). **C e D** – Glioblastoma com componente oligodendroglial, área de aspecto astrocítico (HE x 200). A hibridização correspondente mostra deleção de 19q (1 sinal vermelho, seta). **E** – Glioblastoma convencional, hibridização com a sonda LSI 19q13/19p13 mostrando 19q intacto (2 sinais vermelhos e 2 verdes). **F** – Glioblastoma convencional com deleção de 19q (sinal vermelho – locus alvo, sinais verdes – locus referência).

Figura 10 – Hibridizações *in situ* fluorescentes.

4.5 RESULTADOS DA ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na análise de sobrevida foram analisados os dados de 88 pacientes. Destes, 9 (10,2%) foram censurados. A sobrevida média global foi de 13,8 meses ($\pm 1,2$), com índice de sobrevida em 36 meses de 2,9% (**Figura 11**).

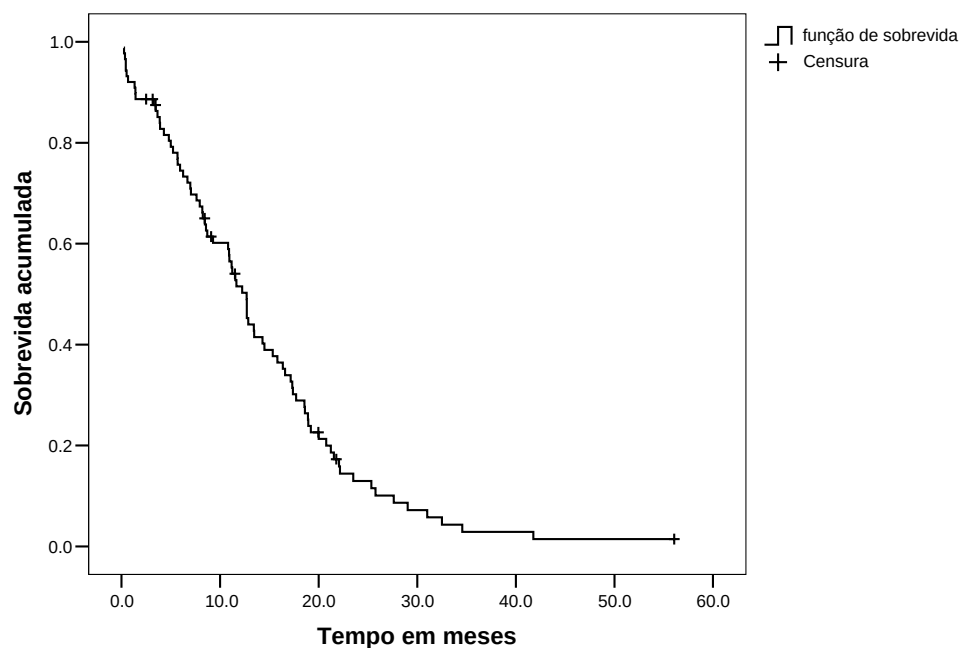


Figura 11 - Estimativa da sobrevida global.

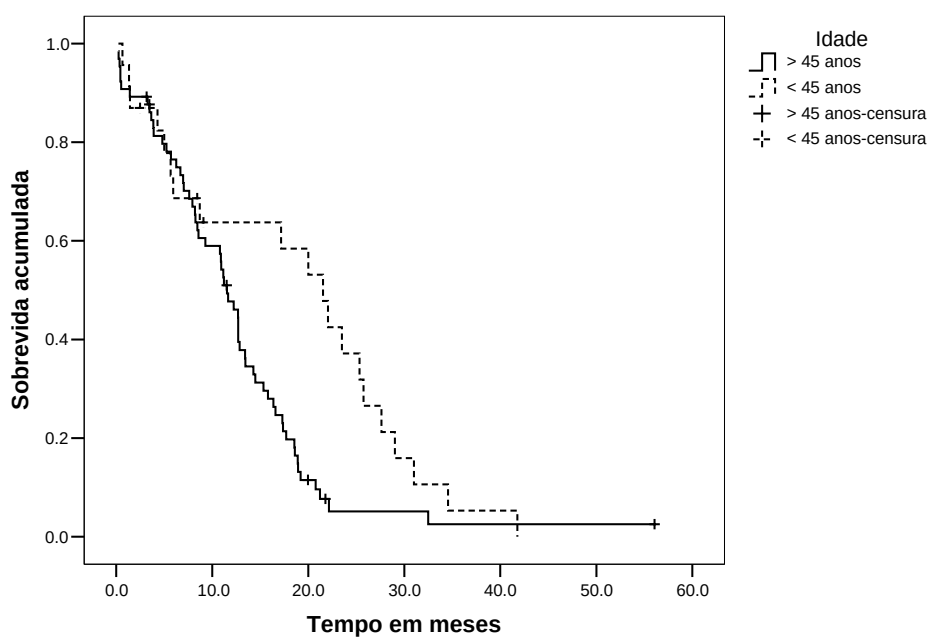
A Tabela 5 apresenta o risco de óbito associado ao grupo etário verificado por meio das razões de risco (HR). Observa-se que existe tendência a aumento do risco na medida em que aumenta a faixa etária (p para χ^2 de tendência linear = 0,03).

Tabela 4 - Risco de óbito para os grupos etários.

Faixa etária	N	HR	IC 95%
0 - 9	1	1,00	
10-19	2	4,37	0,38 – 50,08
20-29	1	14,66	0,86 – 249,01
30-39	8	2,68	0,31 – 23,00
40-49	17	2,68	0,35 – 20,62
50-59	24	4,00	0,52 – 30,78
60-69	23	4,97	0,65 – 38,03
70-79	11	5,32	0,66 – 43,10
80-89	1	13,88	0,82 – 235,52
χ^2 tendência linear			p = 0,03

A seguir, podem ser observados os resultados da análise de sobrevida pelo método de Kaplan-Meier com estratificação. O resultado do teste Log-rank é apresentado na parte inferior dos gráficos. Para a análise dos gráficos, devem ser observadas as diferenças entre as curvas de sobrevida. A curva superior representa o grupo com melhor resultado.

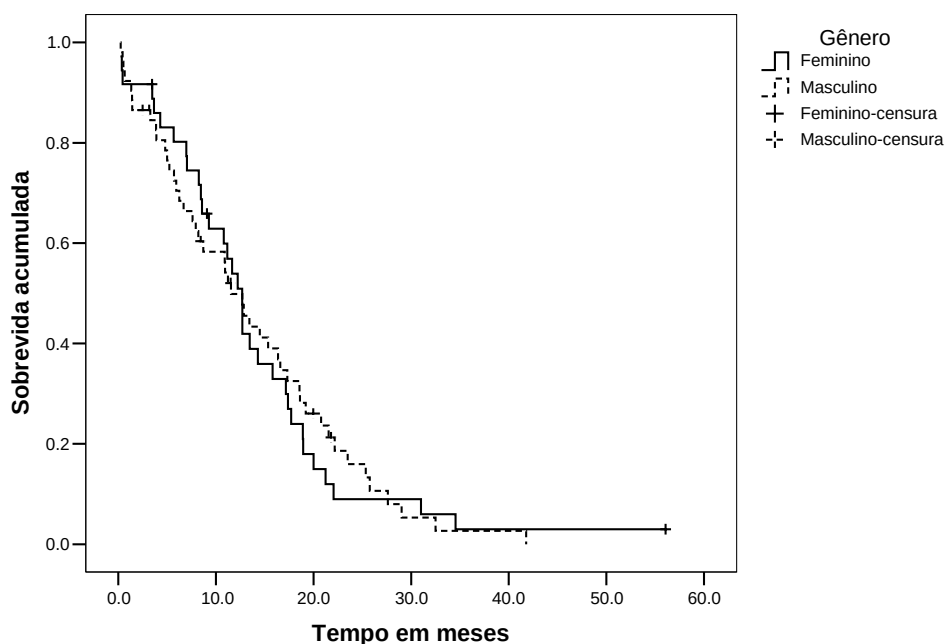
Na **Figura 12** apresenta-se o resultado da aplicação do método de Kaplan-Meier para a variável idade. Os indivíduos foram categorizados em dois grupos: *idade até 45 anos* e *idade maior que 45 anos*. Observa-se que o grupo com *idade até 45 anos* apresenta uma sobrevida maior. A realização do teste log-rank mostrou que a diferença entre os grupos é significativa ($p = 0,013$). A média de sobrevida para o grupo com idade até 45 anos foi de 18,5 meses ($\pm 2,7$) e para o grupo com mais de 45 anos, 12,5 meses ($\pm 1,3$).



Teste *Log-rank*, $p = 0,013$

Figura 12 – Curvas de sobrevida segundo a idade (até 45 anos e mais de 45 anos).

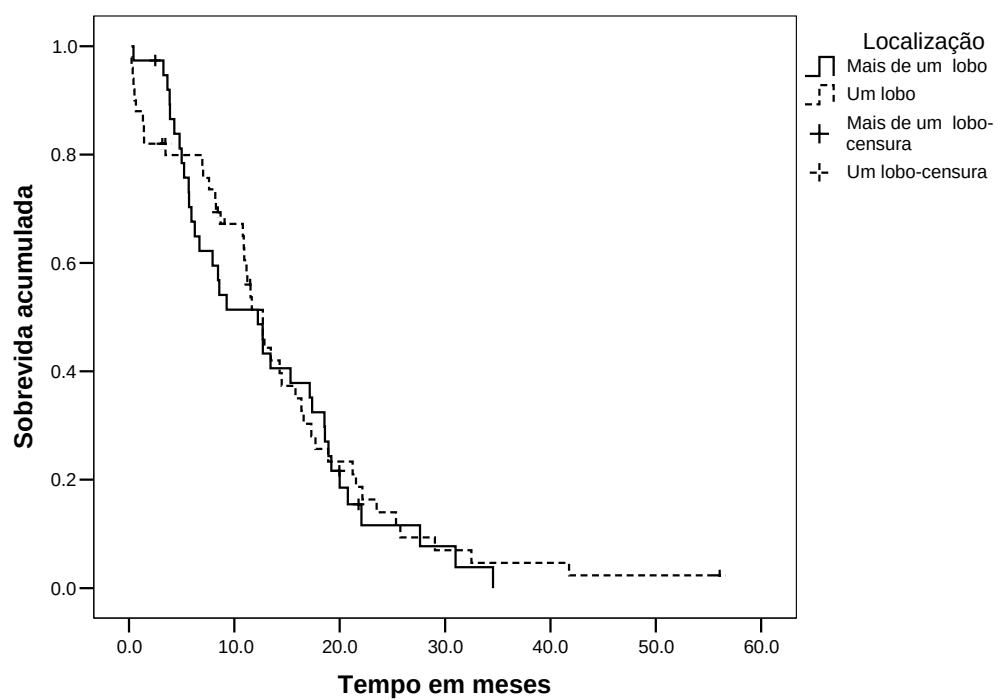
Quanto à variável gênero, o banco de dados é composto por 36 mulheres e 52 homens. Para o grupo dos homens a sobrevida média foi de 13,6 meses ($\pm 1,4$) e para o grupo das mulheres de 14,0 meses ($\pm 1,8$). O teste log-rank mostrou não haver diferença estatisticamente significativa no tempo de sobrevida segundo o gênero ($p = 0,941$) (**Figura 13**).



Teste *Log-rank*, $p = 0,941$

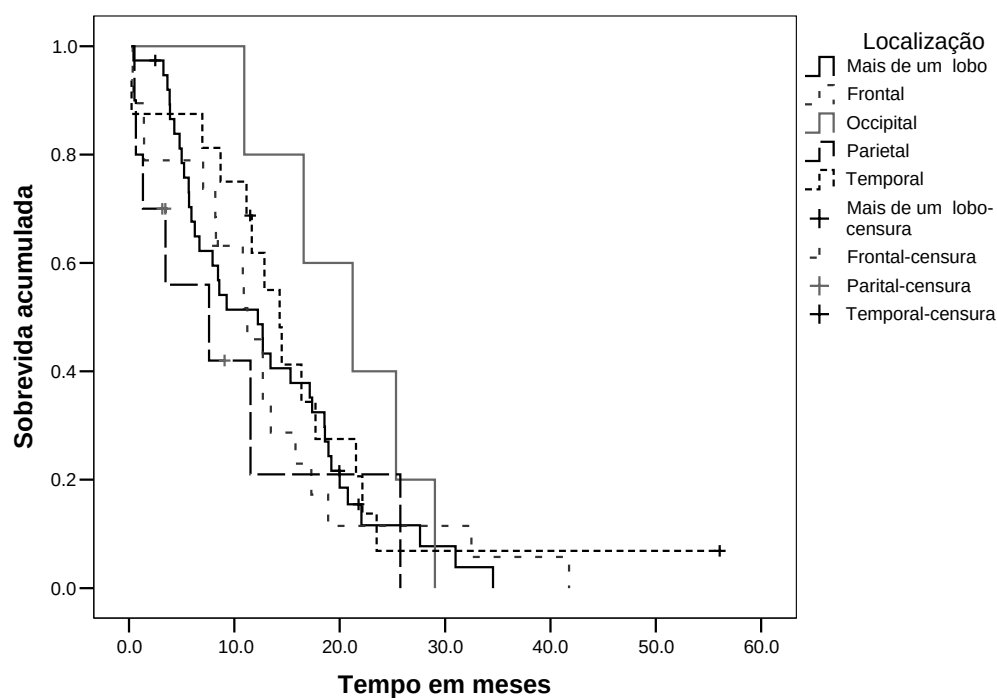
Figura 13 – Curvas de sobrevida segundo o gênero.

A variável localização do tumor foi categorizada em dois grupos: *tumor com localização em apenas um lobo* e *tumor com localização combinada*, ou seja, comprometendo mais de um lobo (incluindo nesta categoria os 3 casos com localização multifocal). Verificou-se que a sobrevida média para o grupo com tumores com localização em mais de um lobo foi de 13,2 meses ($\pm 1,4$) e de 14,2 meses ($\pm 1,7$) no grupo com tumores localizados em apenas um lobo. Não se observou, no entanto, diferença estatisticamente significativa entre as curvas ($p = 0,688$) (**Figura 14**). Ao considerar os vários lobos isoladamente (frontal, temporal, parietal, occipital) e a localização combinada, também foi observado que não há diferença estatisticamente significativa entre as curvas ($p = 0,538$) (**Figura 15**).



