

Aline Nazareth de Paiva Paixão Becker

AVALIAÇÃO DA VIA MAPK NA ONCOGÊNESE DOS ASTROCITOMAS PILOCÍTICOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Rui Manuel Vieira Reis

Co-orientador: Prof. Dr. Cristovam

Scapulatempo Neto

Barretos, SP

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada por Rafael de Paula Araújo CRB 8/9130
Biblioteca da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos

A395a Becker, Aline Nazareth de Paiva Paixão
Avaliação da via MAPK na oncogênese dos astrocitomas pilocíticos / Aline Nazareth de Paiva Paixão Becker. - Barretos, SP 2015.
127 f.: il.

Orientador: Rui Manuel Reis.
Co-orientador: Cristovam Scapulatempo Neto

Tese (Doutorado) – Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos,
2015.

1. Glioma. 2. Astrocitoma. 3. Imuno-histoquímica. 4. Análise de
sequência de DNA. 5. Sistema de sinalização das MAP quinases. 6.
Prognóstico. I. Autor. II. Reis, Rui Manuel

CDD 617.017

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aline Nazareth de Paiva Paixão Becker

Avaliação da via MAPK na oncogênese dos astrocitomas pilocíticos

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

Data da aprovação: 03/06/2015

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Jeremy Andrew Squire

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Departamento de Patologia e Medicina Legal

Prof.^a Dra. Leila Maria Cardão Chimelli

Instituição: Instituto Nacional de Câncer, Divisão de Patologia

Prof. Dr. Luciano Neder Serafini

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

Prof. Dr. Rui Manuel Vieira Reis

Orientador

Dr. Adhemar Longatto Filho

Presidente da Banca

SUPORTE À PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO

Este trabalho recebeu apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), através de auxílio CNPq/Universal (475358/2011-2) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (processo número 2012/19590-0).

As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.

Esta tese 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.

Embora o Núcleo de Apoio ao Pesquisador do Hospital de Câncer de Barretos tenha realizado as análises estatísticas e orientado sua interpretação, a descrição da metodologia estatística, a apresentação dos resultados e suas conclusões são de inteira responsabilidade dos pesquisadores envolvidos.

Os pesquisadores declaram não ter qualquer conflito de interesse relacionado a este estudo.

Ao meu marido Valesio e filhas Alana e Athina, minha motivação maior nos momentos difíceis, nos felizes e até nos ausentes.

Aos meus pais Otávio e Jaciléia Paixão, os grandes mestres responsáveis pelo meu apreço ao conhecimento e à instrução.

À minha avó Hermínia Dias Paiva (in memoriam).

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rui Manuel Reis, por conseguir extrair o melhor deste estudo, ainda que em condições às vezes adversas, e pelas oportunidades que me deu para mostrar que posso fazer melhor.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Cristovam Scapulatempo Neto pelo excelente apoio profissional e pessoal na condução desta tese.

A todos os colaboradores do Hospital de Câncer de Barretos e do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, pelo total apoio e excelência em todas as atividades desenvolvidas neste estudo.

À Doutora Marileila Varela-Garcia e equipe da Universidade do Colorado (EUA).

Aos Professores Doutores componentes das bancas examinadoras de acompanhamento e da defesa da tese, pela imensa contribuição científica, com sugestões e críticas que resultaram na melhora significativa da qualidade deste estudo.

À Viviane Figueiredo Ferreira, meu braço direito na vida fora da Pós-graduação, sem a qual este desfecho seria muito mais difícil.

Aos pacientes cujas lesões foram objetos de investigação no presente estudo e às suas famílias, na esperança de que, compreendendo melhor, combateremos a doença de maneira mais efetiva.

*“Todos esses que aí estão
Atravancando meu caminho
Eles passarão...
Eu passarinho...”*

Mário Quintana

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Astrocitoma pilocítico	2
1.2	Neurofibromatose do tipo 1 (Nf1) e astrocitomas pilocíticos	5
1.3	A via MAPK	5
1.3.1	Mutações do <i>FGFR1</i>	7
1.3.2	Alterações do <i>BRAF</i>	7
1.3.3	Regulador negativo da MAPK: RKIP	9
1.4	Astrocitomas pilocíticos e senescência celular	9
1.4.1	Metiltioadenosina fosforilase (MTAP) e sua implicação na OIS	10
2	JUSTIFICATIVA	11
3	OBJETIVOS	12
3.1	Objetivo geral	12
3.2	Objetivos específicos	12

SUMÁRIO

4	CASUÍSTICA E MÉTODOS	13
4.1	Amostras disponíveis	13
4.2	Aprovação nos Comitês de Ética	13
4.3	Preparação das amostras	14
4.3.1	Revisão clínica	14
4.3.2	Revisão histopatológica	14
4.3.3	Construção da plataforma do TMA	16
4.4	Estudo imuno-histoquímico da expressão das proteínas da via MAPK	17
4.5	Validação do anticorpo anti-MTAP – técnica de Western blot	18
4.6	Análise mutacional dos genes <i>BRAF</i> e <i>FGFR1</i>	19
4.7	Análise das fusões do gene <i>BRAF</i> e da duplicação do <i>FGFR1</i>	21
4.7.1	Reagentes moleculares	22
4.7.1.1	Fusão <i>KIAA1549-BRAF</i>	22
4.7.1.2	Ensaio de quantificação <i>FGFR1/CEP8</i>	23
4.7.2	Interpretação dos ensaios FISH	23
4.8	Análise estatística	24

SUMÁRIO

5	RESULTADOS	25
5.1	Dados clinicoepidemiológicos	25
5.2	Análises do genes e proteínas	28
5.2.1	Galectina-3 e <i>IDH-1</i> mutado	28
5.2.2	<i>FGFR1</i>	30
5.2.3	<i>BRAF</i>	32
5.2.4	Relação entre as alterações nos genes <i>FGFR1</i> e <i>BRAF</i>	35
5.2.5	RKIP	37
5.2.6	MTAP	38
5.2.7	Impacto das características moleculares e expressão proteica na sobrevida	41
5.2.8	Importância prognóstica dos genes <i>FGFR1</i> e <i>BRAF</i> nos astrocitomas pilocíticos	42
6	DISCUSSÃO	45
6.1	Dados clinicoepidemiológicos	45
6.2	Galectina 3 e <i>IDH-1</i>	45
6.3	Gene <i>FGFR1</i>	46

6.4	Gene BRAF	48
6.5	Proteína RKIP	49
6.6	Proteína MTAP	50
6.7	Importância prognóstica das alterações moleculares dos astrocitomas pilocíticos	51
7	CONCLUSÕES	53
	REFERÊNCIAS	54
	ANEXOS	
Anexo A	Anexo A – Capítulo “Pilocytic Astrocytoma: Anatomic, pathological and molecular aspects.” – Capítulo em <i>Open access</i> , disponível em http://www.intechopen.com/books/clinical-management-and-evolving-novel-therapeutic-strategies-for-patients-with-brain-tumors/pilocytic-astrocytoma-anatomic-pathological-and-molecular-aspects	61
Anexo B	Aprovação no Comitê de Ética HCB	79
Anexo C	Aprovação no Comitê de Ética HCRP	80
Anexo D	Ficha de coleta dos dados clínicos	81

Anexo E	Carta de aceite de manuscrito na Pathobiology (Fator de impacto: 2.48).	82
Anexo F	Artigo “Expression of methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) in pilocytic astrocytomas” (Reprodução proibida)	83
Anexo G	Carta de aceite de manuscrito no Journal of Neuropathology and Experimental Neurology (Fator de impacto: 4.372).	89
Anexo H	Artigo “ <i>KIAA1549:BRAF</i> gene fusion and <i>FGFR1</i> hotspot mutations are prognostic factors in pilocytic astrocytomas” – Artigo em <i>Open access</i> , disponível em http://journals.lww.com/jneuropath/toc/2015/07000	90

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Incidência dos astrocitomas pilocíticos nas faixas etárias pediátricas nos Estados Unidos.	3
Figura 2-	Incidência por tipo de câncer infanto-juvenil no Brasil, de 1998-2002.	3
Figura 3-	Representação esquemática da via MAPK ERK 1/2.	6
Figura 4-	Aspectos histopatológicos dos astrocitomas pilocíticos à coloração de HE.	15
Figura 5-	Método de preparação dos TMAs.	17
Figura 6-	Métodos utilizados para o sequenciamento dos genes <i>BRAF</i> e <i>FGFR1</i> nas amostras.	20
Figura 7-	Esquema das sondas utilizadas para pesquisa da fusão <i>KIAA1549-BRAF</i> pelo método de FISH.	23
Figura 8-	Imunoexpressão de galectina-3 e <i>IDH-1</i> mutado.	29

Figura 9-	Padrões de expressão de <i>FGFR1</i> .	30
Figura 10-	Alterações moleculares do gene <i>FGFR1</i> .	32
Figura 11-	Alterações moleculares do gene <i>BRAF</i> .	35
Figura 12-	Resumo das alterações moleculares dos genes <i>FGFR1</i> e <i>BRAF</i> na série de astrocitomas pilocíticos, em relação aos grupos clínicos.	36
Figura 13-	Padrões de expressão imuno-histoquímica da RKIP.	37
Figura 14-	Expressão imuno-histoquímica de MTAP.	39
Figura 15-	Comparação das curvas de sobrevida total dos pacientes com astrocitomas pilocíticos, de acordo com os grupos etários.	41

Figura 16-	Impacto da mutação K656E do <i>FGFR1</i> na sobrevida total e sobrevida livre de doença nos pacientes com astrocitomas pilocíticos.	43
Figura 17-	Impacto da fusão gênica <i>KIAA1549-BRAF</i> na sobrevida total e sobrevida livre de doença nos pacientes com astrocitomas pilocíticos.	43
Figura 18-	Análise combinada da curva de sobrevida total dos pacientes com astrocitomas pilocíticos em relação a alterações do <i>FGFR1</i> (mutação e expressão imuno-histoquímica) e fusão <i>KIAA1549-BRAF</i> .	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Síndromes familiares relacionadas ao desenvolvimento de astrocitomas.	2
Tabela 2-	Anticorpos comerciais utilizados para estudo imuno-histoquímico dos astrocitomas pilocíticos.	16
Tabela 3-	Dados clinicoepidemiológicos da série de astrocitomas pilocíticos.	27
Tabela 4-	Perfil molecular do <i>FGFR1</i> em relação aos grupos clínicos.	31
Tabela 5-	Perfil molecular do <i>BRAF</i> em relação aos grupos clínicos.	34
Tabela 6-	Expressão de RKIP em relação aos grupos clínicos.	38
Tabela 7-	Intensidade de MTAP de acordo com a localização da neoplasia.	40

Tabela 8-	Expressão de MTAP em relação aos grupos clínicos.	41
Tabela 9-	Impacto das alterações gênicas na sobrevida total do grupo de pacientes com astrocitomas pilocíticos.	42

LISTA DE ABREVIATURAS

a-CGH	<i>Comparative genomic hybridization microarray</i>
AP	Astrocitoma pilocítico
CBTRUS	<i>Central Brain Tumors Registry of the United States</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ERK	<i>Extracellular signal-Regulated Kinase</i>
FGFR1	<i>Fibroblast-growth factor receptor 1</i>
GAPs	Proteínas Ativadoras de GTPase
GBM	Glioblastoma
GISTs	Tumores estromais gastrintestinais (<i>Gastrintestinal stromal tumors</i>)
GTP	Guanosina Trifosfato
HCB	Hospital de Câncer de Barretos
HCRP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
HE	Hematoxilina e eosina
IHQ	Imuno-histoquímica
INCA	Instituto Nacional de Câncer

LLA	Leucemia linfoblástica aguda
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MTAP	Metiltioadenosina fosforilase
Nf1	Neurofibromatose tipo 1 (doença)
NF1-AP	Astrocitoma pilocítico relacionado à neurofibromatose tipo 1
OIS	Senescência Induzida por Oncogenes (<i>oncogene-induced senescence</i>)
OMS	Organização Mundial da Saúde
RKIP	Proteína inibidora da <i>RAFkinase</i> (<i>RAFkinase inhibitor protein</i>)
RM	Ressonância magnética
RTK	Receptor Tirosino-Quinase
SDNP	Síntese <i>de novo</i> de purinas
SNC	Sistema Nervoso Central
TC	Tomografia computadorizada
TMA	<i>Tissue microarray</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

% Porcentagem

μm Micrômetro

μl *Microlitro*

$^{\circ}\text{C}$ Graus Celsius

® Marca registrada

= igual

\geq Maior ou igual

\leq Menor ou igual

$>$ Maior que

RESUMO

Becker, AP. Avaliação da via MAPK na oncogênese dos astrocitomas pilocíticos. **Tese (Doutorado)** – Barretos: Hospital de Câncer de Barretos; 2015.

JUSTIFICATIVA: Astrocitomas pilocíticos (APs) são os tumores mais comuns do sistema nervoso central na faixa etária pediátrica. A via MAPK é sua via molecular principal, sendo as alterações mais importantes a fusão *KIAA1549-BRAF* e as mutações do gene *FGFR1*. O papel prognóstico destas alterações e a relação da ativação constitutiva da via MAPK com a senescência induzida por oncogenes, que pode estar relacionada às proteínas RKIP e MTAP, não são bem estabelecidos. Potencialmente, este conhecimento possibilitaria a utilização de terapias-alvo para bloqueio do crescimento de lesões residuais e/ou recidivas, principalmente nas lesões inacessíveis à cirurgia. **OBJETIVOS:** *Objetivo geral:* Elucidar o papel da via MAPK na oncogênese dos APs. *Objetivos específicos:* a) Descrever os dados clínico-epidemiológicos e a sobrevida na série de pacientes. b) Descrever a expressão imuno-histoquímica de dois genes ativadores (*FGFR1* e *BRAF*) e de um regulador negativo (*RKIP*) da via MAPK e de uma proteína relacionada à OIS (MTAP). c) Descrever, na série, a frequência das alterações gênicas mais comuns de acordo com a literatura (mutações pontuais do *BRAF*, fusão *KIAA1549-BRAF*, amplificações e mutações pontuais do *FGFR1*). d) Comparar as características moleculares dos astrocitomas pilocíticos entre grupos pediátrico e adulto, entre casos esporádicos e familiares (NF1-APs) e entre tumores cerebelares e extracerebelares. e) Investigar a influência prognóstica das alterações moleculares observadas nos astrocitomas pilocíticos. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Estudo observacional descritivo de uma série de 69 pacientes com APs levantados nos Departamentos de Patologia do Hospital de Câncer de Barretos e do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Os pacientes foram divididos em grupos de acordo com o gênero, idade, localização da lesão, diagnóstico clínico de Neurofibromatose do tipo 1 (Nf1) e evolução. Após a revisão dos casos, foram construídas duas plataformas de TMA, específicas para cada serviço. Os estudos imuno-histoquímicos da expressão de *FGFR1*, *BRAF*, *RKIP* e *MTAP* e a pesquisa da fusão *KIAA1549-BRAF* e da amplificação do *FGFR1* através de FISH foram realizados nas lâminas dos TMAs. O sequenciamento total de exons específicos dos genes *FGFR1* (exons 12 e 14; códons 546 e

656) e *BRAF* (exon 15; códon 600) foram realizados no DNA tumoral extraído das amostras embebidas em parafina. Toda a metodologia e interpretação dos dados seguiu protocolos previamente estabelecidos na literatura. Os cálculos estatísticos foram realizados assumindo $p < 0,05$ como valor de significância. **RESULTADOS:** A sobrevida total mediana da série foi de 4,0 anos (0,6-16,4 anos) com sobrevida em 5 e 10 anos de, respectivamente, >90% e 80%, e não influenciada por idade de aparecimento da neoplasia ($p=0,664$), gênero ($p=0,293$), localização da lesão ($p=0,826$) ou ocorrência de Nf1 ($p=0,726$). *FGFR1*- Houve expressão de *FGFR1* em 71% dos casos. A mutação pontual K656E foi detectada em 3 tumores cerebelares (6,7%) de pacientes do grupo pediátrico. Não foi observada amplificação do *FGFR1* em nenhum dos casos, mas 10% apresentaram baixo ganho no número de cópias do gene. A relação dessas alterações com a expressão imuno-histoquímica de *FGFR1* tendeu à significância ($p=0,086$ e $p=0,091$, respectivamente). Não foram observadas diferenças significativas das alterações do *FGFR1* entre os diversos grupos clínicos do estudo. *BRAF*- O estudo imuno-histoquímico foi negativo em todas as lesões avaliadas. Foram detectadas duas mutações pontuais do *BRAF* (4,2%), V600E e V600K, ambas em pacientes do grupo pediátrico. A fusão *KIAA1549-BRAF* foi detectada em quase 60% dos casos, apresentando correlação positiva com localização cerebelar ($p < 0,001$) e negativa com o diagnóstico de Nf1 ($p=0,011$). Um paciente com *BRAF* mutado e um paciente com *FGFR* mutado apresentaram fusão *KIAA1549-BRAF* concomitante. Não foram observadas diferenças significativas das alterações do *BRAF* entre os diversos grupos clínicos do estudo. *RKIP* e *MTAP*- Ambas apresentaram positividade/expressão mantida em mais de 95% dos casos, sem diferenças significativas entre os grupos clínicos. As alterações que apresentaram impacto na sobrevida total foram a fusão *KIAA1549-BRAF*, que identificou um grupo com melhor prognóstico ($p=0,009$), e a mutação K656E, que determinou menor sobrevida ($p=0,047$). Quando avaliados de maneira combinada, a fusão *KIAA1549-BRAF* foi relacionada a sobrevida mais longa, independente da expressão imuno-histoquímica e status mutacional do *FGFR1*. Entre os tumores sem a fusão *KIAA1549-BRAF*, a presença da mutação K656E determinou pior sobrevida ($p=0,002$), enquanto a expressão de *FGFR1* foi relacionada a um melhor prognóstico ($p=0,032$). **CONCLUSÕES:** O astrocitoma pilocítico é uma lesão de bom prognóstico, com sobrevida total longa, independente de idade de aparecimento da neoplasia, gênero, localização da lesão ou ocorrência de Nf1. A expressão imuno-histoquímica de *FGFR1* aumentada nos APs pode estar relacionada com a mutação K656E e com o baixo ganho no número de cópias do *FGFR1*. As

mutações do gene *FGFR1* foram observadas em lesões cerebelares e determinam sobrevida mais curta. Amplificação gênica do *FGFR1* não foi um evento observado nesta série de APs. As mutações do gene *BRAF* são eventos raros, observadas em menos de 10% dos astrocitomas pilocíticos e não interferiram na sobrevida dos pacientes. A fusão *KIAA1549-BRAF* é o evento mais frequentemente observado nos astrocitomas pilocíticos, apresentando correlação positiva com localização cerebelar e negativa com a ocorrência de Nf1. A presença da fusão *KIAA1549-BRAF* é um fator prognóstico nos APs, identificando um grupo com maior sobrevida. A superexpressão de RKIP em astrocitomas pilocíticos em praticamente todos os casos sugere o bloqueio da via MAPK em sua função de indução de proliferação celular, explicando o comportamento indolente dos astrocitomas pilocíticos. A superexpressão de MTAP em quase todos os casos sugere a importância da senescência induzida por oncogenes na gênese dos astrocitomas pilocíticos e a perda de expressão de MTAP pode identificar um subgrupo de pacientes que responderiam à terapia com inibidores da síntese de novo de purinas.

1. Glioma. 2. Astrocitoma. 3. Prognóstico. 4. Imuno-histoquímica. 5. Análise de sequência de DNA. 6. Sistema de sinalização das MAP quinases.

