

**Adriana Cruvinel Carloni**

**ESTABELECIMENTO E CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA E MOLECULAR DE  
CULTURAS PRIMÁRIAS DE GLIOBLASTOMAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Rui Manuel Reis

Coorientador: Prof. Dr. Jeremy A. Squire

Barretos, SP

2013

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada por Tatiana Messias Freitas da Costa

Biblioteca da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos

C284e Carloni, Adriana Cruvinel.

Estabelecimento e caracterização de culturas primárias de glioblastomas. /  
Adriana Cruvinel Carloni. - Barretos, SP 2013.

79f. : il.

Orientador: Dr. Rui Manuel Reis.

Co-orientador: Dr. Jeremy Andrew Squire.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Fundação Pio XII – Hospital  
de Câncer de Barretos, 2013.

1. Cultura primária. 2. Glioblastoma. 3. Sistema Nervoso Central. 4. Genes  
Supressores. 5. Aberrações Cromossômicas. 6. Gene *TP53*. I. Autor. II. Reis, Rui  
Manuel. III. Squire, Jeremy A. IV. Título.

CDD 617.017583

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Adriana Cruvinel Carloni**

**Estabelecimento e caracterização citogenética e molecular de culturas primárias de glioblastomas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde - Área de Concentração: Oncologia.

Data da aprovação: 28/08/2013

**Banca Examinadora:**

Prof. Dr. Carlos Afonso Clara

Instituição: Fundação Pio XII - Hospital de Câncer de Barretos

Prof. Dr. Luciano Neder Serafini

Instituição: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Prof. Dra. Silvia Regina Rogatto

Instituição: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina de Botucatu

Prof. Dr. Rui Manuel Vieira Reis

Orientador

Prof. Dr. Carlos Eduardo Paiva

Presidente da Banca Examinadora

## DECLARAÇÃO DE RESPONSABILIDADE DOS PESQUISADORES

“Esta dissertação foi elaborada e está apresentada de acordo com as normas da Pós-Graduação do Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII, baseando-se no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Oncologia e no Manual de Apresentação de Dissertações e Teses do Hospital de Câncer de Barretos. Os pesquisadores declaram ainda que este trabalho foi realizado em concordância com o Código de Boas Práticas Científicas (FAPESP), não havendo nada em seu conteúdo que possa ser considerado como plágio, fabricação ou falsificação de dados. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos”.

**DEDICATÓRIA**

*Aos meus pais **Edson Carloni** e **Maria Aparecida Cruvinel Carloni** por todo carinho, apoio, compreensão, estímulo e amor.*

*Ao meu irmão **Edson Carloni Filho** por sonhar, sempre, os meus sonhos comigo.*

*À minha irmã **Marina Cruvinel Carloni** in memoriam.*

## AGRADECIMENTOS

É com grande alegria que completo mais um ciclo da minha vida, encerrando e ao mesmo tempo iniciando uma nova conquista. Não cheguei aqui sozinha. Nada disso teria sido possível se não tivesse por perto um líder e uma equipe que me acompanhasse por todo este período.

Em primeiro lugar agradeço a Deus e a Nossa Senhora que me guiaram e iluminaram em todos estes momentos.

Agradeço imensamente a oportunidade que me foi dada pelo Prof. Dr. Rui Reis, meu orientador, que me fez descobrir o quão fantástico é o mundo da pesquisa. Agradeço pelas vezes que tirou as pedras do caminho para que eu acreditasse que podia seguir em frente e também pelas vezes, que as colocou de volta para que eu pudesse ultrapassá-las.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Jeremy Squire pela oportunidade de conhecer um mundo diferente do que vivemos no Brasil. Por todo apoio nesta dissertação, e por acreditar em meu potencial. E toda sua equipe da *Queens University* (Kingston/Canadá) e *Sick Children Hospital* (Toronto/Canadá) pela hospitalidade e vasto conhecimento adquirido.

Ao Dr. André Lopes Carvalho pela oportunidade de conhecer e trabalhar no universo do Hospital de Câncer de Barretos.

Ao Dr. Adhemar Longatto tanto pela oportunidade profissional como pelas inúmeras vezes que me ouviu e consolou como um verdadeiro amigo, em especial no início desta caminhada.

Ao Dr. Carlos Clara por toda ajuda e envolvimento em nosso projeto. Pelas vezes que cedeu um pouco do seu tempo para esclarecer dúvidas e por todo trabalho em equipe.

À enfermeira Fernanda Cordeiro, pela parceria, disposição, comprometimento. Obrigada pela amizade, pelas longas tardes de discussão, pelas inúmeras vezes que lembrou toda a equipe da importância da coleta das amostras.

À Dra. Gisele Caravina de Almeida, pela imensa contribuição com todo seu conhecimento. Pela dedicação, amizade e paciência.

À Viviane Aline e Renato Oliveira pela dedicação às preciosas culturas primárias quando foi necessária a minha ausência.

À Lucas Bidinotto não somente por dividir seu vasto conhecimento técnico científico, mas pelo companheirismo nas horas mais difíceis do desenrolar deste projeto.

Aos irmãos, Adriana Tarlá Lorenzi, Carolina Laus e Renato Oliveira, pela paciência, compreensão, amizade, companheirismo, tempo, disposição, risadas e lágrimas.

Às amigas que seguirão eternamente comigo: Olga Martinho, Letícia Yamane, Lidia Rebolho e Alessandra Paulino Santos. Ao amigo Matias Melendez pela paciência e excesso de café que me mantinham pra cima. Ao amigo Maicon Zanon pelos vários momentos de descontração, mas principalmente por aqueles que juntos rogamos: “Maria, passa na frente”.

A todo o CPOM (Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular) pela oportunidade de crescermos juntos. Pela alegria contagiante das risadas de Flávia e Taciane, o sorriso animador e confiante de Ana Laura, o abraço apertado de Natalia Campacci, Rodolfo e Abel, o olhar de cumplicidade de Viviane Aline e Edenír Palmero, o bom dia sempre bem humorado de Marcela Nunes e Letícia Girardo, a recepção de Aline Moraes, a simpatia constante de Deise, a sempre disposição de Raul Torrieri, ao vasto conhecimento de Daniel respondendo a todas as perguntas. Ao Dr. Croider Lacerda pelo companheirismo e ajuda mútua no crescimento de nossos estudos. Ao apoio e amizade de Adriane Feijó. Aos demais, alunos e estagiários que me estimularam a ir sempre em busca de algo a mais.

À todo departamento Diagnóstico em Oncologia Molecular, em especial a Deise, André, Carolina e Gustavo, por todo auxílio com os infindáveis sequenciamentos. Ao departamento de citogenética pela oportunidade de desenvolvermos este trabalho juntos.

À Rossana que me acolheu diversas vezes, não somente nos momentos de análise de dados, mas principalmente naqueles momentos em que eu pensava que não conseguiria seguir. À amizade de Cleiton Zanardo.

Aos colegas de trabalho, pesquisadores, biólogos e administrativos, em especial a Márcia, Renato, Alessandra, Abel e Letícia por toda ajuda e compreensão às vezes em que me ausentei do laboratório para dar prioridade ao desenvolvimento desta dissertação.

Aos tios Belfort e Elaini, meus pais de coração, por estarem sempre presente em minha vida. Pela confiança e amor, principalmente por NUNCA permitirem que eu não acreditasse em mim.

À eterna irmã Tatiana Sá pela paciência, confiança, amizade e por estar sempre ao meu lado.

À Brenda Honda e Silvana Rodrigues por todo suporte e paciência.

À Tatiana e Marcos, pelas inúmeras vezes que me atenderam prontamente, tanto em artigos solicitados de última hora, como nos atrasos na entrega dos livros. E não poderia nunca me esquecer da amizade de Jacqueline, que além do suporte bibliotecário esteve presente também em momentos de lágrimas e risadas.

À Dra Marjori Camparotto e ao Dr. Luciano Neder que me acompanharam durante todo este trabalho, permitindo meu crescimento e evolução na área científica.

Finalmente, agradeço ao Hospital de Câncer de Barretos e aos pacientes, sem os quais este estudo não teria sido possível.



## ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	Epidemiologia	<b>1</b>
<b>1.2</b>	Classificação histológica dos gliomas	<b>3</b>
<b>1.3</b>	Glioblastomas	<b>4</b>
<b>1.4</b>	Tratamento	<b>6</b>
<b>1.5</b>	Alterações genéticas	<b>6</b>
<b>1.5.1</b>	1.5.1 Alterações cromossômicas	<b>7</b>
<b>1.5.2</b>	1.5.2 Alterações moleculares	<b>9</b>
<b>1.5.2.1</b>	1.5.2.1 <i>TP53</i>	<b>11</b>
<b>1.5.2.2</b>	1.5.2.2 <i>PTEN</i>	<b>12</b>
<b>1.5.2.3</b>	1.5.2.3 <i>BRAF</i>	<b>12</b>
<b>1.5.2.4</b>	1.5.2.4 <i>IDH1/IDH2</i>	<b>13</b>
<b>1.5.2.5</b>	1.5.2.5 <i>H3F3A</i>	<b>14</b>
<b>1.5.2.6</b>	1.5.2.6 <i>FGFR1</i>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>16</b>
<b>3.1</b>	Objetivo Geral	<b>16</b>
<b>3.2</b>	Objetivos Específicos	<b>16</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>17</b>
<b>4.1</b>	População de Estudo	<b>17</b>
<b>4.2</b>	Cultura Celular	<b>17</b>
<b>4.3</b>	Caracterização Celular	<b>18</b>
<b>4.3.1</b>	Padrão de Crescimento	<b>18</b>
<b>4.3.2</b>	Perfil Fenotípico	<b>18</b>
<b>4.4</b>	Caracterização das Alterações Citogenéticas	<b>19</b>
<b>4.4.1</b>	Análise Cariotípica	<b>19</b>
<b>4.4.2</b>	a-CGH	<b>20</b>
<b>4.5</b>	Análise de mutações dos genes <i>TP53, PTEN, BRAF, IDH1, IDH2, H3F3A e FGFR1</i>	<b>23</b>
<b>4.5.1</b>	Extração de DNA	<b>23</b>
<b>4.5.2</b>	Amplificação pela técnica de PCR e sequenciamento direto dos genes <i>TP53, PTEN, BRAF, IDH1, IDH2, H3F3A e FGFR1</i>	<b>23</b>
<b>4.6</b>	Análise Estatística	<b>24</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>25</b>
<b>5.1</b>	Método de Estabelecimento	<b>25</b>
<b>5.2</b>	Caracterização Clínico-patológica	<b>26</b>
<b>5.3</b>	Caracterização Fenotípica das Culturas Primárias	<b>28</b>
<b>5.4</b>	Caracterização das Alterações Citogenéticas	<b>29</b>
<b>5.4.1</b>	Análise Cariotípica	<b>29</b>
<b>5.4.2</b>	a-CGH	<b>31</b>
<b>5.5</b>	Caracterização das Alterações Moleculares	<b>38</b>

<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>40</b>
<b>6.1</b>	Método de Estabelecimento	<b>40</b>
<b>6.2</b>	Caracterização Clínico-patológica	<b>40</b>
<b>6.3</b>	Caracterização das Culturas Primárias	<b>41</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>45</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>46</b>
	<b>ANEXOS</b>	<b>54</b>
	Anexo I – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	<b>54</b>
	Anexo II – <i>GenomePlots</i> aCGH	<b>59</b>

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1-</b>	Incidência e mortalidade dos tumores cerebrais em mulheres (A) e homens (B) no mundo.	1
<b>Figura 2-</b>	Incidência de gliomas entre as faixas etárias na população europeia.	2
<b>Figura 3-</b>	Distribuição dos tumores intracranianos e tumores do sistema nervoso central segundo sua histologia.	2
<b>Figura 4-</b>	Frequência dos subtipos de gliomas.	4
<b>Figura 5-</b>	Imagem representativa de tumor primário de glioblastoma corado por hematoxilina-eosina (HE). Em A – Glioblastoma e em B – Proliferação microvascular.	5
<b>Figura 6-</b>	Principais alterações moleculares envolvidas no desenvolvimento dos gliomas malignos	7
<b>Figura 7-</b>	Principais genes mutados em glioblastomas.	10
<b>Figura 8-</b>	Principais vias de sinalização envolvidas na patogênese dos glioblastomas (RTK/RAS/PI-3K, p53 e RB).	11
<b>Figura 9-</b>	Imagem representativa de cultura primária HCB-2, tumor primário e marcação de anticorpos específicos.	28
<b>Figura 10-</b>	Análise cariótica por banda G da cultura primária HCB-2.	29
<b>Figura 11-</b>	Análise cariótica por banda G da linhagem estabelecida GAMG.	30

<b>Figura 12-</b>	Exemplo de um <i>GenomePlot</i> (HCB2).	32
<b>Figura 13-</b>	Análise da frequência de ganhos e perdas cromossômicas das culturas primárias.	33
<b>Figura 14-</b>	Análise da frequência de ganhos e perdas cromossômicas dos tumores primários.	34
<b>Figura 15-</b>	Análise hierárquica não supervisionada de clusters das culturas primárias, seus respectivos tumores primários e linhagem estabelecida.	38
<b>Figura 16-</b>	<i>GenomePlot</i> HCB29.	59
<b>Figura 17-</b>	<i>GenomePlot</i> HCB40.	60
<b>Figura 18-</b>	<i>GenomePlot</i> HCB144.	61
<b>Figura 19-</b>	<i>GenomePlot</i> HCB151.	62

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1-</b>	Classificação dos tumores gliais, OMS 2007.	<b>3</b>
<b>Tabela 2-</b>	Principais alterações cromossômicas nos gliomas.	<b>8</b>
<b>Tabela 3-</b>	Dados clínico-patológicos das culturas primárias e linhagem comercial de glioblastomas.	<b>27</b>
<b>Tabela 4-</b>	Resultados das alterações citogenéticas das culturas gliais pela análise cariotípica.	<b>31</b>
<b>Tabela 5-</b>	Alterações do número de cópias cromossômicas.	<b>33</b>
<b>Tabela 6-</b>	Principais alterações pontuais (amplificação e deleção) pela análise de aCGH.	<b>35</b>
<b>Tabela 7-</b>	Análise dos genes <i>TP53</i> , <i>PTEN</i> , <i>BRAF</i> , <i>IDH1</i> , <i>IDH2</i> , <i>H3F3A</i> e <i>FGFR1</i> .	<b>39</b>
<b>Tabela 8-</b>	Análise do perfil mutacional dos genes <i>TP53</i> , <i>PTEN</i> , <i>BRAF</i> , <i>IDH1</i> , <i>IDH2</i> , <i>H3F3A</i> e <i>FGFR1</i>	<b>39</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

aCGH ( <i>array</i> -CGH)	Microarranjo baseado em hibridização genômica comparativa ( <i>microarray-based comparative genomic hybridization</i> )
CEP	Comitê de Ética e Pesquisa
Cy-3	Cianina 3
Cy-5	Cianina 5
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DAB	Diaminobenzidina
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Bases nitrogenadas
EDTA	Ácido tetraacético etilenodiamino
ETOH	Etanol
FISH	hibridização <i>in situ</i> por fluorescência ( <i>Fluorescence in situ hybridization</i> )
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida ( <i>glial fibrillary acidic protein</i> )
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HCB	Hospital de Câncer de Barretos
ISCN	<i>An International System of Cytogenetic Nomenclature</i>
KCl	Cloreto de potássio
KPS	<i>Karnofsky Performance Status</i>
LOH	Perda de heterozigose ( <i>loss of heterozygosity</i> )
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
OMS	Organização Mundial de Saúde
P	Passagem
PBS	Tampão fosfato salino ( <i>Phosphate-buffered saline</i> )
PS	Penicilina-estreptomicina
QT	Quimioterapia
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto

RT	Radioterapia
S-100	Anticorpo monoclonal S-100
SAB	Soro de albumina bovina
SAME	Serviço de Arquivos Médicos e Estatística
SFB	Soro fetal bovino
SKY	Cariótipo espectral ( <i>spectral karyotyping</i> )
SNC	Sistema Nervoso Central
TUC	Tempo de confluência ( <i>time until confluency</i> )
UP	Ultra-pura
WHO	<i>World Health Organization</i>

## RESUMO

### **Estabelecimento e caracterização citogenética e molecular de culturas primárias de glioblastomas.**

Carloni, A.C., Dissertação Mestrado, Hospital de Câncer de Barretos, 2013.

**INTRODUÇÃO:** Os glioblastomas (grau IV - OMS) são os tumores astrocíticos de maior frequência (acima de 50%) e pior prognóstico. Podem ser classificados como primários ou *de novo*, sem história prévia da doença ou secundários, tumores que surgem de lesões de menor grau de malignidade e evoluem para glioblastomas. Aberrações cromossômicas e gênicas, assim como elevada heterogeneidade intratumoral estão entre as principais características deste tipo tumoral. Mesmo diante do conhecimento destas alterações, o prognóstico e sobrevida dos pacientes é inferior a 2 anos, sendo então necessários estudos que viabilizem melhor entender o desenvolvimento do tumor e possibilitem estudos futuros com terapias mais eficazes. **OBJETIVOS:** i) estabelecer de culturas primárias de glioblastomas; ii) caracterizar fenotipicamente as culturas primárias, utilizando marcadores de linhagem glial; iii) caracterizar as alterações citogenéticas das culturas primárias; iv) caracterizar o perfil mutacional dos genes *TP53*, *PTEN*, *BRAF*, *IDH1*, *IDH2*, *H3F3A* e *FGFR1*; v) correlacionar as alterações citogenéticas e moleculares das culturas primárias com as alterações presentes no tumor primário. **MATERIAL E MÉTODOS:** Estudo de 5 pacientes com diagnóstico de glioblastoma (grau IV) submetidos a neurocirurgia no Hospital de Câncer de Barretos. Os dados clínico-patológicos dos pacientes foram coletados através da análise de prontuários. As amostras dos pacientes foram estabelecidas em cultura celular. Após o estabelecimento, foram caracterizadas quanto aos perfis fenotípico, citogenética e molecular, utilizando das técnicas de cariótipo convencional, aCGH e sequenciamento de Sanger. **RESULTADOS:** O protocolo de estabelecimento teve êxito em 53% de todas as amostras submetidas ao estabelecimento de cultura primária. Das 5 amostras incluídas neste estudo, 60% foram do sexo feminino e apresentaram uma média de idade de 58 anos. A análise das aberrações cromossômicas mostrou a diversidade de alterações presentes nestes tumores, com destaque para a trissomia do cromossomo 7 e monossomia do cromossomo 10. A análise de mutações demonstrou a prevalência de alteração envolvendo os genes supressores tumorais *TP53* e *PTEN* mesmo em glioblastomas primários. Houve uma



boa correlação entre os resultados das culturas primárias com os resultados dos tumores primários para as alterações cromossômicas e algumas discrepâncias foram identificadas na análise mutacional. **CONCLUSÃO:** Os resultados deste trabalho permitiu estabelecer com sucesso culturas primárias de glioblastomas e identificar suas alterações cromossômicas e genéticas em regiões previamente associadas a tumorigênese de glioblastomas. Além disso, mostrou boa reprodutibilidade entre as alterações identificadas na cultura primária e o tumor primário, sendo um potencial modelo para estudos *in vitro* da biologia destes tumores.

Palavras-chave: cultura primária; glioblastoma; Sistema Nervoso Central; genes supressores; aberrações cromossômicas; gene *TP53*.

## ABSTRACT

### **Establishment and cytogenetic and molecular characterization of glioblastomas primary cultures.**

Carloni, A.C., Master Thesis, Barretos Cancer Hospital, 2013.

**BACKGROUND:** Glioblastomas (grade IV - WHO) are the most frequent astrocytic tumors with a dismal prognostic. They can be primary or *de novo* glioblastoma, without clinical or histopathological evidence of a preexisting lesion or secondary, tumors that develop from a lower grade tumor to glioblastomas. Chromosomal and genes aberrations, as well as high heterogeneity, are some of the features of these tumors. Despite the knowlegde of these alterations, the prognosis is the worst and survival of the patients is less than 2 years. So, further studies are necessary to enable a better understanding of glioblastoma development in order to desing more effective therapies. **OBJECTIVES:** i) to establish primary cultures of glioblastomas; ii) to characterize phenotypically the established primary cultures; iii) to identify chromosomal alterations; iv) to determine mutations status of the genes *TP53*, *PTEN*, *BRAF*, *IDH1*, *IDH2*, *H3F3A* e *FGFR1*; v) to correlate the cytogenetic and the molecular profiles between primary cultures and frozen tissue tumors. **MATERIAL AND METHODS:** Study of 5 patients with glioblastoma (grade IV) treated at neurosurgery department of Barretos Cancer Hospital. The clinicopathological data of patients were collect from medical records. Following the establishment of tumor cell culture, the cells were characterized to phenotypic, cytogenetic and molecular alterations using conventional karyotyping, aCGH and Sanger sequencing. **RESULTS:** The established protocol was successful in 53% of all samples. Of the 5 patients included, 60% were female with an average age of 58 years. The analysis of chromosomal aberrations showed the diversity of alterations present in these tumors, in special trissomy of chromosome 7 and monosomy of chromosome 10. The mutation analysis showed the prevalence of mutations in tumor suppressor genes *TP53* and *PTEN* even in primary glioblastomas. A good correlation was observed between primary cultures and respective primary tumors for chromosomal aberrations and some discrepancies were observed in the mutation profile. **CONCLUSION:** The present findings showed successful establishment of glioblastoma primary cultures and allowed to identify

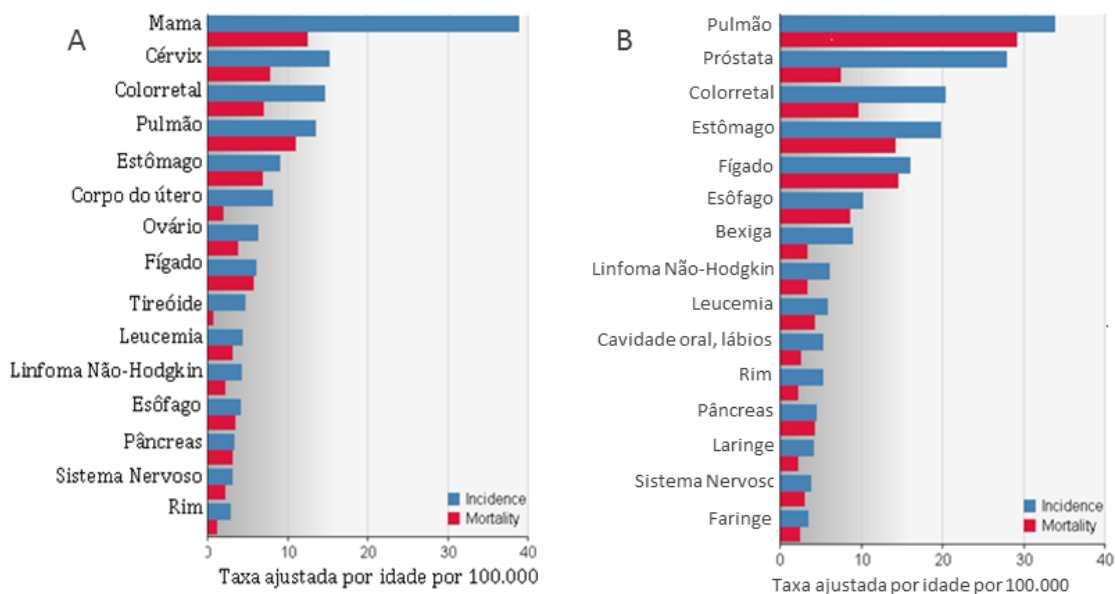
the chromosomal and genetic alterations in regions previously associated with tumorigenesis of glioblastomas. Moreover, it showed a good reproducibility between found alterations of primary culture and primary tumor, being a potential *in vitro* model for glioblastoma biology studies.