Teste *Log-rank*, $p = 0,688$

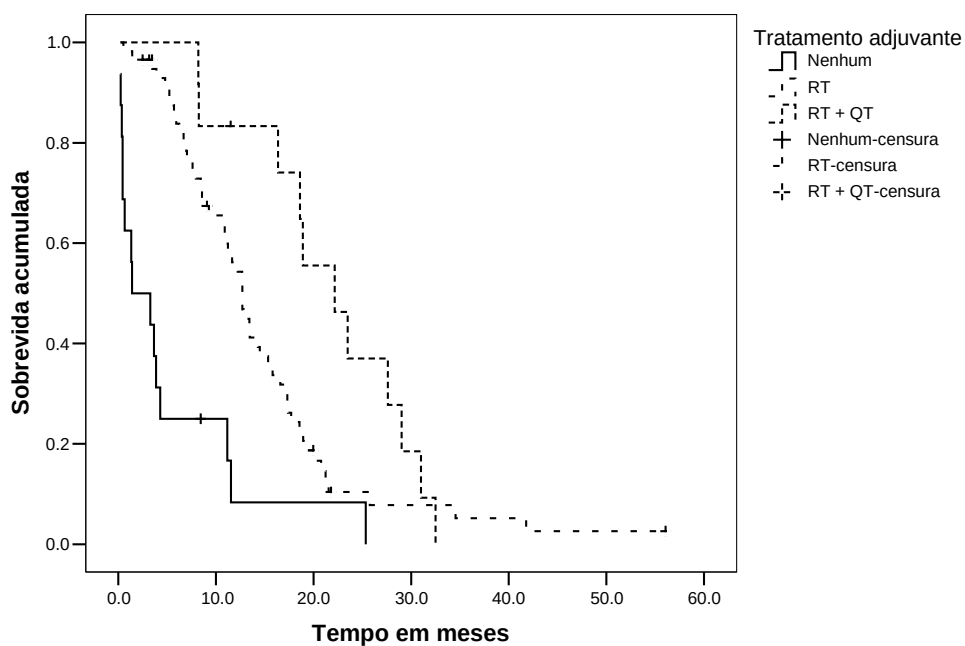
Figura 14 – Curvas de sobrevida segundo a localização do tumor (um lobo x localização combinada).



Teste Log-rank, $p = 0,538$

Figura 15 - Curvas de sobrevida segundo a localização do tumor (frontal parietal, temporal, occipital, combinada).

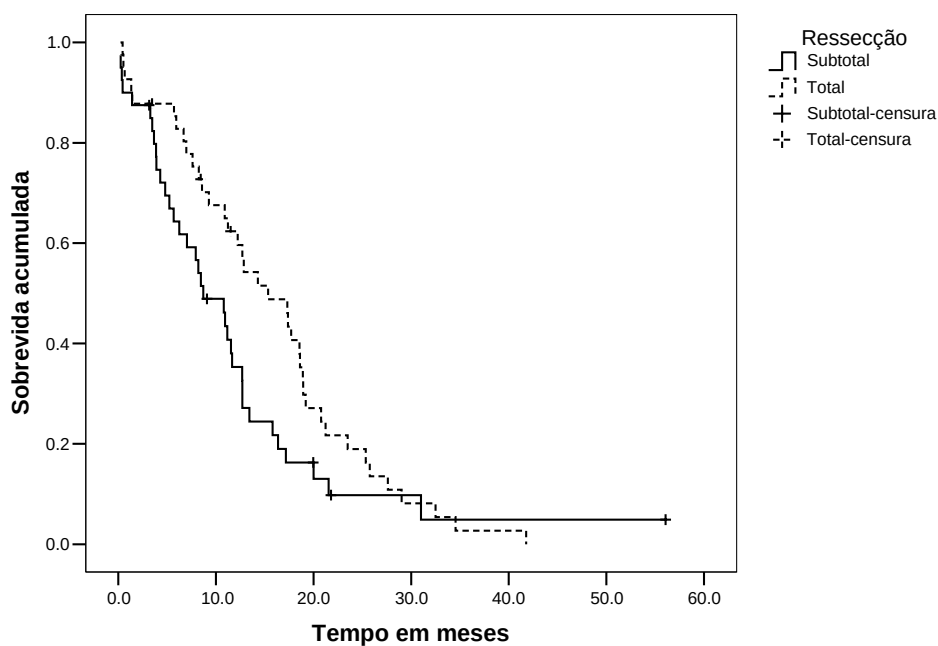
Quanto ao tratamento adjuvante, observou-se que 16 pacientes não realizaram tratamento adjuvante, 58 realizaram somente radioterapia e 12 realizaram radioterapia e quimioterapia. A sobrevida média estimada no grupo que não realizou nenhum tratamento adjuvante foi de 5,3 meses ($\pm 1,9$). No grupo que realizou somente radioterapia verificou-se sobrevida média de 14,7 meses ($\pm 1,5$) e no grupo que realizou radioterapia e quimioterapia a sobrevida média foi de 21,7 ($\pm 2,4$). Verificou-se por meio do teste log-rank que há diferença estatisticamente significativa entre as curvas ($p = 0,001$) (**Figura 16**).



Teste Log-rank, $p = 0,001$

Figura 16 – Curvas de sobrevida segundo o tratamento adjuvante.

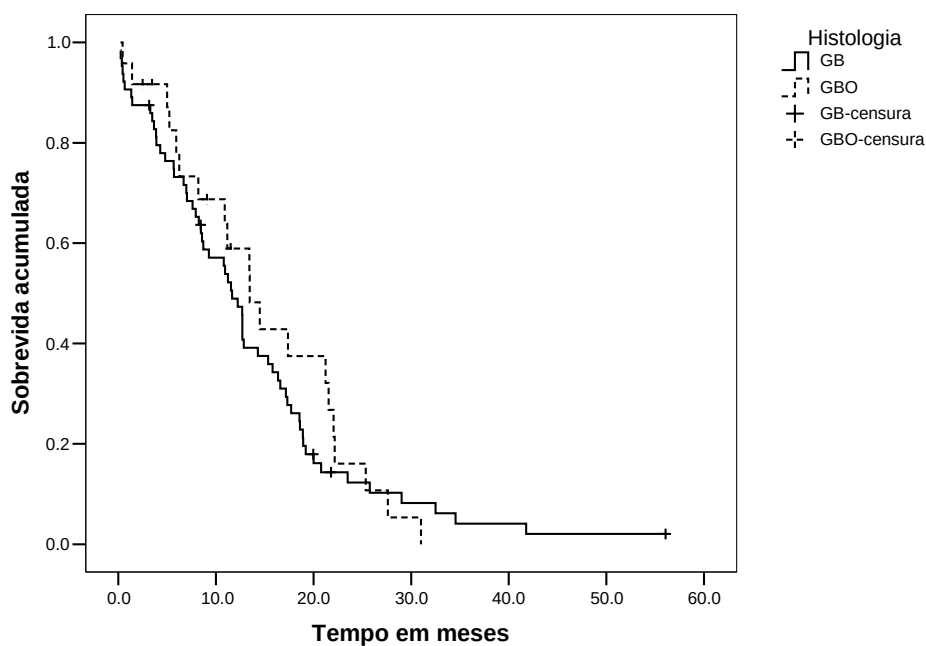
A sobrevida média no grupo que fez ressecção subtotal (40 pacientes) foi de 12,1 meses ($\pm 2,1$) e no grupo que fez ressecção total (41 pacientes) 15,6 meses ($\pm 1,6$). Verificou-se que não há diferença estatisticamente significativa entre as curvas de sobrevida segundo extensão da ressecção ($p=0,09$) (**Figura 17**).



Teste Log-rank, $p = 0,09$

Figura 17 – Curvas de sobrevida segundo a extensão da ressecção.

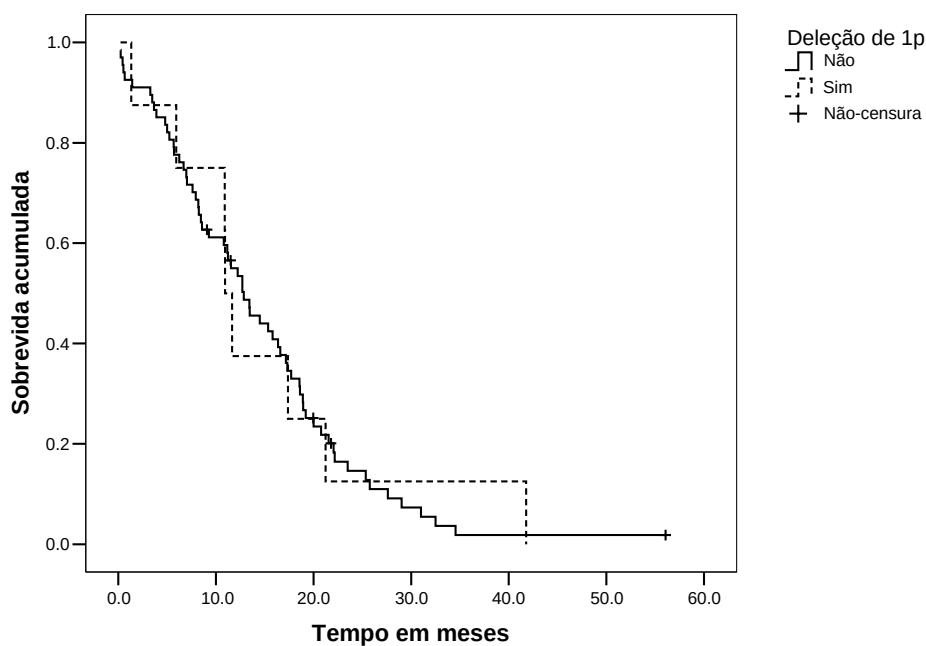
A sobrevida média para cada grupo, segundo a histologia, foi de 14,9 meses ($\pm 1,9$) para o grupo com diagnóstico de glioblastoma com componente oligodendroglioma (24 pacientes) e de 13,5 meses ($\pm 1,4$) para o grupo com diagnóstico de glioblastoma convencional (64 pacientes). Não foi verificada diferença significativa entre as curvas ($p = 0,566$) (**Figura 18**).



Teste Log-rank, $p = 0,566$

Figura 18 – Curvas de sobrevida segundo o diagnóstico histológico.

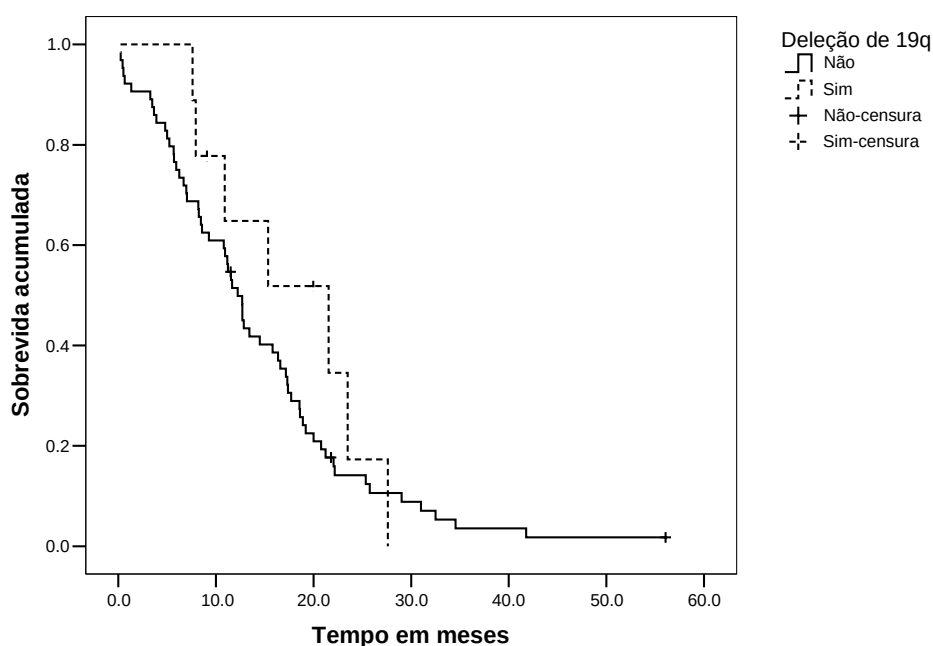
Dos 88 pacientes do banco de dados, obteve-se resultado na pesquisa da deleção do 1p em 75 pacientes. Destes, somente 8 apresentaram deleção do 1p. No grupo sem deleção a sobrevida média foi de 14,4 meses ($\pm 1,3$). No grupo com deleção de 1p a sobrevida média foi de 15,1 meses ($\pm 4,4$). Não se verificou diferença estatisticamente significativa entre os grupos segundo a deleção de 1p ($p = 0,894$) (**Figura 19**).



Teste Log-rank, $p = 0,894$

Figura 19 – Curvas de sobrevida segundo o status do cromossomo 1p.

Dos 88 pacientes do banco de dados, obteve-se resultado na pesquisa da deleção do 19q em 73 pacientes. Destes, somente 9 apresentaram deleção do 19q. No grupo sem deleção a sobrevida média foi de 14,2 meses ($\pm 1,4$). No grupo com deleção de 19q a sobrevida média foi de 17,7 meses ($\pm 2,8$). Não se verificou diferença estatisticamente significativa entre os grupos segundo a deleção de 19q ($p = 0,372$) (**Figura 20**).



Teste Log-rank, $p = 0,372$

Figura 20 – Curvas de sobrevida segundo o status do cromossomo 19q.

Para avaliar o efeito das covariáveis no tempo de sobrevida, aplicou-se um modelo de regressão de Cox. Foram utilizadas no modelo as seguintes variáveis: idade, gênero, diagnóstico histopatológico, localização, tratamento adjuvante, extensão da ressecção, status de 1p e status de 19q. Nesta análise, foram incluídos 67 pacientes e os resultados podem ser visualizados na Tabela 6. Os resultados da análise múltipla mostraram que os pacientes que não fizeram tratamento adjuvante apresentaram um risco 6,39 vezes maior do que aqueles que fizeram radioterapia e quimioterapia ($p < 0,001$), sendo esta diferença estatisticamente significativa e que os pacientes que fizeram somente radioterapia têm um risco 1,25 vezes maior do que os que fizeram radioterapia e quimioterapia ($p = 0,577$). Quanto à variável idade, verificou-se um risco 2,49 vezes maior de óbito entre os pacientes com mais de 45 anos. Esta diferença também foi estatisticamente significativa ($p = 0,008$). Os

pacientes com diagnóstico histopatológico de glioblastoma convencional mostraram um risco 1,29 vezes maior de ir a óbito do que os pacientes com glioblastoma com componente oligodendrogliol, porém esta diferença não foi estatisticamente significativa. Não houve diferença de risco estatisticamente significativa para as variáveis: gênero, extensão da ressecção, localização do tumor, status de 1p e status de 19q.