ABSTRACT

BACKGROUND: Pilocytic astrocytomas (PAs) are the most common tumors of the central nervous system in pediatric patients. The MAPK pathway is the main molecular pathway, with the *KIAA1549-BRAF* fusion and *FGFR1* mutations being the most important changes. The prognostic role of these changes and the relationship of constitutive activation of the MAPK with the senescence induced by oncogenes, which may be related to RKIP and MTAP proteins, are not well established. Potentially this knowledge would allow the use of targeted therapies for blocking growth of residual lesions and / or recurrences, particularly in lesions inaccessible to surgery. **AIMS:** General aim: To elucidate the role of the MAPK pathway in the oncogenesis of PAs. Specific aims: a) To describe the clinical and epidemiological data and the overall survival in the series of patients. b) To describe the immunohistochemical expression of two triggers (*FGFR1* and *BRAF*), and a negative regulator (RKIP) of MAPK pathway and a protein related to oncogene-induced senescence (MTAP). c) To describe, in the series, the frequency of the most common genetic alterations in accordance with the literature (*BRAF* point mutations, *KIAA1549-BRAF* fusion, *FGFR1* amplifications and point mutations). d) To compare the molecular characteristics of pilocytic astrocytomas between pediatric and adult groups, sporadic and familial cases (NF1-PAs), and cerebellar and extra-cerebellar tumors. e) To investigate the prognostic influence of the molecular changes observed in pilocytic astrocytomas. **PATIENTS AND METHODS:** Observational study of a series of 69 patients with PAs obtained in the Departments of Pathology of the Barretos Cancer Hospital and the Hospital of the Ribeirão Preto Medical School, University of Sao Paulo. Patients were divided into groups according to gender, age, location of the lesion, clinical diagnosis of neurofibromatosis type 1 (NF1) and evolution. After reviewing the cases, we built two TMA platforms specific to each service. Immunohistochemical studies of *FGFR1*, *BRAF*, *RKIP*, and *MTAP* expression and the search of *BRAF-KIAA1549* fusion and *FGFR1* amplification by FISH were performed in TMA slides. The sequencing of specific whole exons from the *FGFR1* gene (exons 12 and 14, codons 546 and 656) and *BRAF* (exon 15, codon 600) were performed in DNA extracted from tumor samples embedded in paraffin. The entire methodology and interpretation of data followed protocols previously established in the literature. Statistical analyses were performed considering $p < 0.05$ as significance value. **RESULTS:** The median overall survival in the series was 4.0 years (0.6 to 16.4 years) with 5- and 10-years survival

respectively >90% and 80%, and not influenced by age of onset of neoplasia ($p = 0.664$), gender ($p = 0.293$), location of the lesion ($p = 0.826$) or occurrence of Nf1 ($p = 0.726$). *FGFR1*- There was *FGFR1* expression in 71% of cases. The K656E point mutation was detected in three cerebellar tumors (6.7%) in pediatric patients. There was no amplification of *FGFR1* in either case, but 10% showed low copy number gain of the gene. The relationship of these changes with the immunohistochemical expression of *FGFR1* tended towards significance ($p = 0.086$ and $p = 0.091$, respectively). No significant differences were observed in *FGFR1* alterations between different clinical groups. *BRAF*- The immunohistochemical study was negative in all evaluated lesions. We detected two point mutations in *BRAF* (4.2%), V600E and V600K, both in pediatric patients. The *KIAA1549-BRAF* fusion was detected in nearly 60% of cases showing positive correlation with cerebellar location ($p < 0.001$) and negative with the diagnosis of Nf1 ($p = 0.011$). A patient with mutated *BRAF* and one patient with mutated *FGFR* presented concomitant *KIAA1549-BRAF* fusion. No significant differences were observed in *BRAF* changes between different clinical groups. *RKIP* and *MTAP*- Both were positive / had maintained expression in 95% of cases, without significant differences between clinical groups. The changes that had impact on overall survival were the *KIAA1549-BRAF* fusion, which identified a group with better prognosis ($p = 0.009$), and the K656E mutation, which determined shorter survival ($p = 0.047$). When evaluated on a combined basis, the *KIAA1549-BRAF* fusion was related to longer survival, regardless of immunohistochemical expression and mutational status of *FGFR1*. Among the tumors without the *KIAA1549-BRAF* fusion, the presence of the mutation K656E determined worse survival ($p = 0.002$), while *FGFR1* expression was associated with a better prognosis ($p = 0.032$). **CONCLUSIONS:** - Pilocytic astrocytoma presents good prognosis, with long overall survival, regardless of age of onset of cancer, gender, location of the tumor or occurrence of Nf1. Increased immunohistochemical expression of *FGFR1* in PAs can be related to the mutation K656E and with low copy number gain of *FGFR1*. *FGFR1* point mutations were observed in cerebellar lesions and determined shorter survival. *FGFR1* gene amplification was not observed in this series of PAs. *BRAF* mutations are rare, and did not affect patients' survival. The *KIAA1549-BRAF* fusion is the most frequent event in pilocytic astrocytomas, presenting positive correlation with cerebellar location and negative with the occurrence of Nf1. The presence of *KIAA1549-BRAF* fusion is a prognostic factor in PAs, identifying a group with longer survival. The *RKIP* overexpression in pilocytic astrocytomas in virtually all cases suggests blocking the cell proliferation-inducing

function of the MAPK pathway, possibly explaining the indolent behavior of pilocytic astrocytomas. Overexpression of MTAP in almost all cases suggests the importance of oncogene-induced senescence in the pathogenesis of pilocytic astrocytomas, and loss of MTAP expression may identify a subset of patients who could possibly respond to therapy with inhibitors of *de novo* purine synthesis.

1. Glioma. 2. Astrocytoma. 3. Prognosis. 4. Immuno-histochemistry. 5. Sequence Analysis, DNA. 6. MAP Kinase Signaling System.

1 INTRODUÇÃO

Astrocitomas são gliomas derivados de células primordiais do neuroepitélio que se diferenciam em astrócitos^{1,2}. Tais tumores constituem um grupo intensamente heterogêneo, tanto do ponto de vista histopatológico, quanto molecular, o que se reflete numa ampla variabilidade de apresentação, curso clínico e prognóstico dos pacientes^{1,2}.

Os fatores associados à etiologia dos gliomas são pouco conhecidos ou inconsistentes¹. Dentre estes, a radiação X é o único fator comprovadamente associado ao desenvolvimento de astrocitomas em crianças portadoras de leucemia linfoblástica aguda (LLA), submetidas a radioterapia profilática³⁻⁵.

Além da radiação como fator etiológico extrínseco relacionado ao desenvolvimento de astrocitomas, algumas síndromes genéticas familiares são relacionadas à gênese destas neoplasias⁶. Tais síndromes tem em comum um padrão de herança autossômica dominante e os principais exemplos estão citados na Tabela 1.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica os astrocitomas em 4 graus de malignidade, baseados nas características morfológicas (radiológicas e histopatológicas) das neoplasias, nomeados como graus I, II, III e IV. Os astrocitomas de graus II (astrocitomas difusos), III (astrocitomas anaplásicos) e IV (glioblastomas – GBMs) são astrocitomas infiltrativos, mais comuns em pacientes adultos, e apresentam alterações moleculares em comum, podendo evoluir de um grau a outro ao longo do tempo (GBM secundário). As características histopatológicas que identificam estes tumores, são, cumulativamente, a presença de atipias nucleares (grau II), anaplasia e atividade mitótica (grau III) e proliferação microvascular e/ou necrose (grau IV).

Tabela 1- Síndromes familiares relacionadas ao desenvolvimento de astrocitomas.

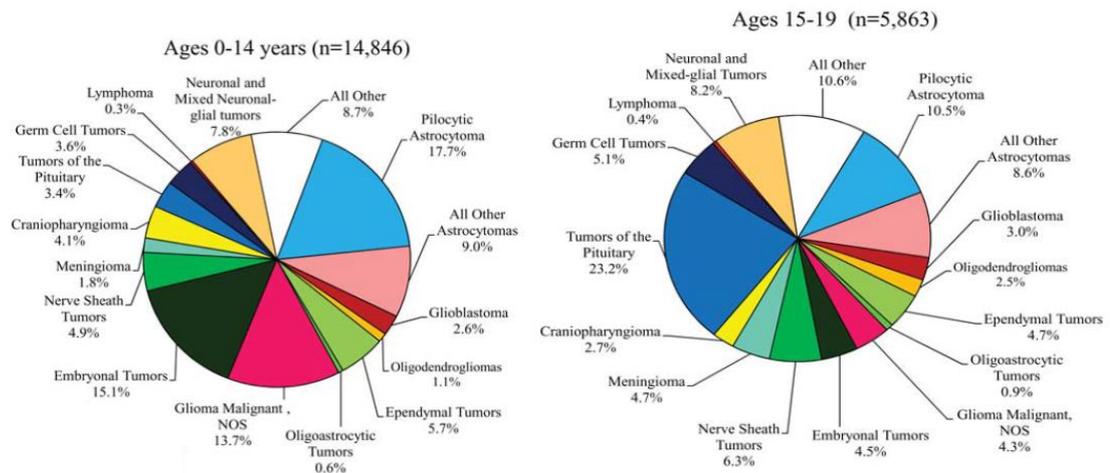
Síndrome	Gene	Locus	Neoplasia
Neurofibromatose tipo 1	<i>NF1</i>	17q11	Astrocitoma pilocítico, astrocitoma difuso e GBMs.
Neurofibromatose tipo 2	<i>NF2</i>	22q12	Astrocitoma pilocítico e astrocitoma difuso.
Li-Fraumeni	<i>TP53</i>	17p13	Astrocitoma difuso, astrocitoma anaplásico e GBM.
Esclerose tuberosa	<i>TSC1</i> <i>TSC2</i>	9p34 16p13	Astrocitoma subependimário de células gigantes.
Turcot tipo 1	<i>hPSM2</i>	7p22	Astrocitoma anaplásico e GBM.

GBM- Glioblastoma. Fonte: Louis et al.⁶

Diferentemente dos astrocitomas infiltrativos (graus II, III e IV), o astrocitoma de grau I da OMS é um tumor circunscrito, representado nesta classificação unicamente pelo *astrocitoma pilocítico*^{1,7}.

1.1 Astrocitoma pilocítico

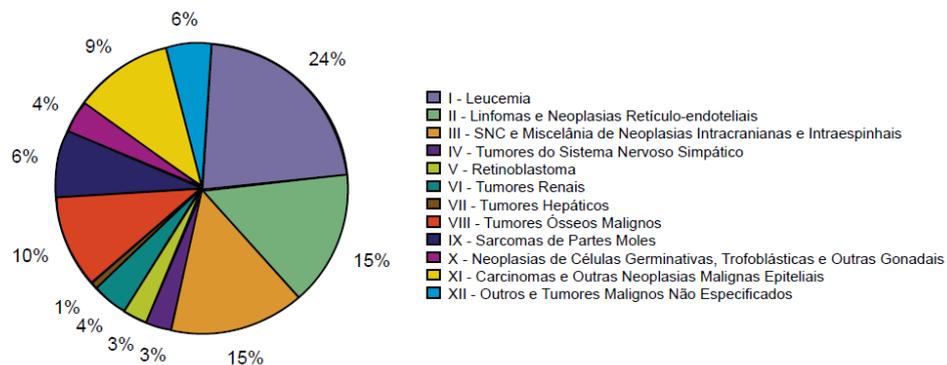
O astrocitoma pilocítico (AP) representa uma grande parte das neoplasias cerebrais da infância. Segundo os dados do *Central Brain Tumors Registry of the United States* (CBTRUS), em 2012 os APs corresponderam a cerca de 5% de todos os gliomas, sendo o tumor mais comum na faixa etária de 5 a 14 anos e o segundo mais frequente nas faixas de 0-4 e 15-19 anos⁸ (Figura 1).



Fonte: Dolecek et al.⁸

Figura 1- Incidência dos astrocitomas pilocíticos nas faixas etárias pediátricas nos Estados Unidos.

No Brasil, os dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA) mostram que os tumores do sistema nervoso central (SNC) correspondem à terceira neoplasia mais prevalente na maior parte do país, atrás apenas das leucemias e dos linfomas⁹ (Figura 2). No estado de São Paulo, o AP foi o tumor mais frequente do SNC, ocorrendo em cerca de 18% dos casos¹⁰.



Fonte: Camargo et al.⁹

Figura 2- Incidência por tipo de câncer infanto-juvenil no Brasil, de 1998-2002.

O AP é uma neoplasia predominantemente pediátrica, com pico de incidência entre 6 e 8 anos, porém são descritos casos em pacientes até a 8ª década de vida². Na população adulta a incidência é muito menor, correspondendo a menos de 1% dos tumores cerebrais em pacientes maiores de 20 anos⁸, e apresentam curso clínico mais agressivo^{11,12}.

A localização mais frequente dos APs é o cerebelo, porém podem ocorrer em todo o neuroeixo, preferencialmente nas estruturas da linha média e próximo aos ventrículos ^{1,2,13}. Os tumores extracerebelares, particularmente os localizados nas vias ópticas, com frequência estão relacionados à ocorrência de neurofibromatose do tipo 1 (Nf1) ^{1,2}. Os APs esporádicos e aqueles relacionados à Nf1 (Nf1-APs), apresentam curso clínico diferente e alterações moleculares diversas ^{14,15}.

Em exames de neuroimagem o AP é geralmente observado como uma lesão bem delimitada, com variáveis proporções de componentes sólidos e císticos característicos. Histologicamente, padrão bifásico com células piloides e células arredondadas (semelhantes a oligodendrócitos), fibras de Rosenthal e glóbulos hialinos são as características que frequentemente definem a neoplasia ^{1,2,13}. Curiosamente, apesar de ser uma lesão de baixo grau, os APs podem apresentar algumas características comuns aos GBMs, como por exemplo: captação de contraste nos exames de ressonância magnética (RM) e presença de atipias nucleares, proliferação microvascular e focos de necrose ao exame histopatológico ^{1,2,13}. Entretanto, diferente dos astrocitomas infiltrativos, tais características histológicas não são consideradas indicativas de malignidade, exceto se associadas à presença de alta atividade mitótica ^{16,17}.

Por seu caráter circunscrito, os APs frequentemente são passíveis de ressecção total, com sobrevida em 10 anos em mais de 90% dos pacientes ^{1,2}. Entretanto, em cerca de 10 a 20% dos casos ocorrem recidivas, crescimento de lesões residuais ou, ainda, evoluções desfavoráveis devido à morbidade cirúrgica ^{17,18}. Apesar de vários autores buscarem características morfológicas que possam prever o comportamento dos APs, a extensão da ressecção continua sendo um importante fator prognóstico ^{19,20}.

Do ponto de vista molecular, embora originado da mesma célula primordial dos astrocitomas infiltrativos, o AP apresenta vias de oncogênese diferentes ^{21,22}, tanto na expressão gênica, quanto no padrão de herança destas alterações. Dentre as principais diferenças, citamos o gene *Epidermal growth factor receptor (EGFR)*, relacionado à invasão e progressão de neoplasias, que se encontra hipoexpresso em APs ^{23,24}, enquanto é amplificado/superexpresso nos GBMs primários ²⁵, e os genes *TP53*, *PTEN* e *IDH1* ²⁶⁻²⁸, que estão frequentemente inativados (*TP53* e *PTEN*) ou mutados (*IDH-1*) nos astrocitomas difusos, anaplásicos e GBMs secundários, mas não apresentam um papel de destaque na oncogênese dos APs.

1.2 Neurofibromatose do tipo 1 e astrocitomas pilocíticos

A Nf1 é uma síndrome genética familiar de herança autossômica dominante, com expressão fenotípica variada. Dentre as principais neoplasias relacionadas à Nf1 estão os neurofibromas e os gliomas, principalmente os localizados nas vias ópticas ²⁹. Os APs correspondem à grande maioria dos gliomas relacionados à Nf1 ^{30,31}. Cerca de 15% dos pacientes com Nf1 desenvolvem APs ³¹ e em torno de 10% dos APs são relacionados à Nf1 ²¹.

A relação dos APs com a Nf1 é devida a uma mutação de linhagem germinativa no gene *NF1* ²¹, diferente das mutações somáticas que ocorrem em cerca de 15% dos GBMs ^{21,32} e das deleções do *NF1* que ocorrem em gliomas de alto grau pediátricos ³³.

As mutações do *NF1* resultam em alterações da proteína neurofibromina, que faz parte da família de Proteínas Ativadoras de GTPase (GAPs), as quais têm a função de inativar a oncoproteína mitogênica RAS ²¹. A perda da função da neurofibromina, com consequente ativação constitucional da RAS, leva à ativação de vias de sinalização intracelular que promovem a mitogênese e facilitam o desenvolvimento de tumores, tais como mTOR/AKT e MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*) ²¹. A via mTOR/AKT identifica um subgrupo mais agressivo, porém seu papel ainda não é bem estabelecido na gênese dos APs ³⁴. A via MAPK, por outro lado, vem ganhando força como um pilar central na oncogênese dos APs ²¹ e será o principal alvo deste estudo.

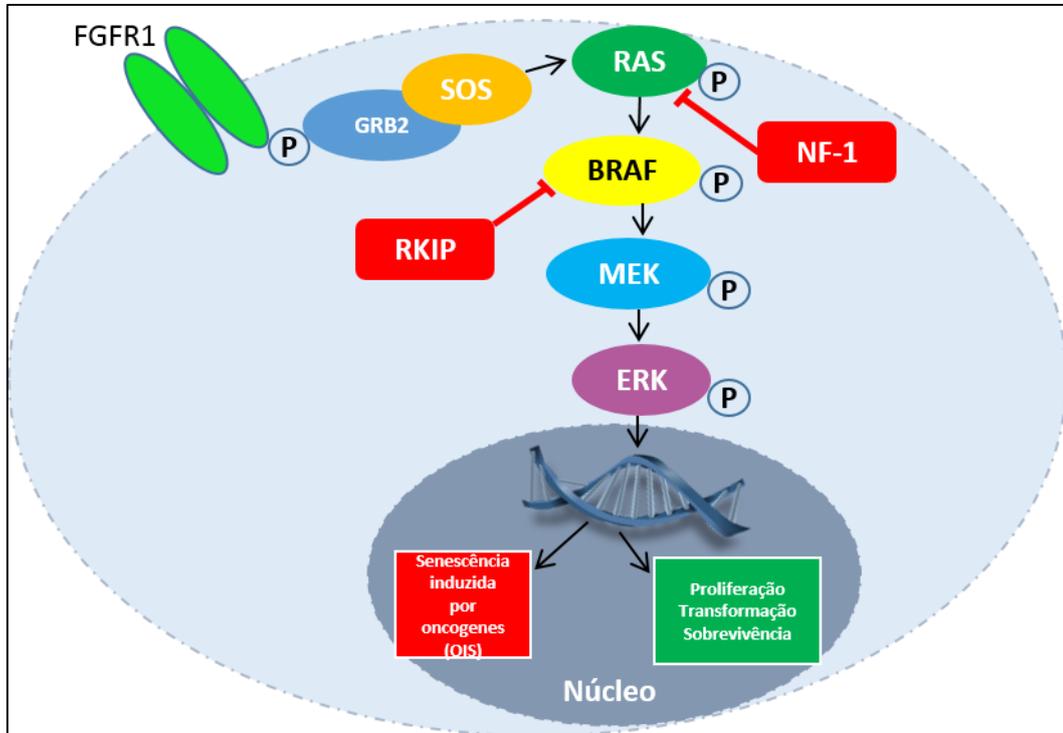
1.3 A via MAPK

As células neoplásicas apresentam características fundamentais, que conferem a elas vantagens de crescimento, nutrição e invasão em relação às demais células ³⁵. A atividade proliferativa sustentada é um dos principais mecanismos na oncogênese humana e é iniciada e mantida através da ativação constitutiva das vias de sinalização intracelulares, como as vias MAPK.

As MAPKs são proteínas constitutivas de todos os tipos celulares, que regulam respostas específicas a vários estímulos, como citocinas, fatores de crescimento, antígenos, toxinas, drogas e agentes físicos, através da ligação destes estímulos a um receptor tirosino-quinase (RTK), seguida da fosforilação (ativação) em cascata de diferentes classes de proteínas efetoras, permitindo uma organização da resposta celular a estes estímulos ³⁶.

Dentre as diversas vias MAPK conhecidas, a via ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinase*), constituída pelas proteínas RAS, RAF, MEK e ERK, é a mais estudada (Figura 3) ³⁷. Esta

via regula os processos de proliferação, diferenciação, sobrevivência, migração, angiogênese e remodelação da cromatina ^{38,39}.



Fonte: Modificado de Becker et al.¹³ (Anexo A)

Figura 3- Representação esquemática da via MAPK ERK1/2.

Cerca de 1/3 de todas as neoplasias malignas em humanos apresentam alteração da via ERK, geralmente ocorrendo em fases precoces da via, ou seja, entre a ligação do estímulo com o RTK e a ativação das RAFs ³⁷. A proteína crítica na transmissão do sinal do RTK para ERK é a proteína RAS, a qual interage com a família RAF, constituída por três membros (ARAF, BRAF e CRAF), que são as principais quinases efetoras da cascata ERK ^{40,41} (Figura 3). As mutações das proteínas constituintes da via MAPK podem ocorrer em qualquer nível, geralmente de maneira mutuamente exclusiva ¹⁸.

Nos APs a via MAPK é considerada a via principal de oncogênese ^{18,42}, apresentando mutações frequentes em vários níveis. Atualmente, as mutações mais estudadas são as ativações constitutivas dos RTKs e da família RAF, no eixo principal da via.

1.3.1 Mutações do *FGFR1*

O Receptor do fator de crescimento fibroblástico-1 (*Fibroblast-growth factor receptor-1* – *FGFR1*) é um RTK cujas mutações, representadas principalmente pela amplificação do gene, iniciam a ativação da via MAPK em vários tumores sólidos. Nos carcinomas de mama ^{43,44}, amplificações do *FGFR1* ocorrem em cerca de 10% dos casos, porém aparentemente sem implicações prognósticas ⁴⁵. Em carcinomas de não-pequenas células de pulmão ^{46,47}, são associadas a tumores mais agressivos ⁴⁸ e em osteossarcomas estão associadas a pior resposta a quimioterapia ⁴⁹.

Em tumores do SNC, o principal mecanismo de alteração das proteínas da família *FGFR* descrito são as fusões gênicas envolvendo os genes *FGFR1-TACC1* e *FGFR3-TACC3*, descritas em um subgrupo de glioblastomas ⁵⁰.

Recentemente, mutações pontuais do gene *FGFR1* em astrocitomas pilocíticos ganharam destaque como gatilhos de ativação da via MAPK com os estudos de Jones et al. ⁴². Tais mutações envolvem codons específicos do *FGFR1* e representam substituição de asparagina por lisina no codon 546 (Asn546Lys ou N546K) e substituição de lisina por ácido glutâmico no codon 656 (Lys656Glu ou K656E). As mesmas mutações do *FGFR1* foram posteriormente descritas também em um pequeno grupo de tumores glioneurais formadores de roseta do quarto ventrículo ⁵¹. O mesmo estudo relatou também a presença de mutação K656E em um astrocitoma pilomixóide da região diencefálica em um dos pacientes analisados ⁵¹. Não há na literatura estudos com séries maiores confirmando a presença das mutações de *FGFR1* em APs e seu papel prognóstico ainda permanece desconhecido ⁴².

1.3.2 Alterações do *BRAF*

O eixo RAS-RAF é considerado o centro regulatório da via MAPK. Mutações primárias da proteína RAS estão presentes em cerca 30% das neoplasias humanas, principalmente de pâncreas, cólon, tireoide, pulmão e nos melanomas ⁵². Entretanto, a alteração do eixo pode também estar associada a mutações das proteínas RAF e de outras classes de moléculas efetoras ^{53,54}.

As proteínas da família RAF são os efetores diretos de RAS e mediam a fosforilação e ativação das proteínas MEK1 e MEK2 ⁵⁵. Há três isoformas descritas, que são

similares em estrutura e características biológicas. Dentre essas, a proteína BRAF é a que apresenta maior atividade quinase⁵⁵ e a única que pode ser ativada isoladamente pela RAS^{37,56}.

A hiperativação do gene *BRAF* foi descrita em cerca de 8% dos tumores humanos⁵⁵, atingindo até 60% dos melanomas⁵⁷ e sendo descritas também nos tumores de tireoide, cólon e ovário³⁷. As alterações do proto-oncogene *BRAF* foram recentemente descritas em até 80% dos APs²⁸. Os mecanismos que explicam o aumento da atividade constitutiva de *BRAF* são as fusões gênicas, a mutação pontual V600E e a duplicação do gene⁵⁸, sendo estes mecanismos, em geral, mutuamente exclusivos⁵⁹.