Keywords: primary culture; glioblastoma; central nervous system; suppressor genes; chromosomal aberrations; *TP53* gene.

## 1. INTRODUÇÃO

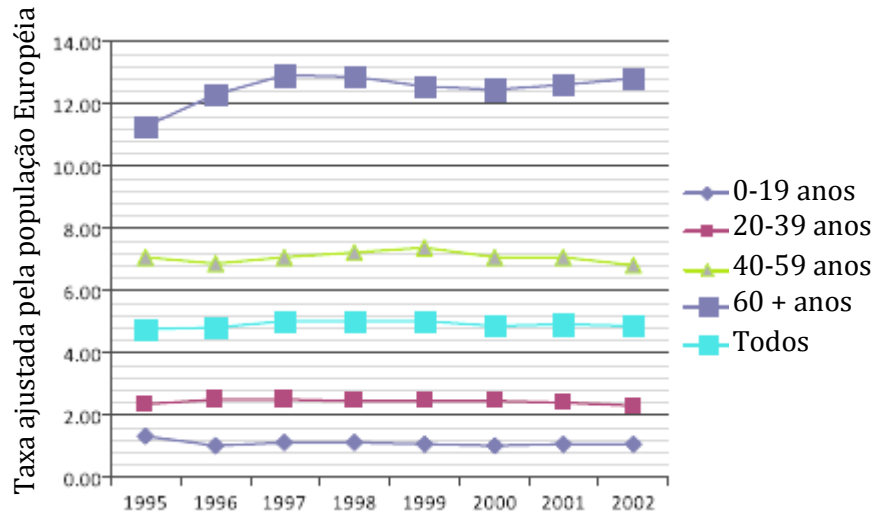
### 1.1. Epidemiologia

Segundo dados do GLOBOCAN 2008 (último acesso em 08 de Julho de 2013), os tumores do sistema nervoso central (SNC) possuem uma incidência de 3,1/100.000 mulheres e 3,8/100.000 homens em todo o mundo, representando cerca de 2% de todos os tipos de neoplasias malignas<sup>1</sup>. Apesar da baixa frequência, estes tumores apresentam elevada taxa de mortalidade, atingindo cerca de 70-76%, como apresentado na Figura 1<sup>1</sup>.



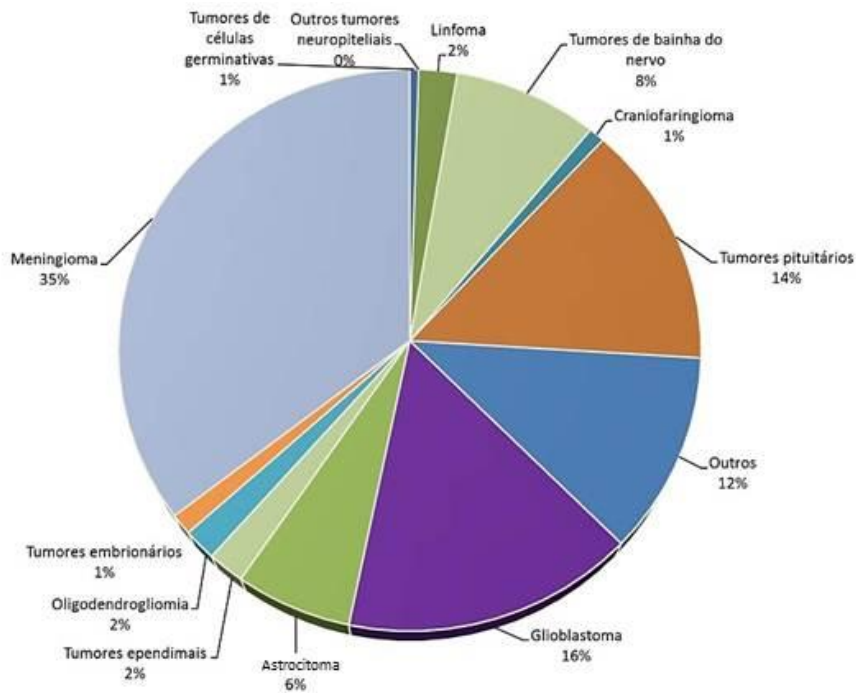
**Figura 1:** Incidência e mortalidade dos tumores cerebrais em mulheres (A) e homens (B) no mundo. Modificado de Globocan, 2008<sup>1</sup>.

Entre os tumores cerebrais, os gliomas, lesões originadas a partir das células gliais ou células precursoras, são as neoplasias de maior frequência (acima de 70%)<sup>2</sup>. Nos países Europeus são diagnosticados cerca de 26.610 novos casos de gliomas por ano<sup>3</sup>. Este tipo tumoral acomete principalmente pacientes idosos, acima dos 60 anos (Figura 2)<sup>3</sup>, no entanto, podem também ocorrer na infância (aproximadamente 7%), sendo atualmente a principal causa de morte associada a câncer nesta faixa etária<sup>4-6</sup>.



**Figura 2:** Incidência de gliomas entre as faixas etárias na população europeia. Modificado de Crocetti, E. *et al*, 2012<sup>3</sup>.

Dentre os gliomas, os tumores astrocíticos são os de maior incidência, sendo os glioblastomas os mais frequentes, atingindo cerca de 16% de todos os tumores cerebrais (Figura 3)<sup>5</sup>.



**Figura 3:** Distribuição dos tumores intracranianos e tumores do sistema nervoso central segundo sua histologia. Modificado de Dolecek, T.A. *et al*, 2012<sup>5</sup>.

## 1.2. Classificação histológica dos gliomas

Os tumores cerebrais compreendem um grupo diversificado de neoplasias quanto a aspectos morfológicos, localização, biologia molecular e comportamento clínico<sup>3</sup>. Baseado nas diferentes características histológicas, os gliomas são classificados em quatro grandes grupos: astrocitomas (aproximadamente 70%), oligodendrogliomas (10-30%), gliomas mistos e ependimomas (menos de 10%)<sup>2, 4, 7-9</sup> e pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 4 graus de malignidade (Tabela 1).

**Tabela 1-** Classificação dos tumores gliais, OMS 2007. Modificado de *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System, 4th Edition*.

Classificação OMS (Grau)	
<b>Astrocitoma</b>	Astrocitoma pilocítico (I)
	Xantoastrocitoma pleomórfico (II)
	Astrocitoma difuso (II)
	Astrocitoma anaplásico (III)
	Glioblastoma (IV)
	Gliossarcoma (IV)
	Glioblastoma de células gigantes (IV)
<b>Oligodendroglioma</b>	Oligodendroglioma (II)
	Oligodendroglioma anaplásico (III)
<b>Glioma Misto</b>	Oligoastrocitoma (II)
	Oligoastrocitoma anaplásico (III)
<b>Ependimoma</b>	Subependimoma (I)
	Mixopapilar (I)
	Ependimoma (II)
	Ependimoma anaplásico (III)

Os astrocitomas pilocíticos ou lesões de grau I (OMS) são tumores geralmente benignos com alta probabilidade de cura e ressecção cirúrgica completa. São tumores bem delimitados, de crescimento lento que raramente evoluem para outro nível de lesão. Histologicamente apresentam baixa celularidade, rara evidência de mitose e núcleos hiper cromáticos. Acometem, principalmente, pacientes jovens de 0 – 19 anos<sup>4, 7, 8, 10</sup>.

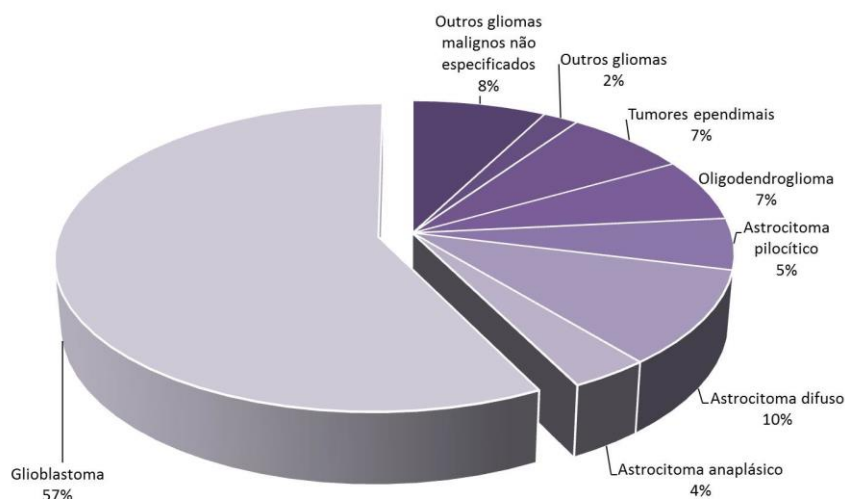
A maioria dos gliomas de baixo grau (ex. astrocitoma difuso) evolui para gliomas de alto grau (ex. astrocitoma anaplásico e glioblastoma) devido à intrínseca capacidade infiltrativa deste tipo tumoral. Esta característica infiltrativa é um fator limitante na remoção cirúrgica completa, permitindo assim que um residual de células neoplásicas já tratadas

possam levar à recorrência do tumor e conseqüente progressão maligna<sup>11-13</sup>. Embora o anatomopatológico seja o padrão-ouro para o diagnóstico dos diversos gliomas, a distinção entre os diferentes subtipos histológicos é uma tarefa bastante difícil, tanto pelas limitações inerentes à técnica de análise quanto por sua capacidade infiltrativa<sup>7,8</sup>.

Histologicamente, os gliomas expressam a proteína glial fibrilar ácida (GFAP), filamento proteico intermediário presente na maioria dos astrócitos maduros e algumas células ependimais<sup>14</sup>. Outros marcadores também podem estar presentes, como as proteínas nestina, S-100 e vimentina. A nestina é também um filamento protéico intermediário conhecido como marcador de células não diferenciadas ou células tronco<sup>15, 16</sup>. A proteína S-100 é um marcador localizado no citoplasma dos astrócitos, está envolvida na regulação de fosforilação de proteína, fatores de transcrição, crescimento e diferenciação celular, entre outros processos biológicos e a vimentina, marcador de astrócitos menos diferenciados, possui função estrutural, encontra-se expressa no núcleo celular<sup>17</sup>.

### 1.3. Glioblastomas

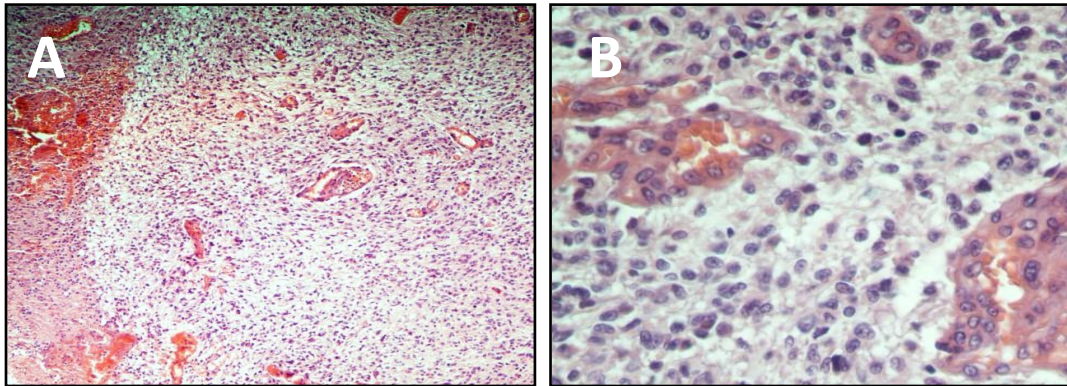
Os glioblastomas (OMS IV) são os tumores astrocíticos mais frequentes (Figura 4), mais invasivos e de pior prognóstico<sup>4, 9, 18, 19</sup>.



**Figura 4:** Frequência dos subtipos de gliomas<sup>5</sup>.

Os glioblastomas são caracterizados histologicamente por alta celularidade, intensa atividade mitótica, proliferação de microvasos, atipia nuclear, pleomorfismo celular e

presença de necrose (Figura 5). Uma das principais características destes tumores é a elevada heterogeneidade intratumoral<sup>4, 20, 21</sup>.



**Figura 5:** Imagem representativa de tumor primário de glioblastoma corado por hematoxilina-eosina (HE). Em A- Glioblastoma – 100X (coloração HE) e em B- Proliferação microvascular – 400X. Imagens cedidas pela Dra Gisele Caravina de Almeida, Hospital de Câncer de Barretos.

Baseado em suas características clínicas, estes tumores foram divididos por Scherer em 1940 em dois grupos: primários ou *de novo* e secundários<sup>4, 22</sup>. Os glioblastomas primários ou *de novo* possuem crescimento acelerado com curta história clínica (inferior a 3 meses) sem evidência histopatológica prévia, correspondem à maioria dos glioblastomas (acima de 90% dos casos) e acometem, principalmente, pacientes mais idosos, com idade aproximada de 60 anos. Os glioblastomas secundários surgem a partir de lesão de menor grau de malignidade (astrocitoma difuso ou anaplásico) que evoluem para glioblastoma, apresentam desenvolvimento um pouco mais lento e conseqüente, história clínica mais longa. Estes últimos representam a minoria dos casos deste tipo tumoral e ocorrem frequentemente em pacientes adultos jovens (por volta de 45 anos). O glioblastoma é uma das patologias humanas mais devastadoras, com média de sobrevida de 12 a 15 meses<sup>4, 8, 23-26</sup>, não havendo diferença significativa na sobrevida dos pacientes com glioblastomas primários ou secundários. Histologicamente, não é possível distinguir estes dois subtipos clínicos, no entanto, nas últimas décadas tem sido demonstrado que eles apresentam distintas vias moleculares<sup>7, 24, 27, 28</sup>.



#### 1.4. Tratamento

Apesar do tratamento dos tumores cerebrais ser dependente de uma série de fatores, tais como subtipo, localização, tamanho do tumor e idade do paciente, a grande maioria dos indivíduos acometidos com este tipo tumoral é, rotineiramente, submetida à terapia agressiva com intenção de controlar a doença, diminuir os sintomas e aumentar da sobrevida dos pacientes.

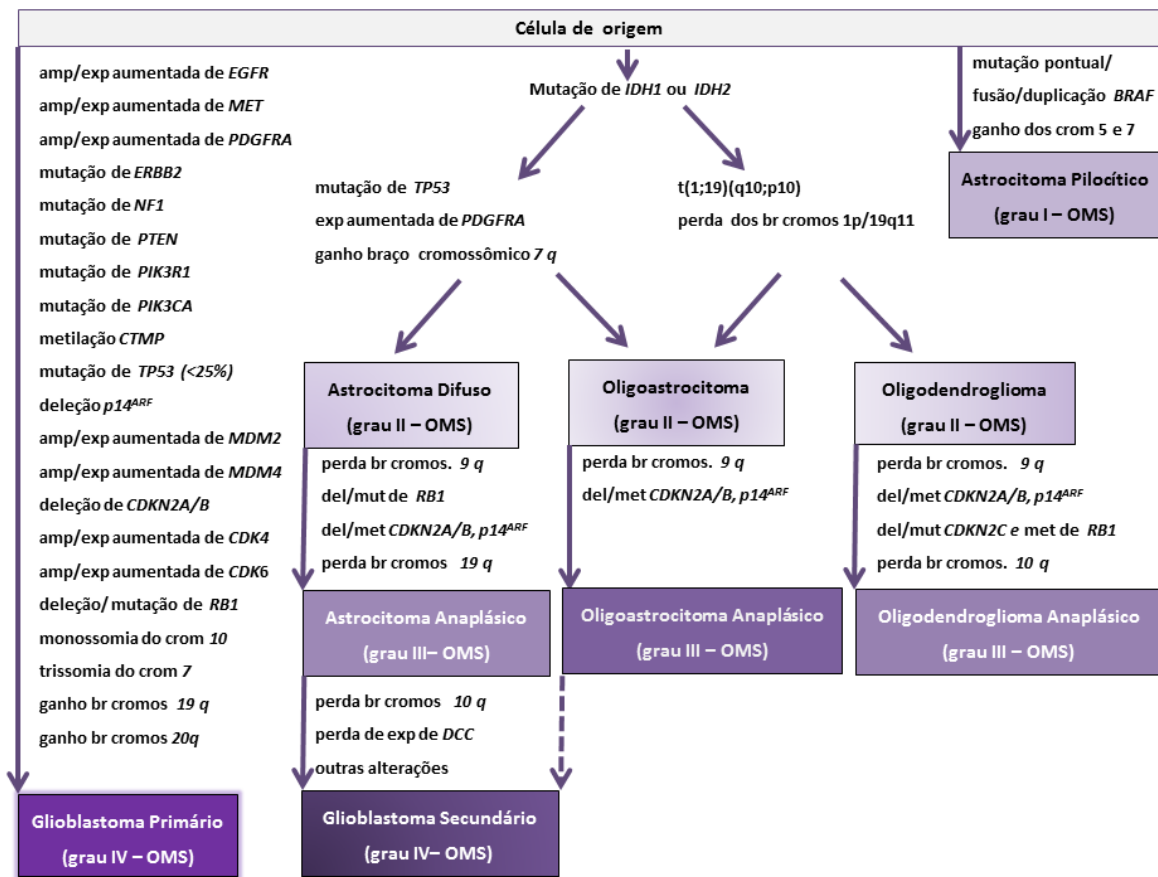
A opção de tratamento padrão para os glioblastomas consiste em ressecção cirúrgica o mais ampla possível ou parcial, seguida de um regime combinado de radioterapia e quimioterapia adjuvante com agentes alquilantes (ex: temozolamida)<sup>29-31</sup>.

#### 1.5. Alterações genéticas

O câncer é uma doença multifatorial resultante de interações complexas entre alterações genéticas e fatores ambientais<sup>32</sup>, que promovem o crescimento descontrolado, escape ao ciclo celular, resistência à apoptose, imortalização das células e estimulação de mecanismos de angiogênese, invasão e metastização<sup>33,34</sup>.

Geneticamente, os gliomas são também heterogêneos, existindo distintas vias moleculares caracterizadas por várias alterações cromossômicas e genéticas responsáveis pela sua evolução (Figura 6)<sup>7,8</sup>.

Entre as múltiplas alterações presentes nestes tumores, destacam-se a trissomia do cromossomo 7, monossomia do cromossomo 10, mais frequentemente associada aos glioblastomas primários. Perda de heterozigose (LOH) dos braços cromossômicos 1p/19q nos oligodendrogliomas, assim como ganho dos braços cromossômicos 19q e 20q nos glioblastomas primários<sup>7</sup>. Vários estudos indicam mutações e LOH em diversos genes, em especial nos genes supressores tumorais *TP53* (glioblastomas secundários) e *PTEN* (glioblastomas primários) e nos oncogenes *BRAF*, *IDH1* e *IDH2* (astrocitomas de grau II, III (OMS) e glioblastomas secundários)<sup>7, 35, 36</sup>. A caracterização dessas mutações pode potencialmente ser utilizada como biomarcador para o diagnóstico e prognóstico mais preciso desta doença.



**Figura 6** - Principais alterações moleculares envolvidas no desenvolvimento dos gliomas malignos. Amp (amplificação), exp (expressão), crom (cromossomo), br cromos (braço cromossômico), del (deleção), mut (mutação), met (metilação). Modificado de Riemenschneider MJ. *et al*, 2010<sup>7</sup>.

### 1.5.1 Alterações cromossômicas

O desequilíbrio genômico presente nestes tumores sólidos deve-se principalmente à instabilidade cromossômica e consequente aneuploidia tumoral. A instabilidade cromossômica envolve diversos tipos de alterações que vão desde mudanças estruturais (inversão, inserção, deleção, translocação, duplicação) e numéricas (perdas ou ganhos) dos cromossomos<sup>37</sup>. Inúmeros trabalhos têm descrito as principais alterações cromossômicas presentes em gliomas (Tabela 2)<sup>6, 7, 24, 38, 39</sup>.

**Tabela 2** - Principais alterações cromossômicas nos gliomas.

Região Cromossômica	Tipo de alteração
1p36.31-pter	ganhos ou deleções
1p36.22-p36.31	ganhos ou deleções
1p34.2-p36.1	ganhos ou deleções
1q32	ganhos
4q	deleções
7p11.2-p12	amplificações ou ganhos
9p21-p24	deleções
10q23	deleções
10q25-q26	deleções
11p	deleções
12q13.3-q15	amplificações
13p11-p13 e 13q14-q34	perda
19q13	perda
22q11.21-q12.2	perda
22q13.1-q13.3	perda

Modificado de Schwartzbaum JA. *et al*, 2006<sup>39</sup>.

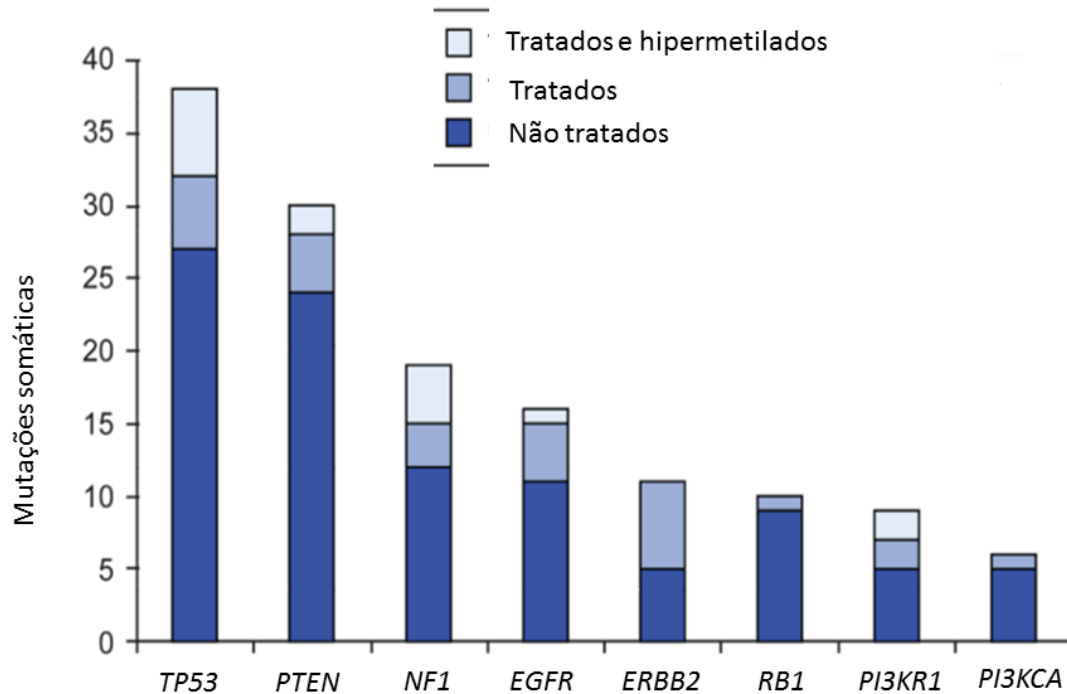
A avaliação destas alterações cromossômicas pode ser realizada por técnicas citogenéticas, tais como cariótipo convencional, cariótipo espectral (*spectral karyotyping* - SKY), hibridização *in situ* por fluorescência (*Fluorescence in situ hybridization* - FISH) ou microarranjo baseado em hibridização genômica comparativa (*microarray-based comparative genomic hybridization* - array-CGH, a-CGH), cada uma com as suas vantagens e desvantagens.