Também não foi verificada correlação estatisticamente significativa entre as variáveis do estudo, considerando todos os pacientes envolvidos na análise.

Tabela 5 - Resultados da análise múltipla.

Variável	Razão de riscos (intervalo de confiança – 95%)	Valor-p
Idade		
Até 45 anos	1,00	
Mais de 45 anos	2,49 (1,26 – 4,91)	0.008
Gênero		
Feminino	1,00	
Masculino	0,96 (0,54 – 1,72)	0.896
Diagnóstico Histopatológico		
GBO	1,00	
GB	1,29 (0,62 – 2,69)	0.489
Tratamento adjuvante		
RT+QT	1,00	
RT	1,25 (0,57 – 2,71)	0.577
Nenhum	6,39 (2,34 – 17,45)	0.001
Extensão da Ressecção		
Total	1,00	
Subtotal	1,13 (0,64 – 1,99)	0.675
Status 1p		
Deletado	1,00	
Não deletado	0,71 (0,29 – 1,71)	0.439
Status 19q		
Deletado	1,00	
Não Deletado	0,93 (0,38 – 2,24)	0.868
Localização		
Mais um lobo	1,00	
Um lobo	0,66 (0,37 – 1,16)	0.149

Ainda na análise de sobrevida, foi realizada uma análise independente separando os pacientes em dois grupos, aqueles com mais de 45 anos e aqueles com menos de 45 anos. Também foi realizada uma análise independente separando os pacientes em dois grupos quanto ao diagnóstico histológico (GB e GBO).

Os pacientes com até 45 anos (23 pacientes) compreenderam 26,1% do total de pacientes, sendo 8 do gênero feminino e 15 do gênero masculino. Doze foram submetidos à ressecção total e 8 à ressecção subtotal. Neste grupo de pacientes, os tumores envolveram com maior frequência mais de um lobo (localização combinada - 11 pacientes). Com relação ao tratamento adjuvante, 52% dos pacientes com até 45 anos realizaram somente radioterapia e 17,4% foram submetidos à radioterapia e quimioterapia. Foram observados 14 pacientes com glioblastomas convencionais e 9 com diagnóstico de GBO. Três pacientes apresentaram tumores com deleção de 1p e 4 apresentaram tumores com deleção de 19q. A análise de sobrevida para este grupo de pacientes mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa no tempo de sobrevida para nenhuma das categorias de cada variável analisada. Também não foi observada correlação estatisticamente significativa entre as variáveis.

Quanto aos pacientes com mais de 45 anos, estes representaram 73,9% (65 pacientes) do total de pacientes, sendo 37 do gênero masculino e 28 do gênero feminino. Observou-se que as localizações mais frequentes neste grupo foram: a combinada em mais de um lobo (27 pacientes) e a frontal (16 pacientes). Para 61 pacientes com mais de 45 anos a informação sobre a extensão da ressecção estava disponível. Destes, 32 realizaram ressecção subtotal e 29, ressecção total. Quarenta e seis pacientes (70,1%) realizaram somente radioterapia como tratamento adjuvante.

Cinquenta pacientes (76,9%) tiveram diagnóstico histológico de GB e 15 pacientes de GBO. Cinco pacientes apresentaram tumores com deleção de 1p e 5 pacientes tumores com deleção de 19q, sendo apenas um dos casos uma codeleção de 1p/19q. A análise de sobrevida neste grupo mostrou diferença estatisticamente significativa no tempo de sobrevida para a variável tratamento adjuvante ($p < 0,001$). Ao analisar a correlação entre as variáveis no grupo com mais de 45 anos, observou-se que esta foi estatisticamente significativa entre localização e o status de 1p deletado ($p = 0,010$). Para investigar qual das localizações estava associada com a deleção de 1p, ajustou-se um modelo de regressão logística por meio do qual se pôde verificar a associação entre as localizações combinada e frontal com a deleção de 1p ($p = 0,016$ e $p = 0,048$, respectivamente).

Entre os 64 pacientes com diagnóstico glioblastoma convencional, a idade média foi de 54,8 anos ($\pm 15,3$). Cinquenta pacientes (78,1%) tinham mais de 45 anos e 14 pacientes possuíam idade até 45 anos. Com relação ao gênero, 27 pacientes (42,2%) eram mulheres e 37 (57,8%) eram homens. As localizações mais frequentes foram: combinada envolvendo mais de um lobo (27 pacientes) e frontal (15 pacientes). Quanto à ressecção, 30 pacientes foram submetidos à ressecção subtotal e 33, à ressecção total (a informação sobre a extensão da ressecção não estava disponível para um paciente). Quatro pacientes apresentaram tumores com deleção de 1p e 5 apresentaram deleção de 19q. Quarenta e cinco pacientes fizeram tratamento adjuvante com radioterapia e 7 com radio e quimioterapia. Na análise de sobrevida para este grupo, apenas o tratamento adjuvante mostrou ter impacto estatisticamente significativo na sobrevida ($p < 0,001$). Não foi observada correlação estatisticamente significativa entre as variáveis analisadas.

Entre os 24 pacientes com diagnóstico de GBO a idade média foi de 52,3 anos ($\pm 2,8$). Destes, 9 pacientes possuíam idade até 45 anos e 15, mais de 45 anos; 15 eram do gênero masculino e 9, do gênero feminino. A localização mais freqüente foi a combinada (11 pacientes). Oito pacientes foram submetidos à ressecção total e 10 à ressecção subtotal (esta informação não estava disponível para 6 dos 24 pacientes). Treze pacientes foram submetidos à radioterapia e 5 à RT e QT. Três pacientes apresentaram tumores com deleção isolada de 1p e outros 3 apresentaram tumores com deleção isolada de 19q. Um paciente apresentou tumor com codeleção de 1p/19q. A análise de sobrevida no grupo com diagnóstico de GBO mostrou que houve diferença estatisticamente significativa para a variável idade, com os pacientes com menos de 45 anos apresentando sobrevida significativamente maior que aqueles com mais de 45 anos ($p=0,017$). Não foi observada correlação estatisticamente significativa entre as variáveis analisadas.

Por meio do teste t para dados independentes pôde-se verificar que não há diferença estatisticamente significativa entre a idade dos pacientes nos grupos com diagnóstico de glioblastoma convencional e glioblastoma com componente oligodendroglial ($p = 0,490$).

Para verificar se as freqüências de deleção nos grupos com diagnóstico de GB e GBO eram iguais foi utilizado um teste Z de diferença entre proporções. Verificou-se que a freqüência de deleção de 1p e 19 q para os dois grupos de diagnóstico histopatológico (GB e GBO) não é estatisticamente significativa ($p = 0,130$ e $0,225$, respectivamente).

Tabela 6 – Comparação entre as características dos glioblastomas convencionais e glioblastomas com componente oligodendroglial.

Características	GB	GBO	Valor-p
Idade média (anos)	54,8(± 15,3)	52,3(± 2,8)	0,490
Deleção 1p (%)	7,4	19,0	0,130
Deleção 19q (%)	9,4	20,0	0,225
Sobrevida média (meses)	13,5(± 1,4)	14,9(± 1,9)	0,566

5 DISCUSSÃO

O estudo desta série de glioblastomas mostrou que a idade dos pacientes ainda é um dos fatores prognósticos mais relevantes, apesar de outras características clínicas também ter influência na sobrevida. Nenhum dado genético ou molecular tem mostrado, até o momento, importância significativa quando comparado com esta característica clínica. Como já mencionado, no estudo populacional realizado por OHGAKI et al. (2004), a idade foi o fator prognóstico mais significativo. Alguns ensaios clínicos não têm mostrado este efeito da idade na sobrevida, mas isto pode ser devido ao fato de que os pacientes elegíveis para os ensaios são geralmente mais jovens e com melhor status funcional. Além disso, os pacientes mais idosos tendem a receber tratamentos menos agressivos. Análises retrospectivas utilizando dados coletados em estudos mais antigos, quando a radioterapia ainda não era realizada de rotina em todos os pacientes, demonstraram que, nos pacientes tratados apenas com cirurgia, o tempo de sobrevida não estava significativamente relacionado com a idade, o que sugere que a resistência ao tratamento adjuvante deve ser um dos fatores responsáveis pela menor sobrevida observada nos pacientes mais idosos. Entre as hipóteses já levantadas para justificar este dado está a de que as diferenças na patologia molecular dos gliomas poderiam estar relacionadas com a sensibilidade aos tratamentos citotóxicos (BARKER et al. 2001). Mais recentemente, o papel das alterações moleculares em pacientes com glioblastomas com menos de 50 anos foi avaliado por KORSHUNOV et al. (2005). Neste estudo, os tumores dos pacientes com mais de 40 anos mostraram frequentemente amplificação de EGFR, perdas em

9p e 10q e ganhos no cromossomo 19, alterações estas relacionadas com menor sobrevida. As perdas em 19q foram observadas apenas nos tumores de pacientes com menos de 40 anos. Estes dados sugeriram que o significado prognóstico de uma determinada alteração genética/molecular pode ser diferente em pacientes com menos de 50 anos. Para avaliar o impacto das alterações genéticas de 1p/19q em pacientes de diferentes grupos etários na presente série de glioblastomas, foi realizada também uma análise de sobrevida dividindo-se os pacientes em 2 grupos: aqueles com menos de 45 anos e aqueles com mais de 45 anos. Porém, o status de 1p e 19q não mostrou correlação com a sobrevida em nenhum dos grupos etários.

O papel da radioterapia como adjuvante no tratamento dos pacientes com glioblastomas já está bem estabelecido, porém a resposta é variável. Além da idade, outras variáveis clínicas que podem predizer uma melhor resposta à radioterapia incluem o status funcional pré-operatório e a extensão da ressecção (BARKER et al. 2001). SHIH et al. 2005 investigaram o impacto das alterações genéticas dos tumores na resposta à radioterapia, porém sem um resultado consistente. A quimioterapia também pode ser utilizada no tratamento adjuvante inicial, dependendo do *status* funcional do paciente. No entanto, apenas um pequeno grupo de pacientes (cerca de 10%) vai apresentar algum prolongamento da sobrevida com a quimioterapia adjuvante. As drogas mais comumente empregadas são as nitrosureas, que produzem seu efeito citotóxico através da metilação do DNA, sendo as duas principais drogas desta classe a Carmustina (BCNU) e a lomustina (CCNU). A temozolamida, um dos novos agentes alquilantes que vem sendo utilizado no tratamento quimioterápico, já mostrou contribuir para a melhora da qualidade de vida dos pacientes e recentemente foi sugerido que a sua administração concomitante com a radioterapia, uma nova

abordagem, aumenta significativamente a sobrevida (STUPP et al. 2005; MATHIEU e FORTIN 2006). Entre os mecanismos de quimiorresistência já caracterizados nos tumores astrocíticos está a expressão de MGMT (O⁶-metilguanina-DNA-metiltransferase), que media a resistência aos agentes alquilantes removendo os grupos alquil do DNA e criando um fenótipo resistente. O silenciamento epigenético do gene de reparo MGMT através de metilação do promotor compromete o reparo do DNA e tem sido associado com sobrevida prolongada nos pacientes com glioblastomas que recebem agentes alquilantes (MATHIEU e FORTIN 2006). HEGI et al. (2005) mostraram que os pacientes com glioblastomas contendo um promotor de MGMT metilado foram beneficiados pelo tratamento com temozolamida. A presente série de glioblastomas mostrou que os pacientes tratados com radioterapia adjuvante e quimioterapia ou somente com radioterapia adjuvante tiveram sobrevida mais prolongada do que aqueles submetidos apenas à ressecção cirúrgica, sendo este resultado estatisticamente significativo. No entanto, deve-se observar que poucos pacientes receberam quimioterapia, muitos provavelmente no momento da recorrência, podendo haver uma influência importante do *status* funcional e da idade na seleção dos tratamentos realizados. Além disso, esta série compreendeu um período muito longo (1980-2003) e os pacientes que receberam quimioterapia correspondem aos casos mais recentes, diagnosticados a partir de 1997. Este dado permite considerar que mudanças no cuidado médico ao longo do tempo também possam ter influência na sobrevida dos pacientes. Os agentes quimioterápicos utilizados compreenderam nitrosureas, o esquema PCV (que é um esquema combinado para aumentar a eficácia das nitrosureas), a temozolamida e ainda outras combinações de várias drogas, incluindo sais de *platinum*, etoposide, nitrosureas, etc.

Os pacientes que foram tratados apenas com cirurgia, sem relato no prontuário de tratamento adjuvante, foram os que apresentaram a menor sobrevida. Entre estes, apenas 4 foram óbitos dentro do primeiro mês após a cirurgia. Este dado pode parecer impreciso já que o tratamento padrão consiste de cirurgia seguida de radioterapia, porém como discutido acima, as abordagens terapêuticas e o acesso aos tratamentos complementares podem ter variado ao longo do tempo. Certamente o desenho deste estudo não é adequado para fazer uma avaliação sobre o papel dos tratamentos adjuvantes, porém esta foi uma variável que mostrou ser um fator prognóstico independente.