A fusão gênica é o mecanismo mais frequente de alteração do BRAF em APs, ocorrendo em 50 a 100% dos pacientes investigados¹⁸. Em 60 a 80% dos casos a fusão se dá entre os proto-oncogenes *KIAA1549* e *BRAF* (fusão *KIAA1549-BRAF*)^{60,61}, ambos localizados no cromossomo 7¹⁸. Outras fusões menos comuns envolvendo membros da família RAF em APs podem ser observadas, tais como *CRAF-SRGAP3*⁶², *FAM131B-BRAF*⁶³ e *RNF130-BRAF*, *CLCN6-BRAF*, *MKRN1-BRAF* e *GNAI1-BRAF*⁴².

O segundo mecanismo de ativação de *BRAF* é a mutação pontual V600E, que ocorre quando há uma substituição do ácido glutâmico por valina no códon 600 do gene *BRAF*⁵⁵. Esta mutação ocorre em menos de 10% dos casos de APs e além de rara, não é específica, podendo ser observada em outros tumores cerebrais, particularmente em mais de 60% dos xantastrocitomas pleomórficos e em 18% dos gangliogliomas⁶⁴, podendo inclusive ser identificada em até 6% dos glioblastomas^{64,65}.

Finalmente, a duplicação da região 7q34 do *BRAF*, observada em estudos de hibridização genômica comparativa em matriz (*comparative genomic hybridization* - aCGH) é um mecanismo menos frequente de hiperexpressão deste gene em APs esporádicos, resultando em ativação da via ERK^{59,66}. Embora este mecanismo de duplicação tenha sido descrito inicialmente como específico de APs, ele pode ocorrer como um evento anterior à fusão *KIAA1549-BRAF*⁶⁷.

Apesar de bem caracterizadas, há poucos estudos sobre o papel prognóstico das mutações do *BRAF* em APs.

1.3.3 Regulador negativo da MAPK: RKIP

A proteína inibidora da RAFkinase (*RAFkinase inhibitor protein* – RKIP) é uma proteína reguladora negativa da via ERK (Figura 3), cuja perda da expressão foi relacionada a maior agressividade e possibilidade de metástase de neoplasias de próstata⁶⁸, mama, cólon, fígado e melanoma²², tumores estromais gastrintestinais (*gastrintestinal stromal tumors* – GISTs) e tumores do colo uterino⁶⁹⁻⁷¹ e à resistência aos tratamentos antineoplásicos²². O mecanismo da perda de expressão nestes tumores não é bem esclarecido²² e o mais provável é a metilação do gene^{69,72}.

Por outro lado, a expressão mantida ou aumentada de RKIP apresenta importância prognóstica, identificando tumores de próstata⁷³, mama⁷⁴, colorretal^{72,75} e GISTs⁶⁹ com melhor evolução clínica. Além disso, vários trabalhos demonstram que a superexpressão de RKIP em câncer de próstata e mama^{76,77} e de linfoma não-Hodgkin⁷⁸ resulta em uma ressensibilização aos agentes quimioterápicos utilizados²² e em melhora da resposta à radioterapia em câncer de próstata⁷⁹.

Em tumores do SNC, a perda de expressão de RKIP foi descrita em gliomas infiltrativos de alto grau^{80,81}, com impacto negativo na sobrevivência dos pacientes com astrocitomas difusos, anaplásicos e glioblastomas, oligodendrogliomas e oligoastrocitomas^{80,81}. Por outro lado, a manutenção da expressão de RKIP foi considerada um marcador de bom prognóstico nestes gliomas infiltrativos, principalmente quando associada à perda de expressão de STAT3, molécula efetora da via PI3K/Akt/MTOR⁸². Não há na literatura relatos da expressão de RKIP em APs.

1.4 Astrocitomas pilocíticos e senescência celular

A senescência fisiológica é um fenômeno biológico caracterizado pela interrupção do ciclo celular⁸³. A senescência induzida por oncogenes (*oncogene-induced senescence* – OIS) é um fenômeno semelhante à senescência fisiológica, que ocorre pela ativação de oncogenes, como o gene *BRAF*⁸³⁻⁸⁵. Com a frequente implicação das alterações do *BRAF* nos APs, a OIS foi demonstrada nestes tumores pela expressão citoplasmática da proteína p16, produto do gene *p16^{INK4a}*⁸⁶, que é um marcador de senescência bem estabelecido^{83,85}, além de identificar um grupo de pacientes com melhor prognóstico. À OIS é atribuído o fato dos APs serem neoplasias geralmente indolentes, sem progressão para maiores graus de malignidade^{83,85}.

1.4.1 Metiltioadenosina fosforilase (MTAP) e sua implicação na OIS

O gene *MTAP* é um gene supressor tumoral localizado na região 9p21, próximo ao gene *p16^{INK4a}*, com o qual é frequentemente coexpresso. A proteína MTAP, produto deste gene, é uma enzima constitutiva de células de vários tecidos normais e tem participação fundamental no metabolismo das purinas^{87,88}. Em células neoplásicas a inativação do *MTAP* estimula a síntese *de novo* de purinas (SDNP), que está relacionada à maior proliferação celular. Embora esta característica seja observada em neoplasias mais agressivas, tal inativação garante melhor respostas destes tumores aos inibidores da SDNP, tais como pemetrexed e metotrexate, pelas células neoplásicas^{87,89}.

MTAP encontra-se frequentemente hipoexpresso em neoplasias agressivas⁹⁰ como leucemias^{87,88,91}, melanoma⁹² e carcinomas de pele⁹³, fígado^{94,95}, bexiga⁹⁶ e pulmão^{97,98}, resultando em pior prognóstico. No SNC, a perda da expressão do *MTAP*, relacionada à deleção do gene³³, foi relatada em GBMs^{99,100}, inclusive pediátricos. Em todos os estudos levantados, tal perda de expressão foi avaliada por outros métodos, como western blot e ELISA^{33,99-102}. Não há na literatura estudos sobre a expressão da proteína MTAP por imunohistoquímica em gliomas, principalmente em APs.

2- JUSTIFICATIVA

Na última década, o conhecimento acerca da oncogênese dos APs foi bastante ampliado, com o reconhecimento da MAPK como via molecular principal destes tumores, apresentando como alterações mais frequentes a fusão *KIAA1549-BRAF* e as mutações do gene *FGFR1*. Entretanto, ainda há muito a ser esclarecido em relação ao papel dos genes e das proteínas constituintes desta via no prognóstico destes pacientes. Além disso, é necessário um maior entendimento sobre a relação da ativação constitutiva da via MAPK com o fenômeno da OIS, que pode estar relacionado às proteínas RKIP e MTAP.

Nossa hipótese é que o esclarecimento das vias oncogênicas dos APs pode auxiliar no estabelecimento do diagnóstico diferencial em casos com características histopatológicas duvidosas, na definição de prognóstico e até na seleção do tratamento para os pacientes que apresentam este tumor. Potencialmente, este conhecimento possibilitaria a utilização ou o desenvolvimento de terapias-alvo para bloqueio do crescimento de lesões residuais e/ou recidivas, possibilitando um tratamento adjuvante de lesões inacessíveis à ressecção cirúrgica.

3- OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Elucidar o papel da via MAPK na oncogênese dos astrocitomas pilocíticos.

3.2 Objetivos específicos:

- a) Descrever os dados clínico-epidemiológicos e a sobrevida na série de pacientes.
- b) Descrever a expressão imuno-histoquímica de dois genes ativadores (*FGFR1* e *BRAF*) e de um regulador negativo (*RKIP*) da via MAPK e de uma proteína potencialmente relacionada à OIS (MTAP).
- c) Descrever na série a frequência das alterações gênicas mais relatadas na literatura (mutação pontual do *BRAF*, fusão *KIAA1549-BRAF*, ampliações e mutações pontuais do *FGFR1*).
- d) Comparar as características moleculares dos astrocitomas pilocíticos entre grupos pediátrico e adulto, entre casos esporádicos e familiares (Nf1-APs) e entre tumores cerebelares e extracerebelares.
- e) Investigar a influência prognóstica das alterações moleculares observadas nos astrocitomas pilocíticos.

4- CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 Amostras disponíveis

O presente estudo constitui um estudo observacional descritivo de uma série de casos. As amostras foram obtidas do arquivo dos Departamentos de Patologia do Hospital de Câncer de Barretos (HCB) e do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCRP), após pesquisa nos arquivos nosológicos, englobando o período de janeiro de 2005 a março de 2013 para os casos do HCB e períodos anteriores, até o limite de março de 2013, para os casos do HCRP.

Foram incluídos no presente estudo:

- a) Pacientes com diagnóstico histopatológico de astrocitoma pilocítico em qualquer localização no neuroeixo.
- b) Material obtido em cirurgias realizadas nas instituições participantes ou provenientes de outros serviços de Patologia, encaminhados para complementação de tratamento nas mesmas, que tenham fornecido o(s) bloco(s) de parafina para análise.

Os critérios de exclusão do estudo foram:

- a) Blocos de parafina não localizados nos arquivos dos Departamentos de Patologia (devolvidos aos pacientes ou encaminhados a outros serviços).
- b) Blocos de parafina com material escasso, que poderiam ser irreversivelmente danificados ou completamente exauridos no processo do estudo.
- c) Material com diagnóstico diferente de astrocitoma pilocítico após revisão histológica dos casos, com estudo imuno-histoquímico complementar.

4.2 Aprovação nos Comitês de Ética

O presente estudo recebeu aprovação nos Comitês de Ética e Pesquisa de ambas instituições. No HCB, foi aprovado sob o Parecer Consubstanciado número 87362, de 31 de agosto de 2012 (Anexo B). No HCRP, foi aprovado sob o parecer consubstanciado número 212.313, de 06 de março de 2013 (Anexo C).

4.3 Preparação das amostras

4.3.1 Revisão clínica

Os prontuários dos pacientes foram revisados para obtenção de dados clínicos. De acordo com as variáveis observadas, classificamos os pacientes em vários grupos: quanto ao gênero (masculino/feminino); idade (pediátricos – idade até 19 anos/adultos – maiores de 20 anos); localização da lesão (cerebelar/extracerebelar); prognóstico (*favorável* – pacientes sem lesão residual, com lesão residual estável e/ou índice de Karnofsky ≥ 80 /*desfavorável* – óbitos, lesões recidivadas, lesão residual com crescimento progressivo e/ou índice de Karnofsky ≤ 70). A ficha de coletas dos dados clínicos utilizados no estudo pode ser observada no anexo D.

Os exames radiológicos e seus respectivos laudos foram revistos para correlação diagnóstica, avaliação da extensão da ressecção e seguimento clínico. Conforme previamente estabelecido ¹⁰³, a extensão da ressecção foi classificada através da avaliação por tomografia computadorizada (TC) no pós-operatório imediato em *total* (sem sinais de lesão residual na TC pós-cirúrgica) ou *parcial* (ressecção de menos de 90% do volume tumoral inicial ou biópsias incisionais).

As lesões detectadas em exames de imagem após ressecção total confirmada foram classificadas como *recidivas*. As lesões parcialmente excisadas foram subclassificadas como *estáveis* ou *progressivas*, quando apresentaram aumento de volume no seguimento radiológico. Os pacientes com diagnóstico clínico confirmado e/ou histórico familiar de Nf1 foram identificados, com base nos critérios clínicos estabelecidos.

4.3.2 Revisão histopatológica

Os espécimes cirúrgicos foram fixados em formalina tamponada a 10% por um tempo médio de 48h e processados segundo o protocolo padrão de cada instituição. De maneira geral, o material foi embebido em álcool absoluto por 48h, xilol por 6h, dois banhos de parafina de 1h cada e incluídos em blocos e parafina, para realização dos cortes histológicos e coloração por hematoxilina e eosina (HE).

Os casos foram submetidos a rigorosa revisão histopatológica, estabelecendo-se os critérios da classificação da OMS 2007 para o diagnóstico de astrocitoma pilocítico (Figura 4).

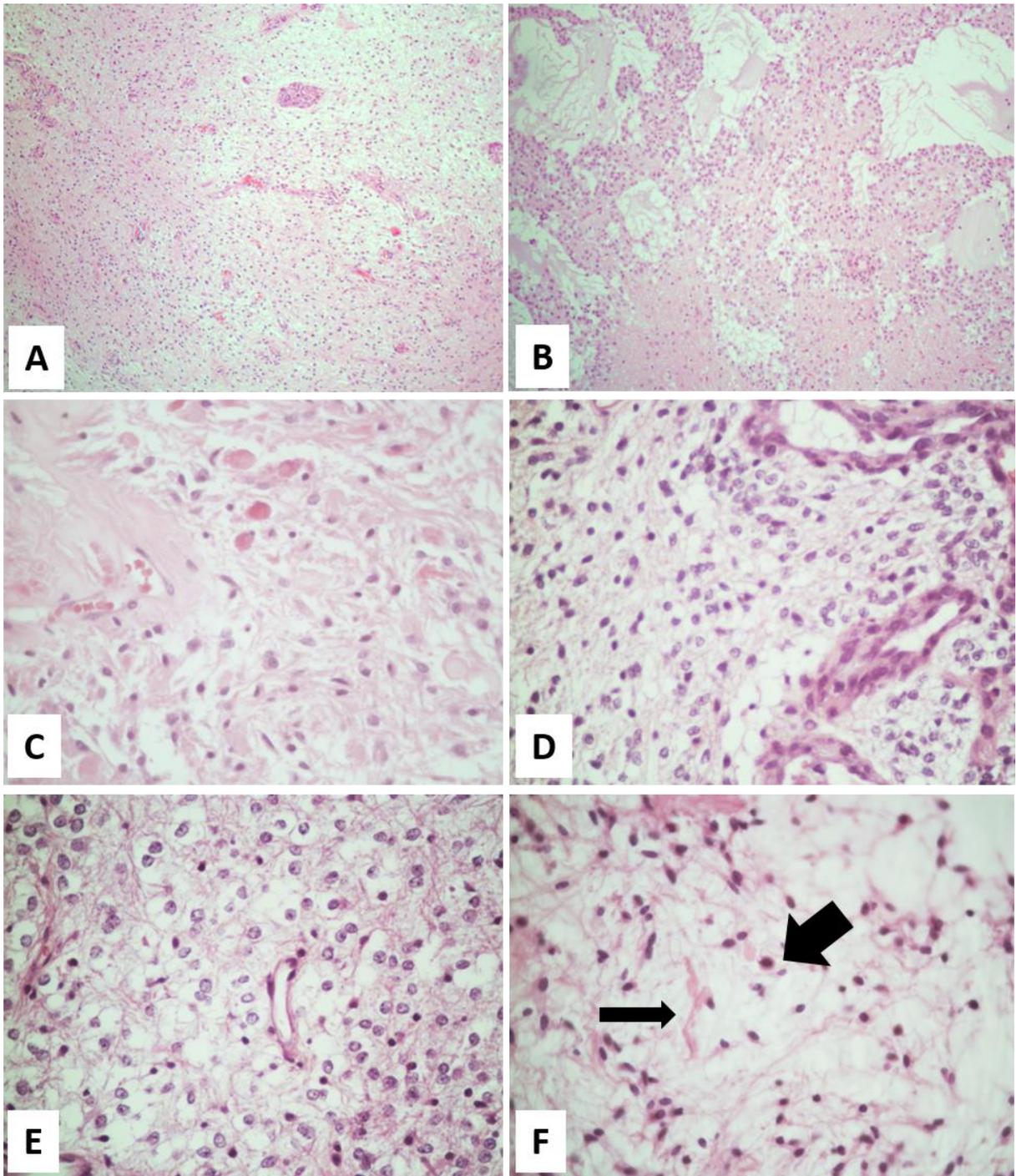


Figura 4- Aspectos histopatológicos dos astrocitomas pilocíticos à coloração de HE. A) Neoplasia bifásica – 40x. B) Área microcística – 100x. C) Corpos granulares eosinofílicos – 400x. D) Proliferação microvascular pode ser notada em alguns tumores – 400x. E) Área com fenótipo oligodendroglial-símile – 400x. F) Área piloide da neoplasia. Fibras de Rosenthal (seta estreita) e atividade mitótica (seta larga) podem ser observadas em alguns casos – 400x.

Nos casos em que houve dúvida, foi realizado procedimento de imuno-histoquímica adicional para confirmação diagnóstica, com os anticorpos anti-galectina 3 (Tabela 2), conforme descrito por Neder et al.^{20,104}, e anti-*IDH-1* (Tabela 2), para diagnóstico diferencial com astrocitomas difusos^{26,105}, os quais apresentam expressão citoplasmática de IDH-1.

Tabela 2- Anticorpos comerciais utilizados para estudo imuno-histoquímico dos astrocitomas pilocíticos.

Anticorpo	Fabricante	Clone	Diluição
Galectina-3	Diagnostic BioSystems	9C4	1:50
IDH-1 mutado	DIANOVA	H09	1:50
FGFR1	Cell Signalling	D8E4	1:200
BRAF V600E	Spring Bioscience		1:200
RKIP	Upstate		1:600
MTAP	Proteintech		1:300

4.3.3 Construção da plataforma do TMA

Após análise inicial das lâminas, foram selecionadas áreas representativas da neoplasia para realização do arranjo tecidual em matriz (*tissue microarray* – TMA) (Figura 5A). Levando-se em consideração a heterogeneidade histológica dos APs, as amostras escolhidas representaram, sempre que possível, várias áreas tumorais (microcística, pilóide, oligodendroglial-símile etc) (Figura 4) e também fragmentos de córtex e substância branca cerebelar não infiltrados pela neoplasia. Foram obtidos de 1 a 8 cores de tumor e tecido adjacente de cada caso, com média de 3,6 cores/caso. Os fragmentos de córtex e substância branca cerebelar adjacente foram obtidos de 9 casos.

As amostras foram então retiradas do bloco de parafina doador com agulhas de calibre 1 mm (casos do HCB) e 1,5mm (casos do HC-FMRP-USP) e transferidas para o bloco de parafina receptor com auxílio de plataforma de TMA (Beecher Instruments™, EUA) (Figura 5A), como previamente descrito ¹⁰⁶. A diferença no tamanho das agulhas se deveu ao fato de os materiais provenientes do HC-FMRP-USP de um modo geral apresentarem maior volume para retirada, sem desgaste excessivo do material.



Figura 5 – Método de preparação dos TMAs. A) Plataforma de TMA. B) Marcação das áreas de diferentes padrões histopatológicos. C) Lâmina de um dos TMAs corada por HE.

4.4 Estudo imuno-histoquímico da expressão das proteínas da via MAPK

Os blocos de parafina contendo os TMAs foram cortados na espessura de 4 μ m e dispostos sobre lâminas silanizadas. As reações imuno-histoquímicas foram realizadas manualmente (para a proteína MTAP) e de maneira automatizada (Galectina-3, IDH-1 mutado, FGFR1, BRAF V600E e RKIP).

Para a reação manual, as lâminas foram desparafinizadas por incubação em xilol em estufa histológica a 58°C durante 10 min, seguidos de dois banhos de xilol à temperatura ambiente por 5 min, um banho em solução de álcool e xilol na proporção de 1:1 por 3 min, um banho de 3 min em álcool absoluto e banhos sequenciais de 1 min em álcool 95%, 90%, 80%, 70% e 50% e em água corrente para hidratação dos cortes histológicos. Em seguida procedemos à recuperação antigênica, utilizando tampão misto (10mMol de citrato/1 mMol de EDTA) em pH 6.0 por 4 minutos a 125°C e por 20 minutos a 90°C. Após a recuperação antigênica, as lâminas foram incubadas com anticorpo policlonal MTAP (Tabela 2) à

temperatura ambiente por 12 horas (*overnight*). Finalmente, realizamos a incubação com anticorpo secundário e estreptavidina-peroxidase, coramos com 3,3' Diaminobenzidina (DAB) e contracoramos com hematoxilina.

As reações automatizadas foram executadas em equipamento Ventana BenchMark XT® (Ventana Medical Systems), de acordo com as especificações do fabricante. A recuperação antigênica foi realizada com tampão misto de citrato/EDTA, em pH 6.0 a 125°C por 4 minutos e a 95°C por 25 minutos em panela de pressão.

As proteínas investigadas foram pesquisadas através de reação com os anticorpos monoclonais comercialmente disponíveis e as respectivas diluições utilizadas estão listados na Tabela 2.

Para galectina-3, IDH-1 mutado e BRAF V600E foi considerada positiva a imunorreação citoplasmática das células neoplásicas, classificando-se os resultados apenas como *negativo* e *positivo* (positividade de pelo menos 10% das células neoplásicas).

A imunorreatividade para FGFR1, RKIP e MTAP foi analisada quanto à intensidade, extensão e localização subcelular da marcação (citoplasmática ou nuclear). A *intensidade* de marcação foi graduada como 0=negativo, 1=fraco, 2=moderado e 3=forte e a *extensão*, como 0=negativo, 1=positivo em menos de 25% das células neoplásicas, 2=positivo em 25-50% das células neoplásicas, 3=positivo em mais de 50% das células neoplásicas. Com a soma destes fatores obtivemos um escore total que variou de 0 a 6. Para casos com mais de um core, foi feita uma média aritmética dos escores e, por fim, agrupamos os casos de acordo com o resultado final, utilizando valores de corte previamente estabelecidos, considerando *negativos* os casos com escore final de 0 a 2 e *positivos* aqueles com escore 3 a 6 para os anticorpos FGFR1 e RKIP^{81,107}. Para o anticorpo MTAP agrupamos os escores finais em 0-3= *expressão reduzida* e 4-6= *expressão mantida*¹⁰⁸.

4.5 Validação do anticorpo anti-MTAP – técnica de Western blot

Uma vez que a reação imuno-histoquímica para MTAP não foi previamente descrita em tumores do SNC, antes de realizarmos a técnica nas amostras, procedemos à validação do anticorpo através da técnica de Western Blotting, com posterior confirmação, por reação imuno-histoquímica em duas linhagens celulares de gliomas estabelecidas: as linhagens

SNB19 e MDA-MB231, que, respectivamente apresentam e não apresentam expressão de MTAP^{102,109}.