O cariótipo convencional ou bandamento G, desenvolvido em 1969, é uma técnica de citogenética clássica, que permite o reconhecimento de todos os cromossomos e de seus rearranjos cromossômicos<sup>40</sup>. Esta técnica permite detectar alterações cromossômicas de células somáticas em divisão mitótica pela análise do padrão de bandas dos cromossomos em metáfase corados por Giemsa. Entretanto, esta metodologia não permite a detecção de pequenas translocações presentes nos cromossomos<sup>37, 40</sup>. Diante disso, algumas décadas depois, foi desenvolvida a técnica do cariótipo espectral (SKY), que além de confirmar as mudanças estruturais e numéricas dos cromossomos encontradas pela técnica do cariótipo convencional, permite a detecção de translocações balanceadas e não balanceadas<sup>41</sup>. Este ensaio se baseia no uso de cinco corantes espectralmente distintos, que em combinação formam um coquetel de sondas cromossômicas, o qual ao hibridizar com os cromossomos em metáfase gera uma assinatura única para cada cromossomo<sup>42</sup>. Ambas as técnicas

descritas permitem identificar alterações estruturais e numéricas de grandes porções cromossômicas ou de cromossomos inteiros, entretanto não possibilita a detecção de ganhos ou perdas de pequenas regiões cromossômicas. Outra técnica também utilizada na detecção de alterações cromossômicas é a hibridização *in situ* por fluorescência - FISH, desenvolvida nos anos de 1980. O FISH utiliza sondas específicas capazes de identificar sequências conhecidas, como o cromossomo inteiro, o centrômero, telômeros, regiões ou genes específicos, tanto em metáfases como em núcleos interfásicos, ou seja, permite o uso tanto de células em divisão como em tecido parafinado<sup>41, 43</sup>. E ainda, a hibridação genômica comparativa (CGH – *comparative genomic hybridization*). Esta técnica é utilizada no mapeamento de alterações do número de cópias de regiões genômicas tanto em células viáveis como em material congelado ou parafinado. A grande vantagem da utilização do CGH é a possibilidade de analisar todos os cromossomos em um só experimento, enquanto o FISH requer sondas de interesse a regiões ou cromossomos específicos<sup>44</sup>. Entretanto, dada a sua baixa resolução, foi posteriormente desenvolvida a metodologia microarranjo ou array-CGH (a-CGH), cujas vantagens são a alta resolução, o mapeamento direto de aberrações e a possibilidade de análise de vários genes ao mesmo tempo<sup>44</sup>. A utilização conjunta destas técnicas permite traçar um perfil mais fidedigno das alterações cromossômicas presentes nos diversos tumores, incluindo os gliomas.

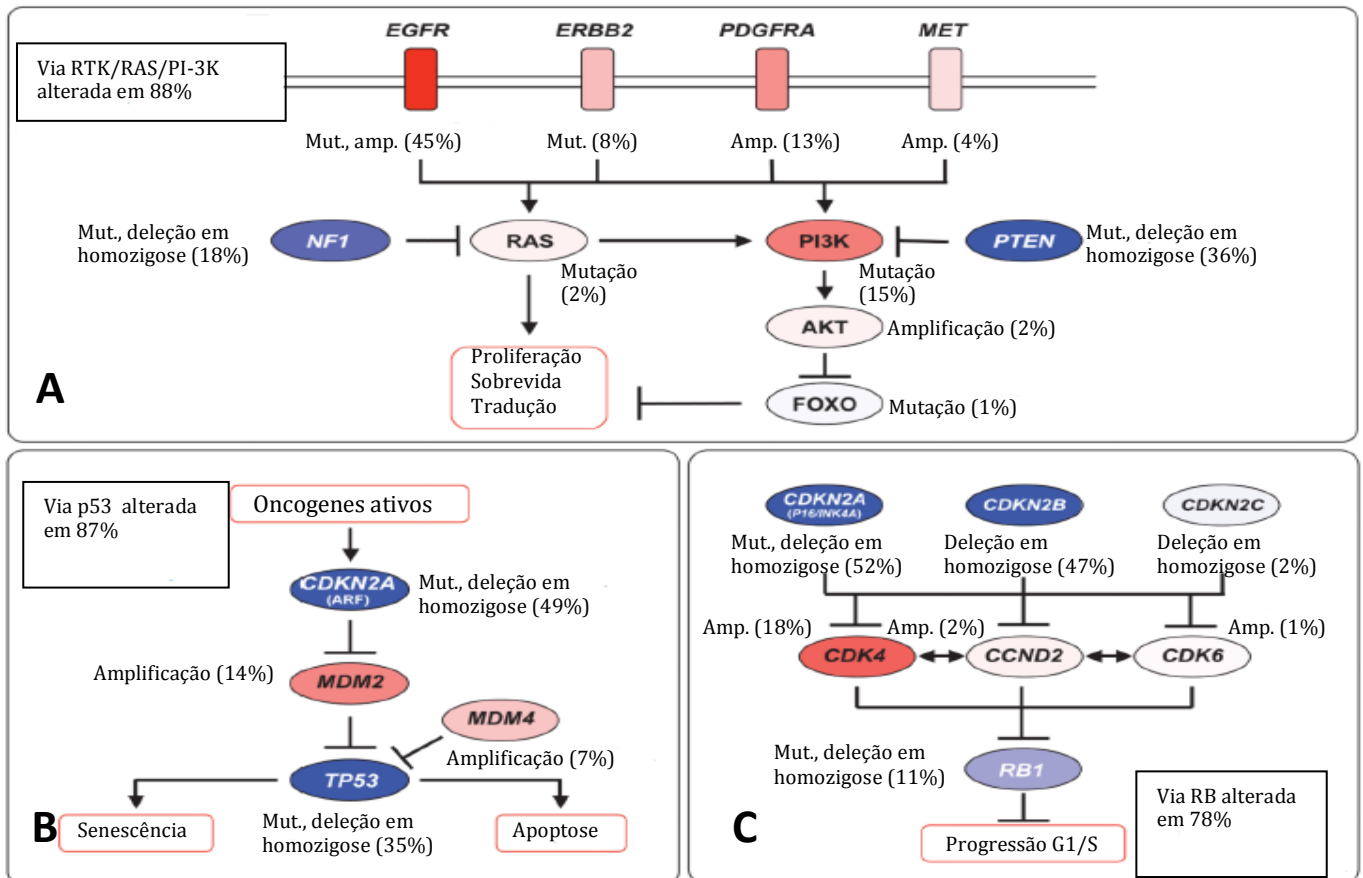
### 1.5.2 Alterações moleculares

Como demonstrado na Figura 7, diversos genes encontram-se alterados nos gliomas, em especial os supressores tumorais *TP53* e *PTEN* e os oncogenes *BRAF*, *IDH1* e *IDH2*<sup>7</sup>. Segundo o estudo *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) em 2008, os supressores tumorais *TP53* e *PTEN* estão entre os 8 genes mais frequentemente mutados, em especial entre pacientes recém diagnosticados (Figura 7)<sup>34</sup>. Estudos recentes revelaram a presença de mutações somáticas no gene *H3F3A* em 44% dos casos e sugere que esta mutação é específica aos gliomas de alto grau pediátricos e aos glioblastomas em adultos jovens<sup>6, 45-47</sup>. Outro gene também recentemente associado à biologia dos glioblastomas é o *FGFR1*, o qual também parece ser mais prevalente em tumores pediátricos<sup>48, 49</sup>.



**Figura 7** - Principais genes mutados em glioblastomas. Em azul escuro, mutações encontradas em pacientes não tratados; em azul médio, presença de mutações em pacientes já tratados e em azul claro, mutações em pacientes tratados e hipermutados. Modificado de TCGA, 2008<sup>34</sup>.

A análise integrada das aberrações genéticas presentes nos glioblastomas mostram uma interação entre 3 importantes vias de sinalização: via dos receptores tirosina quinase (RTKs) e vias dos supressores tumorais p53 e RB<sup>34</sup> (Figura 8). De fato, 74% das alterações estão aportadas nestas vias, sugerindo que a desregulação das mesmas é essencial para o desenvolvimento dos glioblastomas<sup>34</sup>.



**Figura 8** - Principais vias de sinalização envolvidas na patogênese dos glioblastomas (RTK/RAS/PI-3K, p53 e RB). Mut. (mutação); Amp. (amplificação). Em vermelho estão indicadas as alterações ativadoras e em azul, as alterações inibidoras. Mut. (mutação), Amp. (amplificação). Modificado de TCGA, 2008<sup>34</sup>.

### 1.5.2.1 TP53

O gene *TP53* (*tumor protein p53*) é um supressor tumoral, localizado no braço curto do cromossomo 17 (17p13.1). É um dos genes envolvidos no ciclo celular, responsável por reparar danos do DNA antes que o ciclo se complete, ou induzir a morte celular (apoptose), sendo por isso também conhecido como “guardião do genoma humano”<sup>50-52</sup>. Quando ativado, o gene *TP53* sintetiza uma proteína de mesmo nome, p53, que funciona como fator de transcrição, ativando ou inibindo um vasto número de genes, além de poder também interagir diretamente com outras proteínas, levando a manutenção da estabilidade do genoma<sup>23</sup>. Mutação pontual neste gene ou perda de heterozigose (LOH) em 17p é um evento frequente e precoce na patogênese dos gliomas<sup>7, 8, 23, 53</sup>. Estas mutações ocorrem acima de 70% nestes tumores, sendo mais comuns entre os astrocitomas difusos (74%), astrocitomas anaplásicos (65%) e glioblastomas secundários (62%) e com uma frequência de mutações similar entre os tumores primários e os recorrentes<sup>8, 53</sup>.

### 1.5.2.2 PTEN

O gene supressor de tumor *PTEN* (*phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10*), também chamado de *MMAC1* (*mutated in multiple advanced cancers 1*) ou *TEPI* (*transforming growth factor TGF- $\beta$ -regulated and epithelial cell-enriched phosphate*) está localizado no cromossomo 10 (10q22-23)<sup>54, 55</sup>. Possui duas funções essenciais, uma envolvendo atividade fosfatase lipídica e outra, com atividade fosfatase proteica<sup>54</sup>. Em ambas as funções, este gene é responsável por regular negativamente duas vias de motilidade celular, uma envolvendo *Shc*, uma proteína de ligação pertencente à via *MAPK* (*Mitogen-activated protein kinase*) que estimula a migração das células e outra envolvendo *FAK* e *p130<sup>Cas</sup>*, as quais estão relacionadas à adesão celular<sup>54</sup>. Além disso, o gene *PTEN* pode atuar diretamente na proteína *PIP3* (*phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase*), a qual possui atividade tirosina fosfatase e regula negativamente a via de sinalização *Akt/PKB* (*protein kinase B*), levando à parada do ciclo celular ou à apoptose<sup>54</sup>. Acredita-se que estas funções sejam essenciais para as células embrionárias normais, entretanto novos estudos são necessários para melhor entender o envolvimento do gene *PTEN* neste tipo celular<sup>54</sup>. Tal como o gene *TP53*, o *PTEN* encontra-se mutado ou deletado em um grande número de gliomas, em especial nos glioblastomas primários com incidência superior a 70%<sup>7, 8, 54</sup>. A perda da função do gene *PTEN* em tumores de menor grau pode ser relacionada à provável evolução tumoral<sup>54</sup>, estando, assim, associada ao pior prognóstico em múltiplos subtipos de glioma<sup>56, 57</sup>. Outro mecanismo, bastante comum entre os diversos tipos tumorais, de inativação deste gene é a metilação de seu promotor<sup>58</sup>. Além disso, a perda de *PTEN* aumenta drasticamente a gliomagenese em uma série de estudos experimentais<sup>59-61</sup>.

### 1.5.2.3 BRAF

O proto-oncogene *BRAF* (*v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*), mapeado no cromossomo 7 (7q34), é um dos 3 genes pertencentes à família das quinases serina/treonina, denominadas proteínas RAF<sup>62</sup>. A proteína BRAF é ativada pela proteína RAS, uma proteína de ligação à membrana, a qual é regulada por sinais extracelulares, que desencadeiam a ativação da via de sinalização RAS-RAF-MEK-ERK-MAP quinase, responsável por modular as respostas celulares frente a sinais dos fatores de crescimento<sup>62, 63</sup>. Entre os integrantes da família RAF, a proteína BRAF apresenta a maior atividade tirosina quinase,

devido à presença do aminoácido ácido aspártico em sua região C-terminal. Devido à elevada atividade tirosina quinase, mutações envolvendo o gene *BRAF* resultam em uma hiperativação de seu produto proteico. A maioria das mutações ocorre em seu domínio quinase, consistindo da substituição do aminoácido valina pelo aminoácido ácido glutâmico no códon 600 (V600E) do exon 15 do gene, levando a hiperativação e conseqüentemente à elevação da atividade quinase<sup>62</sup>. Mutações pontual envolvendo o gene *BRAF* têm sido amplamente encontradas em uma variedade de tumores humanos, incluindo os gliomas<sup>63</sup>. Outras alterações podem envolver o gene *BRAF* como duplicação e conseqüente fusão (*KIAA1549-BRAF*)<sup>64</sup>. Estudos apontam uma frequência acima de 60% da amplificação da região 7q34 em astrocitomas pilocíticos (38%) e difusos (23%), com ou sem o envolvimento de todo o cromossomo 7<sup>36</sup>. A fusão do gene *BRAF* é frequente na maioria dos astrocitomas pilocíticos<sup>7, 65</sup>, enquanto mutação deste gene possui uma frequência elevada em glioblastomas epitelióides (53.8%)<sup>66</sup>.

#### **1.5.2.4 IDH1/IDH2**

O gene isocitrato desidrogenase (IDH - *isocitrate dehydrogenase*) está envolvido no desempenho de funções metabólicas e produção de energia. É responsável pela síntese da proteína IDH, a qual atua no metabolismo celular catalisando a conversão da enzima  $\alpha$ -cetoglutarato em NADPH, a partir de NADP (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato)<sup>23</sup>. No genoma humano há 5 isoformas das proteínas isocitratos desidrogenases, entre elas as mais conhecidas e envolvidas na gliomagênese são IDH1 (isocitrato desidrogenase 1) e IDH2 (isocitrato desidrogenase 2)<sup>7, 8, 23, 25, 35, 67, 68</sup>. O gene *IDH1* está localizado no cromossomo 2 (2q33), e tem ação no citoplasma das células e nos peroxissomos<sup>25, 68</sup>, enquanto o gene *IDH2* localiza-se no cromossomo 15 (15q26), e atua na matriz mitocondrial<sup>67-69</sup>. Mutações pontual envolvendo, respectivamente, o aminoácido arginina na posição 132 (R132) e 172 (R172) dos genes *IDH1* e *IDH2* são frequentemente encontradas em astrocitomas difusos (80%), oligodendrogliomas (67%), astrocitomas anaplásicos (62%), oligoastrocitomas anaplásicos (75%), oligodendrogliomas anaplásicos (50%), glioblastomas secundários (67%) e menos frequentes em glioblastomas primários<sup>35, 67, 68</sup>. Estudos indicam que as mutações envolvendo ambos os genes ocorrem exclusivamente em heterozigose e estão relacionadas ao melhor prognóstico dos pacientes<sup>25, 65, 67</sup>.



### **1.5.2.5 H3F3A**

O gene *H3F3A* (*H3 histone Family 3A*) ou H3.3 é um dos dois genes responsáveis pela síntese da histona variante H3.3. Está mapeado no braço longo do cromossomo 1 (1q41)<sup>45, 46, 70</sup>. A proteína H3.3 é altamente expressa no início do desenvolvimento e tem a função de reprogramar o genoma paterno em óvulos fertilizados<sup>47</sup>.

Mutações somáticas envolvendo este gene tem sido amplamente relacionadas à biogênese de glioblastomas pediátricos (44%), e são associadas, em geral, a dois códons específicos K27 e G34, respectivamente à repressão e ativação da transcrição<sup>6, 47</sup>.

### **1.5.2.6 FGFR1**

O gene *FGFR1* (*Fibroblast growth factor receptor 1*) está localizado no braço curto do cromossomo 8 (8p12). *FGFR1* é um dos receptores dos fatores de crescimento de fibroblastos *FGFs* (*fibroblast growth factors*), os quais estão envolvidos em processos biológicos fundamentais, tais como proliferação, diferenciação, sobrevivência e migração celular, além de reparo e angiogênese em adultos. É um receptor tirosina quinase envolvido com o crescimento de diversos tumores, incluindo o glioblastoma<sup>71</sup>.

Mutações pontuais somáticas neste gene envolvendo os aminoácidos da proteína *FGFR1* N546K e R576W foram encontradas em glioblastomas<sup>48</sup>. Segundo os mesmos autores, estas mutações ocorrem em glioblastomas que não apresentam mutações no gene *EGFR* (alteração mais frequentemente encontrada neste subtipo tumoral), sugerindo eventos mutuamente exclusivos<sup>48</sup>. Estudos recentes apontam a duplicação deste gene em pacientes com glioblastomas, em especial em crianças e adultos jovens<sup>49</sup>.

## 2. JUSTIFICATIVA

Devido ao alto índice de mortalidade em pacientes com gliomas, é fundamental compreender os seus mecanismos biológicos de forma a encontrar novas e efetivas terapias. Nesse sentido, há necessidade de desenvolver ferramentas, onde as linhagens celulares ocupam um papel de destaque. Este estudo permite a realização de distintas manipulações genéticas, que podem contribuir para o esclarecimento da biologia tumoral, com a qual pode ser desvendado o efeito biológico da expressão aumentada ou perda de expressão de um determinado gene associado ao câncer. A utilização de linhagens celulares permite testar diferentes ensaios para avaliar a eficácia de fármacos para cada tipo tumoral. O modelo mais frequentemente utilizado é de linhagens tumorais comerciais, que apesar das imensas vantagens, possuem alterações moleculares artefatuais decorrentes da sua condição de imortalização. Uma alternativa a esta condição, é o estabelecimento e o estudo de culturas tumorais primárias, que mais se assemelham ao tumor primário, ou seja, mantêm as alterações cromossômicas e gênicas “originais” presentes no tecido neoplásico do paciente.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

O objetivo geral deste projeto é estabelecer e caracterizar culturas primárias de glioblastomas.

#### 3.2. Objetivos Específicos

- Estabelecer culturas tumorais primárias.
- Caracterizar fenotipicamente as culturas primárias, utilizando marcador de linhagem glial (GFAP).
- Caracterizar as alterações citogenéticas das culturas primárias.
- Caracterizar o perfil mutacional dos genes *TP53*, *PTEN*, *BRAF*, *IDH1*, *IDH2*, *H3F3A* e *FGFR1*.
- Correlacionar as alterações citogenéticas e o perfil mutacional das culturas primárias com as alterações presentes no tumor primário.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. População de Estudo

Análise de amostras de pacientes com diagnóstico de glioblastoma (grau IV - OMS), submetidos a neurocirurgia no Hospital de Câncer de Barretos, diagnosticados entre Fevereiro de 2011 a Dezembro de 2012. Todos pacientes inseridos no estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo I), sendo o estudo previamente aprovado pela Comitê de Ética e Pesquisa (CEP - 491/2011). A inclusão dos pacientes foi feita no momento de cada cirurgia pela equipe médica, previamente ao diagnóstico histopatológico do tumor e após a separação de amostras para os departamentos de Patologia e CrioBio (Banco de Tumores) do Hospital de Câncer de Barretos.

### 4.2. Cultura Celular

A amostra remanescente de tecido tumoral de cada paciente com diagnóstico imageológico e clínico de glioma, foi embebida em PBS 1X (*Phosphate-buffered saline*) e colocada em tubo *Falcon* de 50mL. O material coletado pela equipe da neurocirurgia foi transportado ao Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular (CPOM) do Hospital de Câncer de Barretos. Do fragmento foram retirados os vasos sanguíneos e áreas de necrose, se existentes e em seguida, o material foi gentilmente macerado, dissociado mecanicamente e enzimaticamente, utilizando a enzima tripsina (Sigma) em um período máximo de 30 minutos e colocado em frasco de cultura T25, ao qual foi adicionado meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* - Sigma) suplementado com 10% SBF (soro bovino fetal – *Fetal Bovine Serum* - Sigma) e 1% PS (*Penicillin-Streptomycin* – Invitrogen). As amostras foram então incubadas em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C, até as células crescerem e se tornarem confluentes, processo que demorou entre uma semana e 10 dias. Após este período, às células confluentes foi adicionado 500uL tripsina (Sigma) por 5 minutos, com o intuito que as mesmas desagregassem do frasco de cultura e fossem transferidas para novos frascos T25 contendo 5mL de meio de cultura, caracterizando a 1ª passagem (1P). Este processo foi repetido até que as células atingissem a 3ª passagem (3P). Após o crescimento e confluência das células em 3P, elas foram de novo dissociadas

enzimaticamente pela enzima tripsina (Sigma) e transferidas para novos frascos para caracterização citogenética e molecular e, posteriormente congeladas em nitrogênio líquido para futuros estudos de caracterização biológica e de resposta terapêutica. A caracterização citogenética e molecular foi realizada entre as 3ª e 5ª passagens (3P e 5P).

A linhagem glial comercial GAMG, obtida do DSZM (*German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Alemanha*), foi utilizada como controle. A manutenção desta linhagem foi, também, realizada em meio DMEM suplementado com 10% SFB e 1%PS, em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C.

### **4.3. Caracterização Celular**

#### **4.3.1. Padrão de Crescimento**

Para determinar a atividade proliferativa das amostras de tumores primários em cultura, foi observado o tempo em que as células levaram para se tornarem confluentes (TUC = *time until confluency*) a partir do repique das células em frasco T25 sob as condições de cultura previamente descrita.

#### **4.3.2. Perfil Fenotípico**

A determinação fenotípica de cada linhagem celular foi realizada pela técnica de imunocitoquímica, na qual foi avaliada a expressão do marcador específico dos tumores gliais primários (GFAP).