Um dos principais objetivos deste estudo foi analisar o perfil das alterações genéticas nos cromossomos 1p e 19q em um grupo de tumores classificados como glioblastomas convencionais e glioblastomas com componente oligodendrogliol. Apesar de séries anteriormente estudadas demonstrarem que a presença do componente oligodendrogliol está associada com maior sobrevida pós-operatória (KRAUS et al. 2001; PINTO e CHIMELLI 2004; HILTON et al. 2004) esta diferença não foi estatisticamente significativa nos casos deste estudo, embora a sobrevida média dos pacientes com GBO tenha sido ligeiramente maior. A frequência das alterações genéticas nos cromossomos 1p e 19q também não foi significativamente diferente nos 2 grupos ($p = 0,065$) e, de um modo geral, os glioblastomas com componente oligodendrogliol apresentaram um perfil de alterações genéticas nos cromossomos 1 e 19 semelhante aquele observado nos tumores com morfologia convencional. Este dado não corrobora os achados descritos nos estudos iniciais sobre as alterações genéticas e moleculares observadas nos GBO, que sugeriam que estes tumores teriam uma alta frequência de LOH nos

cromossomos 1p e 19q, quando comparados aos GB convencionais, além das alterações habitualmente observadas de EGFR, PTEN, CDKN2A, etc (HE et al. 2001, KRAUS et al. 2001). Recentemente, HOMMA et al. (2006) detectaram a presença de um componente oligodendroglial em 20% dos glioblastomas estudados e observaram que os pacientes deste grupo tiveram sobrevida significativamente mais longa. Porém, a análise multivariada com ajuste para idade e gênero mostrou que a presença do componente oligodendroglial não foi preditiva de maior sobrevida. Além disso, este estudo também não mostrou diferença na frequência de alterações genéticas (perda no 1p e/ou 19q) entre os glioblastomas com e sem componente oligodendroglial, resultado semelhante ao observado no presente estudo. É possível que os primeiros estudos que descreveram uma maior frequência de alterações em 1p e 19 q nos glioblastomas com componente oligodendroglial tenham um viés na seleção dos casos, com a inclusão de tumores que numa avaliação mais criteriosa poderiam ser classificados como oligodendrogliomas ou oligoastrocitomas anaplásicos. Sabe-se que os critérios histológicos para a classificação dos glioblastomas com componente oligodendroglial são pouco definidos e subjetivos. Além disso, a classificação da OMS é imprecisa na definição das características dos gliomas híbridos oligoastrocíticos, sendo tradicionalmente criticada pela sua falta de reprodutibilidade (COONS et al. 1997; DAUMAS-DUPORT et al. 2000).

SCHMIDT et al. (2002) avaliaram a relação das alterações genéticas e moleculares com o prognóstico nos glioblastomas e identificaram a codeleção de 1p/19q em apenas 5 entre 73 glioblastomas. A codeleção estava associada com maior sobrevida, o que não foi observado nos casos com perdas isoladas de 1p ou 19 q, que não mostraram impacto na sobrevida dos pacientes com glioblastomas. No entanto,

este dado não está de acordo com as observações feitas em séries posteriores, que incluíram o estudo das alterações genéticas de 1p/19q em gliomas com graus e histologia variados e falharam em mostrar uma associação destas alterações com tumores que não fossem oligodendrogliomas, nem mesmo naqueles casos designados como glioblastomas com componente oligodendroglioma (FULLER et al. 2003; WALKER et al. 2003; BARBASHINA et al. 2005). O estudo de FULLER et al. (2003), que envolveu gliomas morfológicamente ambíguos com características híbridas oligo-astrocíticas e graus variando de II a IV mostrou que a codeleção de 1p/19q não foi observada nos tumores grau IV, enquanto a deleção isolada de 19q estava presente predominantemente nos tumores graus III e IV. Os autores também procuraram por potenciais associações entre a morfologia e a genética, porém os poucos casos que apresentaram codeleção de 1p/19q não possuíam aspecto mais obviamente oligodendroglioma do que os demais. O único parâmetro histológico, portanto, que apresentou uma correlação clara com os achados genéticos foi o grau tumoral. No entanto, os autores chamaram atenção para o fato de que alguns dos pacientes com tumores grau IV sobreviveram por longo período, o que seria uma evidência de que a presença de características fenotípicas oligodendrogliais no tumor, mesmo sendo um dado subjetivo, poderia ser um indicativo de melhor prognóstico num subgrupo de glioblastomas. No estudo de WALKER et al. (2003), os glioblastomas com componente oligodendroglioma (7 tumores), mostraram apenas perdas no cromossomo 10, sem evidência de perdas em 1p e 19q, tanto no componente astrocítico quanto no oligodendroglioma, que foram avaliados separadamente. Mais recentemente MCDONALD et al. (2005) demonstraram que a presença de codeleções em 1p/19q só tem impacto prognóstico em tumores com

histologia oligodendroglial clássica. Este estudo tenta avançar na questão do valor da deleção de 1p/19q na classificação de tumores com morfologia ambígua, ou seja, com características intermediárias entre tumores astrocíticos e oligodendrogliais, dado até então de significado incerto. Porém, a deleção de 1p/19q não mostrou associação com o prognóstico em pacientes com tumores considerados não clássicos na revisão histopatológica, enquanto naqueles com histologia clássica a sobrevida era significativamente mais longa. Mesmo nos pacientes com 1p/19q intacto, a presença da histologia oligodendroglial clássica foi indicativa de um melhor prognóstico. A razão para a interação entre o status de 1p/19q e a histologia e seu impacto na sobrevida dos pacientes ainda é desconhecida e a hipótese destes autores é de que a ausência da histologia clássica possa refletir alterações genéticas adicionais que modificam tanto o aspecto histológico quanto o comportamento biológico e resposta ao tratamento destes tumores. O mesmo raciocínio também poderia ser aplicado na presente série de glioblastomas, onde observamos que nos tumores com morfologia ambígua, neste caso os glioblastomas com componente oligodendroglial, a presença de deleção em 1p e/ou 19q não apresentou impacto significativo na sobrevida, da mesma forma que nos tumores com morfologia convencional. Codeleção de 1p/19q só foi observada em um glioblastoma com componente oligodendroglial, o que prejudica a avaliação do significado da codeleção na análise de sobrevida. Este paciente com codeleção sobreviveu 11 meses após o diagnóstico e não pode, portanto, ser caracterizado como tendo uma sobrevida longa em relação aos demais. Embora não seja o foco deste estudo, os 5 oligodendrogliomas utilizados como referência para a pesquisa das alterações genéticas apresentaram codeleção de

1p/19q, tanto nos tumores grau II quanto grau III, o que está de acordo com as observações feitas por outros autores.

Os pacientes que apresentaram deleção de 19q na presente série tiveram uma sobrevida média um pouco mais prolongada do que aqueles sem a deleção (17,7 meses x 14 meses), porém como já mencionado, esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,372$). Nos glioblastomas, esta alteração tem sido observada mais frequentemente nos tumores secundários, que evoluem a partir de gliomas de baixo grau. Além disso, a perda de 19q já foi sugerida por BURTON et al. (2002) como um marcador de sobrevida longa em pacientes com glioblastomas. Apenas um glioblastoma desta série foi considerado secundário de acordo com as informações clínicas obtidas. Este tumor (GBO 7631) foi identificado como tendo um componente oligodendroglial e apresentou perda em 19q detectada tanto por FISH quanto pela QuMA. Recentemente, MILLER e PERRY (2007) observaram em um grupo glioblastomas com componente oligodendroglial que estes tumores apresentavam mais frequentemente perdas isoladas de 19q (21% de 58 tumores analisados), porém como a ocorrência desta alteração não foi muito comum, não pode ser utilizada como um marcador genético confiável para o estabelecimento do diagnóstico.

Após estas considerações, pode-se concluir que os glioblastomas com componente oligodendroglial possuem um perfil de alterações genéticas que mais se assemelha aos tumores astrocíticos do que aos oligodendrogliais. Os inúmeros estudos genéticos já realizados em gliomas, particularmente aqueles que tentam identificar as regiões de deleção no cromossomo 1p, têm verificado que o braço curto do cromossomo 1 pode apresentar dois padrões distintos de deleção. Um padrão seria

o de perdas completas do braço 1p, frequentemente associadas às perdas de 19q e classicamente descritas nos oligodendrogliomas. O outro padrão seria o de perdas parciais, frequentemente observadas nos tumores astrocíticos e não associadas com deleção de 19q. Enquanto o primeiro tipo de deleção tem se mostrado um fator preditivo de maior sobrevida nos tumores oligodendrogliais, o segundo tipo de deleção já foi inclusive sugerido como um indicativo de pior prognóstico (IUCHI et al. 2002; IDBAIH et al. 2005; BARBASHINA et al. 2005). O estudo de IDBAIH et al. (2005) mostrou que o padrão de perda parcial de 1p foi mais frequentemente observado nos astrocitomas, mas também esteve presente nos oligodendrogliomas. O grupo sem perda de 1p foi representado principalmente por tumores astrocíticos (70%). O padrão com associação entre deleção completa de 1p e 19q foi observado mais frequentemente nos oligodendrogliomas e em alguns oligoastrocitomas, sendo raramente observado em tumores astrocíticos puros (nenhum astrocitoma grau II ou III e somente em 2 entre 35 glioblastomas). Embora o desenho do presente estudo tenha proposto a utilização da análise quantitativa de microssatélites, o que permitiria verificar não apenas a presença de perdas em 1p e 19q, mas também identificar as regiões envolvidas nas deleções, o pequeno número de marcadores disponíveis somando-se ao fato de que nem todos os casos testados tiveram amplificação adequada de todos os *locus* estudados, tornou limitada a avaliação das regiões envolvidas nas deleções e, portanto, não é possível afirmar que a abordagem realizada tenha sido adequada para a distinção entre estes 2 tipos de deleção descritas no cromossomo 1. No entanto, foi observado que a perda em 1p, quando detectada através da análise quantitativa de microssatélites, envolveu poucos *loci*, em geral compreendidos na região 1p36. Apenas um glioblastoma convencional (GB 9653)

apresentou perdas envolvendo marcadores localizados nas regiões 1p36 e 1p34. Nenhum glioblastoma, seja com morfologia convencional ou com áreas oligodendrogliais, apresentou perda completa do braço 1p, diferente do que foi observado nos oligodendrogliomas testados, nos quais as deleções, quando identificadas por QuMA, mostraram envolvimento de um maior número de marcadores, em um dos casos revelando uma perda completa do braço 1p associada a perda também completa de 19q. A análise utilizando FISH também não permite distinguir entre os 2 padrões de deleção, já que somente a região 1p36 pôde ser avaliada. Esta limitação está presente em todos os estudos que utilizam FISH para a pesquisa de deleção em 1p e 19q. Se a abordagem utilizada não foi suficiente para distinguir entre os padrões de deleção nos braços cromossômicos (total x parcial), tampouco foi possível construir um mapa de deleção adequado para a identificação de regiões de deleção mínima, as quais poderiam conter genes supressores candidatos. O número de casos com deleções também foi pequeno, o que também não contribuiu para o mapeamento das regiões. Uma das questões que permanecem não respondidas em relação à perda de 1p/19q nos tumores oligodendrogliais é a questão dos genes supressores tumorais presentes nas regiões de deleção cuja perda está envolvida na patogênese destes tumores e que ainda não foram identificados, apesar de várias tentativas já realizadas (ALDAPE et al. 2007). Uma das abordagens mais frequentemente empregadas nestas tentativas consiste em identificar regiões de deleção mínima, que muitas vezes são mais facilmente observadas em tumores astrocíticos. A partir do refinamento destas regiões, os genes candidatos da região são submetidos à análise mutacional (HASHIMOTO et al. 2003; FELSBURG et al. 2004; BARBASHINA et al. 2005). Uma abordagem mais recente foi àquela proposta

por TEWS et al. (2006) que avaliou o perfil de expressão gênica de gliomas utilizando cDNA *microarray*, procurando especificamente por diferenças no padrão de expressão entre tumores com e sem perda de 1p/19q, numa tentativa de identificar novos genes candidatos mapeados em 1p e 19q. Uma característica importante na construção deste microarranjo foi o fato de cobrir todos os genes localizados nos segmentos cromossômicos previamente identificados como sendo as regiões de deleção comum nos gliomas. Oito genes foram identificados dentro de 1p36.13-p36.31 ou 19q13.2-q13.33, todos mostrando expressão significativamente menor em gliomas com perda de 1p/19q, quando comparados aos gliomas sem perda.

Uma outra avaliação realizada no presente estudo consistiu em verificar se haveria diferença entre o perfil das alterações de 1p/19q nas diferentes áreas do mesmo tumor, ou seja, diferenças entre os componentes astrocítico e oligodendroglioma nos tumores com morfologia ambígua representados nesta série pelos glioblastomas com componente oligodendroglioma. Tanto a QuMA por PCR em tempo real quanto a FISH foram empregados nesta avaliação. Para a análise quantitativa de microssatélites o DNA utilizado foi proveniente de ambos os componentes, manualmente dissecados e submetidos a reações de PCR em tempo real separadamente. Este método foi de difícil interpretação e, como explicado nos resultados, embora o componente astrocítico dos tumores tenha apresentado mais frequentemente deleções por este método, considerando apenas os tumores que se encaixaram rigorosamente no critério adotado de 2 *locus* deletados consecutivos, estes resultados não puderam ser valorizados devido a pouca frequência de tumores com deleções e por haver tumores que não tiveram todos os *locus* determinados. A correlação com os resultados de FISH foi considerada, portanto, fundamental para a

avaliação dos resultados. Na análise por hibridização *in situ* fluorescente, os tumores com componentes astrocítico e oligodendroglial tiveram estas áreas avaliadas separadamente, porém não foi observada diferença no status de 1p ou 19q entre os dois componentes. Embora se considerasse inicialmente que a avaliação dos componentes astrocítico e oligodendroglial em tumores com morfologia ambígua pudesse trazer contribuições para o entendimento da sua patogênese, dando suporte para a hipótese de que os glioblastomas com componente oligodendroglial evoluíam através de uma via genética/molecular específica (HE et al. 2001), esta hipótese não tem sido confirmada. Estudos que utilizaram microdissecção dos tecidos para avaliar os componentes astrocítico e oligodendroglial de gliomas mostraram que estes componentes parecem ser parte do mesmo processo neoplásico, ou seja, apresentam alterações genéticas semelhantes (WALKER et al. 2003). Questiona-se atualmente, inclusive, se a entidade oligoastrocitoma realmente existe do ponto de vista genético ou se representa apenas uma limitação da morfologia em classificar adequadamente estes tumores (ALDAPE et al. 2007).