As linhagens foram cultivadas em flasks de 25cm² (3x10⁶ células), até uma confluência de 80%, depois raspadas em tampão de lise e centrifugadas para extração da proteína total. Após a eletroforese, os blots foram realizados e incubados com leite desnatado a 5% em TBS-T por uma hora à temperatura ambiente e depois com os anticorpos policlonais MTAP (1:800) e β -actina (Cell Signaling, Boston, EUA, 1:5000), usada como controle, por 1 hora a 4°C. Finalmente, os blots foram lavados com TBS-T e incubados com IgG anti-MTAP de coelho e IgG anti- β -actina de rato (Cell Signaling, 1:5000, para ambos anticorpos). A imunodeteção foi realizada com reagentes de detecção de Western Blotting Amersham ECL, em equipamento automatizado ImageQuant LAS 4000 mini (GE Healthcare) (Anexo F).

A reação imuno-histoquímica das linhagens seguiu o protocolo descrito na subseção 4.4.

4.6 Análise mutacional dos genes *BRAF* e *FGFR1*

A análise das mutações pontuais nos *hotspots* dos genes *BRAF* (exon 15; códon 600) e *FGFR1* (exons 12 e 14; códons 546 e 656) foi realizada através de PCR, seguida por sequenciamento direto dos exons em sua totalidade, com ênfase nos *loci* específicos, como previamente descritos^{42,65}.

Inicialmente, para a extração de DNA tumoral (DNA-t), foram realizados cortes seriados de 10 μ m dos blocos de parafina originais dos casos. As respectivas lâminas foram marcadas para realização da macrodissecção da região tumoral e tecido não neoplásico adjacente. Após desparafinização dos cortes histológicos em xilol e álcool em concentrações crescentes, foi feita uma raspagem da área tumoral com agulha 18G (Figura 6) utilizando-se as lâminas previamente identificadas como guia. A extração de DNA-t do material raspado foi realizada com o kit de extração de DNA Qiagen DNA Micro Kit (Qiagen), como previamente descrito⁶⁵, seguida de avaliação quantitativa e qualitativa do DNA em Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). As amostras de DNA foram então diluídas a uma concentração de 50ng/ml e estocadas a -20°C para posterior análise molecular.

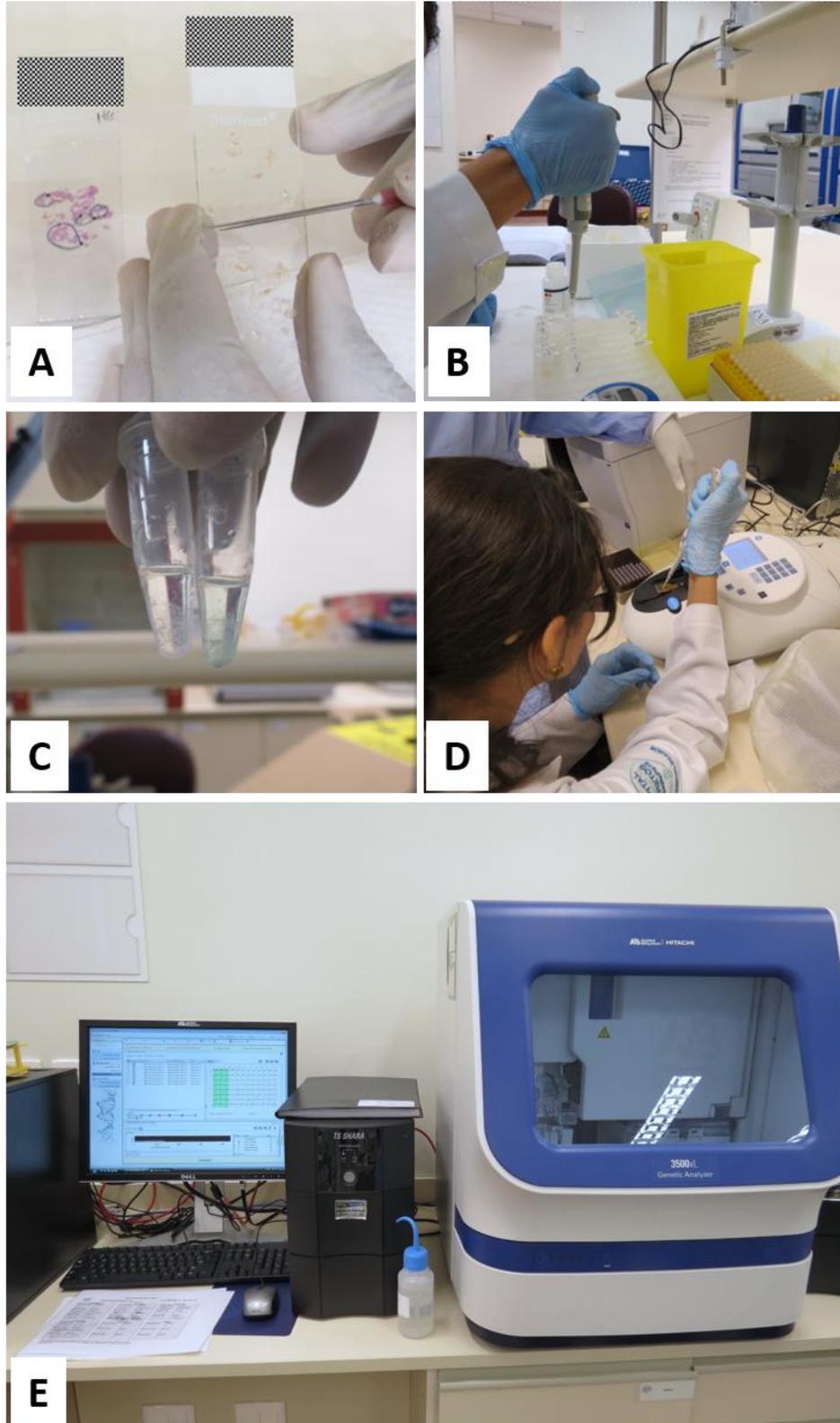


Figura 6 – Métodos utilizados para o sequenciamento dos genes *BRAF* e *FGFR1* nas amostras. A) Procedimento de macrodissecção dos cortes histológicos. B) Procedimento de extração do DNA. C) DNA extraído de duas amostras. D) Procedimento de quantificação do DNA extraído. E) Equipamento utilizado no sequenciamento direto dos casos.

A reação de PCR foi realizada em equipamento Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems), com um volume final de 15µl, sob as seguintes condições: 1x tampão de PCR (Invitrogen); 2mM MgCl₂ (Invitrogen), 10mM dNTPs (Invitrogen); 0,3mM de primers sense e antisense (Sigma-Aldrich), 1 unidade de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 50ng do DNA extraído. Para o gene *BRAF* utilizamos a sequência de primers TCATAATGCTTGCTCTGATAGGA (sense) e GGCCAAAATTTAATCAGTGGGA (antisense)⁶⁵. Para análise do gene *FGFR1* foram utilizados os primers TCAAGTCCCAGGGAAAAGCAG (sense) e AGGCCTTGGGACTGATACCC (antisense) para o exon 12 e GACAAGTCGGCTAGTTGCAT (sense) e CCCACTCCTTGCTTCTCAGAT (antisense) para o exon 14. Os produtos da PCR foram avaliados por eletroforese em gel de agarose antes do sequenciamento.

Os produtos da PCR de cada exon analisado foram inicialmente purificados com EXOSAP-IT (GE Technology) e depois submetidos a uma reação de sequenciamento, usando 1µl de BigDye (Applied Biosystems), 1,5µl de tampão para sequenciamento (Applied Biosystems) e 3,2µM do primer, seguida por purificação pós-sequenciamento com EDTA, álcool e citrato sódico. Os produtos purificados foram eluídos em HiDi (formamida) e incubados a 90°C por 5 minutos e a 4°C por pelo menos 5 minutos. O sequenciamento direto foi realizado em equipamento Genetic Analyzer ABI PRISM® 3500 (Applied Biosystems).

Finalmente, o eletroferograma de cada caso foi analisado para pesquisa da mutação V600E do gene *BRAF* e das mutações do gene *FGFR1*, N546K e K656E, classificando-se os casos como *mutados* ou *wild type* (sem mutação), após comparação com o banco de dados Ensembl GeneBank sequence (*BRAF*: ENSG00000157764 e *FGFR1*: ENSG00000077782).

Todos os casos mutados foram confirmados com nova reação de PCR e sequenciamento direto, a partir do DNA extraído. Além disso, para controle de qualidade, uma nova extração de DNA e nova análise mutacional foram realizadas em 10% dos casos.

4.7 Análise das fusões do gene *BRAF* e da duplicação do *FGFR1*

A pesquisa de fusões e/ou amplificações envolvendo os oncogenes *BRAF* e *FGFR1*, foi realizada através da técnica de hibridização fluorescente *in situ* (*fluorescence hybridization in situ* – FISH).

4.7.1 Reagentes moleculares

4.7.1.1 Fusão *KIAA1549-BRAF*

As sondas de FISH foram criadas a partir de clones BAC contendo DNA humano de regiões homólogas aos genes *KIAA1549* e *BRAF*, no cromossomo 7, conforme identificado no Ensembl Genome Browser (GRCh37). O DNA do gene *BRAF* foi validado por PCR utilizando como *primers* as sequências 5'-CAGAGTTTGTTCAGATGGTCCCTTT-3' (forward) e 5'-ACCATATAATAGAAGCGCCTCCCA -3' (reverse). Para o DNA do gene *KIAA1549*, as sequências de validação foram 3'-AGGTATTGTTGGAACATTGAAGGCT-3' (forward) e 5'-CAGTCAAATGCTCGCAATGAATGAA-3'(reverse). Cada DNA foi extraído de miniculturas, purificado e submetido a amplificação de todo o genoma utilizando o kit REPLI-g Midi (Qiagen-Cat# 150045).

Uma alíquota de 1 µg do DNA purificado de *BRAF* e *KIAA1549* foi marcada, respectivamente, com SpectrumRed (SR) e SpectrumGreen (SG) conjugado dUTPs, utilizando o kit Vysis Nick Translation (Cat# 32-801300, Abbott Molecular) de acordo com o protocolo do fabricante¹¹⁰.

Após bloqueio das sequências repetitivas com DNA de esperma de arenque como carreador (1:50) e Cot-1 DNA humano (1:10) e diluição com tampão de hibridização t-DenHyb (Insitus Biotechnologies), o mix de sondas de FISH marcado foi validado para mapeamento cromossômico e qualidade da hibridização em células em fases de intérfase e metáfase. A representação esquemática deste processo pode ser observada na figura 7.

As lâminas contendo os cortes embebidos em parafina foram desparafinizadas e desidratadas, de acordo com protocolos previamente estabelecidos ¹¹¹ e a sonda aplicada às áreas selecionadas. A hibridização ocorreu a 37°C por 40-67 horas e finalmente, a cromatina foi contracorada com DAPI/anti-fade (0,3µg/ml em meio de montagem Vectashield – Vector Laboratoires).

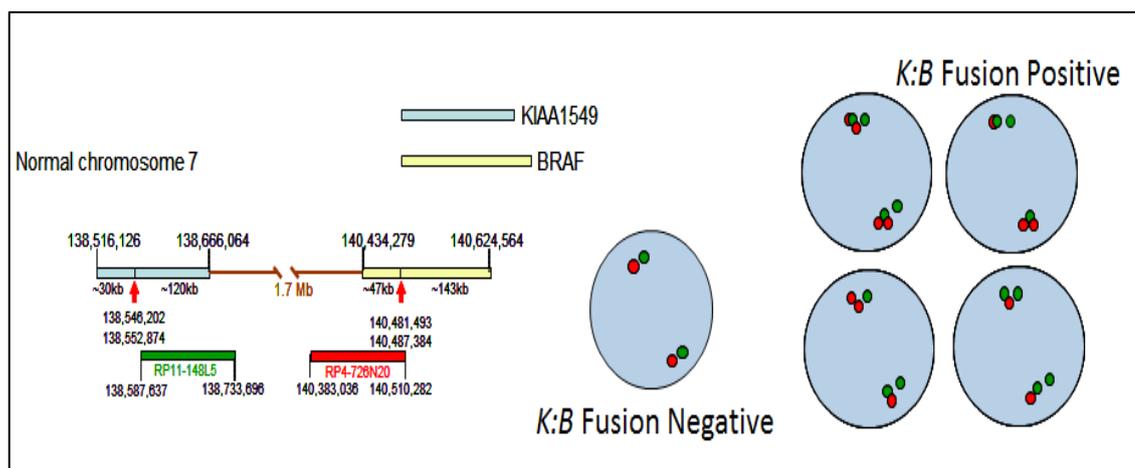


Figura 7- Esquema das sondas utilizadas para pesquisa da fusão *KIAA1549-BRAF* pelo método de FISH.

4.7.1.2 Ensaio de quantificação *FGFR1/CEP8*

O ensaio de quantificação *FGFR1/CEP8* mede dois alvos genômicos utilizando duas sondas comerciais de FISH (Abbott Molecular): Vysis LSI *FGFR1* SpectrumRed, que contém o gene *FGFR1* integralmente marcado com fluoróforo SpectrumRed, e a sonda CEP 8, marcada com fluoróforo SpectrumGreen. A técnica utilizada seguiu o protocolo padrão do fabricante.

4.7.2 Interpretação dos ensaios FISH

A análise foi realizada em microscópio de epifluorescência utilizando conjuntos de filtros de interferência simples para bandas verde (FITC), vermelha (Texas red) e azul (DAPI), assim como filtros duplos (vermelho/verde) e triplos (azul, vermelho e verde). Para cada filtro de interferência, imagens monocromáticas foram adquiridas e fundidas, utilizando CytoVision (Leica Microsystems Inc). Um mínimo de 50 núcleos de células tumorais foi analisado.

O espécime foi considerado positivo para a fusão *KIAA1549-BRAF* quando houve sinais vermelho e verde muito próximos ou parcialmente sobrepostos. Sinais separados por mais de dois diâmetros do sinal foram considerados negativos.

Para determinação da amplificação do gene *FGFR1*, o valor de corte adotado foi o proposto por Schultheis et al. ⁴⁶. A determinação de amplificação do *FGFR1* em baixo ou alto nível foi baseada na razão $FGFR1/CEP\ 8 \geq 2$ ou no número médio de sinais *FGFR1* ≥ 6 cópias por núcleo.

4.8 Análise estatística

Procedemos as estatísticas descritivas da série através de cálculos de porcentagem, média e mediana. O tempo de sobrevida e a sobrevida livre de eventos foi calculado pelo método de Kaplan-Meier.

Para a análise comparativa entre os diversos grupos, utilizamos os testes de qui-quadrado e o teste exato de Fisher. A comparação entre os tempos de sobrevida e sobrevida livre de evento foi feita através de testes log-rank. Os testes estatísticos foram realizados com o programa SPSS *for Windows*, versão 20, SPSS®, Inc.

5- RESULTADOS

5.1 Dados clinicoepidemiológicos

Inicialmente, foram identificados 79 pacientes candidatos ao estudo. Após a avaliação dos casos e aplicação dos critérios de inclusão e de exclusão, um total de 10 casos foram excluídos: três casos não foram localizados nos arquivos dos departamentos de Patologia e cinco foram excluídos por escassez do material incluído em parafina. Dois casos foram excluídos por mudança no diagnóstico após avaliação complementar – um ganglioglioma, cujos neurônios neoplásicos estavam presentes apenas na lesão recidivada, excisada após a construção do TMA, e um astrocitoma difuso (grau II da OMS), que apresentou características infiltrativas nos exames de neuroimagem (obtidos após a realização do TMA) e positividade para *IDH-1* mutado. O caso de astrocitoma difuso grau II serviu como controle positivo da reação de *IDH-1* mutado na lâmina do TMA.

Finalmente, obtivemos um total de 69 pacientes, sendo 23 do HCB e 46 do HCFMRP-USP. Cinco pacientes apresentaram lesões subsequentes representadas neste estudo: quatro pacientes apresentaram uma recidiva e um paciente apresentou duas lesões recidivadas disponíveis para análise. Dessa maneira, obtivemos um total de 75 amostras.

A série foi constituída por 38 pacientes do sexo masculino e 31 do sexo feminino (1,2M:1F), com idades entre 0,3 e 53,4 anos (mediana=9,1 anos), sendo 60 pacientes do grupo etário pediátrico e 9 pacientes adultos. Cinco pacientes (7,2%) apresentaram diagnóstico clínico confirmado de Nf1 (5/69) (Tabela 3).

A principal localização dos APs foi o cerebelo (36 casos – 52,2%). Dentre as lesões extracerebelares, 14 casos foram observados nos hemisférios cerebrais, 6 na região supratentorial, 5 medulares, 4 em vias ópticas e 4 em tronco encefálico (Tabela 3). Não foram incluídos na série casos de astrocitoma pilomixóide, grau II da OMS, o qual é considerado uma variante do AP.

A maioria dos pacientes (38 casos – 55,1%) foi submetida a ressecção parcial ou biópsia estereotáxica da lesão. Para maioria dos pacientes (52 pacientes -75,4%) a cirurgia foi o único tratamento utilizado. Além da cirurgia, dez pacientes (14,5%) foram submetidos a quimioterapia, quatro pacientes (5,8%) a radioterapia e um paciente (1,4%) recebeu quimioterapia e radioterapia associadas (Tabela 3).

Ao final do período do estudo, vinte e sete pacientes (39,1%) apresentavam-se sem evidência clínica ou radiográfica de doença. Trinta e oito pacientes (55,1%) apresentavam-se

vivos com lesão sintomática residual (Tabela 3). Destes, 19 pacientes apresentaram índice de Karnofsky ≥ 80 e os demais apresentaram pior grau de sequelas, com índice de Karnofsky ≤ 70 (variando de 50 a 70). De um modo geral, 35 dos 69 pacientes da série (50,7%) apresentaram critérios para definir a evolução como desfavorável, inclusive com três pacientes (correspondendo a 4,6% dos pacientes que permaneceram vivos) com lesões extra-cerebelares que evoluíram com sequelas permanentes e necessidade de assistência considerável e frequentes cuidados médicos, definidos como índice de Karnofsky=50. Não houve correlação estatisticamente significativa entre a localização da lesão e a evolução clínica medida pelo índice de Karnofsky ($p=0,101$).

Ocorreram quatro óbitos na série (5,8%), todos em pacientes do grupo pediátrico e relacionados à progressão da lesão (Tabela 3). Uma das pacientes (P32) teve recidiva de lesão cerebelar completamente ressecada, seguida por disseminação liquórica da neoplasia. Os outros 3 pacientes (P41, P52 e P55) apresentaram crescimento de lesão residual. Um dos pacientes (P41) apresentou extensa disseminação medular da neoplasia após 10 anos da primeira cirurgia e o material da lesão recidivada foi analisado neste estudo. O tempo de sobrevida destes pacientes variou de 1,7 a 10,7 anos (média de 5,4 anos).

A sobrevida mediana da série foi de 4 anos (0,6-16,6 anos) e a sobrevida livre de doença mediana foi de 3,5 anos (0,1-16,3 anos). A sobrevida em cinco anos da série foi $>95\%$ e a sobrevida em 10 anos foi de 80%.

Tabela 3- Dados clínico-epidemiológicos da série de astrocitomas pilocíticos.

	ID	Origem	Sexo	Idade (anos)	Local	NF1	Ressecção	Recidiva/ crescimento	Tratamento adjuvante	Status	Seguimento (meses)
1	P01	HCB	M	4,8	C		Total	Recidiva	N	VCD	27
2	P02	HCB	M	4,2	C		Total	Não	N	VSD	27,5
3	P03	HCB	M	8,4	C		Total	Não	N	VSD	36,2
4**	P04	HCB	M	8	C		Parcial	Crescimento	N	VCD	34,1
5*	P05	HCB	F	15,8	C		Parcial	Crescimento	N	VSD	24,4
6	P06	HCB	M	20,8	C		Parcial	Não	N	VCD	16,8
7	P07	HCB	F	35,4	MD		Parcial	Não	N	VCD	22,9
8	P08	HCB	M	4,8	C		Parcial	Crescimento	RTX	VCD	29,3
9	P10	HCB	M	10,5	C		Total	Não	N	VSD	43
10	P12	HCB	M	5,2	C		Total	Não	N	VSD	36,5
11	P13	HCB	M	5,1	HC		Parcial	Não	Ign.	VCD	53,5
12	P16	HCB	M	53,4	C		Parcial	Crescimento	RTX	VCD	34,1
13	P17	HCB	F	19,2	C		Total	Não	N	VSD	60,3
14	P18	HCB	F	17	HC		Total	Não	N	VSD	65,3
15	P20	HCB	M	9,2	TE		Parcial	Não	RTX	VCD	63,3
16	P21	HCB	M	3,5	C		Total	Não	RTX	VSD	66,6
17	P23	HCB	M	16,4	HC	Sim	Total	Não	N	VSD	58,2
18	P24	HCB	M	21,9	HC		Parcial	Não	N	VCD	12,9
19	P25	HCB	F	2,1	C		Parcial	Não	N	VCD	7,1
20	P26	HCB	M	10,2	C		Total	Não	N	VSD	39,2
21	P28	HCB	F	7,5	C		Total	Não	N	VSD	86,3
22	P29	HCB	F	5,2	C		Total	Não	N	VSD	8,8
23	P30	HCB	M	15,3	C		Parcial	Crescimento	N	VCD	8
24	P31	HCRP	F	11,3	C		Total	Não	N	VSD	133,2
25	P32	HCRP	F	18,1	C		Total	Recidiva	QTX	OC	20,6
26	P33	HCRP	F	13,8	C		Parcial	Não	N	VCD	196,8
27	P34	HCRP	M	5,2	MD		Parcial	Crescimento	QTX	VCD	194,7
28	P35	HCRP	M	12,7	C		Total	Não	N	VSD	179,1
29	P36	HCRP	F	3,8	C		Total	Recidiva	N	VSD	168,6
30	P37	HCRP	M	11,1	SS		Parcial	Não	N	VCD	170,6
31	P38	HCRP	F	9	MD		Parcial	Crescimento	N	VCD	155
32	P39	HCRP	M	12,8	HC		Parcial	Crescimento	QTX	VCD	144,5
33	P40	HCRP	F	3,6	C		Total	Não	N	VSD	66,1
34*	P41	HCRP	M	9,6	C		Parcial	Crescimento	N	OC	128,8
35	P42	HCRP	M	5,9	C		Total	Não	N	VSD	51,7
36	P43	HCRP	M	3,6	C		Total	Não	N	VSD	116,5
37	P44	HCRP	F	2	C		Total	Não	N	VSD	115,7
38	P45	HCRP	M	7,1	C		Total	Não	N	VSD	112,8

Continua na próxima página.