Resumidamente, um frasco T25 de cultura primária com 80 a 90% de confluência foi dissociado enzimaticamente pela enzima tripsina (Sigma) conforme previamente descrito no item 4.2 Cultura Celular. Após completa dissociação das células observada em microscópio óptico invertido, a enzima foi inativada pela adição de meio DMEM suplementado com 10% SFB e 1% PS. Em seguida, 2mL do meio contendo  $1,0 \times 10^6$  células foram plaqueadas em lamínulas circulares de 15mm em placas estéreis de 6 poços e incubadas em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>, à 37°C. Ao atingirem confluência de 90 a 100%, o meio de cultura foi retirado, as células foram lavadas com PBS 1X e rapidamente fixadas em paraformaldeído 4% (Merck) por 15 minutos para preservação da morfologia celular. As células fixadas foram novamente lavadas em PBS 1X e permeabilizadas com Triton X-100 (0,2%) (Merck) por 4 minutos. Em seguida, as peroxidases endógenas foram inativadas com

peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Merck) 3% (em metanol) e as fosfatases e biotina endógenas foram inativadas com o reagente UVBlock (*Thermo Scientific*) por 10 minutos cada para evitar reações inespecíficas. Após o bloqueio, as lamínulas contendo as células aderidas foram incubadas com anticorpo primário específico (GFAP - 1:1000 (Dako)) por 1 hora à temperatura ambiente em câmara úmida e escura. Seguido à incubação do anticorpo primário, as células foram incubadas com anticorpo secundário polivalente, estreptoavidina-peroxidase (*Thermo Scientific*) e detectada por diaminobenzidina (DAB - DAKO) e, por fim, contra-coradas com hematoxilina.

#### **4.4. Caracterização das Alterações Citogenéticas**

A caracterização das alterações citogenéticas foi realizada através de duas técnicas: análise cariotípica e a-CGH.

##### **4.4.1. Análise Cariotípica**

A análise do cariótipo foi realizada conforme descrito por Krupp *et al*, seguindo a nomenclatura *An International System of Cytogenetic Nomenclature (ISCN)*<sup>37</sup>. A detecção das alterações cromossômicas foi realizada pela análise do padrão de bandamento GTG (*G-banding*). O método padronizado pelo nosso grupo de estudo está detalhadamente descrito a seguir.

Dois frascos T25 (3-5P) de cultura celular com 90 a 100% de confluência foram dissociados enzimaticamente conforme previamente descrito no item 4.2 Cultura Celular. Após completa dissociação das células observada em microscópio óptico invertido, a enzima foi inativada pela adição de meio DMEM suplementado com 10% SFB e 1% PS. As células foram gentilmente ressuspensas e transferidas para tubo *Falcon* de 15mL. O procedimento de obtenção de culturas para análise cariotípica foi realizado em duplicata.

Em seguida, a suspensão de células foi centrifugada à 900 rpm por 5 minutos e todo o sobrenadante foi descartado. O pellet foi ressuspensado em 5mL de meio RPMI 1640 (Gibco) também suplementado com 10% de soro bovino fetal e 1% de estroptomicina-penicilina e 0,0016% de colchicina e incubado em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C por 2h e 5 minutos para obtenção das células em metáfases. À suspensão de células foi adicionado de 3 a 5mL de solução hipotônica KCl 0.075M (cloreto de potássio), por 5 minutos a 37°C para

completa lise da membrana nuclear. Em seguida, os cromossomos em metáfase da suspensão de células foram fixados pela adição de 3 a 5mL de 5 soluções de metanol/ácido acético 3:1. A cada troca do fixador, a suspensão celular foi centrifugada por 10 minutos à 900 rpm. Por fim, a suspensão foi mantida em 0,3mL de fixador até a preparação das lâminas.

Previamente à preparação das lâminas para o bandamento GTG, uma lâmina teste foi preparada com 25µL da suspensão de células fixadas e corada por Giemsa para confirmação da presença de metáfase. Quando a quantidade de metáfases era satisfatória (3-5 metáfase por lâmina), a preparação das lâminas (média 15 lâminas por frasco) contendo as preparações cromossômicas foi seguido. Quando a obtenção de metáfases foi insuficiente ou de má qualidade, o material foi desprezado e o procedimento reiniciado.

Da mesma forma como na preparação lâmina teste, 25µL da suspensão de células fixadas foram gotejadas em lâminas previamente limpas. As lâminas foram envelhecidas em temperatura ambiente por 48h e por 16h no equipamento *ThermoBrite* a 75°C. Em seguida, as lâminas foram tripsinizadas e coradas por Giemsa para obtenção das bandas cromossômicas. As metáfases foram capturas pelo sistema de imagem Case Data Manager.

#### **4.4.2.a-CGH**

A detecção das alterações no número de cópias do DNA pela técnica de a-CGH utilizada por nosso grupo de estudo seguiu as recomendações do fabricante *Agilent Technologies* (versão 7.1). Como DNA de referência para cada experimento, foi utilizado DNA controle universal (*Promega Madison WI USA – Male Reference: G147A; Woman Reference: G152A*). As amostras tumorais foram marcadas com cianina 5 (Cy-5) e o DNA de referência foi marcado com cianina 3 (Cy-3). Cada amostra foi hibridizada na plataforma *Agilent Human Genome CGH 8 x 60K Microarray Slides*. Esta plataforma contém aproximadamente 60.000 oligonucleotídeos (60K), cobrindo grande parte do genoma humano. As lâminas foram escaneadas pelo *Scanner Agilent (SureScan Microarray Scanner – Agilent Technologies)* conforme as recomendações do fabricante e decodificadas pelo *software Feature Extraction (v. 10.7, Agilent Technologies)*, utilizando o protocolo CGH\_1100\_Jul11. Em seguida, os arquivos.txt gerados pelo *software Feature Extraction* foram importados para um *script* escrito em linguagem R para análise de bioinformática. O Log2 da razão das intensidades tumoral/controle foi calculado, assim como a média dos pontos (*spots*) replicados de cada

*array*. A normalização entre os *arrays*, para que fossem comparáveis entre si, foi feita por *Lowess*, os valores *outliers* foram filtrados por *smoothing* e recalculados de acordo com os *spots* vizinhos representados no genoma. Todas estas ferramentas pertencem ao pacote *DNAcopy* (Venkatraman E. Seshan and Adam Olsen. *DNAcopy: DNA copy number data analysis. R package version 1.28.0*). Foram consideradas como ganhos ou perdas cromossômicas as regiões em que o Log2 da razão de pelo menos 5 sondas consecutivas foram maiores que 0.1 ou menores que -0.1. Como ampliações ou deleções foram considerados quando Log2 da razão foi maior que 0.7 ou menor que -0.7, respectivamente.

Para a realização da técnica, um frasco T25 de cultura celular com 80 a 90% de confluência em 3P foi dissociado enzimaticamente pela enzima tripsina (Sigma) conforme previamente descrito no item 4.2 Cultura Celular. Após completa dissociação das células observada em microscópio óptico invertido, a enzima foi inativada pela adição de meio DMEM suplementado com 10% SFB e 1% PS e a suspensão de células foi gentilmente ressuspendida e transferida para um tubo Falcon de 15mL. Em seguida, a suspensão contendo as células de interesse foi centrifugada à 900 rpm por 5 minutos e todo o sobrenadante foi descartado. O pellet celular foi ressuspendido com 1mL de PBS 1X estéril, homogeneizado e novamente centrifugado à 900 rpm por 5 minutos para que todo o meio de cultura fosse retirado da amostra. O PBS 1X foi completamente retirado, com cuidado para que não houvesse ressuspendição do pellet celular e perda de material. Imediatamente, o pellet foi ressuspendido com 1mL de meio DMEM suplementado com 10% SFB e 1% PS para análise da viabilidade e contagem das células e, então, extração do DNA. Quando o procedimento de extração de DNA não foi seguido de imediato, o pellet foi armazenado à -80°C, podendo assim permanecer por tempo indeterminado. Foram aceitas como satisfatórias as suspensões celulares contendo acima de 80% de células vivas, e o número mínimo de células igual a  $1,0 \times 10^6$ .

Após análise de viabilidade e contagem de células, a suspensão foi novamente centrifugada à 900 rpm por 5 minutos e ao pellet celular foi adicionado 1mL de TRizol® Reagent (*Life Technologies*), homogeneizando cuidadosamente com a pipeta por 30x e, em seguida, por inversão por 15 minutos para que toda a membrana fosse lisada e o material genético exposto. Após a etapa de lise, foi adicionado 200µL de NaCl (Cloreto de Sódio - Sigma) 0,9% estéril e 200µL de clorofórmio (Merck), homogeneizado vigorosamente por inversão e centrifugado à 13.000rpm por 15 minutos em centrífuga previamente refrigerada



à 4°C. Esta primeira centrifugação promoveu a separação da amostra em 3 fases: fase aquosa, superior, contendo RNA (ácido ribonucléico), interfase intermediária e a fase vermelha ou orgânica, inferior, contendo o DNA. A retirada de toda a fase aquosa sem qualquer contato com a interfase e fase orgânica foi o segundo passo crítico para a obtenção de um DNA de alta qualidade e pureza.

Após a remoção da fase aquosa, adicionou-se 300µL de etanol (ETOH) absoluto (Merck), homogeneizando vigorosamente por inversão, seguido de nova incubação por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, centrifugou-se à 3000rpm por 5 minutos a 4°C e todo o sobrenadante foi desprezado. Ao pellet, foi adicionado 1,5mL de 0,1M de citrato de sódio em ETOH 10% e incubou-se por 30 minutos à temperatura ambiente, com agitação a cada 10 min e nova centrifugação a 3000rpm por 5 minutos a 4°C. Esta etapa de precipitação do DNA foi repetida duas vezes para aumentar a concentração final do material obtido. Após precipitado, o DNA foi lavado com ETOH 75% para remoção dos reagentes químicos utilizados no processo de extração e então, ressuscitado em 50µL de H<sub>2</sub>O<sub>UP</sub>. O pellet foi gentilmente ressuscitado e incubado a 37°C por 30 minutos e por fim, quantificado no equipamento NanoDrop (ThermoScientific).

Após a extração do DNA, 600ng de DNA foi digerido com Master Mix de Digestão composto por água ultra pura, tampão de enzima de restrição (*10X Restriction Enzyme Buffer* - Promega), soro de albumina bovina (SAB – BSA, Promega), *Alu I* (Promega) e *Rsa I* (Promega), incubado com iniciadores randômicos (*Random Primers*) e marcado com cianina 5 (Cy-5). O DNA controle ou de referência seguiu o mesmo protocolo, sendo marcado com cianina 3 (Cy-3). Em seguida, cada reação foi purificada em colunas Agilent-KREApure. A precipitação foi feita com *Agilent 10X Blocking Agent* e *Agilent 2X Hybridization Solution* (Agilent Technologies). Então, as amostras foram hibridizadas ao *Agilent Human Genome CGH 8 x 60K Microarray*, com aproximadamente 60.000 oligonucleotídeos durante 40 horas.

Em seguida à hibridização, as lâminas foram lavadas e escaneadas utilizando o *software Feature Extraction* (v. 10.7, Agilent). Análise dos resultados foi realizada conforme descrito acima.

#### 4.5. Análise de mutações dos genes *TP53*, *PTEN*, *BRAF*, *IDH1*, *IDH2*, *H3F3A* e *FGFR1*

##### 4.5.1. Extração de DNA

A extração do DNA das culturas primárias e linhagem celular tumoral foi realizada a partir de  $1,0 \times 10^6$  células. O DNA foi extraído pelo método de Trizol (*Life Technologies*) conforme previamente descrito no item 4.4.2 a-CGH.

A extração DNA do tecido tumoral foi realizado no Departamento CriBio pelo kit *DNA QIAamp DNA MicroKit (Qiagen)* seguindo o protocolo do fabricante. Previamente a extração do DNA, as amostras de tecido foram revisadas por um patologista garantindo a presença de células tumoral e ausência de necrose.

Todas as amostras de DNA foram quantificadas no equipamento NanoDrop®2000 (*ThermoScientific*).

##### 4.5.2. Amplificação pela técnica de PCR e sequenciamento direto dos genes *TP53*, *PTEN*, *BRAF*, *IDH1*, *IDH2*, *H3F3A* e *FGFR1*

O DNA extraído foi amplificado pela técnica de PCR. Todas as reações foram padronizadas para volume final de 15µL, seguindo o protocolo: 1X tampão incompleto, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 200µM dNTP, 0,3µM de cada *primer*, 0,5U da enzima *Platinum® Taq DNA Polymerase* e 50ng/µL de DNA. A temperatura de anelamento variou (52 a 62°C) de acordo com o exon a ser amplificado e todas as reações foram submetidas por 40 ciclos a 96°C/45 segundos, temperatura de anelamento/45 segundos, 72°C/45 segundos com denaturação inicial (96°C) de 15 minutos e extensão final (72°C) de 10 minutos. Os *primers* ou iniciadores utilizados foram previamente descritos para os genes *TP53* (exons 5-8)<sup>72</sup>, *PTEN* (exons 1-9)<sup>72</sup>, *BRAF* (exon 15)<sup>73</sup>, *IDH-1* (exon 4), *IDH-2* (exon 4)<sup>74</sup>, *H3F3A* (exon 1)<sup>75</sup>. Os primers do gene *FGFR1* foram desenhados pelo nosso grupo - Ex12\_Fw: 5'-TCAAGTCCCAGGGAAAAGCAG-3', Ex12\_Rv : 5'-AGGCCTTGGGACTGATACCC-3'; Ex14\_Fw : 5'-GACAAGTCGGCTAGTTGCAT-3', Ex14\_Rv : 5'-CCCACTCCTTGCTTCTCAGAT-3'.

Os produtos de PCR foram posteriormente purificados pela enzima *ExoSap-IT* (*Affymetrix*) e sequenciados, utilizando o sequenciador *ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*), segundo o protocolo do fabricante. A purificação dos produtos da reação de sequenciamento foi realizada segundo protocolo EDTA/acetato de sódio/etanol conforme instrução do fornecedor. As sequências foram analisadas pelo software *SeqScape*

(Life Technologies) e a caracterização do perfil mutação de cada fragmento em selvagem ou mutante foi realizada em comparação com a sequência original de cada gene proveniente no banco de dados *GeneBank* (*TP53*: ENSG00000141510; *PTEN*: ENSG00000171862; *BRAF*: ENSG00000157764; *IDH1*: ENSG00000138413; *IDH2*: ENSG00000182054; *H3F3A*: ENSG00000163041; *FGFR1*: ENSG00000077782).

#### 4.6. Análise Estatística

As alterações citogenéticas, o perfil mutacional das culturas primárias e seus respectivos tumores primários e os dados clínico-patológicos (idade, sexo, localização do tumor, KPS (*Karnofsky Performance Status*), ressecção, radio e quimioterapia) dos pacientes foram tabulados para análise estatística descritiva, utilizando média, desvio padrão, mínimo e máximo para as variáveis quantitativas e frequências para as variáveis qualitativas.

As alterações citogenéticas e moleculares encontradas nas diferentes culturas primárias foram correlacionadas entre si, e com as alterações presentes no tumor primário. A partir dos resultados obtidos pela técnica de a-CGH foi realizada uma análise hierárquica não supervisionada de *clusters* de todas as amostras utilizando o *script R*. Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa SPSS para Windows, versão 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Método de Estabelecimento

O protocolo de estabelecimento das culturas primárias foi padronizado e otimizado pelo nosso grupo de estudo. Durante o período de Fevereiro de 2011 à Dezembro de 2012 foram processadas 84 amostras de tumores cerebrais, sendo 67 (79.8%) diagnosticadas com um dos subtipos de gliomas. Das 67 amostras de gliomas submetidas ao nosso protocolo de estabelecimento, 36 (53,73%) tiveram sucesso no estabelecimento. Das 36 culturas primárias estabelecidas com sucesso, 5 amostras de glioblastomas foram posteriormente selecionadas para caracterização citogenética e molecular. A seleção das 5 culturas foi baseada no seu padrão de crescimento e viabilidade das células.

Sob as condições de estabelecimento descritas em Material e Métodos, as células em cultura formaram uma monocamada com morfologia homogênea, no entanto, sem nenhuma característica fibroblástica (Figura 8A). O padrão de crescimento das amostras do processamento do tumor até a primeira passagem foi o mesmo para todas as culturas com tempo de crescimento de 7 a 10 dias (TUC). Após este período, vários testes foram realizados para encontrar o tempo ideal de troca do meio (manutenção das culturas) e passagem de subcultura das células em novas passagens. Relativamente a troca do meio de cultura, foi comparada a troca de dois em dois dias, três em três dias até cinco em cinco dias e foi verificado que o prazo ideal para manutenção das culturas foi de 48-72h, mantendo sempre o mesmo horário. Além do tempo de troca, a quantidade de meio também foi outro aspecto importante no processo de estabelecimento das células. Foi verificado que quando um residual (20%) do meio já metabolizado pelas células era mantido no frasco de cultura as células cresciam com maior rapidez. A subcultura foi realizada quando a cultura apresentava de 80 a 90% de confluência após ter sido observado que quando as células atingiam 100% de confluência, havia muita morte celular, enfraquecendo assim a cultura primária.

Após serem estabelecidas até a 3<sup>a</sup> passagem (3P), uma alíquota de cada cultura celular foi congelada à -80°C e posteriormente, em nitrogênio líquido, possibilitando estudos futuros.

A linhagem celular GAMG também foi cultivada em meio DMEM suplementado com 10% SBF e 1% PS conforme instrução do fabricante. A manutenção foi realizada a cada 24h,

com subcultura a cada 48h até atingir a 3ª passagem (3P). Alíquotas de cada passagem também foram congeladas à -80°C e posteriormente, em nitrogênio líquido.

## **5.2. Caracterização Clínico-patológica**

O material do presente estudo foi composto de 5 amostras de glioblastomas provenientes de 5 pacientes selecionados no Hospital de Câncer de Barretos (HCB) – Fundação Pio XII. Os dados clínico-patológicos das pacientes inseridos no estudo foram adquiridos pela análise de prontuários no Serviço de Arquivos Médicos e Estatística (SAME) do Hospital de Câncer de Barretos. As variáveis localização do tumor, KPS (*Karnofsky Performance Status*), ressecção, recidiva do tumor, status dos pacientes, radioterapia e quimioterapia estão apresentadas na Tabela 3.

A média de idade dos pacientes inseridos neste estudo foi de 58 anos (49-65), sendo 60% do sexo feminino.

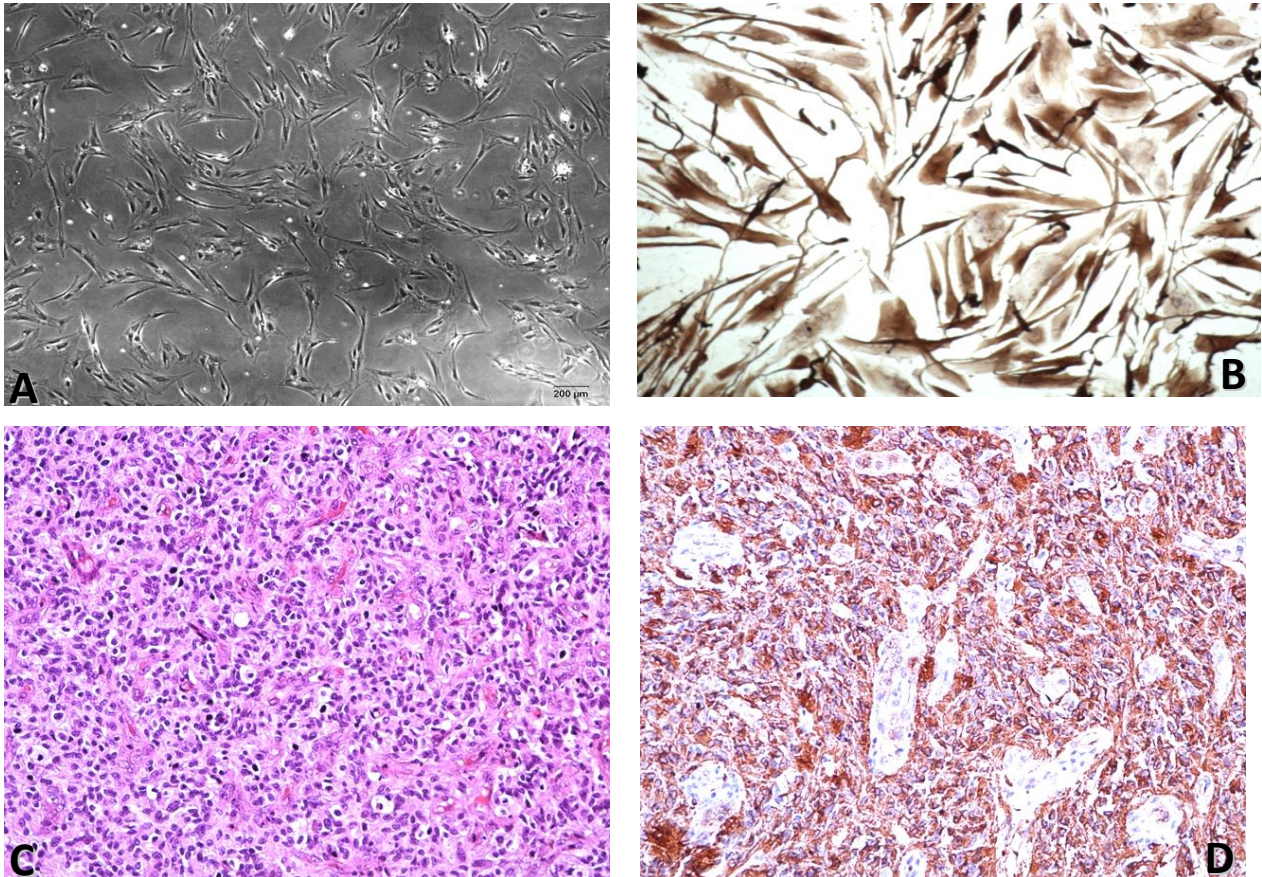
**Tabela 3:** Dados clínico-patológicos das culturas primárias e linhagem comercial de glioblastomas

ID	Idade (anos)	Sexo	Localização do tumor	Classificação	KPS	Ressecção	Recidiva	RT	QT	Status (Agosto 2013)
HCB2	49	M	Parietal esquerdo	Primário	100	Total	Sim	Sim	Sim	Vivo com doença
HCB29	54	F	Parietal esquerdo	Primário	90	Parcial	Não	Não	Não	Vivo com doença
HCB40	61	F	Temporal esquerdo	Primário	50	Parcial	Não	Não	Não	Óbito por câncer
HCB144	65	F	Parietal esquerdo	Primário	80	Total	Não	Não	Não	Óbito por câncer
HCB151	65	M	Temporo-parietal esquerdo	Primário	80	Total	Não	Sim	Não	Óbito por câncer
GAMG	42	F	-	-	-	-	-	-	-	-

ID : Identificação das culturas primárias ; M : masculino ; F : feminino ; OMS : Organização Mundial de Saúde ; KPS : Karnofsky Performance Status ; RT : radioterapia ; QT : quimioterapia.

### 5.3. Caracterização Fenotípica das Culturas Primárias

Após o estabelecimento das culturas primárias, as mesmas foram caracterizadas fenotipicamente pela técnica de imunocitoquímica. Todas as culturas, primárias e estabelecidas, foram submetidas ao procedimento utilizando o marcador específico de linhagem glial GFAP, assim como suas respectivas amostras tumorais (Figura 9).