Algumas considerações importantes devem também ser feitas em relação às metodologias utilizadas no estudo desta série de glioblastomas. Foi observado que nem sempre houve total coincidência entre os resultados obtidos com FISH e aqueles obtidos na análise quantitativa de microssatélites e critérios tiveram que estabelecidos para a determinação do *status* de 1p e 19q. Entre as considerações importantes nesta análise, deve-se notar que apenas um microssatélite utilizado para o cromossomo 1 neste estudo (D1S468) tem correspondência com a região marcada pela sonda de FISH LSI 1p36 (que cobre a região 1p36.32). Para esta região, a FISH foi, muito provavelmente, um método mais sensível que a análise de microssatélites,

já que a sonda de FISH tem cerca de 400Kb e cobre uma região muito maior que o microssatélite D1S468, que tem cerca de 150bp (tamanho médio dos microssatélites utilizados). As demais regiões de 1p estudadas com a QuMA não estão dentro da região compreendida pela sonda de FISH e, portanto, não há como esperar correspondência entre os métodos para estas outras regiões (1p36.22, 1p36.13, 1p36.12, 1p34.2, 1p31.1 e 1p12). Para a região 19q13.32, marcada pela sonda de FISH LSI 19q13, não havia um microssatélite correspondente, no entanto, foram usados microssatélites mapeados nas regiões 19q13.31(D19S408) e 19q13.33 (D19S867), que flanqueiam a região da sonda (19q13.32). Desta forma, os resultados da análise quantitativa de microssatélites tiveram que ser considerados como válidos sempre que a sonda de FISH não correspondia à região deletada em questão (mostrada pela análise quantitativa de microssatélites). Por outro lado, FISH foi um método mais sensível quando consideradas as regiões englobadas pelas sondas, independente do resultado da QuMA.

Como foi comentado, uma das limitações encontradas foi a dificuldade de avaliar os padrões de deleção no cromossomo 1, ou seja, se as deleções observadas eram deleções mais extensas do braço cromossômico ou deleções parciais, envolvendo apenas algumas regiões. Esta avaliação foi dependente principalmente da análise quantitativa de microssatélites, em que foram utilizados oligonucleotídeos mapeando várias regiões do cromossomo 1p, a maior parte deles localizados na região 1p36. A dificuldade de amplificação com alguns dos marcadores inicialmente testados, associada aos problemas na qualidade do DNA obtido, limitou bastante a interpretação dos resultados deste experimento e foi necessária uma estreita correlação com os resultados da hibridização *in situ* fluorescente. Sabe-se que a

obtenção de DNA genômico de boa qualidade a partir de blocos de parafina pode ser difícil de ser conseguida (WU et al. 2002). FARRAND et al (2002) observaram que um mínimo de 600 pg de DNA amplificável por PCR é necessário para a obtenção de resultados confiáveis em análises de LOH. Mesmo que as concentrações totais de DNA obtidas excedam este valor, nem sempre este DNA é amplificável, em especial nas amostras obtidas de blocos de parafina, que podem ser difíceis ou impossíveis de amplificar, particularmente com marcadores de microsatélites longos, o que pode tornar até cerca de 50% das amostras obtidas a partir de blocos de parafina impróprias para os estudos de LOH. Entre os fatores que podem ser responsáveis por problemas na amplificação destes espécimens estão a degradação e a quebra do DNA, seqüestro do DNA em complexos proteína - DNA, modificações químicas do DNA e a presença de inibidores da PCR contidos nos fixadores. A quantificação do DNA antes da PCR ajuda muito pouco nesta questão, pois não é capaz de detectar amostras com DNA degradado ou contendo inibidores da PCR. A amplificação prévia de um fragmento de cerca de 110 bp em diluições seriadas da amostra pode ajudar a determinar a quantidade de DNA amplificável. Nas amostras do presente estudo foi feita uma tentativa de minimizar este problema avaliando a qualidade do DNA através da amplificação de um fragmento do gene albumina (141 bp), porém mesmo assim ocorreram problemas em alguns casos como: falências completas das reações de PCR em tempo real, perdas alélicas aleatórias, reprodutibilidade pobre de resultados em alguns casos submetidos a repetições e falha em detectar uma parte dos casos com deleções, que foram posteriormente detectados através da FISH. EINERSON et al. (2005) compararam a eficácia das técnicas de PCR e FISH para detectar a translocação t(14;18) em tecidos provenientes de blocos de parafina e

observaram que ambos os testes estão sujeitos a falhas técnicas, porém este problema foi mais significativo com a PCR que, costuma ter um índice de sucesso em torno de 60 - 70%. A FISH também foi afetada pela idade avançada dos blocos no estudo de EINERSON et al. (2005), porém foi mais sensível que a PCR por ser capaz de detectar pontos de quebra fora da região coberta pela estratégia da PCR. Além da maior sensibilidade, outra vantagem da técnica de FISH é que está menos sujeita à contaminação por células normais, problema que pode não ser totalmente contornado pela dissecação do tecido nos casos de gliomas, pois estes tumores são muito infiltrativos (PERRY et al. 1997). No presente estudo, em uma parte dos glioblastomas (18,2%), representados predominantemente por casos mais antigos e, portanto, com blocos de parafina igualmente antigos, nenhuma das duas técnicas foi capaz de fornecer resultado. Esta interferência da idade dos blocos ficou especialmente evidente quando a hibridização foi realizada no *tissue microarray*, que permitiu visualizar hibridizações com sinais muito nítidos e sem falhas nos cilindros de tecido dos casos recentes ao lado de cilindros completamente sem evidência de sinal, provenientes dos blocos mais antigos. Além do melhor desempenho que a QuMA, a hibridização *in situ* fluorescente realizada nas condições propostas neste estudo mostrou ser uma técnica de execução relativamente simples e que pôde ser adaptada à rotina do laboratório de patologia. A pesquisa de deleções em 1p/19q nos gliomas pode, portanto, ser facilmente realizada através de FISH. Embora ainda com custo elevado, esta técnica pode fornecer dados importantes na avaliação do prognóstico e resposta à quimioterapia dos pacientes com oligodendrogliomas clássicos. Este dado já está amplamente descrito na literatura.

Finalmente, apesar das alterações nos cromossomos 1p e 19q não ter mostrado impacto no prognóstico nesta série de glioblastomas, incluindo aqueles com áreas de aspecto fenotípico oligodendrogial, marcadores genéticos e moleculares de prognóstico ainda são escassos nestes tumores e precisam ser mais bem caracterizados. Nenhuma alteração nos glioblastomas tem demonstrado até o momento ter o mesmo significado no prognóstico e na resposta ao tratamento que a codeleção de 1p/19 tem para os oligodendrogliomas. Algumas tentativas mais recentes de tratar os glioblastomas têm focalizado nas vias moleculares com alterações já identificadas nestes tumores, como a amplificação/superexpressão de EGFR, perda do gene supressor PTEN, mutações de TP53, etc. No entanto, é possível que devido ao grande número de alterações genéticas e moleculares presentes, a utilização de drogas dirigidas para um único alvo não altere a sobrevida, como foi observado com o inibidor de tirosina quinase erlotinib, que bloqueia a atividade tirosina quinase de EGFR. O melhor entendimento dos alvos moleculares, associado ao uso de uma combinação de agentes pode produzir um melhor resultado (FRIEDMAN e BIGNER 2005). Os estudos de expressão gênica, da mesma forma que vão ajudar a identificar os genes supressores responsáveis pelo melhor prognóstico associado às perdas de 1p/19q nos oligodendrogliomas, podem também ajudar a entender melhor a patogênese e identificar subgrupos com prognóstico distinto entre os glioblastomas. Recentemente, PHILLIPS et al. (2006), utilizando *microarrays* de DNA, identificaram nos astrocitomas grau III e IV subclasses moleculares com valor prognóstico, relacionando estas subclasses com a ativação de vias de sinalização celular e demonstrando que as subclasses lembram estágios na neurogênese. Uma das classes tumorais apresentando marcadores de linhagem

neuronal (assinatura *proneural*) mostrou maior sobrevida, enquanto as subclasses relacionadas a um prognóstico pobre exibiram marcadores de proliferação ou angiogênese e mesênquima. Além disso, a localização cromossômica dos genes que distinguiram as subclasses tumorais se relacionou com a alteração no número de cópias nestes cromossomos no estudo por CGH. Os tumores foram avaliados para alteração no número de cópias nos cromossomos 1, 7, 10 e 19. As perdas no cromossomo 10 e ganhos no cromossomo 7 mostraram associação com as assinaturas *Proliferativa* e *Mesenquimal*. Também houve associação significativa entre o número de cópias no cromossomo 19 e a assinatura tumoral, mas não foram observadas associações para o cromossomo 1. Avanços no entendimento das vias de sinalização que determinam o fenótipo astrocítico ou oligodendroglial também vão permitir uma classificação mais precisa dos gliomas, que atualmente ainda é baseada nos critérios morfológicos. DAI et al. (2005) recapitularam os dois principais tipos de gliomas humanos em camundongos através da ativação constitutiva de uma via de transdução de sinal particular em células que expressavam nestina in vivo. A ativação combinada das vias Akt e Ras induziu a formação de glioblastomas, enquanto a ativação da via de sinalização de PDGF nas mesmas células deu origem a oligodendrogliomas. Este estudo corrobora a idéia de que os fenótipos tumorais distintos são, portanto, determinados em grande parte por alterações moleculares em vias de sinalização diferentes e não por diferenças no tipo de célula de origem.

Em vista das limitações e dificuldades que são observadas na classificação dos gliomas, em particular naqueles com fenótipo híbrido oligo-astrocítico, é preciso identificar novos marcadores de diagnóstico e prognóstico, além de refinar os critérios de diagnóstico. A melhor compreensão da patogênese destes tumores vai

contribuir para o desenvolvimento de novas classificações que integrem os dados genéticos e moleculares com os dados clínicos e morfológicos. O presente estudo contribui para o entendimento do perfil genético dos glioblastomas, em especial aqueles com áreas de aspecto oligodendroglial, que apesar das características morfológicas híbridas possuem um perfil de alterações nos cromossomos 1 e 19 semelhante ao observado nos tumores com morfologia convencional.

6 CONCLUSÕES

- A frequência das alterações nos cromossomos 1p e 19 q nos glioblastomas com componente oligodendroglial foi semelhante à frequência observada nos glioblastomas convencionais. Os glioblastomas com componente oligodendroglial não demonstraram diferença no padrão das alterações genéticas estudadas (perda de 1p/19q) entre os componentes astrocítico e oligodendroglial.
- Nos glioblastomas com componente oligodendroglial, o padrão das deleções observadas nos cromossomos 1p e 19q através da análise quantitativa de microsatélites é mais condizente com o padrão encontrado nos tumores astrocíticos (deleções parciais), apesar das limitações do desenho do estudo na avaliação deste dado.
- A presença de deleção nos cromossomos 1p ou 19q não teve impacto na sobrevida ou correlação com a histologia, ou seja, os glioblastomas que apresentaram deleção de 1p e/ou 19q não têm um aspecto morfológico “mais oligodendroglial” do que os que não apresentaram deleção. A codeleção de 1p/19q só foi observada em 1 tumor, o que prejudica a análise do seu significado nesta série. Os pacientes mais jovens e aqueles submetidos a tratamento adjuvante com radioterapia e quimioterapia tiveram maior sobrevida. Este dado corrobora o que já foi observado em outras séries. As

covariáveis gênero, extensão da ressecção e localização do tumor não tiveram impacto na sobrevida, neste estudo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alaminos M, Davalos V, Ropero S, et al. EMP3, a myelin-related gene located in the critical 19q13.3 region, is epigenetically silenced and exhibits features of a candidate tumor suppressor in glioma and neuroblastoma. **Cancer Res** 2005; 65:2565-71.

Aldape K, Ginzinger DG, Godfrey TE. Real-time quantitative polymerase chain reaction: a potential tool for genetic analysis in neuropathology. **Brain Pathol** 2002; 12:54-66.

Aldape K, Burger PC, Perry A. Clinicopathologic aspects of 1p/19q loss and the diagnosis of oligodendroglioma. **Arch Pathol Lab Med** 2007; 131:242-51.

Barbashina V, Salazar P, Holland EC, Rosenblum MK, Ladanyi M. Allelic losses at 1p36 and 19q13 in gliomas: correlation with histologic classification, definition of a 150-kb minimal deleted region on 1p36, and evaluation of CAMTA1 as a candidate tumor suppressor gene. **Clin Cancer Res** 2005; 11:1119-28.

Barker FG 2nd, Chang SM, Larson DA, et al. Age and radiation response in glioblastoma multiforme. **Neurosurgery** 2001; 49:1288-97; discussion 1297-8.

Bruner JM, Inouye L, Fuller GN, Langford LA. Diagnostic discrepancies and their clinical impact in a neuropathology referral practice. **Cancer** 1997; 79:796-803.

Burton EC, Lamborn KR, Feuerstein BG, et al. Genetic aberrations defined by comparative genomic hybridization distinguish long-term from typical survivors of glioblastoma. **Cancer Res** 2002; 62:6205-10.

Cairncross JG, Ueki K, Zlatescu MC, et al. Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. **J Natl Cancer Inst** 1998; 90:1473-9.

Caskey LS, Fuller GN, Bruner JM, et al. Toward a molecular classification of the gliomas: histopathology, molecular genetics, and gene expression profiling. **Histol Histopathol** 2000; 15:971-81.

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

Dai C, Lyustikman Y, Shih A, et al. The characteristics of astrocytomas and oligodendrogliomas are caused by two distinct and interchangeable signaling formats. **Neoplasia** 2005; 7:397-406.

Daumas-Duport C, Beuvon F, Varlet P, Fallet-Bianco C. Gliomes: classifications de l'OMS et de l'Hôpital Sainte Anne. **Ann Pathol** 2000; 20:413-428.

DeAngelis LM. Chemotherapy for brain tumors-a new beginning. **N Engl J Med** 2005; 352:1036-8.

Dichamp C, Taillibert S, Aguirre-Cruz L, et al. Loss of 14q chromosome in oligodendroglial and astrocytic tumors. **J Neurooncol** 2004; 67:281-5.

Dong Z, Pang JS, Ng MH, Poon WS, Zhou L, Ng HK. Identification of two contiguous minimally deleted regions on chromosome 1p36.31-p36.32 in oligodendroglial tumours. **Br J Cancer** 2004; 91:1105-11.

Donahue B, Scott CB, Nelson JS, et al. Influence of an oligodendroglial component on the survival of patients with anaplastic astrocytomas: a report of Radiation Therapy Oncology Group 83-02. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 1997; 38:911-4.