Tabela 3- Dados clínico-epidemiológicos da série de astrocitomas pilocíticos (continuação)

39	P46	HCRP	F	9,9	TE		Parcial	Não	N	VCD	91,6
40	P47	HCRP	M	17,4	HC		Total	Não	N	VSD	63,7
41	P48	HCRP	F	2,2	C		Total	Não	N	VSD	83,2
42	P49	HCRP	F	5,8	TE		Parcial	Não	N	VCD	83,4
43*	P50	HCRP	F	5,3	C		Parcial	Crescimento	N	VSD	75,1
44	P51	HCRP	M	27,7	C		Total	Não	N	VSD	59,1
45	P52	HCRP	F	16,2	SS		Parcial	Crescimento	QTX/RTX	OC	79,2
46	P53	HCRP	F	11,7	C		Parcial	Não	N	VCD	68,6
47	P54	HCRP	M	4,5	VO		Parcial	Crescimento	QTX	VCD	19,1
48	P55	HCRP	F	0,3	HC		Parcial	Crescimento	Ign.	OC	31,5
49	P56	HCRP	F	4,1	SS		Parcial	Não	QTX	VCD	66,3
50	P57	HCRP	F	5,7	C		Total	Recidiva	N	VCD	58,3
51	P58	HCRP	M	3,1	SS		Parcial	Crescimento	QTX	VCD	54,1
52	P59	HCRP	M	14,7	HC	Sim	Total	Não	N	VCD	58,7
53	P60	HCRP	M	21,9	VO		Parcial	Não	N	VCD	18,9
54	P61	HCRP	M	32,2	HC		Total	Não	N	VSD	10,2
55	P62	HCRP	F	14,4	C		Total	Não	N	VSD	45,1
56	P63	HCRP	F	16,7	HC		Parcial	Não	QTX	VCD	47
57	P64	HCRP	M	24,8	HC		Parcial	Não	N	VCD	50,9
58	P65	HCRP	F	9,1	MD		Total	Não	N	VSD	46,1
59	P66	HCRP	F	15,3	HC	Sim	Total	Não	QTX	VCD	46,9
60	P67	HCRP	M	7,2	TE		Parcial	Não	N	VCD	49
61	P68	HCRP	M	28,2	MD		Parcial	Não	N	VCD	44,8
62	P69	HCRP	M	4,1	SS		Parcial	Não	QTX	VCD	34,7
63	P70	HCRP	F	4,9	SS		Parcial	Crescimento	QTX	VCD	31
64	P71	HCRP	M	5,7	C		Parcial	Crescimento	N	VCD	22,8
65	P72	HCRP	M	17,4	HC		Total	Recidiva	N	VCD	18,4
66	P73	HCRP	F	6,9	VO	Sim	Parcial	Não	N	VCD	15,5
67	P75	HCRP	F	11	HC	Sim	Parcial	Não	N	VCD	7,5
68	P76	HCRP	F	8,5	VO		Parcial	Não	N	VCD	7,6
69*	P77	HCRP	M	12,5	C		Parcial	Crescimento	N	VCD	8,4

M- Masculino. F- Feminino. C- Cerebelo. HC- Hemisférios cerebrais. TE- Tronco encefálico. SS- Suprasselar. MD- Medular. VO- Vias ópticas. N- Nenhum. QTX- Quimioterapia. RTX- Radioterapia. Ign.- Ignorado. VCD- Vivo com doença. VSD- Vivo sem doença. OC- Óbito por câncer. *- Pacientes com uma lesão recidivada representada. **- Paciente com duas lesões recidivadas representadas.

5.2- Análises do genes e proteínas

5.2.1- Galectina-3 e IDH-1 mutado

A reação imuno-histoquímica para galectina-3 foi adequada em 68 lesões primárias, das quais 66 (95,7%) apresentaram imunorreatividade citoplasmática (Figura 8A e B). Dentre as lesões recidivadas, houve perda de material de uma e positividade nas demais, em padrão

semelhante ao da respectiva lesão primária. Dois tumores supratentoriais (2,9%) foram negativos no estudo feito nas lâminas do TMA, porém estes casos e o caso não avaliado apresentaram positividade citoplasmática em reações no momento do diagnóstico inicial.

A reação para *IDH-1* mutado foi adequadamente obtida em todos os tumores primários estudados, os quais foram negativos. O caso diagnosticado como astrocitoma difuso e posteriormente excluído do estudo foi fortemente positivo para este marcador, confirmando a fidelidade da reação (Figura 8 C e D).

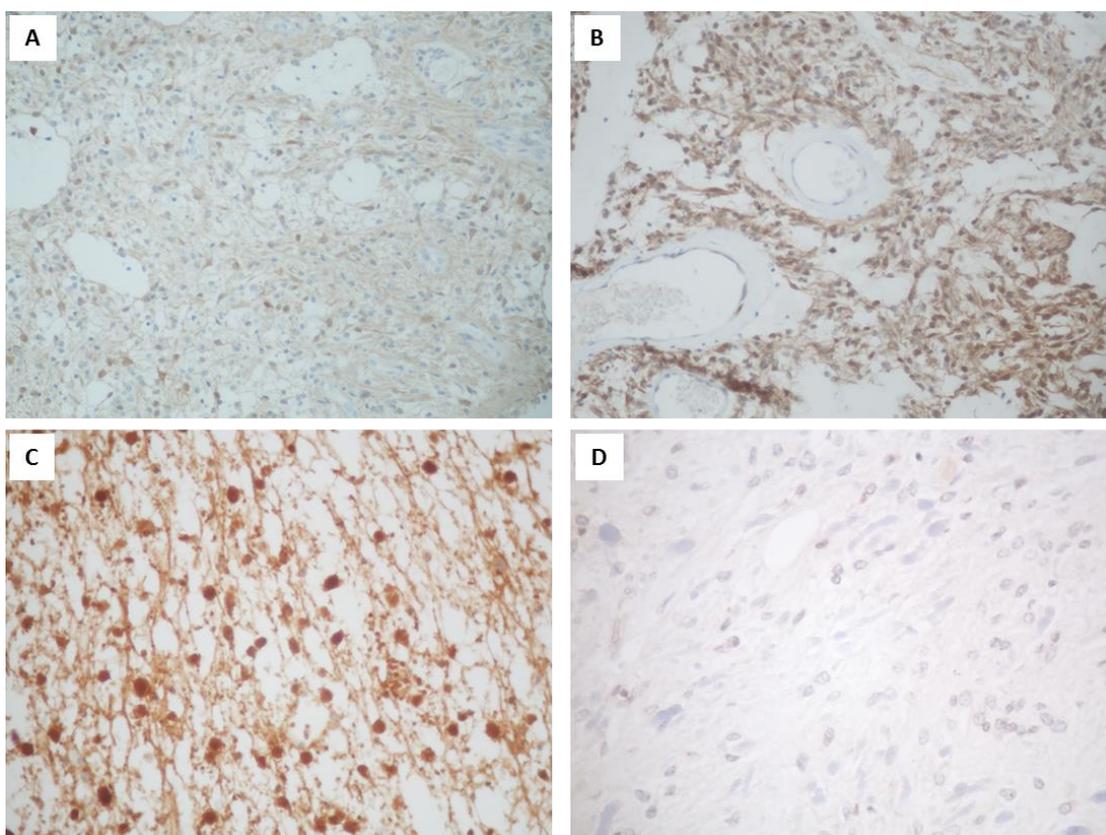


Figura 8- Imunoexpressão de galectina-3 e *IDH-1* mutado. Positividade citoplasmática moderada – 100x (A) e forte – 200x (B) para galectina-3. Caso diagnosticado como astrocitoma difuso, apresentando positividade citoplasmática e nuclear forte e difusa para *IDH-1* mutado – 400x (C) e astrocitoma pilocítico negativo para *IDH-1* mutado – 400x (D).

5.2.2 FGFR1

No total, 74/75 amostras foram testadas para a expressão imuno-histoquímica de FGFR1. Utilizando o escore previamente descrito, 49 lesões primárias (71%) e 5/6 lesões recidivadas (83,3%) exibiram positividade citoplasmática para FGFR1 (Figura 9). Vinte lesões primárias (29%) foram consideradas negativas. Não foram observados casos com positividade nuclear na série. No cerebelo adjacente, houve positividade citoplasmática forte nas células de Purkinje e positividade fraca ou ausência de expressão nos astrócitos não neoplásicos (Figura 9).

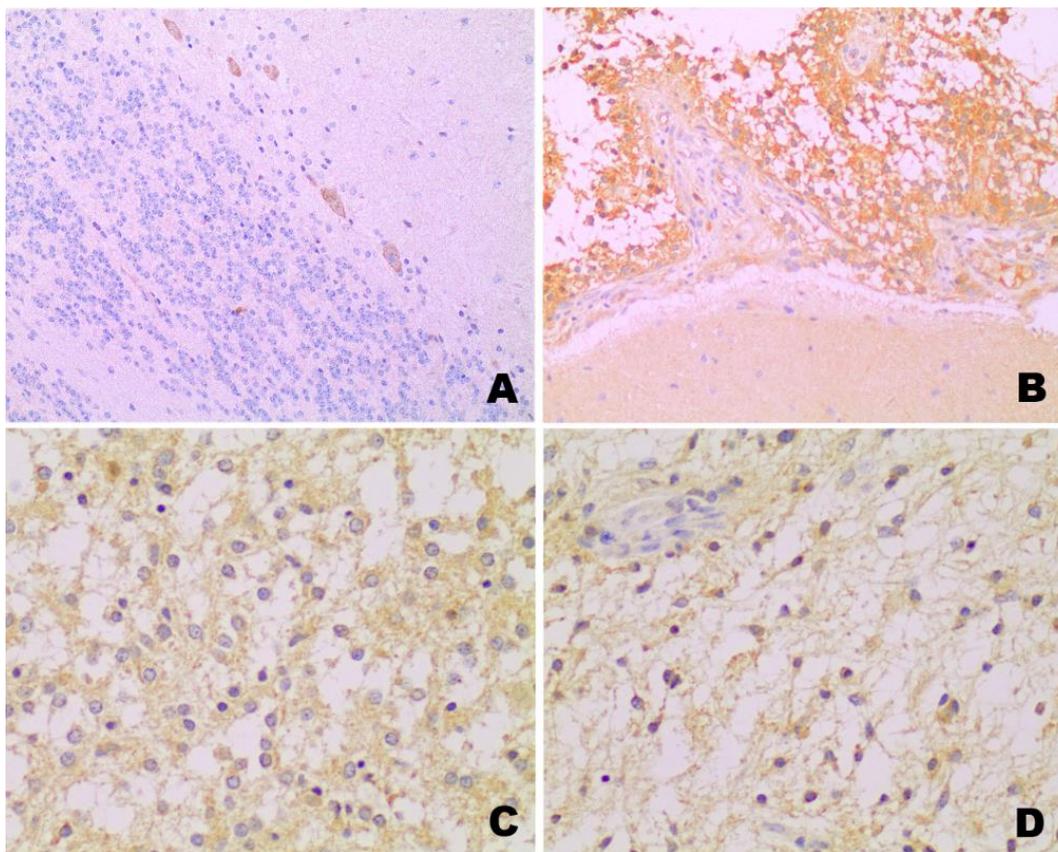


Figura 9- Padrões de expressão do FGFR1. No cerebelo não neoplásico há expressão citoplasmática forte nas células de Purkinje e ausência de expressão nos astrócitos – 20x (A). Astrocitoma pilocítico com expressão forte FGFR1, contrastando com a expressão fraca observada na substância branca adjacente – 40x (B) Positividade citoplasmática do FGFR1 em áreas oligodendrogliais-símile – 400x (C) e áreas piloides – 400x (D).

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na expressão de FGFR1 entre os diversos grupos clínicos (Tabela 4).

Tabela 4- Perfil molecular do *FGFR1* em relação aos grupos clínicos.

	Expressão de <i>FGFR1</i>		<i>p</i>	Mutação <i>FGFR1</i>		<i>p</i>
	Positivo	Negativo		W.T.	Mutado	
Gênero						
Masculino	27	11	0,994	19	1	1,0
Feminino	22	9		23	2	
Grupo etário						
Pediátrico	43	17	0,758	37	3	1,0
Adulto	6	3		5	0	
NF1						
Sim	4	1	1,00	5	0	1,0
Não	45	19		37	3	
Localização						
Cerebelar	27	9	0,446	24	3	0,264
Extracerebelar	22	11		18	0	
Prognóstico						
Favorável	27	14	0,253	21	2	1,0
Desfavorável	22	6		21	1	

Nf1- Neurofibromatose tipo 1.

O gene *FGFR1* foi sequenciado em 45 das 69 lesões primárias (65,2%) e dentre estas, identificamos 3 casos (6,7%) com mutação pontual K656E (Figura 10), previamente descrita por Jones et al. ⁴². Os três casos ocorreram em lesões cerebelares e em pacientes do grupo etário pediátrico (P21, P32 e P44 – Tabela 3). Dois casos mutados apresentaram positividade forte para *FGFR1* no ensaio imuno-histoquímico, apesar disso, a relação entre a mutação e expressão imuno-histoquímica do gene não foi estatisticamente significativa ($p=0,086$).

No ensaio FISH para pesquisa de amplificação do *FGFR1*, foram obtidos resultados confiáveis em 61/69 (88,4%) das lesões primárias e em 5/6 (83,3%) das lesões recidivadas, porém nenhum caso exibiu amplificação do gene. Todas as lesões recidivadas mantiveram padrão semelhante à respectiva lesão primária. Sete lesões primárias (10,6%) apresentaram baixo ganho de cópias do gene *FGFR1* (Figura 10), que também não apresentou correlação estatisticamente significativa com a expressão de *FGFR1* ($p=0,091$).

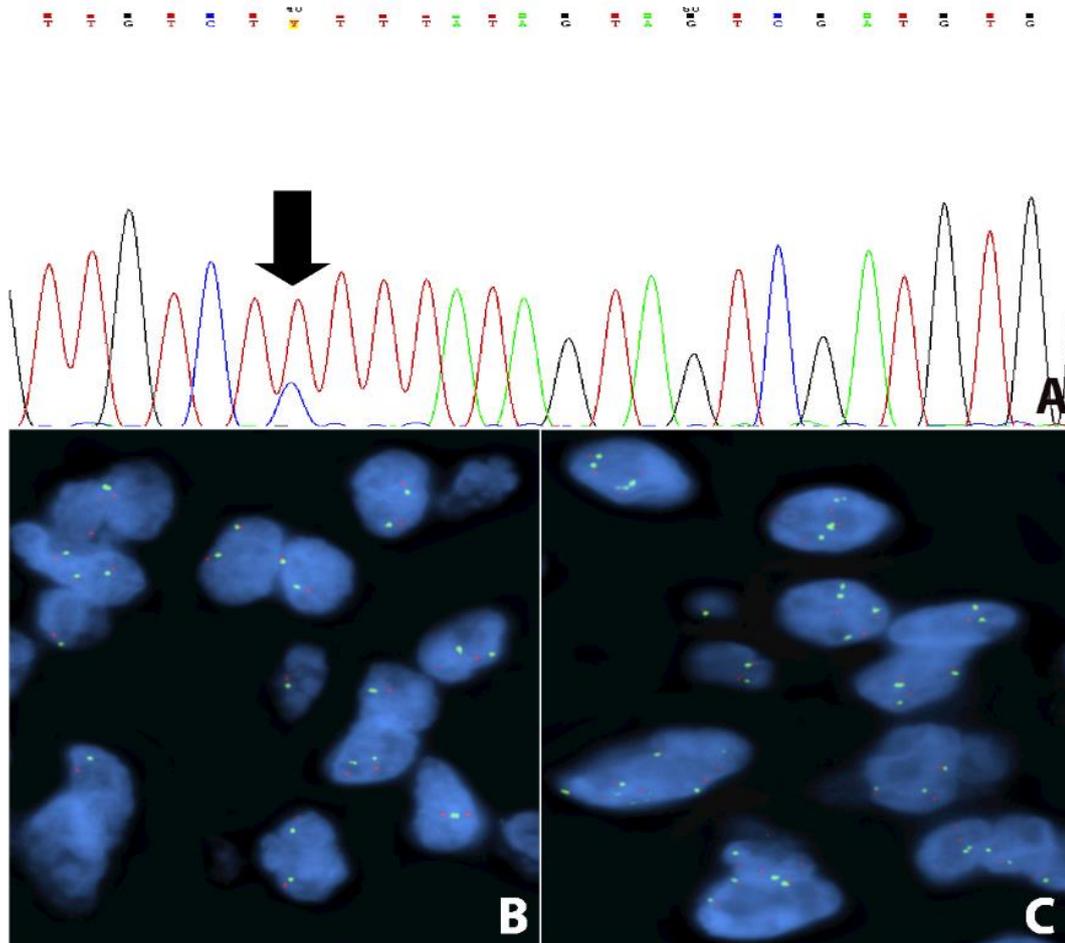


Figura 10- Alterações moleculares do gene *FGFR1*. Eletroferograma mostrando a mutação pontual do gene *FGFR1* (A). Análise por FISH *FGFR1/CEP8*. Padrão dissômico (normal) (B). Baixo ganho no número de cópias do *FGFR1*, porém com menos de 6 cópias do sinal verde em cada núcleo (C).

5.2.3 *BRAF*

Embora o estudo imuno-histoquímico tenha sido realizado segundo os padrões previamente descritos, foi observada apenas uma marcação citoplasmática inespecífica focal, em menos de 10% das células neoplásicas em dois casos (P16 e P68 – Tabela 3). Além de esta marcação ser considerada negativa para fins de cálculos estatísticos, o sequenciamento do gene *BRAF* na amostra do paciente P16 evidenciou gene *wild type*. O material do paciente P68 não foi sequenciado.

O sequenciamento do gene *BRAF* foi realizado em 48 das 69 lesões primárias (69,6%), e em 5 das lesões recidivadas, sem mudança no status do gene nas amostras subsequentes.

Dentre os casos estudados, identificamos dois casos (4,2%) que apresentaram mutações pontuais do gene *BRAF*.

Um paciente masculino, de 11 anos, com tumor supratentorial (P37 – Tabela 3) que teve recidiva tumoral (amostra não disponível para análise) apresentou a mutação V600E do gene *BRAF* (Figura 11) e foi também positivo para a fusão *KIAA1549-BRAF* no estudo por FISH. O segundo espécime portador de mutação do *BRAF* pertencia a uma paciente feminina, de 11 anos com lesão cerebelar (P31 – Tabela 3) que apresentou mutação V600K (substituição de valina por lisina no códon 600 do gene *BRAF*). A paciente permanece viva e sem evidência de doença após seguimento clínico de 11 anos. O estudo por FISH para pesquisa de fusão *KIAA1549-BRAF* não foi bem sucedido nesta amostra. Nenhum dos pacientes com tumores apresentando *BRAF* mutado apresentou diagnóstico de Nf1. Devido ao pequeno número de mutações pontuais identificadas, não houve correlação estatisticamente significativa com as diversas características clínicas da série (Tabela 5).

Na análise por FISH obtivemos resultados confiáveis para pesquisa da fusão *KIAA1549-BRAF* (Figura 11) em 64/69 lesões primárias (92,8%) e em 4/6 lesões recidivadas. Das lesões primárias, 37 casos (57,8%) apresentaram a fusão *KIAA1549-BRAF*, que foi significativamente relacionada com lesões cerebelares ($p < 0,001$) e negativamente com o diagnóstico clínico de Nf1 ($p = 0,009$) (Tabela 5). Não houve diferença significativa entre os demais grupos clínicos (Tabela 5), entretanto, houve uma tendência para esta alteração ser mais detectada no grupo pediátrico (55% no grupo pediátrico e 44,4% no grupo adulto (dados não mostrados)).

Tabela 5- Perfil molecular do *BRAF* em relação aos grupos clínicos.

		Fusão <i>KIAA1549- BRAF</i>		<i>p</i>	Mutação <i>BRAF</i>		<i>p</i>
		Positivo	Negativo		W.T.	Mutado	
Gênero	Feminino	18	11	0.530	25	1	1.0
	Masculino	19	16		21	1	
Idade	≤ 19 anos	33	22	0.381	40	2	1.0
	≥ 20 anos	4	5		6	0	
Nf1	Sim	0	5	0.011	5	0	1.0
	Não	37	22		41	2	
Localização	Cerebelar	27	6	<0.0001	27	1	1.0
	Extracerebelar	10	21		19	1	
Evolução	Favorável	22	16	0.987	26	1	1.0
	Desfavorável	15	11		20	1	

W.T.- *Wild Type* (sem mutação). Destaque em negrito: correlações estatisticamente significativas.