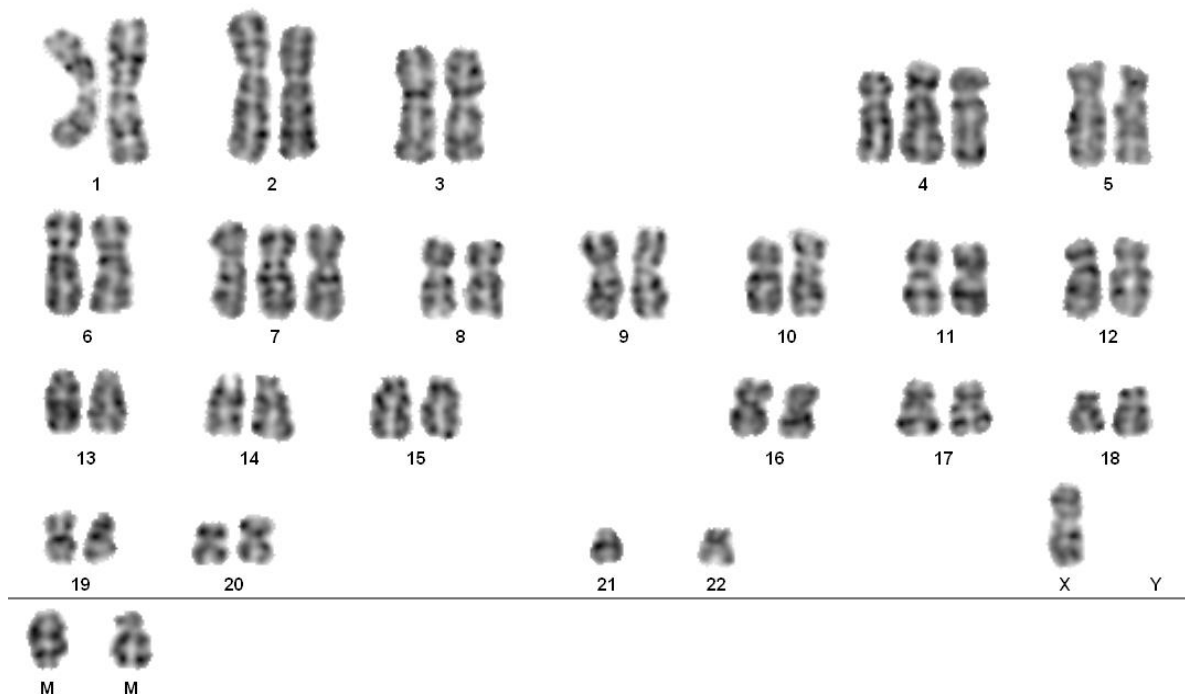
**Figura 9:** Imagem representativa de cultura primária HCB-2, tumor primário e marcação de anticorpos específicos. Em A, a figura mostra a cultura primária em meio DMEM suplementado com 10% SBF e 1% PS (imagem obtida em microscópio óptico invertido – 40X). Em B observa-se a marcação de GFAP (proteína glial fibrilar ácida (*glial fibrillary acidic protein*) pela técnica de imunocitoquímica. Em C, a imagem representa a coloração por HE do tecido tumoral primário e em D, a marcação de GFAP pela técnica de imunohistoquímica. As imagens B,C e D foram obtidas em microscópio óptico Olympus (100X).

#### 5.4. Caracterização das Alterações Citogenéticas

Para a caracterização das alterações cromossômicas duas técnicas foram empregadas: o cariótipo por bandamento GTG e a-CGH. Dado o objetivo de fazer uma análise com elevada resolução das alterações cromossômicas das culturas primárias estabelecidas, a técnica de a-CGH foi realizada em todas as linhagens, enquanto que cariótipo convencional foi realizado em apenas duas culturas primárias (HCB-2 e HCB-151). Para efeitos de comparação, o a-CGH foi também realizado em todos os tumores primários e na linhagem estabelecida (GAMG).

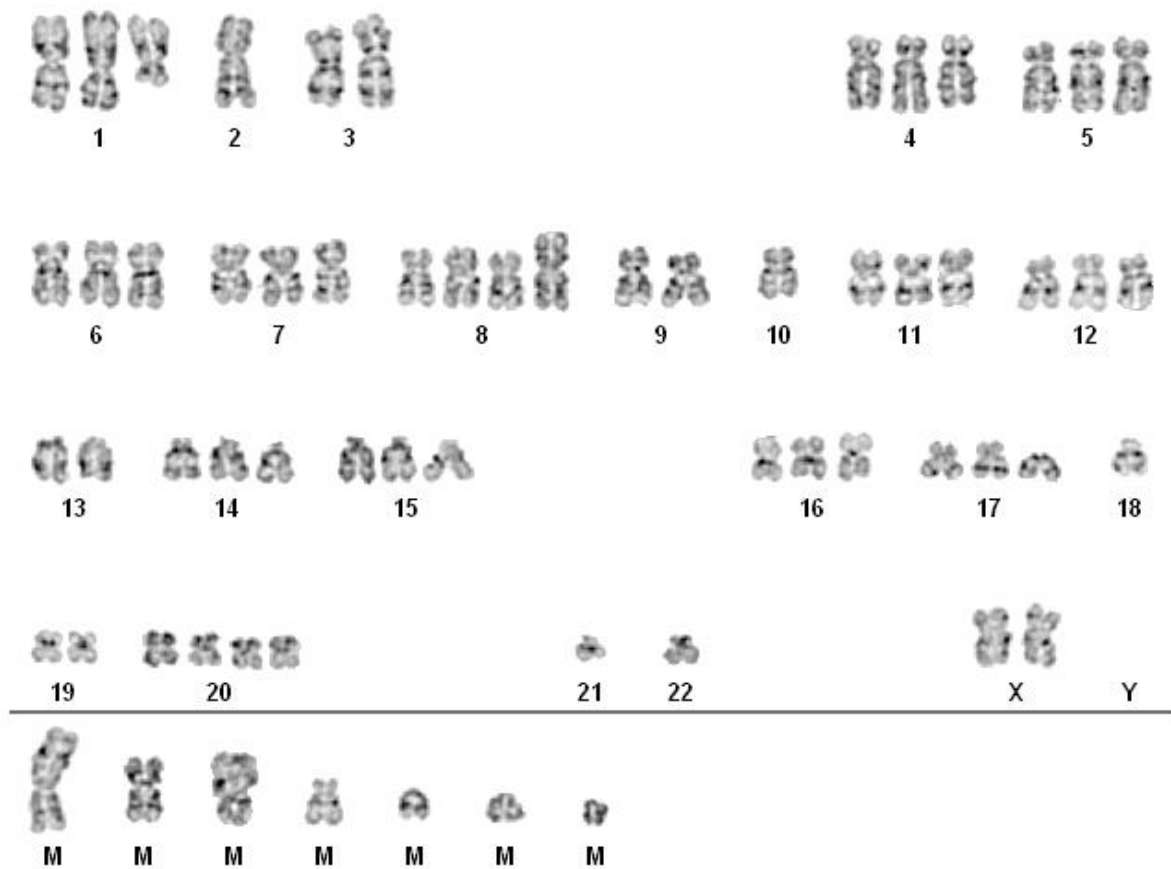
##### 5.4.1. Análise Cariotípica

Duas culturas primárias (HCB2 e HCB151) e a linhagem tumoral imortalizada GAMG foram avaliadas pela técnica do cariótipo convencional. As figuras 10 e 11 exemplificam uma metáfase de uma cultura primária (HCB2) e uma linhagem estabelecida (GAMG), respectivamente.



**Figura 10** – Análise cariotípica por banda G da cultura primária HCB-2. Imagem obtida pelo *software Case Data Manager* (100X). O cariótipo mostra 47, X, +4, +7, -21, -22, +2mar [1]. – (monossomia), + (trissomia), mar (cromossomo marcador).





**Figura 11** – Análise cariotípica por banda G da cultura tumoral imortalizada GAMG. Imagem obtida pelo *software Case Data Manager* (100X). O cariótipo mostra 63, XX, +1, del 1q21, -2, +4, +5, +6, +7, +8, +8, i(8), -10, +11, +12, +14, +15, +16, +17, del 17p13, -18, +20, +20, -21, -22, +7 mar [1]. + (trissomia), t (translocação), q (braço longo do cromossomo), inv (inversão), mar (cromossomo marcador).

Os cariótipos das 3 culturas analisadas pela técnica do cariótipo estão apresentados na Tabela 4. Vale notar que o cariótipo da cultura primária HCB2 foi concluído com apenas 9 das metáfases, enquanto nas demais culturas (HCB151 e GAMG) o cariótipo foi concluído com 20 metáfases cada um.

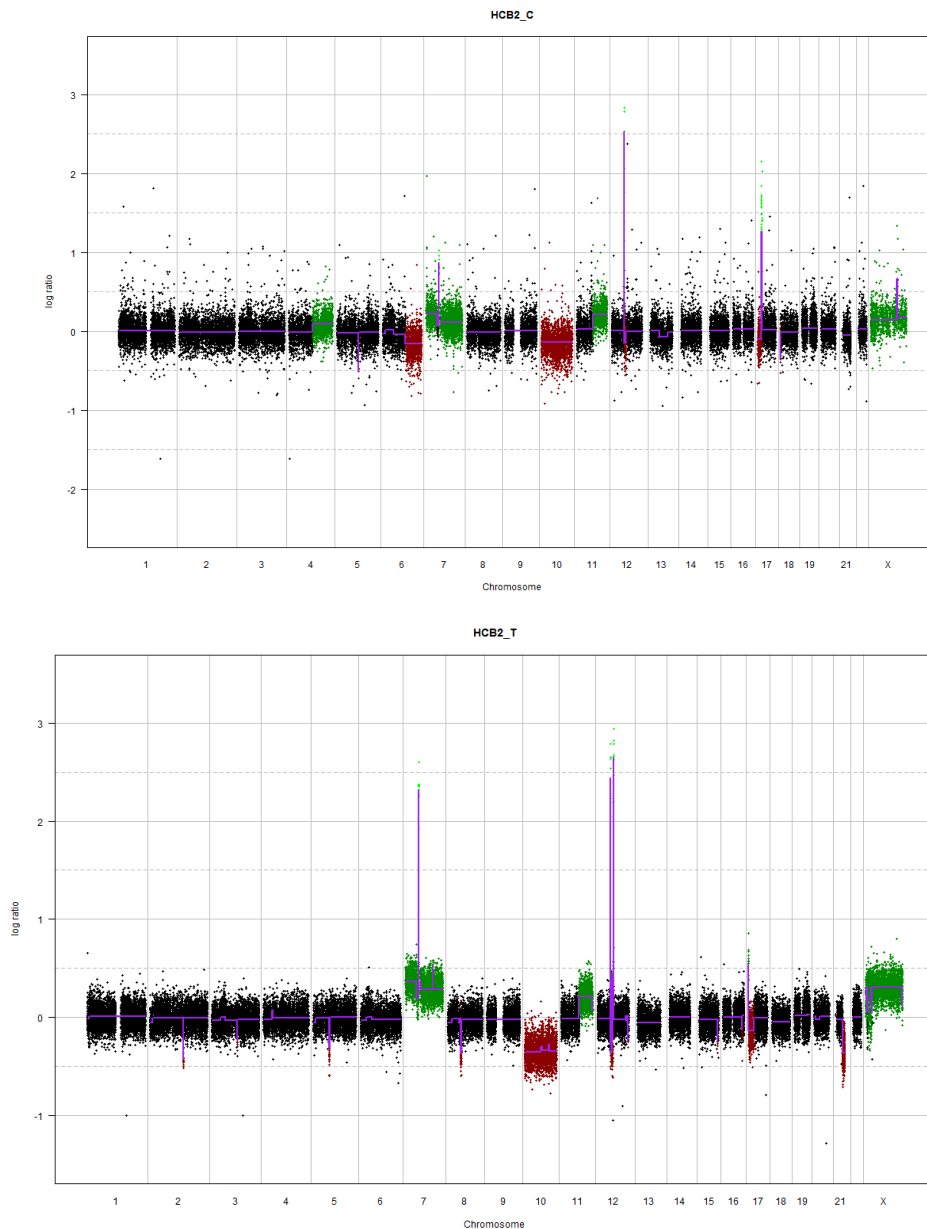
**Tabela 4** – Resultados das alterações citogenéticas das culturas gliais pela análise cariotípica.

ID	Cariótipo
HCB-2	45≈48,XXY,XX,-X,del(3)(p?),+7,-19,-21,+22,+mar[cp9]
HCB-151	55≈68, XX, +1, +2, +3,+3, +4, +4, +5, +5, +6, +6, +7, +7, +7, +8, +8, +8, +9, +9, +9, +10, +10, +10, +11, +11, del (11)(q22), +12, +12, +12,+13, +14, +15, +16, -17, +18, +18, +18, -19, +19, +20, +21, +21, +22, +22, +mar [cp20]
GAMG	59≈125, XX, +1, +1, +1, t(1;10)(q12;q11), +2, +2, +2, +3, t(3;9)(q26.1;p23), +4, +4,+5, +5, +6, +6, +6, +7, +7, +8, +9, +10, +11, +11, +11, +12, +12, +13, +14, +14, +15, +15, +15, +16, +16, +16, inv(16), +17, +17, del 17 (p13), -18, +18, +19, +19, +20, +20, +20, +21, +22, +8mar [cp20]

ID: identificação; HCB: cultura primária; Em cinza, cultura estabelecida. Del (deleção); p (braço curto do cromossomo); q (braço longo do cromossomo); mar (cromossomo marcador); t (translocação); der (cromossomo derivativo); inv (inversão); + (trissomia), - (monossomia).

#### 5.4.2. a-CGH

As 5 culturas primárias e seus respectivos tumores primários e 1 linhagem glial estabelecida (GAMG) foram submetidas a análise de a-CGH. A Figura 12 exemplifica um *GenomePlot* típico de nossos resultados. Os demais *GenomePlots* das culturas primárias, seus respectivos tumores primários e da linhagem GAMG estão apresentados no Anexo II.



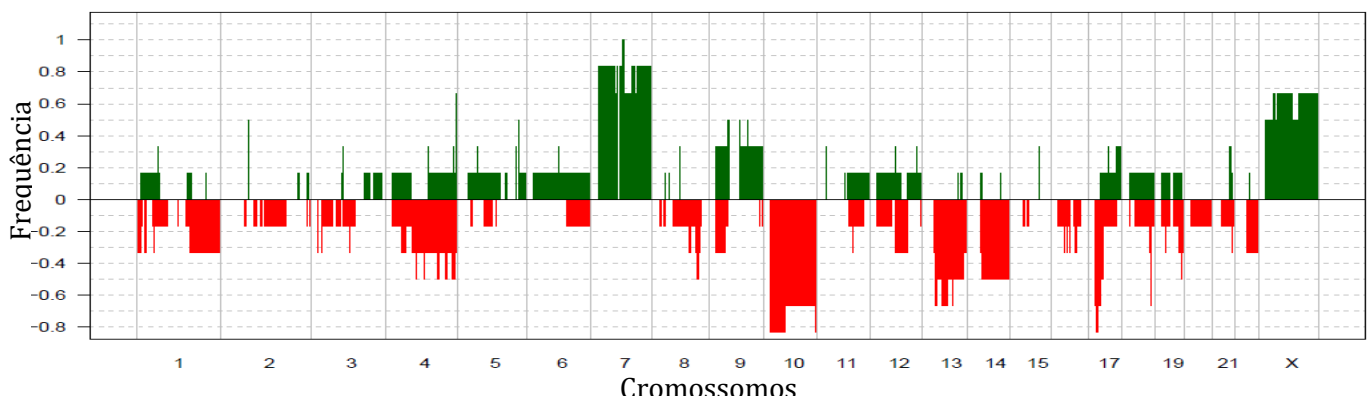
**Figura 12** - Exemplo de um *GenomePlot* (HCB2). O eixo x representa cada um dos cromossomos avaliados (excluindo-se o cromossomo Y) e o eixo y representa o  $\log_2$  da razão da intensidade de DNA tumoral/DNA controle. As regiões cromossômicas em verde representam o ganho cromossômico, enquanto as regiões em vermelho representam a perda. HCB2\_C: cultura primária, HCB2\_T: tumor primário.

O número de alterações do número de cópias dos cromossomos está apresentado na Tabela 5. A maioria das alterações encontradas nas 11 amostras analisadas foi o ganho cromossômico (50%).

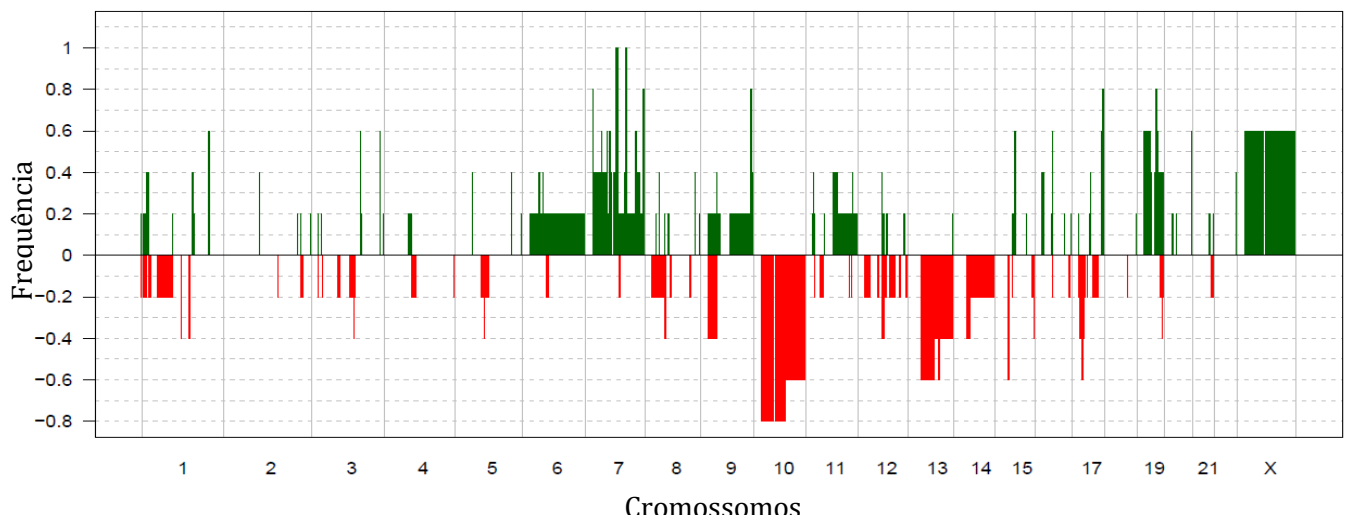
**Tabela 5** – Alterações do número de cópias cromossômicas.

Alterações Cromossômicas	Número de alterações (%)
Ganho	10.539 (50,05%)
Perda	10.392 (49,35%)
Amplificação	102 (0,48%)
Deleção	23 (0,11%)
Total	21.056 (100%)

A análise das alterações cromossômicas presentes nestas culturas primárias mostrou que os eventos mais frequentes ocorrem nos cromossomos 7, 10 e X (60-80%) como apresentado na Figura 13. O ganho do cromossomo 7 esteve presente em mais de 80% das culturas, seguido pelo ganho dos cromossomos X em aproximadamente 70% e 9, em cerca de 30%. A perda dos cromossomos 10 e 17p ocorreram em quase a totalidade das amostras, seguidos pela perda dos cromossomos 13 e 14 (Figura 13).

**Figura 13:** Análise da frequência de ganhos e perdas cromossômicas das culturas primárias.

A mesma análise realizada para os tumores primários evidenciou alterações cromossômicas nos mesmos cromossomos alterados nas culturas primárias. A maior frequência de ganho foi observada nos cromossomos 7 e X, em até 60% dos tumores primários. Em relação a frequência de perdas cromossômicas, os cromossomos 10 e 13 foram os mais alterados (Figura 14).



**Figura 14:** Análise da frequência de ganhos e perdas cromossômicas dos tumores primários.

Tanto nas análises das culturas primárias como nos tumores primários a amplificação da região 7p11 (EGFR) foi o evento mais frequente.

A tabela 6 mostra as principais alterações pontuais (amplificação e deleção) encontrada na análise de todas as amostras.