Einerson RR, Kurtin PJ, Dayharsh GA, Kimlinger TK, Remstein ED. FISH is superior to PCR in detecting t(14;18)(q32;q21)-IgH/bcl-2 in follicular lymphoma using paraffin-embedded tissue samples. **Am J Clin Pathol** 2005; 124:421-9.

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

Fan X, Salford LG, Widegren B. Glioma stem cells: Evidence and limitation. **Semin Cancer Biol** 2007; 17:214-218.

Farrand K, Jovanovic L, Delahunt B, McIver B, Hay ID, Eberhardt NL, Grebe SK. Loss of heterozygosity studies revisited: prior quantification of the amplifiable DNA content of archival samples improves efficiency and reliability. **J Mol Diagn** 2002; 4(3):150-8.

Felsberg J, Erkwow A, Sabel MC, et al. Oligodendroglial tumors: refinement of candidate regions on chromosome arm 1p and correlation of 1p/19q status with survival. **Brain Pathol** 2004; 14:121-30.

Friedman HS, Bigner DD. Glioblastoma multiforme and the epidermal growth factor receptor. **N Engl J Med** 2005; 353:1997-9.

Fuller CE, Wang H, Zhang W, Fuller GN, Perry A. High-throughput molecular profiling of high-grade astrocytomas: the utility of fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays (TMA-FISH). **J Neuropathol Exp Neurol** 2002; 61:1078-84.

Fuller CE, Perry A. Fluorescence in situ hybridization (FISH) in diagnostic and investigative neuropathology. **Brain Pathol** 2002; 12:67-86.

Fuller CE, Schmidt RE, Roth KA, et al. Clinical utility of fluorescence in situ hybridization (FISH) in morphologically ambiguous gliomas with hybrid oligodendroglial/astrocytic features. **J Neuropathol Exp Neurol** 2003; 62:1118-28.

Ginzinger DG, Godfrey TE, Nigro J, et al. Measurement of DNA copy number at microsatellite loci using quantitative PCR analysis. **Cancer Res** 2000; 60:5405-9.

Gonzales M, Dale S, Susman M, Mills J. Quantitation of chromosome 1p and 19q deletions in glial tumours by interphase FISH on formalin-fixed paraffin-embedded tissue. **J Clin Neurosci** 2006; 13:96-101.

Gupta M, Djalilvand A, Brat DJ. Clarifying the diffuse gliomas: an update on the morphologic features and markers that discriminate oligodendroglioma from astrocytoma. **Am J Clin Pathol** 2005; 124:755-68.

Hartmann C, Johnk L, Kitange G, et al. Transcript map of the 3.7-Mb D19S112-D19S246 candidate tumor suppressor region on the long arm of chromosome 19. **Cancer Res** 2002; 62:4100-8.

Hashimoto N, Murakami M, Takahashi Y, Fujimoto M, Inazawa J, Mineura K. Correlation between genetic alteration and long-term clinical outcome of patients with oligodendroglial tumors, with identification of a consistent region of deletion on chromosome arm 1p. **Cancer** 2003; 97:2254-61.

He J, Mokhtari K, Sanson M, et al. Glioblastomas with an oligodendroglial component: a pathological and molecular study. **J Neuropathol Exp Neurol** 2001; 60:863-71.

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

Hilton DA, Melling C. Genetic markers in the assessment of intrinsic brain tumors. **Curr Diag Pathol** 2004; 10:83-92.

Hilton DA, Penney M, Pobereskin L, Sanders H, Love S. Histological indicators of prognosis in glioblastomas: retinoblastoma protein expression and oligodendroglial differentiation indicate improved survival. **Histopathology** 2004; 44:555-60.

Homma T, Fukushima T, Vaccarella S, et al. Correlation among pathology, genotype, and patient outcomes in glioblastoma. **J Neuropathol Exp Neurol** 2006; 65:846-54.

Husemann K, Wolter M, Buschges R, Bostrom J, Sabel M, Reifenberger G. Identification of two distinct deleted regions on the short arm of chromosome 1 and rare mutation of the CDKN2C gene from 1p32 in oligodendroglial tumors. **J Neuropathol Exp Neurol** 1999; 58:1041-50.

Idbaih A, Marie Y, Pierron G, et al. Two types of chromosome 1p losses with opposite significance in gliomas. **Ann Neurol** 2005; 58:483-7.

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

Ino Y, Betensky RA, Zlatescu MC, et al. Molecular subtypes of anaplastic oligodendroglioma: implications for patient management at diagnosis. **Clin Cancer Res** 2001; 7:839-45.

Ironside JW, Moss TH, Louis DN, Lowe JS, Weller RO. **Diagnostic pathology of nervous system tumours**. London: Churchill Livingstone; 2002. Astrocytic tumours; p.53-120.

Iuchi T, Namba H, Iwadata Y, et al. Identification of the small interstitial deletion at chromosome band 1p34-p35 and its association with poor outcome in oligodendroglial tumors. **Genes Chromosomes Cancer** 2002; 35:170-5.

Johnson MD, Vnencak-Jones CL, Toms SA, Moots PM, Weil R. Allelic losses in oligodendroglial and oligodendroglioma-like neoplasms: analysis using microsatellite repeats and polymerase chain reaction. **Arch Pathol Lab Med** 2003; 127:1573-9.

Kanner AA, Staugaitis SM, Castilla EA, et al. The impact of genotype on outcome in oligodendroglioma: validation of the loss of chromosome arm 1p as an important factor in clinical decision making. **J Neurosurg** 2006; 104:542-50.

Kitange GJ, Templeton KL, Jenkins RB. Recent advances in the molecular genetics of primary gliomas. **Curr Opin Oncol** 2003; 15:197-203.

Kleihues P, Burger PC, Collins VP, Newcomb EW, Ohgaki H, Cavenee WK. Glioblastoma. In: Kleihues P, Cavenee WK, editors. **Pathology and genetics tumours of the nervous system**. Lyon: IARC Press; 2000. p.29-39.

Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, et al. The WHO classification of tumors of the nervous system. **J Neuropathol Exp Neurol** 2002; 61:215-25.

Kleinbaum DG, Klein M. **Survival analysis: a self-learning text**. 2nd ed. New York: Springer; 1997.

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

Kraus JA, Lamszus K, Glesmann N, et al. Molecular genetic alterations in glioblastomas with oligodendroglial component. **Acta Neuropathol (Berl)** 2001; 101:311-20.

Laws ER, Parney IF, Huang W, et al. Survival following surgery and prognostic factors for recently diagnosed malignant glioma: data from the Glioma Outcomes Project. **J Neurosurg** 2003; 99:467-73.

Liang Y, Diehn M, Watson N, et al. Gene expression profiling reveals molecularly and clinically distinct subtypes of glioblastoma multiforme. **Proc Natl Acad Sci USA** 2005; 102:5814-9.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta CT) method. **Methods** 2001; 25:402-8.

Ligon KL, Alberta JA, Kho AT, et al. The oligodendroglial lineage marker OLIG2 is universally expressed in diffuse gliomas. **J Neuropathol Exp Neurol** 2004; 63:499-509.

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

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK. **WHO Classification of tumours of the nervous system**. 4th ed. Lyon: IARC Press; 2007.

Mathieu D, Fortin D. The role of chemotherapy in the treatment of malignant astrocytomas. **Can J Neurol Sci** 2006; 33:127-40.

McDonald JM, See SJ, Tremont IW, et al. The prognostic impact of histology and 1p/19q status in anaplastic oligodendroglial tumors. **Cancer** 2005; 104:1468-77.

McLendon RE, Herndon JE 2nd, West B, et al. Survival analysis of presumptive prognostic markers among oligodendrogliomas. **Cancer** 2005; 104:1693-9.

Mee RW. Simultaneous tolerance intervals for normal populations with common variance. **Technometrics** 1990; 32:83-92.

Miller CR, Perry A. Glioblastoma: morphologic and molecular genetic diversity. **Arch Pathol Lab Med** 2007; 131:397-406.

Mocellin S, Rossi CR, Pilati P, Nitti D, Marincola FM. Quantitative real-time PCR: a powerful ally in cancer research. **Trends Mol Med** 2003; 9:189-95.

Myal Y, Del Bigio MR, Rhodes RH. Age-related differences in 1p and 19q deletions in oligodendrogliomas. **BMC Clin Pathol** 2003; 3:6.

Nakamura M, Yang F, Fujisawa H, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Loss of heterozygosity on chromosome 19 in secondary glioblastomas. **J Neuropathol Exp Neurol** 2000; 59:539-43.

Nigro JM, Takahashi MA, Ginzinger DG, et al. Detection of 1p and 19q loss in oligodendroglioma by quantitative microsatellite analysis, a real-time quantitative polymerase chain reaction assay. **Am J Pathol** 2001; 158:1253-62.

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

Okamoto Y, Di Patre PL, Burkhard C, et al. Population-based study on incidence, survival rates, and genetic alterations of low-grade diffuse astrocytomas and oligodendrogliomas. **Acta Neuropathol (Berl)** 2004; 108:49-56.

Perry A, Nobori T, Ru N, et al. Detection of p16 gene deletions in gliomas: a comparison of fluorescence in situ hybridization (FISH) versus quantitative PCR. **J Neuropathol Exp Neurol** 1997; 56:999-1008.

Perry A, Fuller CE, Banerjee R, Brat DJ, Scheithauer BW. Ancillary FISH analysis for 1p and 19q status: preliminary observations in 287 gliomas and oligodendroglioma mimics. **Front Biosci** 2003; 8:a1-9.

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

Pinto LW, Chimelli L. Oligodendroglial and neuronal component in glioblastomas: possible relation with prognosis **Arq Neuropsiquiatr** 2004; 62:1074-8.

Prins J, McCormack D, Michelson D, Horrell K. **Tolerance intervals for a normal distribution. NIST/SEMATECH e-Handbook of Statistical Methods.** Section 7.2.6.3. Available from: <URL:<http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/>> [2007 set 03].

Qian J, Bostwick DG, Takahashi S, et al. Comparison of fluorescence in situ hybridization analysis of isolated nuclei and routine histological sections from paraffin-embedded prostatic adenocarcinoma specimens. **Am J Pathol** 1996; 149:1193-9.

Reifenberger J, Reifenberger G, Liu L, James CD, Wechsler W, Collins VP. Molecular genetic analysis of oligodendroglial tumors shows preferential allelic deletions on 19q and 1p. **Am J Pathol** 1994; 145:1175-90.

Reifenberger G, Collins VP. Pathology and molecular genetics of astrocytic gliomas. **J Mol Med** 2004; 82:656-70.

Rich JN, Hans C, Jones B, et al. Gene expression profiling and genetic markers in glioblastoma survival. **Cancer Res.** 2005; 65:4051-8.

Riemenschneider MJ, Koy TH, Reifenberger G. Expression of oligodendrocyte lineage genes in oligodendroglial and astrocytic gliomas. **Acta Neuropathol (Berl)** 2004; 107:277-82.

Scheie D, Andresen PA, Cvancarova M, et al. Fluorescence in situ hybridization (FISH) on touch preparations: a reliable method for detecting loss of heterozygosity at 1p and 19q in oligodendroglial tumors. **Am J Surg Pathol** 2006; 30:828-37.

Schmidt MC, Antweiler S, Urban N, et al. Impact of genotype and morphology on the prognosis of glioblastoma. **J Neuropathol Exp Neurol** 2002; 61:321-8.

Scott JN, Rewcastle NB, Brasher PM, et al. Long-term glioblastoma multiforme survivors: a population-based study. **Can J Neurol Sci** 1998; 25:197-201.

Shih HA, Betensky RA, Dorfman MV, Louis DN, Loeffler JS, Batchelor TT. Genetic analyses for predictors of radiation response in glioblastoma. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2005; 63:704-10.

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

Smith JS, Perry A, Borell TJ, et al. Alterations of chromosome arms 1p and 19q as predictors of survival in oligodendrogliomas, astrocytomas, and mixed oligoastrocytomas. **J Clin Oncol** 2000; 18:636-45.

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.

Tews B, Felsberg J, Hartmann C, et al. Identification of novel oligodendroglioma-associated candidate tumor suppressor genes in 1p36 and 19q13 using microarray-based expression profiling. **Int J Cancer** 2006; 119:792-800.

Ushio Y, Kochi M, Hamada J, Kai Y, Nakamura H. Effect of surgical removal on survival and quality of life in patients with supratentorial glioblastoma. **Neurol Med Chir (Tokyo)** 2005; 45:454-60; discussion 460-1.

Van den Bent MJ, Carpentier AF, Brandes AA, et al. Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine improves progression-free survival but not overall survival in newly diagnosed anaplastic oligodendrogliomas and oligoastrocytomas: a randomized European Organization for Research and Treatment of Cancer phase III trial. **J Clin Oncol** 2006; 24:2715-22.

Von Deimling A, Louis DN, von Ammon K, Petersen I, Wiestler OD, Seizinger BR. Evidence for a tumor suppressor gene on chromosome 19q associated with human astrocytomas, oligodendrogliomas, and mixed gliomas. **Cancer Res** 1992; 52:4277-9.

Walker C, du Plessis DG, Joyce KA, et al. Phenotype versus genotype in gliomas displaying inter- or intratumoral histological heterogeneity. **Clin Cancer Res** 2003; 9:4841-51.

Wu L, Patten N, Yamashiro CT, Chui B. Extraction and amplification of DNA from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. **Appl Immunohistochem Mol Morphol** 2002; 10:269-74.

ANEXOS

Anexo 1 – Características dos pacientes incluídos no estudo.