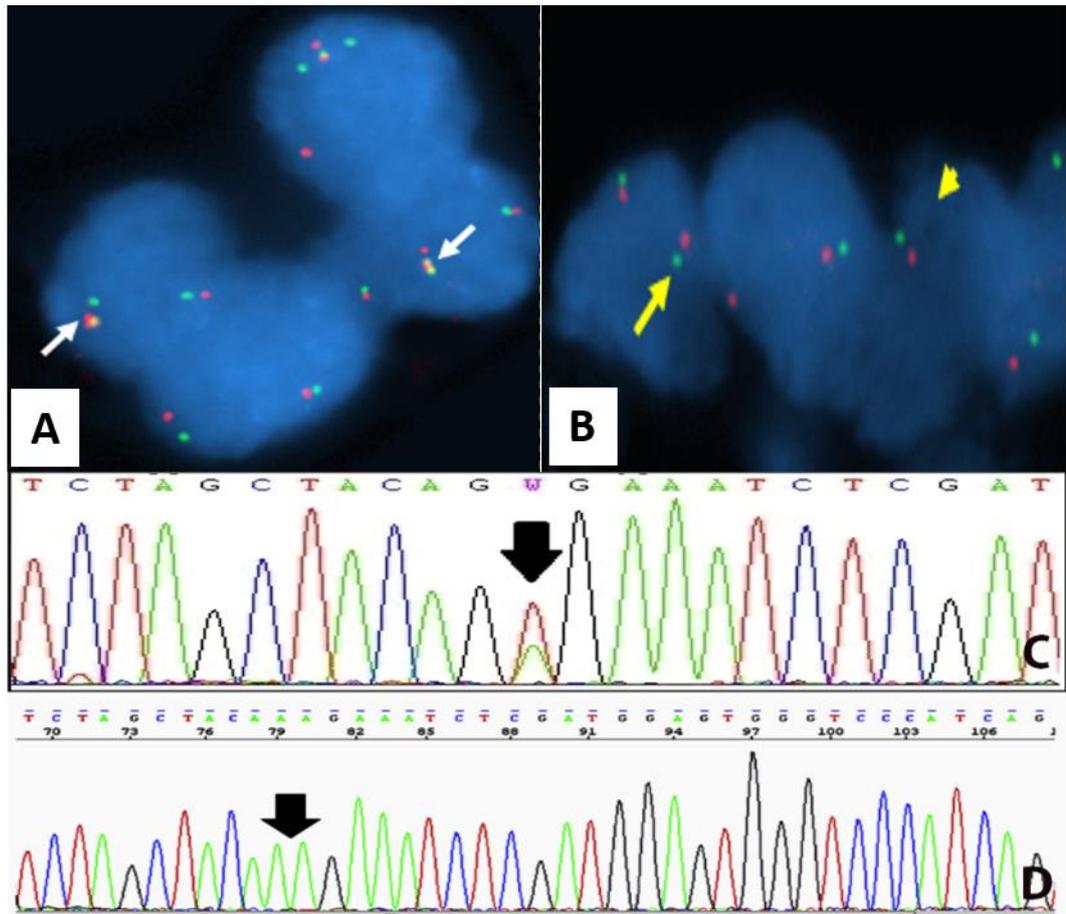


Figura 11- Alterações moleculares do gene *BRAF*. Análise por FISH, positivo (A) e negativo (B) para fusão *KIAA1549-BRAF* – a sobreposição dos sinais vermelho e verde gera um sinal amarelo na reação. Eletroferograma mostrando as mutações pontuais V600E (C) e V600K (D) do gene *BRAF*.

5.2.4 Relação entre as alterações nos genes *FGFR1* e *BRAF*

Alguns pacientes do estudo apresentaram alterações moleculares concomitantes envolvendo os genes *FGFR1* e *BRAF*. Dentre os tumores que apresentaram mutação pontual do *BRAF*, um (P37) exibiu também a fusão *KIAA1549-BRAF*. Já entre os tumores com mutação do *FGFR1*, um (1/3) também foi positivo para a fusão *KIAA1549-BRAF*. O resumo das alterações moleculares dos genes *FGFR1* e *BRAF* pode ser observado na Figura 12.

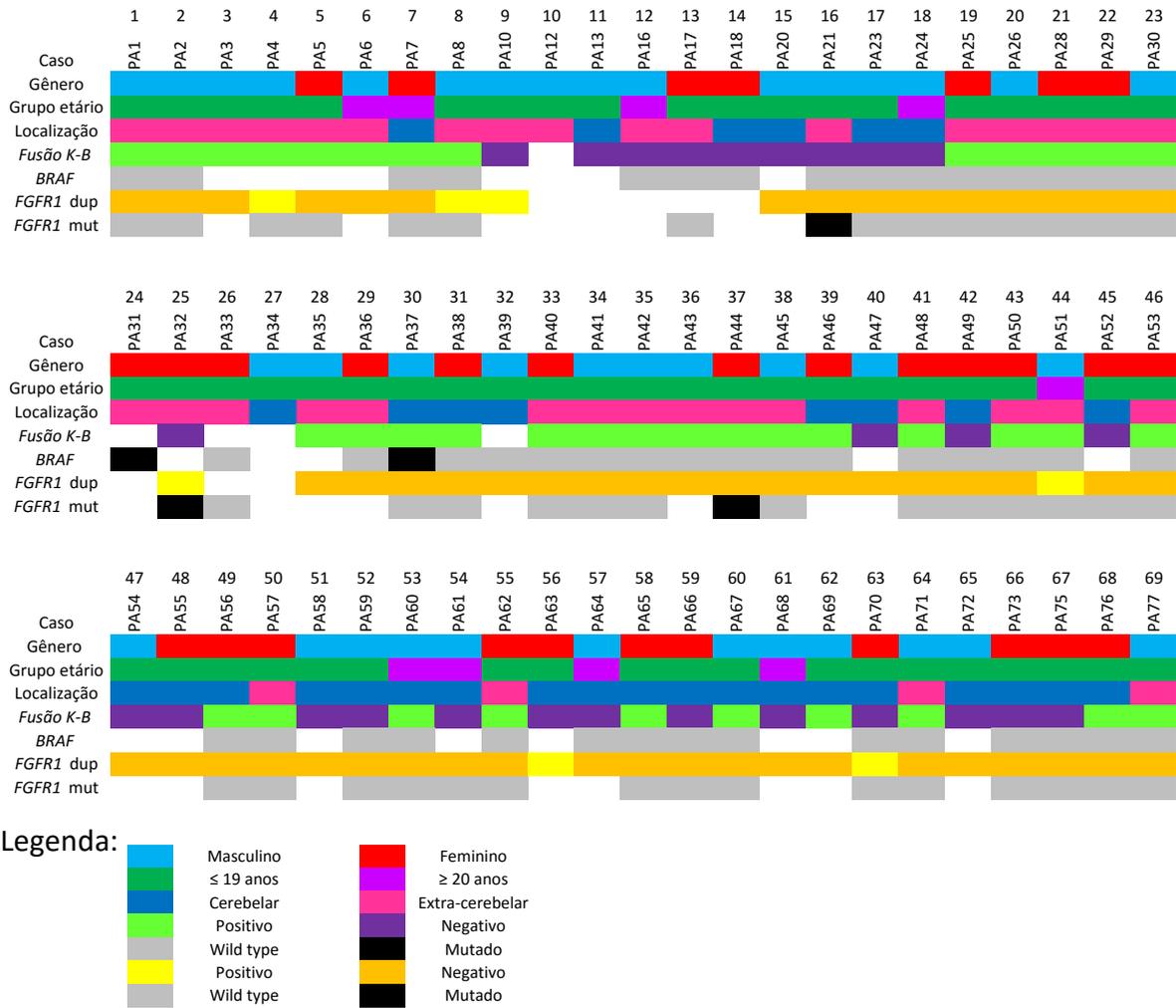


Figura 12- Resumo das alterações moleculares dos genes *FGFR1* e *BRAF* na série de astrocitomas pilocíticos, em relação aos grupos clínicos.

5.2.5 RKIP

O estudo imuno-histoquímico para detecção da RKIP obteve resultados confiáveis em 68/69 das lesões primárias (98,6%), apresentando positividade citoplasmática (escore 3-6) em 97% destas (67 lesões) (Figura 13). Em 1/69 lesões primárias (P12 – Tabela 3) e em uma lesão recidivada (P05 – Tabela 3) houve perda do material. As lesões recidivadas mantiveram o padrão das respectivas lesões originais. Apenas uma lesão (1,4%) apresentou perda completa da expressão de RKIP: um paciente do grupo pediátrico com lesão no tronco encefálico, que foi posteriormente irradiada, permanecendo estável até o final deste estudo. No cerebelo não neoplásico, houve positividade difusa, tanto de astrócitos como de células de Purkinje (Figura 13).

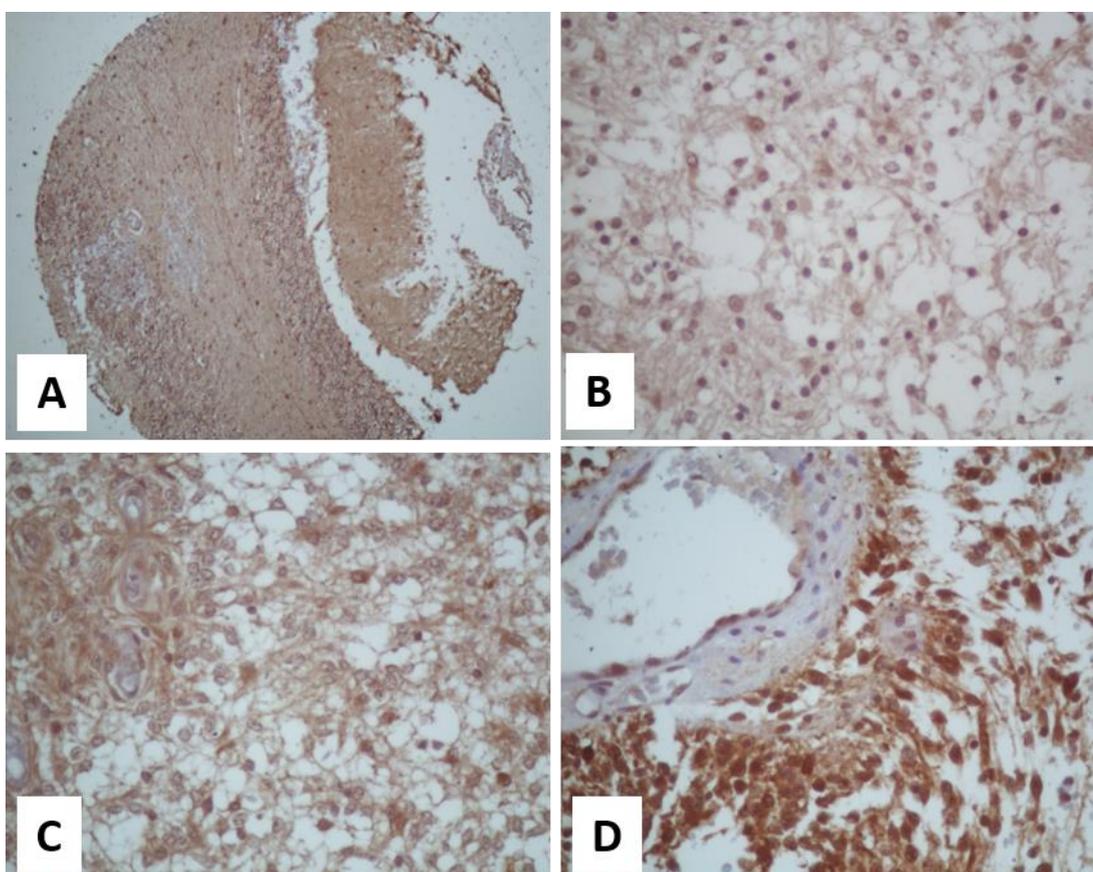


Figura 13- Padrões de expressão imuno-histoquímica da RKIP. Cerebelo não neoplásico apresentando positividade difusa – 20x (A). Imunoexpressão fraca, com marcação nuclear focal – 400x (B), moderada – 400x (C) e forte – 400x (comparar com a expressão endotelial) (D).

Quando comparada a expressão de RKIP nos diversos grupos, não observamos diferenças estatisticamente significativas (Tabela 6).

Tabela 6- Expressão de RKIP em relação aos grupos clínicos.

	Expressão de RKIP		
	Positivo	Negativo	<i>p</i>
Gênero			
Masculino	37	1	1,0
Feminino	31	0	
Grupo etário			
Pediátrico	59	1	1,0
Adulto	9	0	
NF1			
Sim	5	0	1,0
Não	63	1	
Localização			
Cerebelar	36	0	0,478
Extracerebelar	32	1	
Evolução			
Favorável	40	1	1,0
Desfavorável	28	0	

5.2.6 MTAP

A reação imuno-histoquímica mostrou resultados confiáveis em 71/75 amostras (94%). A marcação observada foi citoplasmática, independente do padrão histológico da neoplasia. Três casos (4,3%), todos de pacientes do grupo pediátrico e localizados nos hemisférios cerebrais apresentaram perda completa da expressão de MTAP, com reação endotelial positiva. No córtex cerebelar não neoplásico, observamos positividade citoplasmática forte nas células de Purkinje e ausente (em 8 dos 9 casos) ou fraca (em 1 dos 9 casos) nos astrócitos (Figura 14).

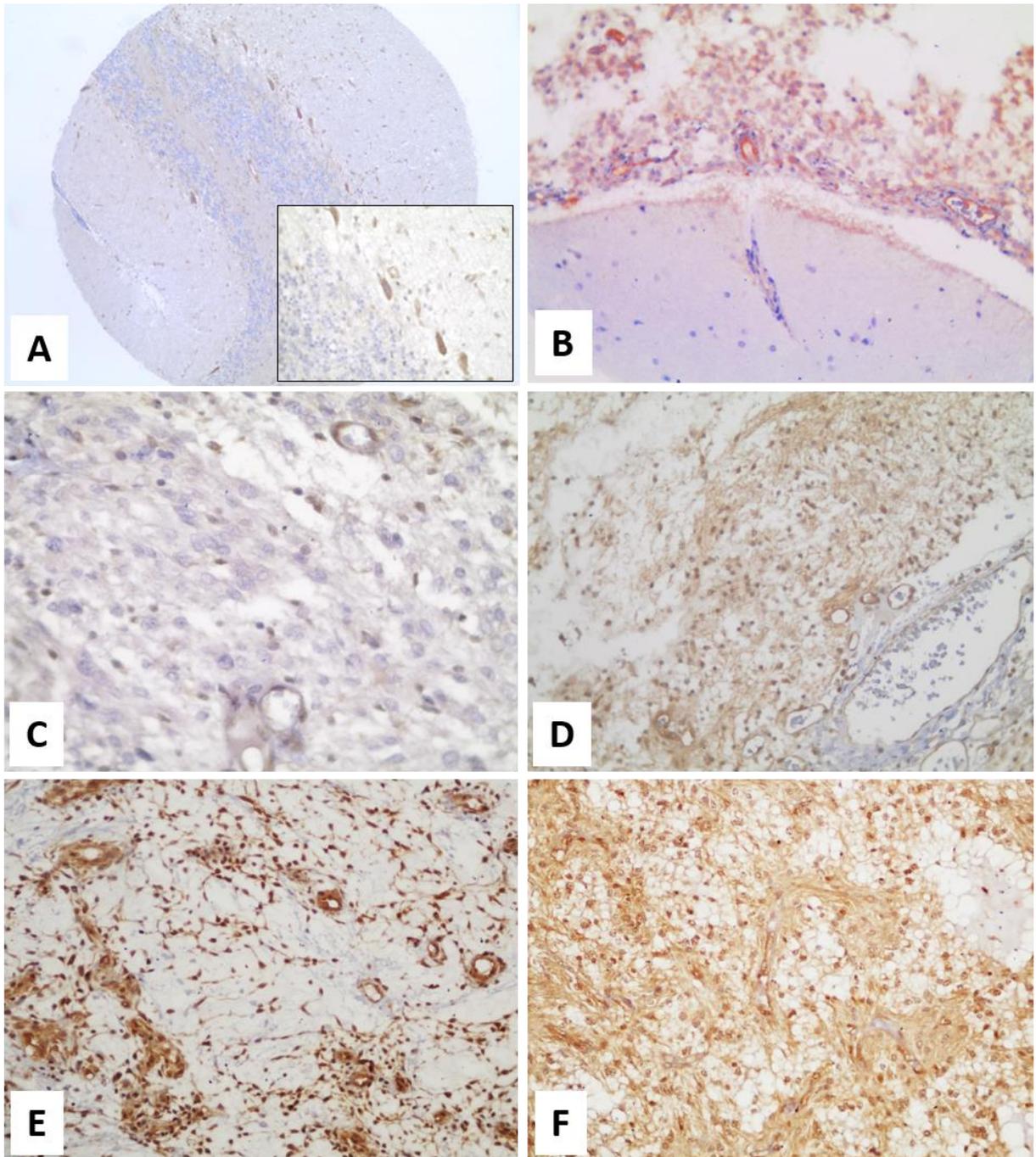


Figura 14- Expressão imuno-histoquímica de MTAP. No cerebelo não neoplásico a marcação foi apenas nas células de Purkinje – 20x (detalhe – 400x)(A). Transição cerebelo não neoplásico-tumor, com reação positiva apenas nas células neoplásicas – 200x (B). Caso com perda da expressão de MTAP (células endoteliais positivas) – 400x (C). Positividade moderada (comparar com a positividade endotelial) – 200x (D). Casos com expressão forte de MTAP, tanto em áreas piloides – 200x (E), quanto em áreas de padrão oligodendroglial-símile – 200x (F).

As lesões das vias ópticas apresentaram relativamente imunoexpressão mais forte de MTAP (4/4 lesões com escore=6). Por outro lado, todos os tumores com perda total da expressão de MTAP localizavam-se nos hemisférios cerebrais. A positividade para MTAP em relação à localização das lesões pode ser observada na tabela 7.

Tabela 7- Intensidade de MTAP de acordo com a localização da neoplasia.

	Intensidade de MTAP				Total
	Negativo	Fraco	Moderado	Forte	
Cerebelo	0	6	21	9	36
Tronco encefálico	0	1	1	2	4
Medular	0	0	4	1	5
Suprasselar	0	0	2	4	6
Vias ópticas	0	0	0	4	4
Hemisférios cerebrais	3	2	4	5	14
Total	3	9	30	25	69

Entre as lesões primárias, 82% foram positivas. As lesões recidivadas mantiveram o padrão de positividade para MTAP ($p=0,5$ pelo teste de McNemar), exceto o paciente com três lesões avaliadas (P04 – Tabela 3), que apresentou intensidade decrescente ao longo da evolução (escores 6, 5 e 4, respectivamente). Dos pacientes cujos tumores apresentaram perda da expressão de MTAP, um apresentava diagnóstico clínico de Nf1 (P23 – Tabela 3) e um (P39 – Tabela 3) apresentou evolução desfavorável, com múltiplas recorrências não analisadas neste estudo.

Não observamos diferenças significativas na expressão de MTAP entre os diversos grupos clínicos, conforme se observa na tabela 8.

Tabela 8- Expressão de MTAP em relação aos grupos clínicos.

	Total	Expressão de MTAP		p
		Positivo	Negativo	
Gênero				
Masculino	38	35	3	0,247
Feminino	31	31	0	
Grupo etário				
Pediátrico	60	57	3	1,0
Adulto	9	9	0	
NF1				
Sim	5	4	1	0,205
Não	64	2	62	
Localização				
Cerebelar	36	36	0	0,104
Extracerebelar	33	30	3	
Evolução				
Favorável	34	2	32	0,614
Desfavorável	35	1	34	

5.2.7 Impacto das características moleculares e expressão proteica na sobrevida

A comparação da sobrevida total entre os grupos etários pode ser observada na figura 15, notando-se que em ambos a sobrevida em 5 anos foi >90% e a sobrevida em 10 anos foi em torno de 80%.

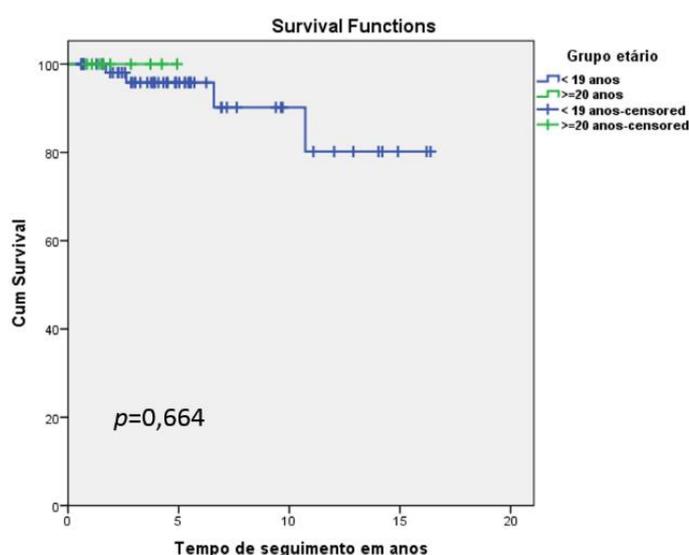


Figura 15- Comparação das curvas de sobrevida total dos pacientes com astrocitomas pilocíticos, de acordo com os grupos etários.

Também não houve diferença significativa na sobrevida total entre os gêneros ($p=0,293$), entre pacientes com APs esporádicos e Nf1-APs ($p=0,726$) e entre os portadores de lesões cerebelares e extracerebelares ($p=0,826$) (dados não mostrados).

A maioria das alterações pesquisadas neste estudo não afetou significativamente a sobrevida dos pacientes. As informações sobre o impacto destas alterações na sobrevida total entre os grupos podem ser observadas na tabela 9. As mutações pontuais do *FGFR1* e a fusão *KIAA1549-BRAF* resultaram em impacto estatisticamente significativo e serão apresentadas detalhadamente.

Tabela 9- Impacto das alterações gênicas na sobrevida total do grupo de pacientes com astrocitomas pilocíticos.

Gene/Parâmetro avaliado (método)	Resultados possíveis	<i>p</i>
<i>FGFR1</i> /Expressão proteica (imuno-histoquímica)	Positivo/Negativo	0,923
<i>FGFR1</i> /Ganho no número de cópias (FISH)	Baixo/Moderado/Alto	0,904
<i>BRAF</i> /Mutação pontual (Sequenciamento)	<i>Wild type</i> /Mutado	0,480
<i>MTAP</i> /Expressão proteica (imuno-histoquímica)	Positivo/Negativo	0,899
<i>RKIP</i> /Expressão proteica (imuno-histoquímica)	Positivo/Negativo	0,841

5.2.8 Importância prognóstica dos genes *FGFR1* e *BRAF* nos astrocitomas pilocíticos

A presença da mutação pontual K656E do gene *FGFR1*, embora rara, foi significativamente relacionada à menor sobrevida total ($p=0,047$) e menor sobrevida livre de eventos ($p=0,025$) de seus portadores (Figura 16).