**Tabela 6:** Principais alterações pontuais (amplificação e deleção) pela análise de aCGH.

Evento	ENSG	Crom.	Início	Fim	Citobanda	Gene	Amostras
	ENSG00000132432	7	54819944	54827667	p11.2	SEC61G	HCB2_T
	ENSG00000146648		55086714	55324313	p11.2	EGFR	HCB2_C, HCB2_T
	ENSG00000065357		56324946	56347805	q13.2	DGKA	HCB2_C
	ENSG00000185664		56347890	56360498	q13.2	SILV	HCB2_C
	ENSG00000123374		56360556	56366565	q13.2	CDK2	HCB2_C
	ENSG00000111540	12	56367862	56388469	q13.2	RAB5B	HCB2_C
	ENSG00000139531		56391043	56399305	q13.2	SUOX	HCB2_C
	ENSG00000123411		56414689	56432219	q13.2	IKZF4	HCB2_C, HCB2_T
	ENSG00000197728		56435686	56438005	q13.2	RPS26	HCB2_C, HCB2_T
Amplificação	ENSG00000141027		15934718	16119010	p11.2	NCOR1	HCB2_C
	ENSG00000108474		16120509	16229561	p11.2	PIGL	HCB2_C
	ENSG00000166582		16245849	16256812	p11.2	CENPV	HCB2_C
	ENSG00000170315		16284367	16287220	p11.2	UBB	HCB2_C
	ENSG00000187688		16318856	16340315	p11.2	TRPV2	HCB2_C
	ENSG00000175061		16342351	16345338	p11.2	C17orf45	HCB2_C
	ENSG00000181350		16345328	16395480	p11.2	C17orf76	HCB2_C
	ENSG00000141040		16453631	16472520	p11.2	ZNF287	HCB2_C
	ENSG00000197566		16524060	16557158	p11.2	ZNF624	HCB2_C
	ENSG00000170160		16593536	16681195	p11.2	CCDC144A	HCB2_C
	ENSG00000131885		16744209	16749250	p11.2	KRT17P1	HCB2_C
	ENSG00000128438		16826229	16875402	p11.2	TNFRSF13B	HCB2_C
	ENSG00000133030	17	16946074	17088874	p11.2	MPRIP	HCB2_C
	ENSG00000214899		17072078	17088887	p11.2	C17orf84	HCB2_C
	ENSG00000179598		17104311	17109632	p11.2	PLD6	HCB2_C
	ENSG00000154803		17115529	17140502	p11.2	FLCN	HCB2_C
	ENSG00000141030		17150141	17184591	p11.2	COPS3	HCB2_C
	ENSG00000205309		17206680	17250975	p11.2	NT5M	HCB2_C
	ENSG00000141026		17380300	17396534	p11.2	MED9	HCB2_C
	ENSG00000108551		17397755	17399707	p11.2	RASD1	HCB2_C
	ENSG00000133027		17408877	17495022	p11.2	PEMT	HCB2_C
	ENSG00000108557		17584787	17714767	p11.2	RAI1	HCB2_C
	ENSG00000223737		17681969	17682391	p11.2	SMCR5	HCB2_C
	ENSG00000072310		17715069	17740325	p11.2	SREBF1	HCB2_C
	ENSG00000175662	17746823	17875784	p11.2	TOM1L2	HCB2_C	
	ENSG00000130881		33685166	33699773	q13.11	LRP3	HCB144_C, HCB144_T
	ENSG00000130876		33699570	33716756	q13.11	SLC7A10	HCB144_C, HCB144_T
	ENSG00000153879		33864609	33873591	q13.11	CEBPG	HCB144_C, HCB144_T
	ENSG00000124299		33877865	34012801	q13.11	PEPD	HCB144_C, HCB144_T
	ENSG00000124302		34112861	34264413	q13.11	CHST8	HCB144_C, HCB144_T
	ENSG00000153885		34287751	34306668	q13.11	KCTD15	HCB144_C, HCB144_T
	ENSG00000105216	19	34663352	34720420	q13.11	LSM14A	HCB144_C, HCB144_T
	ENSG00000166398		34745456	34846471	q13.11	KIAA0355	HCB144_C, HCB144_T
ENSG00000105220	34855815		34891236	q13.11	GPI	HCB144_C, HCB144_T	
ENSG00000126249	34895303		34917070	q13.11	PDCD2L	HCB144_C, HCB144_T	
ENSG00000126261	34919268		34960795	q13.11	UBA2	HCB144_C, HCB144_T	
ENSG00000142279	34971874		34992085	q13.11	WTIP	HCB144_C, HCB144_T	
ENSG00000205209	35084347		35087501	q13.11	SCGBL	HCB144_C, HCB144_T	

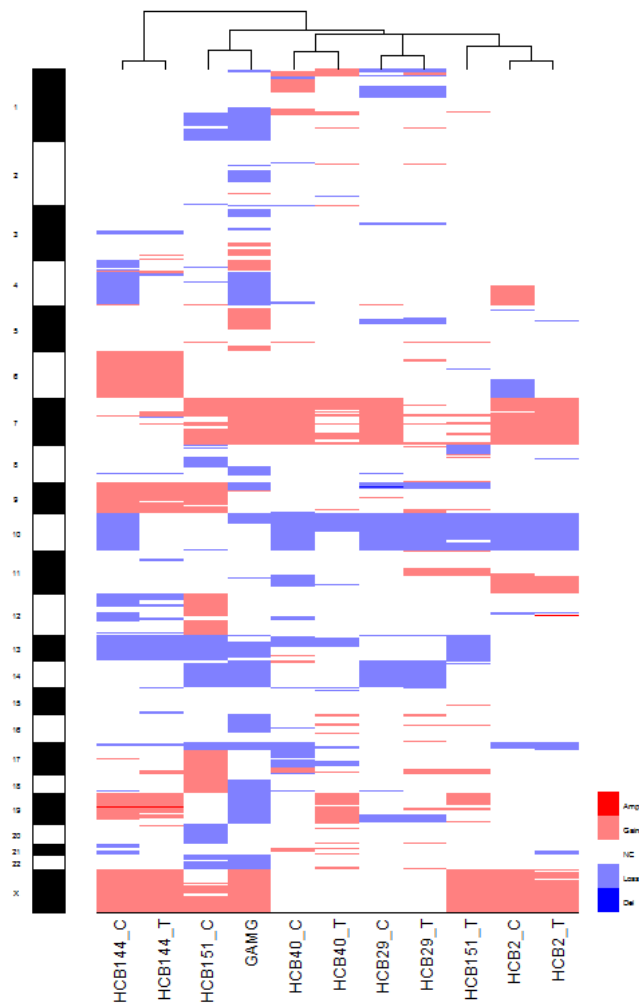
Evento	ENSG	Crom.	Início	Fim	Citobanda	Gene	Amostras
Amplificação	ENSG00000197841	19	35225093	35233774	q13.11	ZNF181	HC144_C, HCB144_T
	ENSG00000153896		35248979	35270385	q13.11	ZNF599	HC144_C, HCB144_T
	ENSG00000168661		35417807	35436074	q13.11	ZNF30	HC144_C, HCB144_T
	ENSG00000180884		35447258	35454953	q13.11	ZNF792	HC144_C, HCB144_T
	ENSG00000089351		35486927	35517373	q13.11	GRAMD1A	HC144_C, HCB144_T
	ENSG00000105711		35521534	35531352	q13.12	SCN1B	HC144_C, HCB144_T
	ENSG00000105707		35531410	35557475	q13.12	HPN	HC144_C, HCB144_T
	ENSG00000089356		35607166	35615227	q13.12	FXVD3	HC144_C, HCB144_T
	ENSG00000153902		35615417	35626178	q13.12	LG14	HC144_C, HCB144_T
	ENSG00000221857		35629728	35634013	q13.12	FXVD1	HC144_C, HCB144_T
	ENSG00000221946		35634154	35645205	q13.12	FXVD7	HC144_C, HCB144_T
	ENSG00000089327		35645627	35660785	q13.12	FXVD5	HC144_C, HCB144_T
	ENSG00000177558		35715706	35719632	q13.12	FAM187B	HC144_C, HCB144_T
	ENSG00000105699		35739559	35758865	q13.12	LSR	HC144_C, HCB144_T
	ENSG00000105698		35759896	35770718	q13.12	USF2	HC144_C, HCB144_T
	ENSG00000105697		35773410	35776046	q13.12	HAMP	HC144_C, HCB144_T
	ENSG00000105695		35783028	35804707	q13.12	MAG	HC144_C, HCB144_T
	ENSG00000012124		35820079	35838262	q13.12	CD22	HC144_C, HCB144_T
	ENSG00000126266		35842455	35843357	q13.12	FFAR1	HC144_C, HCB144_T
	ENSG00000185897		35849488	35851387	q13.12	FFAR3	HC144_C, HCB144_T
	ENSG00000126262		35940617	35941609	q13.12	FFAR2	HC144_C, HCB144_T
	ENSG00000188508		35978228	35981356	q13.12	KRTDAP	HC144_C, HCB144_T
	ENSG00000161249		35988122	36004560	q13.12	DMKN	HC144_C, HCB144_T
	ENSG00000105679		36024314	36036221	q13.12	GAPDHS	HC144_C, HCB144_T
	ENSG00000105677		36036532	36038428	q13.12	TMEM147	HC144_C, HCB144_T
	ENSG00000105675		36041096	36054560	q13.12	ATP4A	HC144_C, HCB144_T
	ENSG00000089336		36103646	36116251	q13.12	HAUS5	HC144_C, HCB144_T
	ENSG00000126254		36119980	36128586	q13.12	RBM42	HC144_C, HCB144_T
	ENSG00000105672		36132647	36135773	q13.12	ETV2	HC144_C, HCB144_T
	ENSG00000126267		36139155	36149683	q13.12	COX6B1	HC144_C, HCB144_T
	ENSG00000105668		36157715	36169367	q13.12	UPK1A	HC144_C, HCB144_T
	ENSG00000011590		36195429	36207940	q13.12	ZBTB32	HC144_C, HCB144_T
	ENSG00000126246		36230153	36233351	q13.12	TMEM149	HC144_C, HCB144_T
	ENSG00000161265		36233430	36236336	q13.12	U2AF1L4	HC144_C, HCB144_T
	ENSG00000205155		36236494	36237903	q13.12	PSENNEN	HC144_C, HCB144_T
	ENSG00000188223		36239499	36245417	q13.12	LIN37	HC144_C, HCB144_T
	ENSG00000004776		36245496	36247959	q13.12	HSPB6	HC144_C, HCB144_T
	ENSG00000167595		36249044	36260077	q13.12	C19orf55	HC144_C, HCB144_T
	ENSG00000004777		36266476	36279724	q13.12	SNX26	HC144_C, HCB144_T
	ENSG00000161270		36290892	36342739	q13.12	PRODH2	HC144_C, HCB144_T
ENSG00000126259	36347810	36358048	q13.12	KIRREL2	HC144_C, HCB144_T		
ENSG00000105290	36359401	36370699	q13.12	APLP1	HC144_C, HCB144_T		
ENSG00000167604	36379143	36393185	q13.12	NFKBID	HC144_C, HCB144_T		
ENSG00000126264	36393382	36395175	q13.12	HCST	HC144_C, HCB144_T		
ENSG00000011600	36395312	36399186	q13.12	TYROBP	HC144_C, HCB144_T		
ENSG00000126243	36427750	36436084	q13.12	LRFN3	HC144_C, HCB144_T		
ENSG00000181392	36494002	36505141	q13.12	C19orf46	HC144_C, HCB144_T		

Evento	ENSG	Crom.	Início	Fim	Citobanda	Gene	Amostras
Amplificação	ENSG00000105270	19	36505562	36523795	q13.12	CLIP3	HCB144_C, HCB144_T
	ENSG00000161277		36525887	36545664	q13.12	THAP8	HCB144_C, HCB144_T
	ENSG00000075702		36545783	36596012	q13.12	WDR62	HCB144_C, HCB144_T
	ENSG00000105258		36604612	36606206	q13.12	POLR2I	HCB144_C, HCB144_T
	ENSG00000105254		36605888	36616849	q13.12	TBCB	HCB144_C, HCB144_T
	ENSG00000126247		36630918	36641254	q13.12	CAPNS1	HCB144_C, HCB144_T
	ENSG00000161281		36641824	36643771	q13.12	COX7A1	HCB144_C, HCB144_T
	ENSG00000196357		36673188	36705986	q13.12	ZNF565	HCB144_C, HCB144_T
Deleção	ENSG00000171843	9	20344968	20622514	p21.3	MLLT3	HCB29_C
	ENSG00000188352		20658308	20995954	p21.3	KIAA1797	HCB29_C
	ENSG00000188921		21006365	21031635	p21.3	PTPLAD2	HCB29_C
	ENSG00000171855		21077104	21077943	p21.3	IFNB1	HCB29_C
	ENSG00000177047		21140631	21142144	p21.3	IFNW1	HCB29_C
	ENSG00000137080		21165636	21166659	p21.3	IFNA21	HCB29_C
	ENSG00000236637		21186617	21187598	p21.3	IFNA4	HCB29_C
	ENSG00000214042		21201468	21202204	p21.3	IFNA7	HCB29_C
	ENSG00000186803		21206180	21207142	p21.3	IFNA10	HCB29_C
	ENSG00000147885		21216372	21217310	p21.3	IFNA16	HCB29_C
	ENSG00000234829		21227254	21228240	p21.3	IFNA17	HCB29_C
	ENSG00000228083		21239201	21239978	p21.3	IFNA14	HCB29_C
	ENSG00000147873		21304325	21305311	p21.3	IFNA5	HCB29_C
	ENSG00000198642		21331018	21335429	p21.3	KLHL9	HCB29_C
	ENSG00000120235		21349834	21351377	p21.3	IFNA6	HCB29_C
	ENSG00000233816		21367371	21368075	p21.3	IFNA13	HCB29_C
	ENSG00000188379		21384254	21385396	p21.3	IFNA2	HCB29_C
	ENSG00000120242		21409146	21410184	p21.3	IFNA8	HCB29_C
	ENSG00000197919		21440440	21441315	p21.3	IFNA1	HCB29_C
	ENSG00000099810		21802635	22121096	p21.3	MTAP	HCB29_C
ENSG00000224854	21967138	21967753	p21.3	C9orf53	HCB29_C		
ENSG00000147889	21967751	21994490	p21.3	CDKN2A	HCB29_C		
ENSG00000147883	22002909	22009312	p21.3	CDKN2B	HCB29_C		

Crom. (cromossomo)

Por fim, a análise hierárquica não supervisionada de clusters (Figura 15) revelou que, em geral, as culturas primárias e os respectivos tumores primários estão no mesmo nível hierárquico, com exceção de uma única cultura e tumor (HCB151\_C = cultura primária HCB151, HCB151\_T = tumor primário HCB151).





**Figura 15:** Análise hierárquica não supervisionada de *clusters* das culturas primárias, seus respectivos tumores primários e linhagem estabelecida. O eixo X representa os cromossomos avaliados. Eixo Y corresponde as amostras tumorais analisadas. C: cultura primária; T: tumor primário; GAMG: linhagem estabelecida. Vermelho vivo corresponde as ampliações gênicas, vermelho fosco refere-se ao ganho cromossômico. Em azul fosco as perdas cromossômicas e o azul vivo representa as deleções gênicas.

### 5.5. Caracterização das Alterações Moleculares

A análise de mutações das regiões *hotspots* dos genes *TP53*, *PTEN*, *BRAF*, *IDH1*, *IDH2*, *H3F3A* e *FGFR1* foi realizada em todas culturas primárias e seus respectivos tumores primários e linhagem tumoral comercial utilizada como controle (Tabela 7).

**Tabela 7** - Análise dos genes *TP53*, *PTEN*, *BRAF*, *IDH1*, *IDH2*, *H3F3A* e *FGFR1*.

ID	Genes						
	<i>TP53</i>	<i>PTEN</i>	<i>BRAF</i>	<i>IDH1</i>	<i>IDH2</i>	<i>H3F3A</i>	<i>FGFR1</i>
HCB2C	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
HCB2T	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
HCB29C	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
HCB29T	WT	WT	<b>MUT</b>	WT	WT	WT	WT
HCB40C	<b>MUT</b>	WT	WT	WT	WT	WT	WT
HCB40T	<b>MUT</b>	WT	WT	WT	WT	WT	WT
HCB144C	<b>MUT</b>	<b>MUT</b>	WT	WT	WT	WT	WT
HCB144T	<b>MUT</b>	<b>MUT</b>	WT	WT	WT	WT	WT
HCB151C	<b>MUT</b>	WT	WT	WT	WT	WT	WT
HCB151T	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
GAMG	<b>MUT</b>	WT	WT	WT	WT	WT	WT

ID: identificação das amostras, sendo C referente às culturas primárias e T correspondente ao tumor primário. WT ( *wild type*, gene selvagem); MUT (gene mutante).

A Tabela 8 mostra o perfil mutacional dos genes analisados. A maioria das mutações encontradas foi nos supressores tumorais *TP53* e *PTEN*. Todas as mutações (N =9) foram do tipo *missense*. As alterações genéticas encontradas nos controles positivos confirmam as mutações previamente descritas em literatura (Tabela 8).

**Tabela 8** - Análise do perfil mutacional dos genes *TP53*, *PTEN*, *BRAF*, *IDH1*, *IDH2*, *H3F3A* e *FGFR1*.

ID	Gene	Éxon	Códon	Mutação	Troca de aminoácido	Tipo de mutação	Natureza
HCB29T	<i>BRAF</i>	15	600	GTG - GCG	Val – Ala	T:A – C:G	<i>Missense</i>
HCB40C	<i>TP53</i>	8	273	CGT - CAT	Arg – His	G:C – A:T	<i>Missense</i>
HCB40T	<i>TP53</i>	8	273	CGT - CAT	Arg - His	G:C – A:T	<i>Missense</i>
HCB144C	<i>TP53</i>	6	216	GTG - ATG	Val – Met	G:C – A:T	<i>Missense</i>
	<i>PTEN</i>	6	165	GGA - GAA	Gly - Glu	G:C – A:T	<i>Missense</i>
HCB144T	<i>TP53</i>	6	216	GTG – ATG	Val – Met	G:C – A:T	<i>Missense</i>
	<i>PTEN</i>	6	165	GGA - GAA	Gly – Glu	G:C – A:T	<i>Missense</i>
HCB151C	<i>TP53</i>	5	173	GTG - ATG	Val – Met	G:C – A:T	<i>Missense</i>
GAMG	<i>TP53</i>	8	265	CTG - CGG	Leu - Pro	T:A – G:C	<i>Missense</i>

ID: identificação das amostras, sendo C referente às culturas primárias e T correspondente ao tumor primário. A (adenina), T (timina), C (citosina), G (guanina). Val (valina), Ala (alanina), Arg (arginina), His (histidina), Met (metionina), Gly (glicina), Glu (ácido glutâmico), Leu (leucina) Pro (proline).

## 6. DISCUSSÃO

Glioblastomas são os tumores astrocíticos de maior frequência e pior prognóstico<sup>4, 9, 18, 19</sup>. Assim como outros tumores sólidos, estes tumores são caracterizados por diversas aberrações cromossômicas e gênicas<sup>7</sup>, além de elevada heterogeneidade intratumoral<sup>4, 20, 21</sup>. Apesar dos avanços no conhecimento molecular destes tumores nos últimos 10 anos, nenhuma melhora no prognóstico e sobrevida dos pacientes foi observada. Neste estudo, foi proposto o estabelecimento de culturas primárias de glioblastomas e caracterização de suas alterações citogenéticas e moleculares em alguns dos genes mais comumente envolvidos no processo de evolução desta doença para melhor entender a biologia destes tumores em cada paciente e possibilitar, a partir dos dados encontrados, estudos futuros de terapias mais eficazes.

### 6.1. Método de Estabelecimento

A metodologia para o estabelecimento foi otimizada pelo nosso grupo de estudo conforme previamente descrito. O protocolo teve êxito em 53,73% (36 de 67) de todas as amostras de gliomas. Este dado é bastante significativo devido à dificuldade e delicadeza do processo como visto em outros trabalhos, nos quais a grande maioria obtém sucesso no estabelecimento em número menos expressivo<sup>76-78</sup>.

### 6.2. Caracterização Clínico-patológica

Os 5 pacientes do estudo são provenientes do Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII, Barretos/SP, com diagnóstico imageológico prévio de glioblastoma e anátomopatológico confirmatório pós cirurgia.

A média de idade dos pacientes inseridos no estudo foi de 58 anos (Tabela 3). Este dado está de acordo com os dados da literatura que aponta um pico de incidência entre os 45 e 75 anos de idade<sup>30, 79-81</sup>.

Interessantemente, o sexo predominante em nossos pacientes foi o feminino em 60% das amostras. Este resultado foi comum a todas as culturas primárias de gliomas estabelecidas, sendo 35 pacientes do sexo feminino das 67 amostras enviadas para o estabelecimento celular (52,24%) e 19 culturas primárias das 36 estabelecidas com sucesso (52,78%). A diferença na prevalência deste tumor em relação a outros trabalhos previamente publicados<sup>34</sup>, como a taxa de 1,26 nos Estados Unidos e 1,28 na Suíça<sup>4</sup>, para cada 100.000 mulheres e 3,8 para cada 100.000 homens no mundo<sup>1</sup> ou ainda, 1,6 – 8,5 casos por 100.000 mulheres e 4,5 - 11,2 casos por 100.000 homens na Europa<sup>3</sup>, pode ser justificada pela inclusão das amostras ter sido realizada no momento da cirurgia e somente após a remoção do tumor para o Departamento de Patologia do Hospital de Câncer de Barretos com finalidade diagnóstica e para o Departamento Banco de Tumores, para armazenamento no banco de amostras.

Os dados clínico-patológicos dos pacientes, adquiridos pela análise de prontuários no Serviço de Arquivos Médicos e Estatística (SAME), estão apresentados na Tabela 3. Quanto à localização tumoral, os tumores estavam na região parietal (60%), temporal (20%) e/ou temporo-parietal (20%) em concordância com dados da literatura<sup>4, 5</sup>. Apesar da dificuldade de remoção cirúrgica completa<sup>30</sup>, a maioria dos pacientes inseridos neste estudo teve ressecção total do tumor (60%). Entretanto, somente um deles encontra-se vivo com doença.

### **6.3. Caracterização das Culturas Primárias**

As culturas primárias foram caracterizadas quanto aos seus perfis de crescimento, expressão fenotípica de marcadores específicos, aberrações cromossômicas e alterações genéticas.

O padrão de crescimento das amostras desde o processamento do tecido tumoral até o estabelecimento da cultura celular foi padrão para todas as amostras atingindo a confluência em 7 a 10 dias. O tempo de estabelecimento destas culturas está de acordo com dados da literatura que mostra um tempo de confluência (TUC – *time until confluency*) bastante variável entre os diferentes tipos de glioma<sup>82</sup>.

Quanto ao perfil fenotípico, todas as amostras, tanto como cultura primária quanto como tecido tumoral primário, tiveram expressão significativa do marcador específico de células gliais como apresentado na Figura 8.

Após a caracterização quanto ao padrão de crescimento e perfil fenotípico, duas culturas primárias foram plaqueadas em meio específico para realização da técnica do cariótipo (HCB2 e HCB151), assim como a linhagem tumoral imortalizada GAMG. Os resultados mostraram grande número de alterações numéricas e estruturais em todas as amostras analisadas como pode ser observado na Tabela 4. Estes resultados estão de acordo com os dados da literatura que apontam que o número de aberrações cromossômicas nos glioblastomas é bastante elevado<sup>7, 24</sup>. A análise dos resultados destas amostras mostrou um número elevado de alterações numéricas e estruturais nas culturas primárias, entretanto como descrito previamente na literatura as aberrações presentes em linhagem comercial são ainda maiores<sup>77</sup>, impossibilitando assim uma aproximação à realidade dos pacientes com este tipo de tumor. Entretanto, uma das alterações mais frequente dos glioblastomas, a trissomia do cromossomo 7, foi observada em todas as amostras.

Outra alteração frequentemente observada nos glioblastomas, em especial nos primários, é a perda do cromossomo 10<sup>24</sup>. Interessantemente, apesar de todas as amostras deste estudo serem do tipo primário, segundo a análise dos prontuários dos pacientes, nenhuma das 3 amostras analisadas por cariótipo apresentou monossomia do cromossomo 10. A cultura HCB2 não teve nenhuma alteração envolvendo este cromossomo e as culturas HCB151 e GAMG apresentaram trissomia do cromossomo 10. Entretanto, em análise comparativa das alterações cromossômicas encontradas no aCGH, foi observado que a frequência das alterações cromossômicas, tanto nas culturas primárias como nos tumores primários, a perda do cromossomo 10 é um dos eventos mais comuns de acordo com a literatura. Este resultado pode nos sugerir que as metáfases analisadas não foram suficientes para expressar todas as alterações presentes nestes tumores.

Na análise de aCGH, a amplificação da região cromossômica 7p11.2 e a deleção 9p21, correspondente aos genes *EGFR* e *CDKN2A*, foram os eventos pontuais observados, na análise das 11 amostras. Este resultado está de acordo com dados da literatura que apontam alterações frequentes nestas regiões<sup>7, 39</sup>.

A análise de clusterização revelou que as amostras de culturas primárias e seus respectivos tumores primários possuem o mesmo perfil de alterações cromossômicas, com exceção apenas de um único paciente HCB151.

A maioria das mutações envolvendo os genes *TP53*, *PTEN*, *BRAF*, *IDH1*, *IDH2*, *H3F3A* e *FGFR1* ocorreram nos supressores tumorais *TP53* e *PTEN*, com exceção de uma única amostra que apresentou mutação no gene *BRAF*. Apesar de a maioria das mutações presentes neste gene estar relacionada à gliomas de menor grau de malignidade ou à glioblastomas secundários<sup>36</sup>, estudos recentes apontam presença desta mutação em glioblastomas recém diagnosticados<sup>66</sup>. Nenhuma mutação foi encontrada nos genes *IDH1* e *IDH2*. Este resultado já era esperado visto que a presença de mutações nos genes *IDH1* e *IDH2* são esperados em glioblastomas secundários<sup>35, 67, 68</sup>. O mesmo resultado foi obtido para os genes *H3F3A* e *FGFR1*, ou seja, todas as amostras foram do tipo selvagem. Estes resultados também estão em concordância com a literatura que apontam que a maioria das mutações presentes neste genes ocorrem em tumores pediátricos<sup>6, 47, 48, 83</sup>.