Paciente	idade	gênero	Localização	Ressecção	RT	QT	Sobrevida (meses)	Histologia	Deleção 1p	Deleção 19q
158561	47	F	combinado	Sbt	N	N	3,7	GB	não	não
159421	39	M	combinado		S	N	2,5	GBO	ND	ND
174263	58	F	T	Sbt	N	N	11,2	GBO	não	não
176895	65	M	P	Sbt	S	N	3,2	GB	ND	ND
184868	59	M	F	Sbt	N	N	1,4	GBO	ND	ND
185013	40	M	F	Total	S	N	1,4	GB	não	ND
186766	65	F	combinado	Total	S	N	18,9	GB	não	ND
223620	41	M	F	Total	N	N	8,4	GB	ND	ND
226925	73	F	F	Sbt	N	N	0,4	GB	ND	ND
236627	32	F	combinado	Sbt	N	N	4,3	GB	ND	ND
249096	62	M	combinado	Sbt	N	N	3,9	GB	ND	ND
253062	33	M	T	Sbt	S	N	8,7	GB	ND	ND
258244	38	F	P	Sbt	S	N	9,1	GBO	não	sim
261870	53	F	combinado	Sbt	S	N	12,7	GB	ND	ND
267621	62	F	F		S	N	13,5	GBO	não	ND
273859	53	M	combinado	Sbt	S	N	13,4	GBO	não	não
274824	56	M	F	Total	N	N	0,4	GB	ND	ND
281033	59	F	P	Total	S	N	3,5	GBO	ND	ND
284094	44	M	P	Total	N	N	0,7	GB	não	não
284877	60	M	combinado	Sbt	S	N	3,9	GB	não	não
285072	54	M	combinado	Sbt	S	N	21,8	GB	não	não
299532	59	M	combinado	Total	S	N	6,7	GB	não	não
301859	62	F	combinado	Sbt	N	N	0,4	GBO	não	não
315590	72	F	F	Sbt	S	N	10,8	GB	não	não
317337	71	M	O	Sbt	S	N	10,9	GB	sim	não
317836	49	M	combinado	Sbt	S	N	20,0	GB	não	sim
320992	66	F	T	Total	S	N	14,3	GB	ND	ND
322619	62	M	combinado	Sbt	N	N	3,3	GB	não	não
323284	44	M	O	Total	S	S	29,0	GB	não	não
325356	64	M	F	Total	S	N	10,9	GBO	sim	sim
332629	65	F	T	Sbt	N	N	0,2	GB	não	não

Paciente	idade	gênero	Localização	Ressecção	RT	QT	Sobrevida (meses)	Histologia	Deleção 1p	Deleção 19q
332981	71	F	combinado	Sbt	S	N	12,7	GB	ND	não
338397	67	F	F	Total	S	N	12,7	GB	não	não
175233	51	M	P	Sbt	N	N	11,5	GB	não	não
692	50	M	T	Total	S	S	11,5	GBO	não	não
789	49	F	T	Total	S	N	7,0	GB	não	não
838	54	F	F	Sbt	S	N	15,8	GB	não	não
3171	38	F	combinado	Sbt	S	N	17,2	GB	não	não
4409	68	F	combinado	Total	S	N	12,2	GB	não	não
4780	72	F	combinado	Total	S	N	17,4	GBO	sim	não
4412	63	M	combinado	Sbt	S	N	7,9	GB	não	sim
7122	68	F	combinado	Total	S	N	9,3	GB	não	não
7360	34	M	P	Total	S	N	25,8	GB	não	não
7501	59	F	combinado	Sbt	S	N	8,5	GB	não	não
7645	46	M	T	Sbt	S	S	16,4	GB	não	não
9057	52	M	T	Total	S	N	12,9	GB	não	não
526	72	M	P	Total	S	N	7,6	GB	não	sim
891	62	M	P	Total	S	N	0,5	GB	não	não
263	10	F	combinado	Sbt	S	N	20,0	GB	não	não
4045	76	M	combinado	Total	S	N	19,2	GB	não	não
9756	69	F	T	Sbt	S	N	56,1	GB	não	não
9856	52	M	F	Total	S	N	17,3	GB	não	não
1252	46	M	F	Total	S	N	11,2	GB	não	não
4222	40	M	O	Total	N	N	25,3	GBO	não	não
4249	81	M	combinado	Sbt	S	N	6,2	GBO	não	não
4689	57	M	F	Total	S	S	32,5	GB	não	não
6206	57	M	combinado	Total	S	N	18,6	GB	não	não
9318	42	M	F	Total	S	N	41,8	GB	sim	não
9591	11	F	combinado	Sbt	S	N	5,7	GB	não	não
9925	71	M	combinado	Sbt	S	N	4,8	GB	não	não
784	6	F	combinado	Total	S	N	34,6	GB	não	não
1868	60	M	O		S	N	16,6	GB	não	não
5920	37	M	T	Total	S	S	23,5	GB	não	sim

Paciente	idade	gênero	Localização	Ressecção	RT	QT	Sobrevida (meses)	Histologia	Deleção 1p	Deleção 19q
8075	60	F	F	Total	S	S	18,9	GB	não	não
9008	50	M	T	Sbt	N	N	0,2	GB	não	não
9441	78	M	combinado	Total	S	N	20,8	GB	não	não
10599	43	M	combinado	Total	S	S	27,6	GBO	não	sim
1077	63	F	T	Sbt	S	N	11,7	GB	sim	não
2040	68	F	F	Total	S	S	8,2	GB	não	não
5585	53	F	T	Total	S	N	17,7	GB	não	não
5775	68	M	F	Sbt	S	N	12,7	GB	não	não
5814	70	M	combinado	Total	S	S	18,6	GB	não	não
6062	21	M	combinado	Total	S	N	5,9	GBO	sim	não
6632	69	M	combinado	Total	S	N	15,3	GB	não	sim
7631	31	M	T	Sbt	S	N	21,5	GBO	não	sim
592	49	F	P	Sbt	S	N	3,5	GB	não	não
1768	57	M	combinado	Total	S	N	5,7	GB	não	não
3015	66	F	combinado	Total	S	N	8,6	GB	não	não
4277	52	F	F	Sbt	S	N	7,0	GB	não	não
5908	57	M	F	Sbt	S	S	8,2	GBO	não	não
9653	44	M	P	Total	N	N	1,3	GB	sim	não
3366	44	F	combinado	Sbt	S	S	31,0	GBO	não	não
10271	44	M	combinado			N	5,0	GBO	não	não
1392	58	M	T		S	N	14,5	GBO	não	não
15284	58	M	T		S	S	22,2	GBO	não	não
19260	42	F	combinado			N	22,1	GBO	não	não
4835	70	M	combinado	Sbt	S	N	5,2	GBO	não	não
279	51	F	O	Total	S	N	21,2	GBO	sim	não

Legenda:

M – masculino, **F** – feminino, **Sbt** – ressecção subtotal, **F** – frontal, **P** – parietal, **T** – temporal, **O** – Occipital

GB – glioblastoma, **GBO** – glioblastoma com componente oligodendrogial, **ND** – não determinado.

Anexo 2 – Quantificação do DNA.

Amostra	Quantidade (ug)	Amostra	Quantidade (ug)
C1868	45,3	GBO159421 (G)	29.73
O340291	33,24	GBO159421(O)	35.13
O11198	55,44	GBO273589 (G)	6.63
O8553	18,18	GBO273589 (O)	46.83
C1768	14,49	GBO4780 (G)	10.92
C784	2,85	GBO4780 (O)	78.9
C4412	3,27	GBO4249 (G)	11.67
C1077	8,82	GBO4249 (O)	19.17
O5573	30,66	GBO281033 (G)	24.0
O487	19,17	GBO281033 (O)	25.32
C1795 (1)	17,76	GBO174263 (G)	21.12
C1795 (2)	13,17	GBO174263 (O)	39.9
C789	17,28	GBO692 (G)	19.74
GB592	6,15	GBO692 (O)	24.42
GB5920	16,44	GBO184868 (G)	22.8
GB2040	34,23	GBO184868 (O)	31.14
GB5585	22,53	GBO6062 (G)	23.22
GB6632	30,78	GBO6062 (O)	11.82
GB4277	17,16	GBO10271	2.85
GB1252	28,89	GBO3366	40.23
GB9591	29,1	GBO279 (G)	41.91
GB9653	54,12	GBO279 (O)	30.18
GB 5814	43,11	GBO7781 (G)	35.82
GBO301859 (O)	15,39	GBO7781 (O)	29.25
GBO301859 (G)	5,25	GBO19260 (G)	11.34
GBO4222 (O)	25,74	GBO19260 (O)	22.17
GBO4222 (G)	6,15	GBO1392 (G)	7.71
GBO7631 (O)	17,01	GBO1392 (O)	15.21
GBO7631 (G)	12,96	GBO4835 (G)	5.82
GBO5908	3,48	GBO4835 (O)	18.9
GBO325356	37,59	GBO15284 (G)	14.55
GBO10599 (G)	4,14	GBO15284 (O)	59.7
GBO10599 (O)	16,17	GBO267621 (G)	7,41
GBO258244 (G)	7,41	GBO267621(O)	4,53
GBO258244 (O)	11,67		

C- controle, O- oligodendroglioma, GB – glioblastoma, GBO glioblastoma com componente

oligodendroglioma

Anexo 3 – Eficiência dos oligonucleotídeos.

Oligonucleotídeo	Slope	Eficiência (%)
D19S408	-3.1	110
D19S418	-3.1	110
D19S424	-3.2	105
D19S867	-3.09	110
D1S199	-3.5	93
D1S224	-3.27	102
D1S2620	-3.09	110
D1S2736	-3.9	97
D1S2892	-3.2	105
D1S468	-3.06	110
D1S514	-3.28	101
D2S385	-3.3	100
D3S1554	-3.27	102
D5S643	-3.01	110
D8S1800	-3.21	104
D12S1669	-3.35	98
D21S1904	-3.4	96

Anexo 4 - Média e desvio padrão (SD) para todos os *loci* obtidos com os controles (normais).

DDCT	C1077	C4412	C784	C1795 2	C1768	C789	C1868	C044631	MEDIA	SD
D1S468	1.53	2.62	2.14	1.37	2.24	2.26	1.86	2.14	2.02	0.411096
D1S2736	1.55	1.69	2.02	1.81	2.11	2.85	2.04	2.33	2.05	0.407115
D1S199	1.85	2.31	2.33	1.22	2.61	2.32	1.77	1.34	1.96875	0.505836
D1S2620	2.31	1.93	2.14	1.45	1.89	2.53	1.71	1.72	1.96	0.35169
D1S2892	2.86	2.26	2.06	1.25	1.66	2.23	1.79	1.9	2.00125	0.477477
D1S224	2.03	2.16	1.34	1.77	2.15	2.4	1.55	2	1.925	0.349489
D1S514	2.18	2.38	2.01	2.25	1.96	1.94	2.08	2.24	2.13	0.157389
D19S418	2.45	2.51	1.59	1.36	1.83	2.34	1.8	1.54	1.9275	0.44631
D19S867	2.73	2.54	1.51	1.82	2	2.06	2.07	1.69	2.0525	0.410496
D19S408	1.95	3.14	1.55	1.71	1.74	1.95	2.21	1.95	2.025	0.492863
D19S424	1.35	1.83	2.68	2.22	1.76	2.03	1.82	2.33	2.0025	0.407422

2.005682	0.401562
média	SD

Anexo 5 – Resultados da determinação do número de cópias dos loci pela análise quantitativa de microssatélites nas amostras de oligodendrogliomas, glioblastomas convencionais e glioblastomas com componente oligodendrogliol.

[illegible]

	1p36				1p34	1p31	1p12	19p13	19q13		
CASO	D1S468	D1S2736	D1S199	D1S2620	D1S2892	D1S224	D1S514	D19S424	D19S408	D19S867	D19S418
GB07631 (G)	1.62	1.98	1.11	1.32	1.34	1.39	1.61	1.58	1.26	1.13	0.77
GB07631 (O)	1.34	2.08	1	1.25	1.31	1.26	2.4	1.78	0.97	0.89	0.47
GB010599 (G)	0.95	4.19	2.65	4.56	2.52	1.39	2.28	4.31	2.87	0.7	0.93
GB010599 (O)	2.8		1.82	4.42	1.64	1.68	1.57			1.52	4.47
GB015284 (G)		1.36	1.86	1.91	1.97	1.93	1.06		1.26	1.65	2.63
GB015284 (O)	0.94	2.06	3.83	3.94	5.43	3.07	2.97	1.71	2.58	4.7	4.66
GB0159421(G)											
GB0159421(O)											
GB0174263(G)		2.52	8.58	3.57	7.12	3.36		0.82	1.69	4.76	9.13
GB0174263(O)			6.55	3.56	5.34	3.15	1.49	0.74	1.22	5.95	9.79
GB0258244(G)	1.47	0.52	2.06	2.41		2.27	0.63	1.51	1.41	0.29	0.63
GB0258244(O)			8.85	3.47	8.61	1.63	3.25			5.41	3.92
GB0267621(G)			2.04	1.91	1.2	1.69					0.48
GB0267621(O)											
GB0273589(G)	0.86	1.1	5.98	3.71	6.28	2.52	0.8		1.76	6.83	7.87
GB0273589(O)	0.8	NI	5.53	4.39	9.86	4.72	1.53	2.05	4.06	13.01	15.4
GB0301859(G)		2.53	5.16	5.3	6.95	1.94			0.47	3.12	6.3
GB0301859(O)		1.75	4.52	3.19	4.09	2.7		0.94	2.37	3.84	4.53
GB0325356		2.75	3.83	2.58	3.3	1.69	1.05		1.61	1.61	4.11
GB06062 (G)		2.29	2.55	2.95		1.44	4.07	4.33	6.68	2.55	2.09
GB06062 (O)				2.9	3.84	1.53	4.1	2.72	3.27	1.29	1.59
GB0184868(G)											
GB0184868(O)											
GB010271	4.2	3.54	5.1	6.36	8.12	4.59	4.26	5.11	5.9	6.93	2.79
GB0279(G)		1.07	3.83	2.55	4.96	2.23	2.03	1.59	3.77	5.53	5.82
GB0279(O)		0.75	5.72	3.35	5.3	2.39	1.33	1.9	2.57	9.27	8.23
GB03366	0.98	4.42	2.84	3.41	5.02	2.69	2.42	1.66	1.49	1.75	2
GB019260 (G)	1.27	1.27	4.46	2.66	1.5	1.33	3.7	0.5	1.67	1.86	3.22
GB019260 (O)	2.13	2.39	4.7	5.01	4.29	3.48	3.6	2.89	2.97	3.46	2.87

	1p36				1p34	1p31	1p12	19p13	19q13		
CASO	D1S468	D1S2736	D1S199	D1S2620	D1S2892	D1S224	D1S514	D19S424	D19S408	D19S867	D19S418
GB01392 (G)			1.03	1.31	2.92			3.54	3.62		1.49
GB01392 (O)			7.47	3.54	7.76						
GB0281033(G)											
GB0281033(O)											

Legenda:

Caixa cinza – representa deleção (número de cópias < 1.1, quando observado em pelo menos 2 marcadores consecutivos).

Caixa com tracejado – casos que apresentaram deleção em um locus e não foram determinados no locus adjacente.