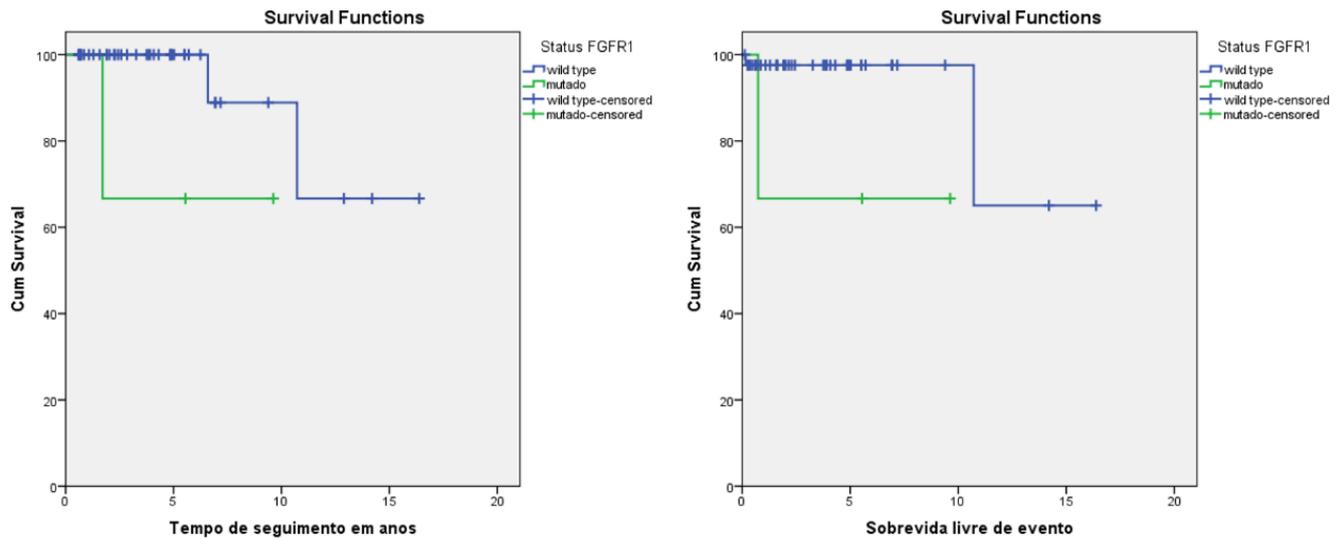


Figura 16- Impacto da mutação K656E do *FGFR1* na sobrevida total e sobrevida livre de evento nos pacientes com astrocitomas pilocíticos.

Por outro lado, a presença da fusão *KIAA1549-BRAF* identificou um grupo de pacientes com sobrevida total e sobrevida livre de evento significativamente maiores ($p=0,003$ e $p=0,018$, respectivamente) (Figura 17).

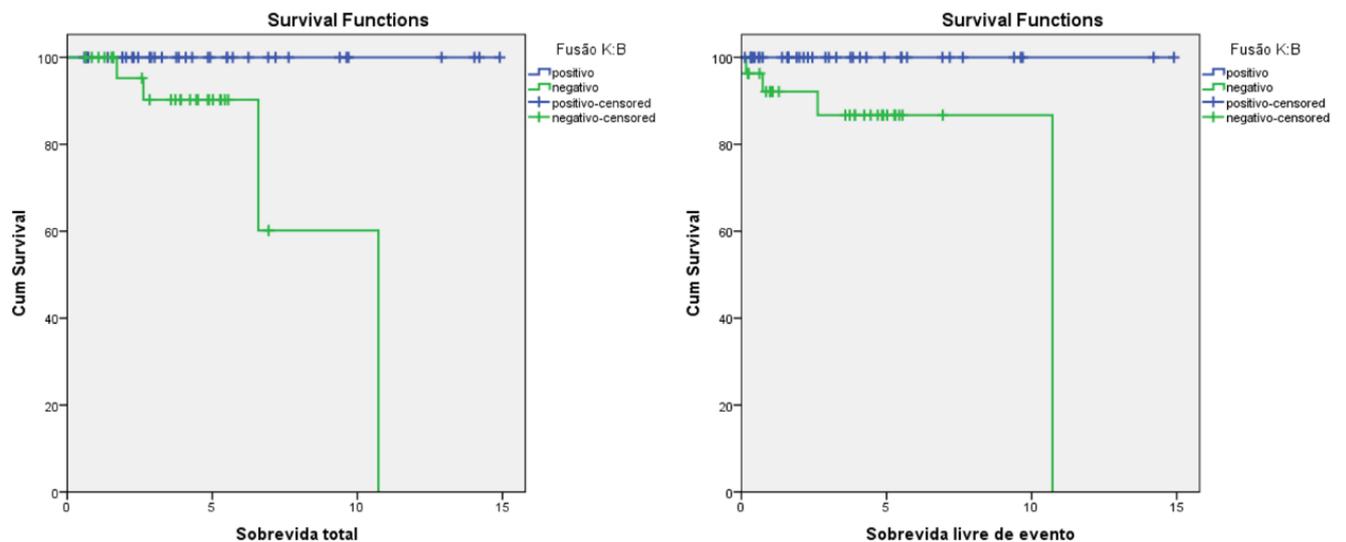


Figura 17- Impacto da fusão gênica *KIAA1549-BRAF* na sobrevida total e sobrevida livre de doença nos pacientes com astrocitomas pilocíticos.

Devido à presença de alterações moleculares combinadas do *FGFR1* e do *BRAF* em alguns pacientes, investigamos a influência destas combinações na sobrevida total dos pacientes.

Quando analisados em conjunto o status do gene *FGFR1* e a presença da fusão *KIAA1549-BRAF*, os pacientes com tumores negativos para a fusão *KIAA1549-BRAF* apresentaram sobrevida menor independente do status do *FGFR1*. A mutação K656E determinou uma redução adicional na sobrevida. O pior resultado foi alcançado pelos dois pacientes que apresentaram tumor com *FGFR1* mutado e sem a fusão *KIAA1549-BRAF*. A diferença na sobrevida entre os diversos grupos foi altamente significativa ($p=0,002$) (Figura 18).

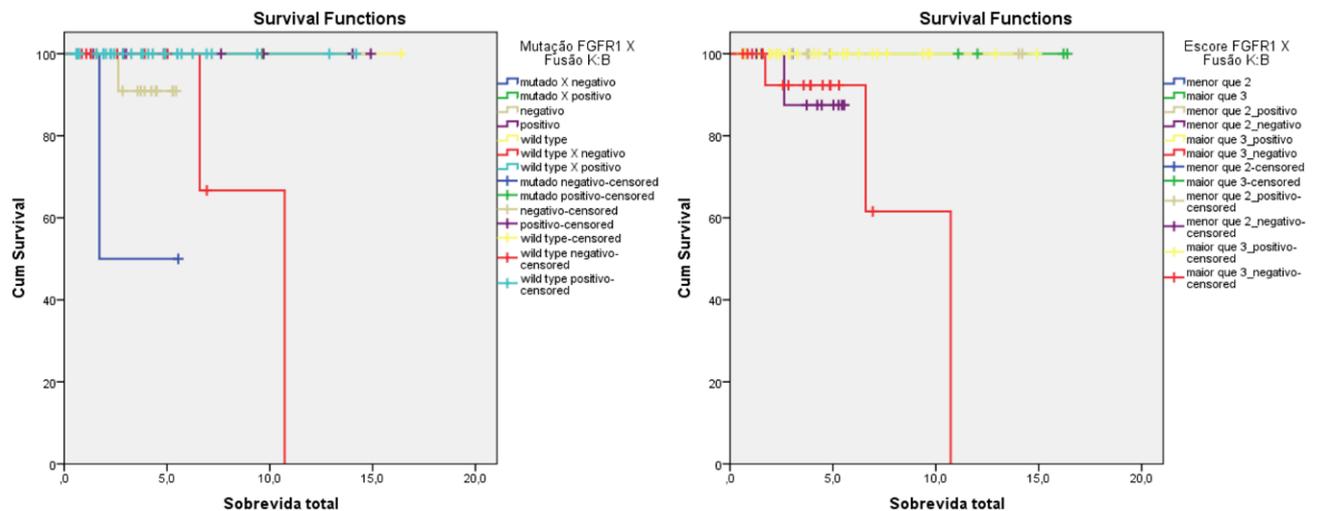


Figura 18- Análise combinada da curva de sobrevida total dos pacientes com astrocitomas pilocíticos em relação a alterações do *FGFR1* (mutação e expressão imuno-histoquímica) e fusão *KIAA1549-BRAF*.

Finalmente, uma vez que a relação entre a mutação do *FGFR1* e a expressão imuno-histoquímica do gene tendeu à significância estatística, avaliamos também a relação do perfil imuno-histoquímico com a presença da fusão *KIAA1549-BRAF* na sobrevida total dos pacientes da série. Os pacientes com expressão forte de *FGFR1* e presença da fusão *KIAA1549-BRAF* apresentaram a sobrevida mais longa, enquanto a negatividade de ambos os marcadores resultou em uma menor sobrevida total (Figura 18). A diferença na sobrevida entre os grupos avaliados foi estatisticamente significativa ($p=0,032$).

6- DISCUSSÃO

6.1 Dados clinicoepidemiológicos

A presente série de casos apresenta características clínicas semelhantes aos dados da literatura mundial, em relação à distribuição da neoplasia por gênero (1,2M:1F) e proporção entre pacientes pediátricos e adultos ^{1,2}. A média etária dos pacientes (11,6 anos) foi um pouco mais alta que a média descrita em outros estudos ^{2,17}, porém em nossa série tivemos nove pacientes adultos, o que colabora para o aumento da média etária.

Embora na literatura os estudos sobre APs sejam em geral realizados apenas com crianças, a decisão de estudar em conjunto pacientes pediátricos e adultos teve o objetivo de comparar possíveis diferenças entre tais grupos. Os APs em adultos apresentam alterações moleculares diferentes daquelas observadas em tumores pediátricos ^{60,62} e a evolução em pacientes mais velhos tende a ser mais agressiva ¹¹, inclusive resultando em sobrevida em 5 anos significativamente menor ¹¹. Esta diferença não foi observada nesta série e a sobrevida de ambos os grupos etários foi semelhante.

A sobrevida longa e a mortalidade baixa (5,8%) na série foram semelhantes aos dados mundiais ^{1,2}. Entretanto, quando analisados não apenas os parâmetros objetivos de tempo de sobrevida e número de óbitos na série, notamos que a maioria (50,7%) dos pacientes apresentou evolução considerada desfavorável dentro dos critérios estabelecidos para definição dos grupos clínicos deste estudo. Apesar disso, a presença de sequelas graves descrita em cerca de 11% dos pacientes com astrocitomas pilocíticos cerebelares ¹¹², é superior ao aqui apresentado. Há certa limitação na comparação com os dados da literatura, pois a maioria dos estudos sobre a evolução clínica subjetiva dos astrocitomas pilocíticos considera apenas as lesões cerebelares ¹¹²⁻¹¹⁴.

Cinco pacientes (7,2%) apresentaram diagnóstico clínico de Nf1, proporção que também é compatível com outras séries publicadas ^{15,29,30,115}.

6.2 Galectina-3 e IDH-1

A positividade da maioria dos casos para galectina-3 e a negatividade de todos os casos da série para IDH-1 confirmou o diagnóstico de AP nos casos da série e é compatível com estudos prévios. A galectina-3 foi estabelecida como um marcador diagnóstico auxiliar dos astrocitomas pilocíticos ^{17,104,116}, permitindo mais segurança no diagnóstico diferencial com astrocitoma difuso grau II da OMS ¹⁰⁴, embora a expressão de galectina-3 não seja específica

dos APs, podendo ser observada em outros tumores de baixo grau, como os ependimomas e os PXAs ^{116,117}.

Já a expressão do *IDH-1* é uma ferramenta útil recentemente descrita para o diagnóstico diferencial principalmente dos APs com astrocitomas difusos grau II da OMS e GBMs secundários ^{26,105}. Um dos casos incluídos no TMA apresentou características histopatológicas pouco definidas de astrocitoma pilocítico (por exemplo, ausência do padrão bifásico clássico e de fibras de Rosenthal). Na pesquisa da expressão de *IDH-1* foi observada marcação forte e difusa das células neoplásicas, destoante dos demais casos do estudo. Os exames radiológicos só foram obtidos após a inclusão do caso no TMA e confirmaram aspecto infiltrativo da lesão na RM. Este caso foi excluído das análises estatísticas, mas serviu como controle positivo da reação no TMA.

6.3 Gene *FGFR1*

A expressão difusa de *FGFR1* pelas células neoplásicas em contraste com a reduzida expressão nos astrócitos não neoplásicos observada nesta série confirmou os achados de estudos prévios ¹¹⁸. Os estudos mais recentes vem se concentrando em descrever alterações do gene *FGFR1* através de métodos mais sofisticados e tiveram sucesso em identificar alterações como as duplicações do gene em astrocitomas difusos de grau II ^{119,120} e as mutações pontuais ocorrendo em APs e outras neoplasias ^{42,51}. Apesar disso, a correlação com a imunoexpressão de *FGFR1* foi pouco explorada em tumores do SNC. Jones et al. descreveram superexpressão da forma fosforilada da *FGFR1*, confirmando a ativação da via MAPK pela mutação pontual do gene ⁴² e que é compatível com a expressão da forma total de *FGFR1* por nós observada nesta série.

A presença da mutação K656E foi um evento raro. A proporção dos casos com a forma mutada do gene *FGFR1* em nosso estudo foi semelhante à descrita por Jones et al. ⁴² em APs extracerebelares. Até o momento, apenas um outro estudo relatou a presença desta mutação em um paciente com astrocitoma pilomixóide da região hipotalâmica, que evoluiu com o desenvolvimento de um tumor glioneuronal formador de rosetas do quarto ventrículo, o qual também exibiu a mesma mutação ⁵¹. Não há outros estudos relatando a presença e a frequência de mutações do *FGFR1* em APs na literatura atual.

Interessantemente todas as mutações desta série foram detectadas em lesões cerebelares, contrariando os estudos prévios ^{42,51}. Apesar da localização cerebelar ser mais

relacionada a bom prognóstico, uma das pacientes que exibiu a forma mutada do gene (P32) era uma paciente de 18 anos com lesão no vermis cerebelar totalmente excisada, que recidivou em um curto tempo e apresentou disseminação liquórica, culminando no óbito da paciente em menos de 2 anos após a cirurgia. Os outros dois pacientes, que também foram submetidos a ressecção total da lesão, permanecem vivos e sem evidência de doença até o momento.

Com relação ao estudo por FISH, a amplificação gênica, que é o mecanismo molecular e alvo terapêutico mais comum de alteração do gene em outras neoplasias ^{43,47,49,121} não foi observada em nenhum dos casos da nossa série. Apesar disso, um pequeno número de casos apresentou um baixo ganho no número de cópias do gene, que não apresentou correlação com a evolução dos pacientes. Não encontramos na literatura estudos em gliomas ou outros tumores que relatem a presença desta alteração, embora as duplicações intragênicas do *FGFR1* tenham sido descritas em gliomas baixo grau ^{119,120}, portanto seu papel na histogênese dos APs permanece a ser esclarecido.

A expressão citoplasmática de *FGFR1* na grande maioria dos casos apresentou relação positiva, porém não significativa do ponto de vista estatístico, com a presença da mutação K656E e com o ganho no número de cópias do *FGFR1*, sugerindo que ambos podem ser mecanismos responsáveis pela superexpressão do *FGFR1*. Estudos com séries mais numerosas poderão confirmar esta hipótese e apresentar implicações no tratamento dos APs, pois o *FGFR1* é atualmente um importante alvo terapêutico, principalmente no tratamento de carcinomas pulmonares ¹²². Há relatos que tumores pulmonares que apresentam superexpressão de *FGFR1* (no caso de estudo, medida por imunoblot ou quantificação do mRNA), independente do número de cópias do gene, apresentam melhor resposta ao ponatinib (AP 24534), um novo inibidor de *FGFR1* ¹²². Além destes, outros inibidores como o lucitanib ¹²³ e o CH5183284/Debio 1347 ¹²⁴ são potenciais alternativas futuras para o tratamento não-cirúrgico dos APs, porém são necessários estudos pré-clínicos e clínicos para comprovação desta hipótese.

6.4 Gene *BRAF*

A padronização do anticorpo *BRAF* mutado para uso em APs apresentou dificuldades técnicas, embora o mesmo esteja atualmente padronizado para uso em melanomas em nossa instituição. Esta dificuldade foi discutida em sessão científica no XVIII Congresso Internacional de Neuropatologia, realizado no Rio de Janeiro (Setembro, 2014) e, devido o anticorpo não estar apresentando bons resultados, segundo os especialistas envolvidos na discussão, e correremos o risco de se obterem resultados falso-negativos optamos por suprimir estes dados do presente estudo.

O sequenciamento de parte dos casos (48 no total) detectou dois tumores com mutações pontuais no códon de interesse do gene *BRAF*, correspondendo a 4,1% da amostra estudada, proporção menor que a referida em estudos prévios⁶⁴. Devido à presença da forma mutada do gene ter sido observada em uma lesão supratentorial e outra cerebelar, não confirmamos neste estudo a ocorrência preferencial desta mutação em tumores extracerebrais previamente relatada⁶⁴. O paciente com a lesão supratentorial que apresentou a mutação clássica V600E, evoluiu com múltiplas recidivas tumorais, permanecendo vivo com doença.

Por outro lado, a lesão cerebelar apresentou a mutação V600K, ao nosso ver, inédita em APs. Esta mutação já foi descrita em 5-15% dos melanomas e relacionada à ocorrência de metástases e pior prognóstico¹²⁵⁻¹²⁷, porém com melhor resposta aos inibidores de *BRAF* de 1ª geração, como o vemurafenib¹²⁷. Semelhante ao que ocorreu com os melanomas, este inibidor apresentou excelentes resultados contra astrocitomas de alto grau portadores da mutação V600E^{128,129}, porém com resultados não repetidos em APs¹³⁰. De fato, observou-se aumento da resistência tumoral ao análogo do vemurafenib (PLX4720), relacionado à presença da fusão *KIAA1540-BRAF*¹³⁰, a qual é a alteração mais comum nos APs. A presença de mutações alternativas à V600E pode potencialmente identificar um grupo de pacientes que responderiam melhor à terapia com vemurafenib, entretanto, esta possibilidade é passível de confirmação com estudos mais abrangentes.

Por outro lado, a fusão *KIAA1549-BRAF* foi confirmada como a alteração mais frequente para ativação da via MAPK em APs, corroborando os relatos de vários autores^{18,60,61}. Do mesmo modo, a relação negativa com o diagnóstico de NF1 observada neste estudo foi previamente descrita^{60,61} e pode sinalizar que a ativação da via MAPK se faz por mecanismos alternativos em pacientes com NF1. Também confirmam os estudos prévios a predominância

da fusão *KIAA1549-BRAF* em lesões cerebelares^{18,42,63,120,131} e a sua frequência discretamente mais elevada em pacientes do grupo etário pediátrico⁶⁰, embora sem significância estatística nesta série. A confirmação da fusão *KIAA1549-BRAF* como característica dos APs, além de ter importância diagnóstica, abre a possibilidade da utilização de inibidores de BRAF de segunda geração (PLX-PB3), que têm a fusão *KIAA1549-BRAF* como alvo terapêutico, porém ainda não estão disponíveis para uso clínico¹³⁰.

6.5 Proteína RKIP

A proteína RKIP é descrita como um regulador negativo da via MAPK e a perda de sua expressão já foi descrita em gliomas⁸⁰, relacionada à maior agressividade, em estudo que avaliou apenas astrocitomas anaplásicos e GBMs. De fato, a manutenção da expressão de RKIP foi comprovada como fator de bom prognóstico apenas em GBMs^{80,82}. Não há na literatura estudos que descrevam o comportamento nem a importância da RKIP no prognóstico nos APs, já que os estudos sobre a expressão de RKIP em gliomas foram restritos aos gliomas infiltrativos, tanto astrocíticos, como oligodendrogliais, puros ou mistos^{80,81}.

Nossos achados demonstraram expressão forte e difusa de RKIP em praticamente todos os APs estudados, porém devido ao mínimo número de espécies com perda da expressão e à homogeneidade da expressão nos demais tumores e inclusive no cerebelo não neoplásico adjacente, não houve diferenças estatísticas entre os grupos do estudo.

A expressão difusa de RKIP nos astrocitomas pilocíticos sugere que esta proteína de fato participa ativamente como um regulador negativo da via MAPK, gerando a hipótese de que poderia estar relacionada ao desvio da função da MAPK para a indução de senescência celular (Figura 3). Isto explicaria a melhor evolução geral dos APs e evolução agressiva dos gliomas que apresentam perda da expressão de RKIP, entretanto mais estudos são necessários para confirmar esta hipótese.

Além disso, não conseguimos estabelecer em nossa série uma relação significativa entre a expressão de RKIP e a presença das alterações dos genes *BRAF* e *FGFR1*, que são os principais fatores ativadores da via MAPK, e nem com a expressão de *MTAP*, que poderia justificar um potencial vínculo da RKIP na indução da OIS.

6.6 Proteína MTAP

A imunexpressão de MTAP é descrita em todos os tecidos normais, porém sua distribuição no SNC não é apropriadamente descrita, exceto nos astrócitos do nervo óptico e no epitélio da retina ¹³². Em nosso estudo, observamos uma forte positividade citoplasmática para MTAP nas células de Purkinje do cerebelo, porém os astrócitos não neoplásicos não apresentaram reatividade para esta proteína ou exibiram apenas expressão fraca. Além disso, a distribuição normal de MTAP explicaria a expressão mais forte desta proteína nos tumores do nervo óptico em nossa série.

A expressão mantida de MTAP observada na quase totalidade dos casos é um dos achados mais significativos deste estudo. Primeiro, porque não há dados na literatura relativos à expressão desta proteína em APs, embora vários relatos identifiquem a perda da expressão em neoplasias agressivas. Em tumores do SNC encontramos apenas relatos de deleções ³³ e de perda da expressão ^{99,100} do gene *MTAP* em GBMs, porém não há relatos de estudos da expressão imuno-histoquímica nestes tumores. Ao nosso ver, este é o primeiro trabalho a descrever a expressão imuno-histoquímica do gene *MTAP* em um tumor primário do SNC.