Interessantemente todas as demais amostras apresentaram mutação no gene *TP53*. Apesar de a maioria dos trabalhos apontarem a presença de mutação em glioblastomas secundários<sup>8, 53</sup>, um estudo do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) de 2008 mostrou que a presença de mutações neste gene é um evento bastante comum em glioblastomas primários<sup>34</sup>.

Outro resultado bastante interessante foi a presença de mutação em ambos os supressores tumorais analisados, *TP53* e *PTEN*, no paciente HCB144. Este resultado difere de dados da literatura que indicam a presença da mutação tanto no gene *TP53* como no gene *PTEN* em glioblastomas secundários, ou seja, em tumor de baixo grau de malignidade que evoluiu para maior grau de malignidade<sup>7, 24</sup>.

Assim como nas aberrações cromossômicas pela análise de clusterização, a análise do perfil mutacional mostrou diferença entre as amostras de cultura celular e tumor primário do paciente HCB151. Na análise de clusterização, foi observado uma proximidade maior da cultura primária (HCB151\_C) com a linhagem comercial GAMG, enquanto a amostra de tecido tumoral HCB151\_T encontrou-se no mesmo nível hierárquico de outro paciente, HCB2. Da mesma maneira, a amostra de HCB151\_T na análise de mutações não apresentou

nenhuma alteração nos genes avaliados, enquanto a amostra da cultura primária, HCB151\_C, apresentou mutação no gene *TP53*. Este resultado pode ser justificado pela heterogeneidade tumoral, característica marcante dos glioblastomas<sup>4, 20, 21</sup>, assim como pela amostra do tecido tumoral retirada no momento da cirurgia.

Entretanto, a maioria dos resultados encontrados nas culturas primárias apresentaram alterações bem parecidas com os tumores primários, sugerindo que estas são as melhores candidatas para estudos *in vitro* que permitam melhor compreender a biologia dos glioblastomas. Todos os resultados encontrados em conjunto apontam para importante predição do prognóstico de cada paciente, entretanto são necessários novos estudos em uma série maior de pacientes para confirmação dos resultados. Entre as perspectivas futuras para melhor entendimento da gliomagênese incluem o estabelecimento e caracterização de culturas primárias de células-tronco com marcadores específicos que permitam melhor entender a clonicidade e diferenciação das células tumorais precursoras, além da avaliação da metilação de *MGMT*.

## 7. CONCLUSÃO

Este estudo possibilitou estabelecer com sucesso culturas primárias de gliomas e permitiu identificar alterações cromossômicas e genéticas em regiões previamente associadas à tumorigênese de glioblastomas. Além disso, os resultados encontrados mostraram uma boa reprodutibilidade entre as alterações identificadas na cultura primária e no tumor primário, indicando um potencial modelo de estudo *in vitro* da biologia destes tumores.



## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. GLOBOCAN. <http://globocan.iarc.fr>. 2008.
2. Ohgaki H. *Epidemiology of Brain Tumor*. *Cancer Epidemiology*;2009. p. 323-42.
3. Crocetti E, Trama A, Stiller C, Caldarella A, Soffiotti R, Jaal J, et al. *Epidemiology of glial and non-glial brain tumours in Europe*. **Eur J Cancer**. 2012;48(10):1532-42.
4. Louis DN OH, Wiestler OD, Cavenee WK. *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System*. 4th ed. Bosman FT JE, Lakhani SR, Ohgaki H, editor. **Lyon, France: International Agency for Research on Cancer (IARC)**; 2007.
5. Dolecek TA, Propp JM, Stroup NE, Kruchko C. *CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009*. **Neuro Oncol**. 2012;14 Suppl 5:v1-49.
6. Jones C, Perryman L, Hargrave D. *Paediatric and adult malignant glioma: close relatives or distant cousins?* **Nat Rev Clin Oncol**. 2012;9(7):400-13.
7. Riemenschneider MJ, Jeuken JW, Wesseling P, Reifenberger G. *Molecular diagnostics of gliomas: state of the art*. **Acta Neuropathol**. 2010;120(5):567-84.
8. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, et al. *IDH1 and IDH2 mutations in gliomas*. **N Engl J Med**. 2009;360(8):765-73.
9. Alelu-Paz R, Ashour N, Gonzalez-Corpas A, Ropero S. *DNA Methylation, Histone Modifications, and Signal Transduction Pathways: A Close Relationship in Malignant Gliomas Pathophysiology*. **J Signal Transduct**. 2012;2012:956958.
10. Nieto-Sampedro M, Valle-Argos B, Gómez-Nicola D, Fernández-Mayoralas A, Nieto-Díaz M. *Inhibitors of Glioma Growth that Reveal the Tumour to the Immune System* 2011.
11. Le Mercier M, Fortin S, Mathieu V, Kiss R, Lefranc F. *Galectins and gliomas*. **Brain Pathol**. 2010;20(1):17-27.
12. Binda E, Visioli A, Reynolds B, Vescevi AL. *Heterogeneity of cancer-initiating cells within glioblastoma*. **Front Biosci (Schol Ed)**. 2012;4:1235-48.

13. Sottoriva A, Spiteri I, Piccirillo SG, Touloumis A, Collins VP, Marioni JC, et al. *Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2013;110(10):4009-14.
14. Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. *Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000)*. **Neurochem Res**. 2000;25(9-10):1439-51.
15. Dahlstrand J, Collins VP, Lendahl U. *Expression of the class VI intermediate filament nestin in human central nervous system tumors*. **Cancer Res**. 1992;52(19):5334-41.
16. Suzuki S, Namiki J, Shibata S, Mastuzaki Y, Okano H. *The neural stem/progenitor cell marker nestin is expressed in proliferative endothelial cells, but not in mature vasculature*. **J Histochem Cytochem**. 2010;58(8):721-30.
17. Zhou Y, Bian X, Le Y, Gong W, Hu J, Zhang X, et al. *Formylpeptide receptor FPR and the rapid growth of malignant human gliomas*. **J Natl Cancer Inst**. 2005;97(11):823-35.
18. Zhu Y, Parada LF. *The molecular and genetic basis of neurological tumours*. **Nat Rev Cancer**. 2002;2(8):616-26.
19. Chamberlain MC. *Treatment options for glioblastoma*. **Neurosurg Focus**. 2006;20(4):E19.
20. Little SE, Popov S, Jury A, Bax DA, Doey L, Al-Sarraj S, et al. *Receptor tyrosine kinase genes amplified in glioblastoma exhibit a mutual exclusivity in variable proportions reflective of individual tumor heterogeneity*. **Cancer Res**. 2012;72(7):1614-20.
21. Szerlip NJ, Pedraza A, Chakravarty D, Azim M, McGuire J, Fang Y, et al. *Intratumoral heterogeneity of receptor tyrosine kinases EGFR and PDGFRA amplification in glioblastoma defines subpopulations with distinct growth factor response*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2012;109(8):3041-6.
22. Scherer H. *Cerebral astrocytomas and their derivatives*. **The American Journal of Cancer**. 1940;40(2):159-98.
23. M N-S. *Inhibitors of Glioma Growth that Reveal the Tumour to the Immune System*. **Clinical Medicine Insights: Oncology**. 2011;5.
24. Wen PY, Kesari S. *Malignant gliomas in adults*. **N Engl J Med**. 2008;359(5):492-507.

25. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, et al. *An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme*. **Science**. 2008;321(5897):1807-12.
26. Kesari S. *Understanding glioblastoma tumor biology: the potential to improve current diagnosis and treatments*. **Semin Oncol**. 2011;38 Suppl 4:S2-10.
27. Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, 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(3):157-73.
28. Robertson T, Koszyca B, Gonzales M. *Overview and recent advances in neuropathology. Part 1: Central nervous system tumours*. **Pathology**. 2011;43(2):88-92.
29. Lai A, Kharbanda S, Pope WB, Tran A, Solis OE, Peale F, et al. *Evidence for sequenced molecular evolution of IDH1 mutant glioblastoma from a distinct cell of origin*. **J Clin Oncol**. 2011;29(34):4482-90.
30. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. *Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma*. **N Engl J Med**. 2005;352(10):987-96.
31. Abhinav K, Aquilina K, Gbejuade H, La M, Hopkins K, Iyer V. *A pilot study of glioblastoma multiforme in elderly patients: Treatments, O-6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) methylation status and survival*. **Clin Neurol Neurosurg**. 2013.
32. Jelonek K, Gdowicz-Klosok A, Pietrowska M, Borkowska M, Korfanty J, Rzeszowska-Wolny J, et al. *Association between single-nucleotide polymorphisms of selected genes involved in the response to DNA damage and risk of colon, head and neck, and breast cancers in a Polish population*. **J Appl Genet**. 2010;51(3):343-52.
33. Gordon DJ, Barbie DA, D'Andrea AD, Pellman D. *Mechanisms of Genomic Instability. Cancer Principles & Practice of Oncology Primer of the Molecular Biology of Cancer*. Philadelphia Lippincott Williams & Wilkins; 2011.
34. Cancer Genome Atlas Research N. *Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways*. **Nature**. 2008;455(7216):1061-8.
35. Sonoda Y, Kumabe T, Nakamura T, Saito R, Kanamori M, Yamashita Y, et al. *Analysis of IDH1 and IDH2 mutations in Japanese glioma patients*. **Cancer Sci**. 2009;100(10):1996-8.

36. Pfister S, Janzarik WG, Remke M, Ernst A, Werft W, Becker N, et al. *BRAF gene duplication constitutes a mechanism of MAPK pathway activation in low-grade astrocytomas*. **J Clin Invest**. 2008;118(5):1739-49.
37. Yan JB, Xu M, Xiong C, Zhou DW, Ren ZR, Huang Y, et al. *Rapid screening for chromosomal aneuploidies using array-MLPA*. **BMC Med Genet**. 2011;12:68.
38. Marta Viana Pereira CJArMR. *Genetic Instability in Paediatric and Adult Brain Tumours*. **Braga: Enpub**; 2011.
39. Schwartzbaum JA, Fisher JL, Aldape KD, Wrensch M. *Epidemiology and molecular pathology of glioma*. **Nat Clin Pract Neurol**. 2006;2(9):494-503; quiz 1 p following 16.
40. Shaffer LG, McGowan-Jordan J, Schmid M. *ISCN 2013: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2013)*: **Karger Publishers**; 2012.
41. Baak JPA, Path FRC, Hermsen MAJA, Meijer G, Schmidt J, Janssen EAM. *Genomics and proteomics in cancer*. **European journal of cancer (Oxford, England : 1990)**. 2003;39(9):1199-215.
42. Bayani J. *Applications of SKY in Cancer Cytogenetics*.; 2004. p. 1-23.
43. Chin SF, Daigo Y, Huang HE, Iyer NG, Callagy G, Kranjac T, et al. *A simple and reliable pretreatment protocol facilitates fluorescent in situ hybridisation on tissue microarrays of paraffin wax embedded tumour samples*. **Mol Pathol**. 2003;56(5):275-9.
44. Ruano Y, Mollejo M, de Lope AR, Hernandez-Moneo JL, Martinez P, Melendez B. *Microarray-based comparative genomic hybridization (array-CGH) as a useful tool for identifying genes involved in Glioblastoma (GB)*. **Methods Mol Biol**. 2010;653:35-45.
45. Lewis PW, Muller MM, Koletsky MS, Cordero F, Lin S, Banaszynski LA, et al. *Inhibition of PRC2 activity by a gain-of-function H3 mutation found in pediatric glioblastoma*. **Science**. 2013;340(6134):857-61.
46. Gielen GH, Gessi M, Hammes J, Kramm CM, Waha A, Pietsch T. *H3F3A K27M mutation in pediatric CNS tumors: a marker for diffuse high-grade astrocytomas*. **Am J Clin Pathol**. 2013;139(3):345-9.
47. Liu CP, Xiong C, Wang M, Yu Z, Yang N, Chen P, et al. *Structure of the variant histone H3.3-H4 heterodimer in complex with its chaperone DAXX*. **Nat Struct Mol Biol**. 2012;19(12):1287-92.

48. Rand V, Huang J, Stockwell T, Ferriera S, Buzko O, Levy S, et al. *Sequence survey of receptor tyrosine kinases reveals mutations in glioblastomas.* **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2005;102(40):14344-9.
49. Zhang J, Wu G, Miller CP, Tatevossian RG, Dalton JD, Tang B, et al. *Whole-genome sequencing identifies genetic alterations in pediatric low-grade gliomas.* **Nat Genet.** 2013;45(6):602-12.
50. Kuwabara T, Hiyama T, Tanaka S, Yoshihara M, Arihiro K, Chayama K. *Genetic pathways of multiple esophageal squamous cell carcinomas.* **Oncol Rep.** 2011;25(2):453-9.
51. Frebourg T, Barbier N, Yan YX, Garber JE, Dreyfus M, Fraumeni J, Jr., et al. *Germ-line p53 mutations in 15 families with Li-Fraumeni syndrome.* **Am J Hum Genet.** 1995;56(3):608-15.
52. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. *The p53 tumour suppressor gene.* **Nature.** 1991;351(6326):453-6.
53. Frankel RH, Bayona W, Koslow M, Newcomb EW. *p53 mutations in human malignant gliomas: comparison of loss of heterozygosity with mutation frequency.* **Cancer Res.** 1992;52(6):1427-33.
54. Tamura M, Gu J, Tran H, Yamada KM. *PTEN gene and integrin signaling in cancer.* **J Natl Cancer Inst.** 1999;91(21):1820-8.
55. Abdulkareem IH, Blair M. *Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10.* **Niger Med J.** 2013;54(2):79-86.
56. Sasaki H, Zlatescu MC, Betensky RA, Ino Y, Cairncross JG, Louis DN. *PTEN is a target of chromosome 10q loss in anaplastic oligodendrogliomas and PTEN alterations are associated with poor prognosis.* **Am J Pathol.** 2001;159(1):359-67.
57. Smith JS, Tachibana I, Passe SM, Huntley BK, Borell TJ, Iturria N, et al. *PTEN mutation, EGFR amplification, and outcome in patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme.* **J Natl Cancer Inst.** 2001;93(16):1246-56.
58. Hanahan D, Weinberg RA. *Hallmarks of cancer: the next generation.* **Cell.** 144(5):646-74.

59. Hu X, Pandolfi PP, Li Y, Koutcher JA, Rosenblum M, Holland EC. *mTOR promotes survival and astrocytic characteristics induced by Pten/AKT signaling in glioblastoma. Neoplasia*. 2005;7(4):356-68.
60. Kwon CH, Zhao D, Chen J, Alcantara S, Li Y, Burns DK, et al. *Pten haploinsufficiency accelerates formation of high-grade astrocytomas. Cancer Res*. 2008;68(9):3286-94.
61. Wei Q, Clarke L, Scheidenhelm DK, Qian B, Tong A, Sabha N, et al. *High-grade glioma formation results from postnatal pten loss or mutant epidermal growth factor receptor expression in a transgenic mouse glioma model. Cancer Res*. 2006;66(15):7429-37.
62. Crema E, Lopo PN, Kalinauskas PF, Cunha GR, Silva AA. *Estudo da imunossupressão dos portadores de esofagopatia chagásica por meio da avaliação das citocinas (MIG, IL-4, IL-5, IFN-G, TNF-A) [abstract]*. In: **Anais do XXVI Congresso Brasileiro de Cirurgia**; Rio de Janeiro, RJ; 2005. **Rev Col Bras Cir**. 32(supl):77.
63. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. *Mutations of the BRAF gene in human cancer. Nature*. 2002;417(6892):949-54.
64. Dahiya S, Yu J, Kaul A, Leonard JR, Gutmann DH. *Novel BRAF Alteration in a Sporadic Pilocytic Astrocytoma. Case Rep Med*. 2012;2012:418672.
65. Guo C, Pirozzi CJ, Lopez GY, Yan H. *Isocitrate dehydrogenase mutations in gliomas: mechanisms, biomarkers and therapeutic target. Curr Opin Neurol*. 2011;24(6):648-52.
66. Kleinschmidt-DeMasters BK, Aisner DL, Birks DK, Foreman NK. *Epithelioid GBMs Show a High Percentage of BRAF V600E Mutation. The American journal of surgical pathology*. 2013;37(5):685-98.
67. Smolkova K, Jezek P. *The Role of Mitochondrial NADPH-Dependent Isocitrate Dehydrogenase in Cancer Cells. Int J Cell Biol*. 2012;2012:273947.
68. Marko NF, Weil RJ. *The molecular biology of WHO Grade II gliomas. Neurosurg Focus*. 2013;34(2):E1.
69. Oh IU, Inazawa J, Kim YO, Song BJ, Huh TL. *Assignment of the human mitochondrial NADP(+)-specific isocitrate dehydrogenase (IDH2) gene to 15q26.1 by in situ hybridization. Genomics*. 1996;38(1):104-6.

70. Szenker E, Ray-Gallet D, Almouzni G. *The double face of the histone variant H3.3*. **Cell Res.** 2011;21(3):421-34.
71. Irschick R, Trost T, Karp G, Hausott B, Auer M, Claus P, et al. *Sorting of the FGF receptor 1 in a human glioma cell line*. **Histochem Cell Biol.** 2013;139(1):135-48.
72. Reis RM, Konu-Lebleblicioglu D, Lopes JM, Kleihues P, Ohgaki H. *Genetic profile of gliosarcomas*. **Am J Pathol.** 2000;156(2):425-32.
73. Basto D, Trovisco V, Lopes JM, Martins A, Pardal F, Soares P, et al. *Mutation analysis of B-RAF gene in human gliomas*. **Acta Neuropathol.** 2005;109(2):207-10.
74. Tefferi A, Lasho TL, Abdel-Wahab O, Guglielmelli P, Patel J, Caramazza D, et al. *IDH1 and IDH2 mutation studies in 1473 patients with chronic-, fibrotic- or blast-phase essential thrombocythemia, polycythemia vera or myelofibrosis*. **Leukemia.** 2010;24(7):1302-9.
75. Sturm D, Witt H, Hovestadt V, Khuong-Quang D, Jones D, Konermann C, et al. *Tö njes, M., Sill, M., Bender, S., et al.(2012). Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma*. **Cancer Cell.**22:425-37.
76. Hu YY, Zheng MH, Cheng G, Li L, Liang L, Gao F, et al. *Notch signaling contributes to the maintenance of both normal neural stem cells and patient-derived glioma stem cells*. **BMC Cancer.** 2011;11:82.
77. Pollard SM, Yoshikawa K, Clarke ID, Danovi D, Stricker S, Russell R, et al. *Glioma stem cell lines expanded in adherent culture have tumor-specific phenotypes and are suitable for chemical and genetic screens*. **Cell Stem Cell.** 2009;4(6):568-80.
78. Lee J, Kotliarova S, Kotliarov Y, Li A, Su Q, Donin NM, et al. *Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines*. **Cancer Cell.** 2006;9(5):391-403.
79. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. *The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system*. **Acta Neuropathol.** 2007;114(2):97-109.
80. Hadjipanayis CG, Van Meir EG. *Brain cancer propagating cells: biology, genetics and targeted therapies*. **Trends Mol Med.** 2009;15(11):519-30.

81. Paugh BS, Qu C, Jones C, Liu Z, Adamowicz-Brice M, Zhang J, et al. *Integrated molecular genetic profiling of pediatric high-grade gliomas reveals key differences with the adult disease.* **J Clin Oncol.** 2010;28(18):3061-8.
  
82. Rueger MA, Winkler A, Miletic H, Kaestle C, Richter R, Schneider G, et al. *Variability in infectivity of primary cell cultures of human brain tumors with HSV-1 amplicon vectors.* **Gene Ther.** 2005;12(7):588-96.
  
83. Zhang W, Zhang J, Yan W, You G, Bao Z, Li S, et al. *Whole-genome microRNA expression profiling identifies a 5-microRNA signature as a prognostic biomarker in Chinese patients with primary glioblastoma multiforme.* **Cancer.** 2013;119(4):814-24.



## ANEXOS

## Anexo I – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Versão 2.0 (outubro / 2012)



**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)  
PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA**

**Titulo do Projeto: “Estabelecimento, caracterização molecular e estudo de resposta terapêutica de culturas celulares primárias de tumores cerebrais”**

**INVESTIGADOR DO ESTUDO**  
Hospital de Câncer de Barretos, Brasil  
Rui Manuel Reis  
Carlos Clara

Identificação do participante

Número do prontuário médico (se pertinente)

Você está sendo convidado(a) a participar deste estudo que será realizado no Hospital de Câncer de Barretos - Fundação Pio XII.

Este Termo de Consentimento explica porque este estudo está sendo realizado e qual será a sua participação, caso você aceite o convite. Este documento também descreve os possíveis riscos e benefícios se você quiser participar. Após analisar as informações com a pessoa que explica este Termo de Consentimento, e esclarecer suas dúvidas, você deverá ter o conhecimento necessário para tomar uma decisão esclarecida sobre sua participação ou não neste estudo.

**JUSTIFICATIVA PARA O ESTUDO**

Para obter um maior conhecimento clínico e científico do câncer, no seu caso o tumor cerebral, o corpo clínico deste Hospital (médicos e pesquisadores) desenvolve pesquisa clínica científica. Através dessa pesquisa é possível conhecer melhor como a doença se desenvolve e, portanto, oferecer novos possíveis meios de diagnóstico e tratamento. Neste estudo, pegaremos uma pequena porção de seu tumor no momento que ele for operado ou biopsiado e em laboratório iremos reproduzi-lo e o manteremos vivo para que possamos buscar novos genes ou lesões em genes já existentes e também testaremos o efeito de medicações para o câncer sobre ele. Tudo isso para que possamos entender melhor como o tumor funciona e de criarmos um modelo vivo para testes futuros, tanto de diagnóstico como de tratamentos.

Rubricas Sujeito de pesquisa / Responsável:  
Testemunha imparcial:  
Aplicador do TCLE:

**OBJETIVO DO ESTUDO**

Através de material colhido do seu tumor, pretende-se manter células do tumor vivas em laboratório, e através disto fazer estudos genéticos e moleculares (pesquisar a composição de certas substâncias no tumor) e também com drogas, para testar a sensibilidade do tumor a medicamentos.

**PROCEDIMENTOS**

Você está sendo admitido(a) neste Hospital para estabelecimento de diagnóstico e /ou tratamento do tumores cerebrais. Para fins de diagnóstico, fator prognóstico e/ou como parte de seu tratamento, há a necessidade de remoção do tumor e/ou material biológico relacionado à sua doença. É prática rotineira deste Hospital, usar parte do tumor e/ou material biológico retirado, para exames clínicos laboratoriais, necessários para um diagnóstico. Uma pequena porção do restante do tumor que é retirado será utilizada para o estabelecimento de culturas tumorais primárias, ou seja, irá para o laboratório de pesquisa onde vamos tentar manter o tumor vivo e se multiplicando em condições controladas para que possamos fazer uma série de testes e pesquisas nele, inclusive testando sua sensibilidade a medicações.

**RISCOS E DESCONFORTOS PARA OS PARTICIPANTES**

Não vai haver nenhum procedimento a mais a ser realizado em você fora do que é feito normalmente para o tratamento e/ou diagnóstico da sua doença. Apenas utilizaremos uma parte do material retirado na biópsia/cirurgia para o estudo. Não retiraremos material em caso disso implicar em dificuldade no seu diagnóstico. Seus dados pessoais serão mantidos em sigilo.