Caixa vazia – *loci* não determinados

Abreviaturas: **O** – Oligodendroglioma, **GB** – glioblastoma, **GB0** - glioblastoma com componente oligodendroglioma.

(G) – componente astrocítico, **(O)** – componente oligodendroglioma.

Anexo 6 – Resultados da hibridização *in situ* fluorescente (*ratio* entre os braços p e q menor ou igual a 0,86 foi considerado deleção, tanto para o cromossomo 1 quanto para o cromossomo 19).

AMOSTRA	1p36	1q25	Nº núcleos	19q13	19p13	Nº núcleos	RATIO	
O 5573	118	189	100	135	218	108	0,63	0,62
O 340291	134	225	113	127	234	115	0,59	0,54
O 487	431	562	242	167	236	102	0,76	0,7
O 8553	129	212	106	120	210	104	0,608	0,57
O 11198	105	179	101	111	179	101	0,58	0,62
GB 236627								
GB 158561	207	209	104	72	75	38	0,99	0,96
GB 176895								
GB 175233								
GB 185013	194	200	100				0,97	
GB 186766	220	226	113				0,97	
GB 226925								
GB 223620								
GB 249096								
GB 253062								
GB 261870								
GB 274824								
GB 284094	228	229	115	117	118	57	0,995	0,99
GB 284877	196	184	100	171	176	87	1,06	0,97
GB 285072	232	232	116	214	202	101	1	1,05
GB 299532	235	233	127	226	223	113	1,008	1,01
GB 315590	208	212	114	199	202	103	0,98	0,985
GB 00526	222	240	124	210	248	121	0,925	0,84
GB 317337	130	204	102	211	214	109	0,63	0,98
GB 320992								
GB 322619	201	198	101	210	215	105	1,01	0,97
GB 9756	195	199	102	208	204	109	0,97	1,01
GB 5775	195	201	100	204	203	100	0,97	1
GB 9925	213	216	110	225	228	112	0,98	0,986
GB 332629	280	274	142	197	198	102	1,02	0,99
GB 332981				199	205	106		0,97
GB 338397	193	194	100	254	251	126	0,99	1,01
GB 838	222	233	115	223	230	116	0,95	0,97
GB 1077	123	178	90	201	207	105	0,69	0,97
GB 789	220	226	112	196	200	100	0,97	0,98
GB 323284	197	197	100	206	209	104	1	0,98
GB 04409	207	214	107	237	242	118	0,96	0,98
GB 03171	217	224	112	214	215	109	0,96	0,995
GB 04412	199	196	102	179	265	124	1,015	0,67
GB 7122	193	202	104	221	222	110	0,95	0,995
GB 7360	205	206	109	200	198	100	0,995	1,01

AMOSTRA	1p36	1q25	Nº núcleos	19q13	19p13	Nº núcleos	RATIO	
GB 7501	202	214	109	201	199	100	0,94	1,01
GB 7645	194	195	101	195	196	100	0,995	0,99
GB 9057	154	149	80	238	237	115	1,03	1,004
GB 263	208	202	109	191	195	102	1,02	0,97
GB 891	195	199	103	199	201	101	0,98	0,99
GB 4045	99	99	53	207	215	107	1	0,96
GB 9856	200	201	102	322	319	168	0,995	1,009
GB 1252	197	196	100	230	233	117	1,005	0,987
GB 4689	201	192	100	220	217	110	1,04	1,01
GB 6206	209	212	105	229	230	117	0,98	0,995
GB 9318	124	200	100	242	236	115	0,62	1,02
GB 9591	218	250	109	227	229	114	0,872	0,99
GB 784	203	209	107	199	193	103	0,97	1,03
GB 1868	207	196	112	199	199	100	1,056	1
GB 5920	193	197	101	205	206	104	0,97	0,995
GB 8075	205	207	105	206	210	100	0,99	0,98
GB 9008	201	198	102	266	173	105	1,01	1,53
GB 2040	194	190	103	213	217	108	1,02	0,98
GB 5585	216	212	110	202	231	104	1,02	0,87
GB 5814	181	190	100	206	226	107	0,95	0,91
GB 9441	201	200	100	120	128	65	1,005	0,94
GB 6632	181	190	101	122	212	106	0,95	0,57
GB 1768	202	206	108	232	225	112	0,98	1,03
GB 3015	230	233	117	194	198	100	0,98	0,98
GB 4277	197	195	105	171	198	101	1,01	0,864
GB 9653	199	204	107	231	235	121	0,97	0,98
GB 592	195	195	108	216	219	110	1	0,98
GB 317836	195	177	100	110	215	100	1,1	0,51
GBO 159421								
GBO 174263	211	227	115	107	115	60	0,93	0,93
GBO 184868								
GBO 258244								
GBO 267621								
GBO 273859	251	243	132	231	223	103	1,03	1,03
GBO 281033								
GBO 301859	214	214	107	181	193	100	1	0,93
GBO 325356	130	211	104	131	218	110	0,61	0,6
GBO 692	122	114	61	95	98	50	1,07	0,97
GBO 4780	185	270	138	210	226	116	0,68	0,92
GBO 6062	111	200	100	219	227	115	0,56	0,96
GBO 4222	210	199	107	231	213	112	1,05	1,08
GBO 4249	201	201	111	195	197	100	1	0,99
GBO 10599	222	207	118	210	212	106	1,07	0,99
GBO 5908	200	182	102	217	193	106	1,09	1,12
GBO 7631	213	200	106	134	206	103	1,06	0,65
GBO 10271	235	210	100	192	192	96	1,11	1
GBO 1392								

AMOSTRA	1p36	1q25	Nº núcleos	19q13	19p13	Nº núcleos	RATIO	
GBO 15284	200	190	100	240	210	110	1,05	1,14
GBO 19260	200	190	100	220	210	100	1,05	1,04
GBO 4835	201	193	101	212	217	102	1,04	0,97
GBO 279	86	139	70	204	196	100	0,61	1,04
GBO 159421								
GBO 174263	197	197	101	253	251	133	1	1,007
GBO 184868								
GBO 258244								
GBO 267621								
GBO 273859	198	190	109	229	226	104	1,04	1,01
GBO 281033								
GBO 301859	201	194	106	192	194	102	1,03	0,99
GBO 325356	207	269	145	121	216	108	0,77	0,56
GBO 692	209	199	103	211	204	103	1,05	1,03
GBO 4780	118	204	102	195	181	102	0,58	1,07
GBO 6062	148	196	102	233	216	122	0,75	1,08
GBO 4222	165	142	70	259	256	100	1,16	1,01
GBO 4249	233	222	100	239	242	103	1,04	0,99
GBO 10599	196	188	102	214	211	110	1,04	1,01
GBO 5908	210	199	100	220	220	102	1,05	1
GBO 7631	260	219	100	205	249	111	1,18	0,82
GBO 10271	208	193	100	210	207	104	1,07	1,01
GBO 1392								
GBO 15284	200	194	103	204	198	105	1,03	1,03
GBO 19260	229	220	101	233	225	102	1,04	1,03
GBO 4835	201	193	101	212	217	102	1,04	0,97
GBO 279	150	194	106	252	246	115	0,77	1,02
GBO 3366	199	191	104	169	188	102	1,04	0,89

Legenda:

Intervalo de Tolerância: 0,86 a 1,29

Caixa cinza – o valor observado representa deleção

Caixa vazia – *ratio* não determinados

Abreviaturas: **O** – Oligodendroglioma, **GB** – glioblastoma, **GBO** - glioblastoma com componente oligodendroglioma.

GBOs foram avaliados no componente astrocítico e oligodendroglioma (marcados em cinza escuro).

Anexo 7 - Classificação dos tumores astrocíticos e oligodendrogliais (OMS, 2007).

NOMENCLATURA	GRADUAÇÃO
Tumores astrocíticos	
Astrocitoma pilocítico	Grau I
Astrocitoma pilomixóide	Grau II
Astrocitoma subependimário de células gigantes	Grau I
Xantoastrocitoma pleomórfico	Grau II
Astrocitomas difusos (fibrilar, protoplasmático, gemistocítico)	Grau II
Astrocitoma anaplásico	Grau III
Glioblastoma, Glioblastoma de células gigantes e gliossarcoma	Grau IV
Tumores oligodendrogliais	
Oligodendroglioma	Grau II
Oligodendroglioma anaplásico	Grau III
Tumores oligoastrocíticos	
Oligoastrocitoma	Grau II
Oligoastrocitoma anaplásico	Grau III

Anexo 8 – Resumo aceito no Congresso da United States and Canadian Academy of Pathology, 2007.



United States and Canadian Academy of Pathology

November 21, 2006

Presenting Author: Ludiana Pinto

Abstract #: 1378

Title: Glioblastomas: Correlation between Oligodendroglial Component, Genetic Abnormalities and Prognosis

Poster Session VI – Wednesday Afternoon – Poster #214

Congratulations! The abstract listed above has been accepted for poster presentation during the 2007 USCAP Annual Meeting, March 24–30 in San Diego, CA. All presenters are required to pay the General Registration Fee for the meeting. You may register online through the USCAP web site – www.uscap.org – or call the Academy office to request a form (706/733–7550).

Please place the poster on the board with the Poster Number shown above in the poster display area between 12:30 pm – 1:00 pm. Posters are only displayed for half days. You must remove your poster between 4:00 pm – 4:30 pm (or it may be discarded). Authors should be with their posters during the break period.

EXCITING NEW OPPORTUNITY for 2007 Posters – Call4Posters[®] and Posters2View[™] PROGRAMS

The United States and Canadian Academy of Pathology has arranged with Marathon Multimedia to provide you with the opportunity to create your poster entirely online using the Call4Posters[®] service. In addition to this, you have the option to have your poster shipped directly to the meeting for on-site pick-up. This optional service is an easy and convenient way for you to prepare your poster for the annual meeting! You are not required to use this poster service; however, we hope you will find it a convenient and simple way to produce a professional poster at a reasonable price. You can access the program through the USCAP website (www.uscap.org).

Additionally, the USCAP is offering a FREE poster upload service for inclusion on a Posters2View[™] Online Program. If you choose to electronically submit your poster (whether or not it was created online), it will be available on the USCAP website for viewing and will remain available after the meeting. This will greatly increase your poster's exposure and will allow viewers to access your graphs and photos throughout the year. We hope that you will take advantage of this exciting new opportunity!

Specific Instructions:

1. Poster board surface is 3'10" tall by 5'10" wide. You are limited to this surface.
2. A header which includes the Title, Authors and Affiliations should be mounted at the top of the board. A copy of the abstract, in large type, should be posted in the upper left hand corner of the poster board.
3. All presenters are expected to disclose to the audience any commercial/financial relationship which may have a direct bearing on the subject of the presentation and which may be perceived as a real or apparent conflict of interest.
4. All illustrations, charts, graphs, and printed material should be legible from a distance of 3 feet or more. Keep illustrative material simple. Photographs (including light & electron micrographs) show up better if they are mat finished. Avoid heavy backing material which is difficult to attach to the board.
5. Bring push pins for mounting material on the poster board.

Sincerely,

United States and Canadian Academy of Pathology

Fred G. Silva, M.D., Executive Director

Jeffrey L. Myers, M.D., Education Committee Chairman

United States and Canadian Academy of Pathology Annual Meeting

Filename: 450875

Author for Correspondence Luciana W Pinto, MD

Department/Institution: Anatomic Pathology, Fundacao Antonio Prudente

Address: Rua Prof. Antonio Prudente, 211

City/State/Zip/Country: Sao Paulo, SP, 01509-900, Brazil

Phone: 55-21-8181-7718 **Fax:** **E-mail:** lucianawe@terra.com.br

Presenting Author: Luciana W Pinto

Phone: 55-21-8181-7718 **E-mail:** lucianawe@terra.com.br

Abstract Categories: 16. Neuropathology

Presentation format: Poster Only

Award:

Is the first author of this abstract a pathologist-in-training? No

Title: Glioblastomas: Correlation between Oligodendroglial Component, Genetic Abnormalities and Prognosis.

LW Pinto¹, MB Mahler-Araujo, L Wernersbach³, A Vettore², L Chimelli³ and F Soares¹.

¹Anatomic Pathology, Fundacao Antonio Prudente, Hospital do Cancer, Sao Paulo, SP, Brazil; ²Ludwig Institute for Cancer Research, Sao Paulo, SP, Brazil and ³Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Background: The histology of Glioblastomas (GBM) is quite variable and a small fraction of these tumors may present an oligodendroglial component. The clinical significance of an oligodendroglial component in GBMs remains uncertain, but its presence has been associated with longer survival. Molecular genetic studies of GBMs with oligodendroglial component have shown heterogeneous genetic alterations, with a variable frequency of LOH in chromosomes 1p and 19q. The presence of 1p/19q deletions has been related to prolonged survival and better response to chemotherapy in oligodendrogliomas and led to a growing interest in search for these genetic alterations in other gliomas. In astrocytic tumors, 1p loss is usually partial, not associated with 19q deletion and also may be associated with a worse prognosis.

Design: A series of 31 GBM was investigated for the presence of 1p and/or 19q deletions, 21 of them with oligodendroglioma-like areas. Quantitative microsatellite analysis using real time PCR and/or FISH were used to access the copy number on chromosomes 1p and 19q. Clinical data was retrieved and the variables location, age, gender, adjuvant treatment and extent of resection were correlated to 1p and 19 q status. Survival analysis with all the variables was performed. This group of tumors is part of a study involving 90 GBM, with test results currently under analysis.

Result: Tumors with an oligodendroglial component showed isolated 1p loss in 2 cases and 19q loss in other 2 cases. Only one combined 1p/19q loss was observed. Conventional GBM demonstrated isolated 1p loss in 1 case and 19q loss in other 2 cases. None of these tumors revealed combined loss of 1p/19q. Survival was longer for patients who received radiotherapy and chemotherapy. In a Cox multivariate analysis, the absence of 1p loss, total tumor resection and adjuvant treatment with radiation and chemotherapy were related to reduced risk of death, but only the last one reached statistical significance. No significant correlation was observed between 1p or 19q status and histology.

Conclusion: Combined 1p/19q is infrequent in GBM with oligodendroglial areas. Although these tumors have demonstrated a hybrid phenotype, the pattern of genetic changes on chromosomes 1p and 19q seems to be more closely related to astrocytic than oligodendroglial tumors.