**BENEFÍCIOS ESPERADOS**

Não esperamos nenhum benefício direto relacionado a este estudo que você irá ter. Este estudo fornecerá informações que ajudarão a conhecer melhor esta doença e poderá ajudar a melhorar o diagnóstico e o tratamento futuro do tumores cerebrais.

**PROCEDIMENTOS OU TRATAMENTOS ALTERNATIVOS**

Seu tratamento será o tratamento padrão para sua doença. Não faremos nada diferente dos outros pacientes devido a este estudo.

**DESTINO DOS MATERIAIS BIOLÓGICOS**

Todos os materiais biológicos coletados durante este estudo (fragmento de tumor) e os dados obtidos durante o estudo não serão utilizados para outros fins além daqueles explicados neste Termo de Consentimento. Esses materiais não terão os seus dados pessoais, apenas códigos de identificação, para manter o seu sigilo. Depois de todas as análises terem sido realizadas, o material biológico que restar será adequadamente armazenado no Hospital de Câncer de Barretos. Se houver necessidade de fazer novas análises com seu material e/ou outras pesquisas, o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital

---

Rubricas      Sujeito de pesquisa / Responsável:  
                    Testemunha imparcial:  
                    Aplicador do TCLE:



de Câncer de Barretos (CEP-HCB) avaliará esse novo uso. Sem a autorização deste comitê, novas pesquisas com o seu material não poderão ser realizadas. Apesar de este material biológico ficar guardado no Hospital de Câncer de Barretos, ele pertence a você. A qualquer momento, durante ou após este estudo, você poderá retirar este material do hospital ou pedir que seja destruído. Isto não tirará nenhum direito do seu tratamento neste hospital. Ao final deste termo você poderá decidir se autoriza o uso de seu material em pesquisas futuras (aprovadas pelo CEP-HCB) ou se prefere ser avisado em cada situação em que seu material seja utilizado em novos estudos para que você autorize ou não este uso.

#### **INTERRUPÇÃO DO ESTUDO**

Este estudo poderá ser encerrado antes do prazo se houver dúvidas relativas a sua segurança ou por razões administrativas. Qualquer que seja o motivo, o estudo somente será interrompido depois da avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos que o aprovou, a não ser que existam razões de segurança que exijam a interrupção imediata do estudo.

#### **LIBERDADE DE RECUSA**

A sua participação neste estudo é voluntária e não é obrigatória. Você pode aceitar participar do estudo e depois desistir a qualquer momento. Isto não tirará nenhum direito do seu tratamento e assistência neste hospital. Você também poderá pedir a qualquer momento que as suas informações sejam excluídas completamente deste estudo e que elas não sejam usadas para mais nada.

#### **GARANTIA DE SIGILO**

O Hospital de Câncer de Barretos tomará todas as medidas para manter suas informações pessoais (como nome, endereço e outras) em sigilo. Durante todo o estudo e mesmo depois que terminar, quando os resultados deste estudo forem publicados em revistas científicas ou apresentados em congressos ou reuniões, a sua identidade será guardada em segredo, não sendo revelada qualquer informação ao seu respeito que possa identificar você publicamente. Contudo, durante o estudo, algumas pessoas do Hospital de Câncer de Barretos envolvidas diretamente na pesquisa poderão ter acesso aos seus dados. Mesmo assim, os seus dados serão preservados e não serão divulgados publicamente.

#### **CUSTOS, REMUNERAÇÃO E INDENIZAÇÃO**

A participação neste estudo não terá custos a mais para você. Os custos relacionados diretamente com o estudo serão pagos pela(s) instituição(ões) que está(ão) participando deste estudo. Também não haverá qualquer tipo de pagamento devido à sua participação (mesmo que haja patentes ou descobertas). Se você sofrer algum dano a sua saúde como resultado da sua participação nesse estudo nesta instituição, o Hospital de Câncer de

---

Rubricas      Sujeito de pesquisa / Responsável:  
Testemunha imparcial:  
Aplicador do TCLE:

Versão 2.0 (outubro / 2012)



Barretos será responsável por lhe dar todo o tratamento necessário e de forma gratuita. Ao assinar este Termo de Consentimento, você não perderá nenhum direito, inclusive o de obter indenização por dano a sua saúde se isto acontecer.

#### **ESCLARECIMENTOS ADICIONAIS, CRÍTICAS, SUGESTÕES E RECLAMAÇÕES**

Você poderá tirar qualquer dúvida sobre o estudo, fazer críticas, sugestões e reclamações diretamente com o pesquisador no Hospital de Câncer de Barretos, Dr. Rui Manuel Reis no telefone (17) 3321-6600, ramal: 7090. Você também poderá entrar em contato com o coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos (CEP-HCB), Dr. Sérgio Serrano, localizado na Rua Antenor Duarte Vilela, 1331 – telefone (17) 3321-6600, ramal 6894 – e-mail cep@hcancerbarretos.com.br.

#### **DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO**

Entendi o estudo. Tive a oportunidade de ler o Termo de Consentimento ou alguém o leu para mim. Tive a oportunidade de pensar, fazer perguntas e falar a respeito do documento com outras pessoas quando precisei. Autorizo a minha inclusão neste estudo. Ao assinar este Termo de Consentimento, não renuncio a nenhum dos meus direitos legais. Este documento será assinado em duas vias, sendo que uma cópia ficará comigo e outra com o pesquisador.

#### **DESTINO DOS MATERIAIS BIOLÓGICOS/ USO EM PESQUISAS FUTURAS**

Autorizo o uso de todos os materiais biológicos coletados durante este estudo (especificar os materiais) para os fins explicados neste Termo de Consentimento e autorizo que os mesmos sejam posteriormente armazenados no Hospital de Câncer de Barretos. Se houver necessidade,

| sim, autorizo o uso de meu material biológico em novas pesquisas, que possam ser realizadas futuramente no Hospital de Câncer de Barretos, desde que sejam aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos (CEP-HCB).

| não autorizo o uso de meu material biológico em novas pesquisas, que possam ser realizadas futuramente. Desejo ser informado em cada situação em que meu material será utilizado em novos estudos para que eu possa autorizar ou não este uso.

\_\_\_\_\_  
Nome por extenso do sujeito de pesquisa ou  
do representante legal

\_\_\_\_\_  
Data

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Rubricas

\_\_\_\_\_  
Sujeito de pesquisa / Responsável:

\_\_\_\_\_  
Testemunha imparcial:

\_\_\_\_\_  
Aplicador do TCLE:

Página 4

Versão 2.0 (outubro / 2012)



\_\_\_\_\_  
Nome por extenso do responsável que explicou e obteve o Termo de Consentimento

\_\_\_\_\_  
Data

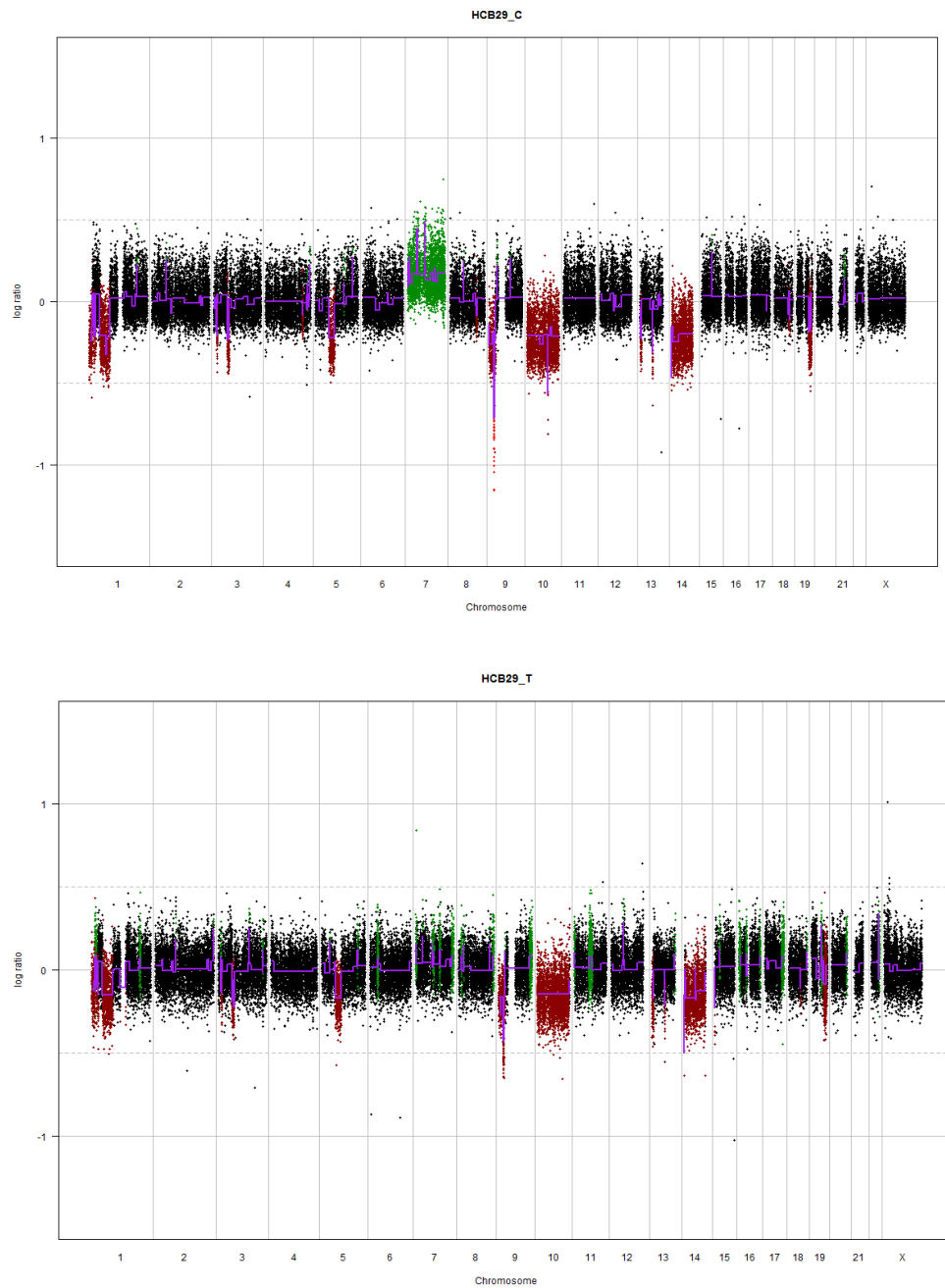
\_\_\_\_\_  
Assinatura

\_\_\_\_\_  
Nome por extenso da testemunha imparcial  
(para casos de analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual)

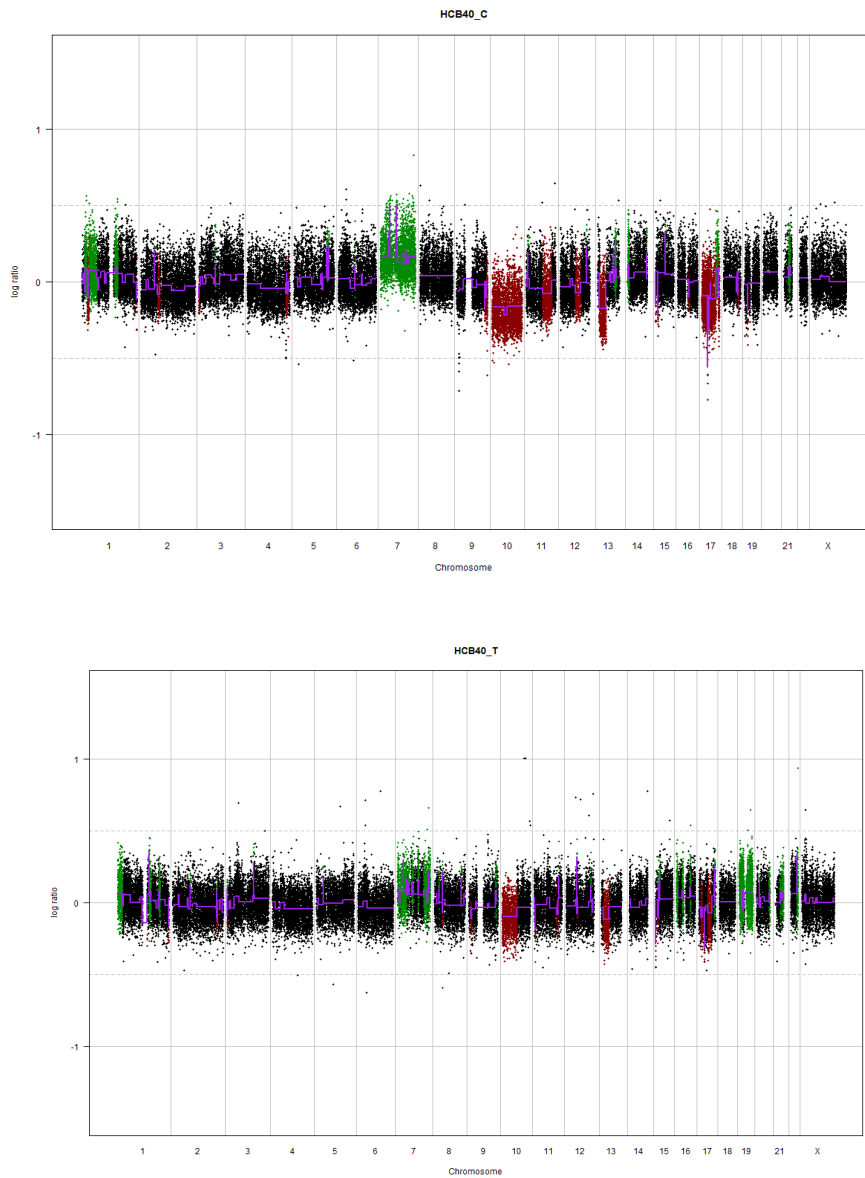
\_\_\_\_\_  
Data

\_\_\_\_\_  
Assinatura

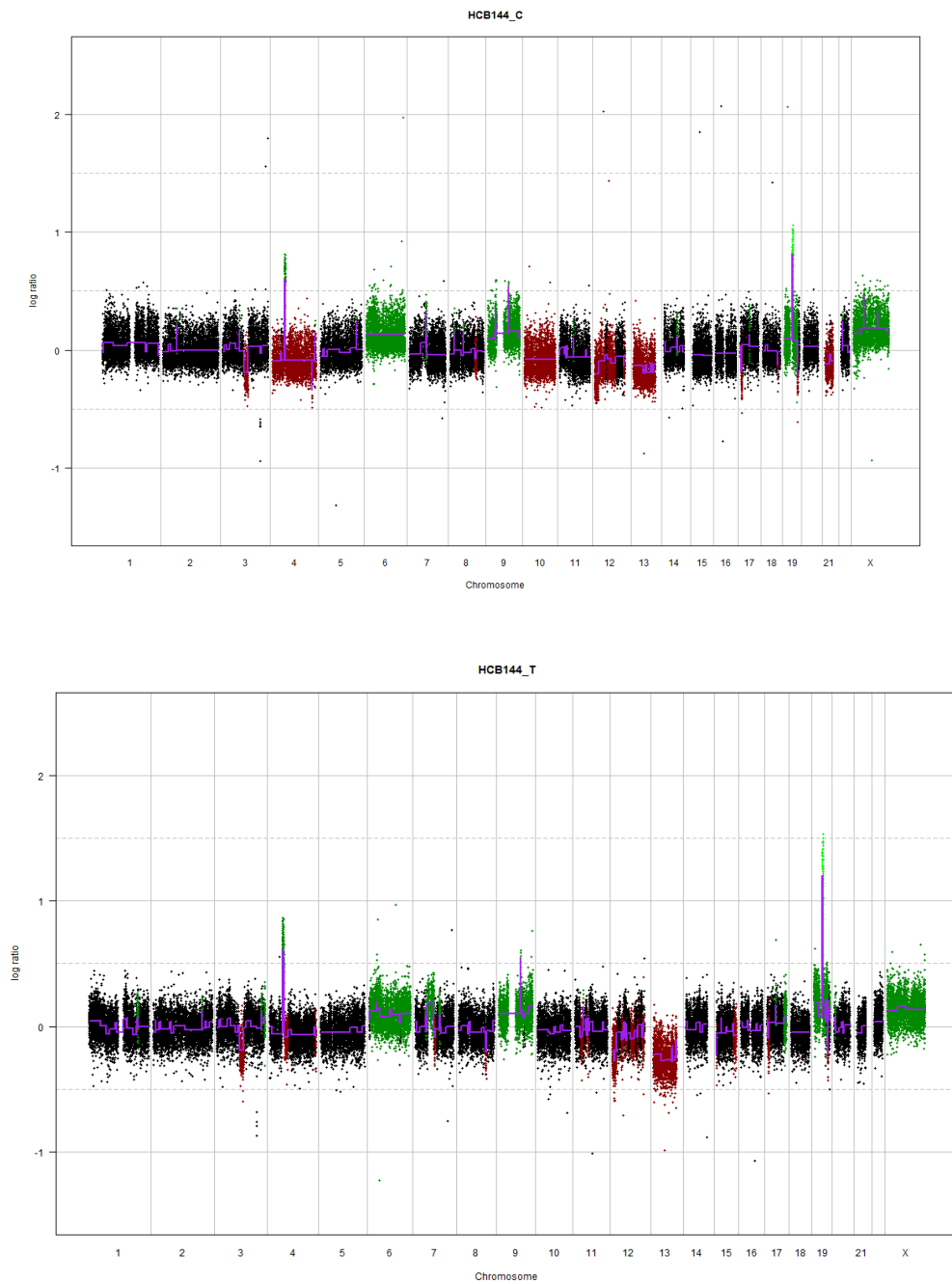
Rubricas \_\_\_\_\_  
Sujeito de pesquisa / Responsável:  
Testemunha imparcial:  
Aplicador do TCLE:

**Anexo II – *GenomePlots* aCGH**

**Figura 16** – *GenomePlot* HCB29. O eixo x representa cada um dos cromossomos avaliados (excluindo-se o cromossomo Y) e o eixo y representa o  $\log_2$  da razão da intensidade de DNAtumoral/DNAcontrole. As regiões cromossômicas em verde representam o ganho cromossômico, enquanto as regiões em vermelho representam a perda. HCB29\_C: cultura primária HCB29, HCB29\_T: tumor primário da cultura primária HCB29.

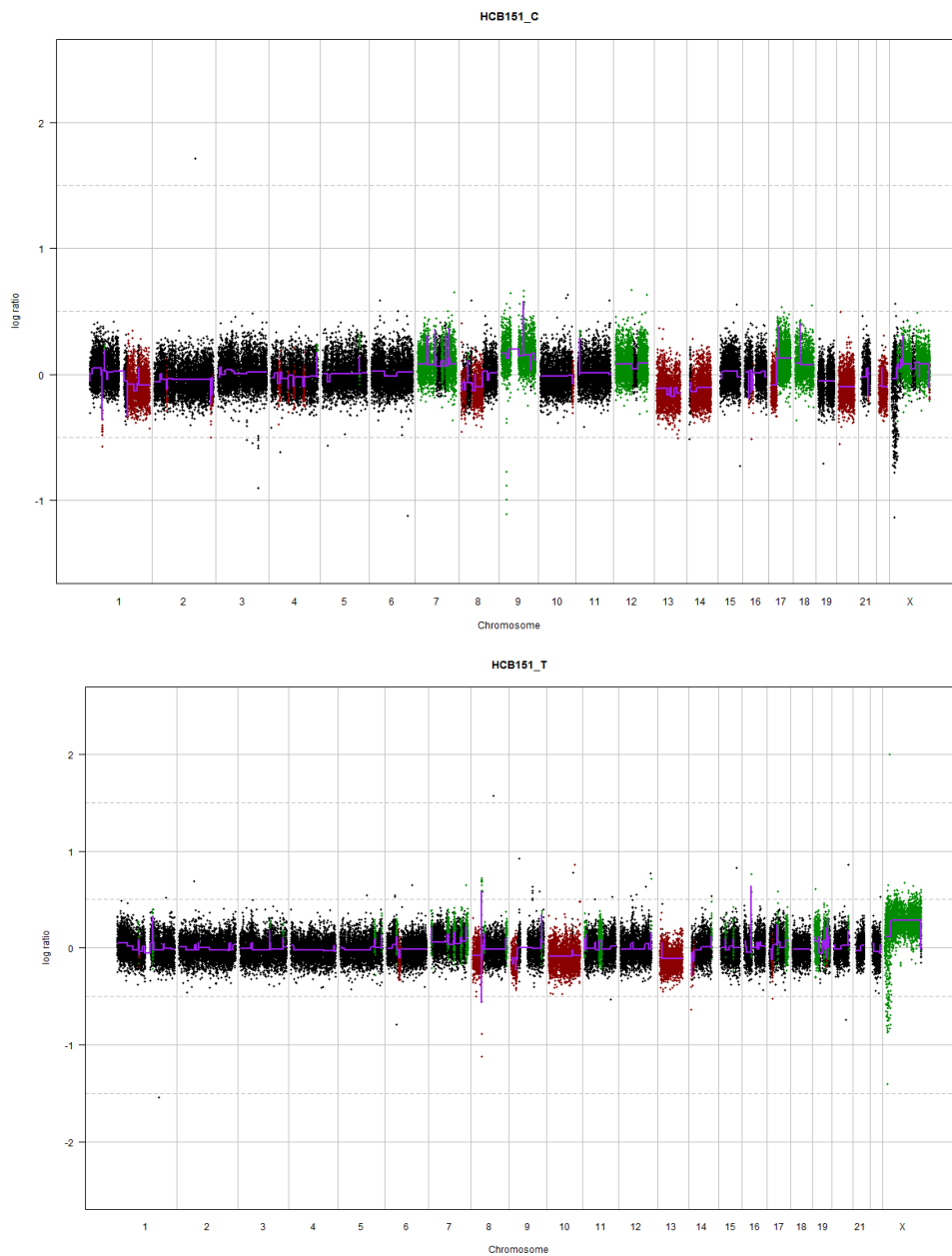


**Figura 17** – *GenomePlot* HCB40. O eixo x representa cada um dos cromossomos avaliados (excluindo-se o cromossomo Y) e o eixo y representa o  $\log_2$  da razão da intensidade de DNA tumoral/DNA controle. As regiões cromossômicas em verde representam o ganho cromossômico, enquanto as regiões em vermelho representam a perda. HCB40\_C: cultura primária HCB40, HCB40\_T: tumor primário da cultura primária HCB40.



**Figura 18** – *GenomePlot* HCB144. O eixo x representa cada um dos cromossomos avaliados (excluindo-se o cromossomo Y) e o eixo y representa o  $\log_2$  da razão da intensidade de DNAtumoral/DNAcontrole. As regiões cromossômicas em verde representam o ganho cromossômico, enquanto as regiões em vermelho representam a perda. HCB144\_C: cultura primária HCB144, HCB144\_T: tumor primário da cultura primária HCB144.





**Figura 19** – *GenomePlot* HCB151. O eixo x representa cada um dos cromossomos avaliados (excluindo-se o cromossomo Y) e o eixo y representa o  $\log_2$  da razão da intensidade de DNA tumoral/DNA controle. As regiões cromossômicas em verde representam o ganho cromossômico, enquanto as regiões em vermelho representam a perda. HCB151\_C: cultura primária HCB151, HCB151\_T: tumor primário da cultura primária HCB151.