A expressão mantida de MTAP nos APs levantou a hipótese de que este gene pode estar relacionado ao fenômeno da senescência celular. Estudos experimentais observaram superexpressão de MTAP em astrócitos senescentes de doenças neurodegenerativas, resultando em perda da função neuroprotetora destas células no SNC normal ^{133,134}. Do ponto de vista oncológico, a ocorrência de OIS através da via MAPK foi confirmada em astrocitomas pilocíticos através da expressão de p16, induzida pela mutação V600E do gene *BRAF* ^{83,85}. Os genes *p16^{INK4a}* e *MTAP*, devido à sua proximidade no cromossomo 9, são frequentemente codelimitados em várias neoplasias malignas ^{44,87,88,90,91} e, apesar de uma relação positiva entre p16 e MTAP e da confirmação do MTAP como fator prognóstico independente em carcinomas pulmonares ⁹⁷, esta relação em astrocitomas pilocíticos ainda permanece a ser esclarecida e pode ser objeto de estudos futuros.

Finalmente, a expressão mantida de MTAP nos APs descrita neste estudo pode ajudar a explicar a resposta insatisfatória dos gliomas pediátricos de alto grau e meduloblastomas aos inibidores da SDNP, como metotrexate e pemetrexed ^{135,136}. Uma vez que a melhor resposta a estas drogas é alcançada por neoplasias agressivas com perda da expressão de MTAP ^{87-89,97,137}, abre-se a possibilidade de ampliação do estudo com avaliação da expressão

de MTAP em outros tumores pediátricos, de maneira a explicar a base celular dos resultados pouco animadores dos estudos clínicos.

6.7 Importância prognóstica das alterações moleculares dos astrocitomas pilocíticos

Não há na literatura estudos que comprovem o papel prognóstico das mutações pontuais do gene *FGFR1* nos APs, tanto pela raridade de sua ocorrência, quanto pelo fato de estas alterações terem sido muito recentemente descritas⁴². Ao nosso ver, este é o primeiro estudo que fortemente sugere um papel prognóstico importante da mutação K656E do *FGFR1*, ao identificar um grupo de pior prognóstico entre os pacientes.

Além disso, confirmamos a importância da fusão *KIAA1549-BRAF* na identificação de pacientes com melhor prognóstico em ambos os grupos etários. Esta relação positiva foi descrita por Hawkins et al.⁶¹ em um estudo englobando “astrocitomas de baixo grau” pediátricos, os quais incluíram astrocitomas de grau II, que eventualmente apresentaram a fusão *KIAA1549-BRAF*. Não encontramos na literatura estudos que confirmem o papel prognóstico da fusão *KIAA1549-BRAF* exclusivamente em astrocitomas pilocíticos, portanto este estudo gerou dados inéditos e que podem ser citados em futuras pesquisas com séries maiores e análises multivariadas.

Interessantemente, a presença da fusão *KIAA1549-BRAF* determinou bom prognóstico mesmo nos casos que apresentaram mutações gênicas simultâneas. Dentre os pacientes com a mutação K656E do *FGFR1*, uma (P44) apresentou também a fusão *KIAA1549-BRAF* e teve evolução excelente após ressecção total de um tumor cerebelar – permanece viva e sem doença após longo seguimento clínico (quase 10 anos). Os outros dois pacientes foram negativos para a fusão *KIAA1549-BRAF*.

Entre os pacientes com mutação do *BRAF*, a paciente que apresentou lesão cerebelar com mutação V600K associada à fusão *KIAA1549-BRAF*, também teve uma excelente evolução em seguimento de mais de 11 anos. Já o paciente com tumor supratentorial com mutação V600E que apresentou múltiplas recorrências do tumor, não teve amostras disponíveis para análise por FISH.

A ocorrência de alterações simultâneas em proteínas da via MAPK é um evento raro, porém descrito por outros autores^{18,61,63}, entretanto, nos dois estudos que descrevem as mutações do *FGFR1* em astrocitomas pilocíticos ou astrocitomas pilomixoides não foram observados casos com alterações simultâneas de *BRAF*^{42,51}.

Em resumo, embora o astrocitoma pilocítico seja, em geral, uma neoplasia de bom prognóstico e passível de cura com ressecção cirúrgica devido ao caráter não infiltrativo, é necessário lembrar que uma parte considerável dos pacientes apresentam evoluções desfavoráveis. Quer pela ocorrência de múltiplas recidivas, quer pela localização da lesão em áreas eloquentes do SNC, que impedem adequada ressecção, é necessário que se busquem alternativas terapêuticas que possibilitem um controle do crescimento dessas neoplasias.

A dificuldade na obtenção de dados para comparação se deve ao caráter inédito de vários achados aqui descritos. Além disso, este estudo abre amplos campos de pesquisa em potencial, ao identificar alterações moleculares relacionadas ao prognóstico dos astrocitomas pilocíticos e que podem ser alvo de terapêuticas específicas, com drogas como os inibidores de *FGFR1*, inibidores de *BRAF* de segunda geração e inibidores da SDNP. Os dados aqui apresentados também possibilitam a comparação do perfil do astrocitomas pilocíticos com outros tumores cerebrais pediátricos e adultos em futuros estudos que expliquem a resposta inadequada aos medicamentos já testados no tratamento de tumores cerebrais da infância. Por fim, o desenvolvimento de novas drogas-alvo pode futuramente tornar o astrocitoma pilocítico, diferentemente de outras neoplasias cerebrais, uma doença potencialmente controlável e com melhor qualidade de vida dos pacientes.

7- CONCLUSÕES

- O astrocitoma pilocítico é uma lesão de bom prognóstico, com sobrevida total longa, independente de idade de aparecimento da neoplasia, gênero, localização da lesão ou ocorrência de Nf1.

- A expressão imuno-histoquímica aumentada de FGFR1 nos APs pode estar relacionada com a mutação K656E e com o baixo ganho no número de cópias do *FGFR1*.

- As mutações do gene *FGFR1* foram observadas em lesões cerebelares e determinam sobrevida mais curta.

- Amplificação gênica do *FGFR1* não foi um evento observado nesta série de APs.

- As mutações do gene *BRAF* são eventos raros nos astrocitomas pilocíticos e não interferiram na sobrevida dos pacientes.

- A fusão *KIAA1549-BRAF* é o evento molecular mais frequentemente observado nos astrocitomas pilocíticos, apresentando correlação positiva com localização cerebelar e negativa com a ocorrência de Nf1.

- A presença da fusão *KIAA1549-BRAF* é um fator de bom prognóstico nos APs, identificando um grupo com maior sobrevida.

- A superexpressão de RKIP em astrocitomas pilocíticos ocorre em praticamente todos os casos e sugere o bloqueio da via MAPK em sua função de indução de proliferação celular, explicando o comportamento indolente dos astrocitomas pilocíticos.

- A superexpressão de MTAP em quase todos os casos sugere a importância da senescência induzida por oncogenes na gênese dos astrocitomas pilocíticos e a perda de expressão de MTAP pode identificar um subgrupo de pacientes que responderiam à terapia com inibidores da síntese *de novo* de purinas.

REFERÊNCIAS

1. Louis D, Reinfenberger G, Brat D, et al: Tumors: introduction and neuroepithelial tumors - Pilocytic astrocytoma, in Love S, Louis D, Ellison D (eds): Greenfield's Neuropathology. London, Hodder Arnold, 2008
2. Scheithauer BW, Hawkins C, Tihan T, et al: Pilocytic astrocytoma, in David N. Louis MD, Hiroko Ohgaki PD, Otmar D. Wiestler MD, et al (eds): WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. World Health Organization Classification of Tumours. Lyon, France, IARC Press, 2007, pp 13-21
3. Meulepas JM, Ronckers CM, Smets AM, et al: Leukemia and brain tumors among children after radiation exposure from CT scans: design and methodological opportunities of the Dutch Pediatric CT Study. *Eur J Epidemiol* 29:293-301, 2014
4. Ishida Y, Maeda M, Urayama KY, et al: Secondary cancers among children with acute lymphoblastic leukaemia treated by the Tokyo Children's Cancer Study Group protocols: a retrospective cohort study. *Br J Haematol* 164:101-12, 2014
5. Schmiegelow K, Levinsen MF, Attarbaschi A, et al: Second malignant neoplasms after treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 31:2469-76, 2013
6. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al: WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System (ed 4th). Lyon, IARC Press, 2007 pp. 205-235
7. Kleihues P, Louis DN, Wiestler OD, et al: WHO grading of tumours of the central nervous system, in Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al (eds): WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. Lyon, IARC Press, 2007
8. Dolecek TA, Propp JM, Stroup NE, et al: CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009. *Neuro Oncol* 14 Suppl 5:v1-49, 2012
9. Camargo Bd, Felipe CFP, Noronha CP, et al: Câncer na criança e no adolescente no Brasil dados dos registros de base populacional e de mortalidade. Rio de Janeiro, Instituto Nacional do Câncer, 2008
10. Rosemberg S, Fujiwara D: Epidemiology of pediatric tumors of the nervous system according to the WHO 2000 classification: a report of 1,195 cases from a single institution. *Childs Nerv Syst* 21:940-4, 2005
11. Johnson DR, Brown PD, Galanis E, et al: Pilocytic astrocytoma survival in adults: analysis of the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program of the National Cancer Institute. *J Neurooncol* 108:187-93, 2012
12. Theeler BJ, Ellezam B, Sadighi ZS, et al: Adult pilocytic astrocytomas: clinical features and molecular analysis. *Neuro Oncol*, 2014
13. Becker AP, Scapulatempo-Neto C, Neder L, et al: Pilocytic Astrocytoma: Anatomic, Pathological and Molecular Aspects, in Lichtor T (ed): Clinical Management and Evolving Novel Therapeutic Strategies for Patients with Brain Tumors, In Tech, 2013
14. Burger PC SB: Pilocytic astrocytoma, in Burger PC SB (ed): Tumors of Central Nervous System. Washington, The Armed Force Institute of Pathology, 1994
15. Tada K, Kochi M, Saya H, et al: Preliminary observations on genetic alterations in pilocytic astrocytomas associated with neurofibromatosis 1. *Neuro Oncol* 5:228-34, 2003
16. Fernandez C, Figarella-Branger D, Girard N, Bouvier-Labit C, Gouvernet J, Paz Paredes A, Lena G: Pilocytic astrocytomas in children: prognostic factors--a retrospective study of 80 cases. *Neurosurgery* 53:544-53; discussion 554-5, 2003
17. Paixao Becker A, de Oliveira R. S., Saggiaro F. P., Neder L., Chimelli L. M., Machado H. R.: In pursuit of prognostic factors in children with pilocytic astrocytomas. *Childs Nerv Syst* 26:19-28, 2010
18. Jones DT, Gronych J, Lichter P, Witt O, Pfister S. M.: MAPK pathway activation in pilocytic astrocytoma. *Cell Mol Life Sci* 69:1799-811, 2012
19. Fernandez C, Figarella-Branger D, Girard N, et al: Pilocytic astrocytomas in children: prognostic factors--a retrospective study of 80 cases. *Neurosurgery* 53:544-53; discussion 554-5, 2003

20. Paixao Becker A, de Oliveira RS, Saggiaro FP, et al: In pursuit of prognostic factors in children with pilocytic astrocytomas. *Childs Nerv Syst* 26:19-28, 2010
21. Jones DT, Gronych J, Lichter P, et al: MAPK pathway activation in pilocytic astrocytoma. *Cell Mol Life Sci* 69:1799-811, 2012
22. Murphy T, Hori S, Sewell J, et al: Expression and functional role of negative signalling regulators in tumour development and progression. *Int J Cancer* 127:2491-9, 2010
23. Huang H, Hara A, Homma T, et al: Altered expression of immune defense genes in pilocytic astrocytomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 64:891-901, 2005
24. Rorive S, Maris, C., Debeir, O., Sandras, F., Vidaud, M., Bieche, I., Salmon, I., Decaestecker, C.: Exploring the distinctive biological characteristics of pilocytic and low-grade diffuse astrocytomas using microarray gene expression profiles. *J Neuropathol Exp Neurol* 65:794-807, 2006
25. Ohgaki H, Kleihues P: Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol* 170:1445-53, 2007
26. Capper D, Reuss D, Schittenhelm J, et al: Mutation-specific IDH1 antibody differentiates oligodendrogliomas and oligoastrocytomas from other brain tumors with oligodendroglioma-like morphology. *Acta Neuropathol* 121:241-52, 2011
27. Riemenschneider MJ, Jeuken JW, Wesseling P, et al: Molecular diagnostics of gliomas: state of the art. *Acta Neuropathol* 120:567-84, 2010
28. Riemenschneider MJ, Reifenberger G: Molecular neuropathology of low-grade gliomas and its clinical impact. *Adv Tech Stand Neurosurg* 35:35-64, 2010
29. von Deimling A, Perry A: Neurofibromatosis type 1, in Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al (eds): *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System*. Lyon, IARC Press, 2007, pp 206-209
30. Rodriguez FJ, Perry A, Gutmann DH, et al: Gliomas in neurofibromatosis type 1: a clinicopathologic study of 100 patients. *J Neuropathol Exp Neurol* 67:240-9, 2008
31. Listerneck R, Charrow J, Gutmann DH: Intracranial gliomas in neurofibromatosis type 1. *Am J Med Genet* 89:38-44, 1999
32. Parsons DW, Jones S, Zhang X, et al: An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 321:1807-12, 2008
33. Carvalho D, Mackay A, Bjerke L, et al: The prognostic role of intragenic copy number breakpoints and identification of novel fusion genes in paediatric high grade glioma. *Acta Neuropathologica Communications* 2, 2014
34. Rodriguez EF, Scheithauer BW, Giannini C, et al: PI3K/AKT pathway alterations are associated with clinically aggressive and histologically anaplastic subsets of pilocytic astrocytoma. *Acta Neuropathol* 121:407-20, 2011
35. Hanahan D, Weinberg RA: Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646-74, 2011
36. Dhanasekaran DN, Johnson GL: MAPKs: function, regulation, role in cancer and therapeutic targeting. *Oncogene* 26:3097-9, 2007
37. Dhillon AS, Hagan S, Rath O, et al: MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* 26:3279-90, 2007
38. Dunn KL, Espino PS, Drobic B, et al: The Ras-MAPK signal transduction pathway, cancer and chromatin remodeling. *Biochem Cell Biol* 83:1-14, 2005
39. Yoon S, Seger R: The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* 24:21-44, 2006
40. Becker AP, Scapulatempo-Neto C, Neder L, et al: *Pilocytic Astrocytoma: Anatomic, Pathological and Molecular Aspects*, 2013
41. Marshall CJ: Ras effectors. *Curr Opin Cell Biol* 8:197-204, 1996
42. Jones DT, Hutter B, Jager N, et al: Recurrent somatic alterations of FGFR1 and NTRK2 in pilocytic astrocytoma. *Nat Genet* 45:927-32, 2013
43. Andre F, Bachelot T, Campone M, et al: Targeting FGFR with dovitinib (TKI258): preclinical and clinical data in breast cancer. *Clin Cancer Res* 19:3693-702, 2013
44. Schmadeka R, Harmon BE, Singh M: Triple-negative breast carcinoma: current and emerging concepts. *Am J Clin Pathol* 141:462-77, 2014

45. Lee HJ, Seo AN, Park SY, et al: Low prognostic implication of fibroblast growth factor family activation in triple-negative breast cancer subsets. *Ann Surg Oncol* 21:1561-8, 2014
46. Schildhaus HU, Heukamp LC, Merkelbach-Bruse S, et al: Definition of a fluorescence in-situ hybridization score identifies high- and low-level FGFR1 amplification types in squamous cell lung cancer. *Mod Pathol* 25:1473-80, 2012
47. Schultheis AM, Bos M, Schmitz K, et al: Fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) amplification is a potential therapeutic target in small-cell lung cancer. *Mod Pathol* 27:214-21, 2014
48. Wang R, Wang L, Li Y, et al: FGFR1/3 Tyrosine Kinase Fusions Define a Unique Molecular Subtype of Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res*, 2014
49. Fernanda Amary M, Ye H, Berisha F, et al: Fibroblastic growth factor receptor 1 amplification in osteosarcoma is associated with poor response to neo-adjuvant chemotherapy. *Cancer Med*, 2014
50. Singh D, Chan JM, Zoppoli P, et al: Transforming fusions of FGFR and TACC genes in human glioblastoma. *Science* 337:1231-5, 2012
51. Gessi M, Moneim YA, Hammes J, et al: FGFR1 mutations in Rosette-forming glioneuronal tumors of the fourth ventricle. *J Neuropathol Exp Neurol* 73:580-4, 2014
52. Roberts PJ, Der CJ: Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 26:3291-310, 2007
53. Repasky GA, Chenette EJ, Der CJ: Renewing the conspiracy theory debate: does Raf function alone to mediate Ras oncogenesis? *Trends Cell Biol* 14:639-47, 2004
54. Shaw RJ, Cantley LC: Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* 441:424-30, 2006
55. Vakiani E, Solit DB: KRAS and BRAF: drug targets and predictive biomarkers. *J Pathol* 223:219-29, 2011
56. Emuss V, Garnett M, Mason C, et al: Mutations of C-RAF are rare in human cancer because C-RAF has a low basal kinase activity compared with B-RAF. *Cancer Res* 65:9719-26, 2005
57. Davies H, Bignell GR, Cox C, et al: Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417:949-54, 2002
58. Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, et al: Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* 116:855-67, 2004
59. Pfister S, Janzarik WG, Remke M, et al: BRAF gene duplication constitutes a mechanism of MAPK pathway activation in low-grade astrocytomas. *J Clin Invest* 118:1739-49, 2008
60. Hasselblatt M, Riesmeier B, Lechtape B, et al: BRAF-KIAA1549 fusion transcripts are less frequent in pilocytic astrocytomas diagnosed in adults. *Neuropathol Appl Neurobiol* 37:803-6, 2011
61. Hawkins C, Walker E, Mohamed N, et al: BRAF-KIAA1549 fusion predicts better clinical outcome in pediatric low-grade astrocytoma. *Clin Cancer Res* 17:4790-8, 2011
62. Jones C, Perryman L, Hargrave D: Paediatric and adult malignant glioma: close relatives or distant cousins? *Nat Rev Clin Oncol* 9:400-13, 2012
63. Cin H, Meyer C, Herr R, et al: Oncogenic FAM131B-BRAF fusion resulting from 7q34 deletion comprises an alternative mechanism of MAPK pathway activation in pilocytic astrocytoma. *Acta Neuropathol* 121:763-74, 2011
64. Schindler G, Capper D, Meyer J, et al: Analysis of BRAF V600E mutation in 1,320 nervous system tumors reveals high mutation frequencies in pleomorphic xanthoastrocytoma, ganglioglioma and extra-cerebellar pilocytic astrocytoma. *Acta Neuropathol* 121:397-405, 2011
65. Basto D, Trovisco V, Lopes JM, et al: Mutation analysis of B-RAF gene in human gliomas. *Acta Neuropathol* 109:207-10, 2005
66. Bar EE, Lin A, Tihan T, et al: Frequent gains at chromosome 7q34 involving BRAF in pilocytic astrocytoma. *J Neuropathol Exp Neurol* 67:878-87, 2008

67. Jacob K, Albrecht S, Sollier C, et al: Duplication of 7q34 is specific to juvenile pilocytic astrocytomas and a hallmark of cerebellar and optic pathway tumours. *Br J Cancer* 101:722-33, 2009
68. Fu Z, Smith PC, Zhang L, et al: Effects of raf kinase inhibitor protein expression on suppression of prostate cancer metastasis. *J Natl Cancer Inst* 95:878-89, 2003
69. Martinho O, Gouveia A, Silva P, et al: Loss of RKIP expression is associated with poor survival in GISTs. *Virchows Arch* 455:277-84, 2009
70. Deshmukh H, Yeh TH, Yu J, et al: High-resolution, dual-platform aCGH analysis reveals frequent HIPK2 amplification and increased expression in pilocytic astrocytomas. *Oncogene* 27:4745-51, 2008
71. Martinho O, Pinto F, Granja S, et al: RKIP Inhibition in Cervical Cancer Is Associated with Higher Tumor Aggressive Behavior and Resistance to Cisplatin Therapy. *PlosOne* 8, 2013
72. Minoo P, Zlobec I, Baker K, et al: Loss of raf-1 kinase inhibitor protein expression is associated with tumor progression and metastasis in colorectal cancer. *Am J Clin Pathol* 127:820-7, 2007
73. Fu Z, Kitagawa Y, Shen R, et al: Metastasis suppressor gene Raf kinase inhibitor protein (RKIP) is a novel prognostic marker in prostate cancer. *Prostate* 66:248-56, 2006
74. Hagan S, Al-Mulla F, Mallon E, et al: Reduction of Raf-1 kinase inhibitor protein expression correlates with breast cancer metastasis. *Clin Cancer Res* 11:7392-7, 2005
75. Al-Mulla F, Hagan S, Behbehani AI, et al: Raf kinase inhibitor protein expression in a survival analysis of colorectal cancer patients. *J Clin Oncol* 24:5672-9, 2006
76. Baritaki S, Katsman A, Chatterjee D, et al: Regulation of tumor cell sensitivity to TRAIL-induced apoptosis by the metastatic suppressor Raf kinase inhibitor protein via Yin Yang 1 inhibition and death receptor 5 up-regulation. *J Immunol* 179:5441-53, 2007
77. Chatterjee D, Bai Y, Wang Z, et al: RKIP sensitizes prostate and breast cancer cells to drug-induced apoptosis. *J Biol Chem* 279:17515-23, 2004
78. Jazirehi AR, Vega MI, Chatterjee D, et al: Inhibition of the Raf-MEK1/2-ERK1/2 signaling pathway, Bcl-xL down-regulation, and chemosensitization of non-Hodgkin's lymphoma B cells by Rituximab. *Cancer Res* 64:7117-26, 2004
79. Woods Ignatoski KM, Grewal NK, Markwart SM, et al: Loss of Raf kinase inhibitory protein induces radioresistance in prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 72:153-60, 2008
80. Gimenez M, Souza VC, Izumi C, et al: Proteomic analysis of low- to high-grade astrocytomas reveals an alteration of the expression level of raf kinase inhibitor protein and nucleophosmin. *Proteomics* 10:2812-21, 2010
81. Martinho O, Granja S, Jaraquemada T, et al: Downregulation of RKIP Is Associated with Poor Outcome and Malignant Progression in Gliomas. *PLoS One* 7, 2012
82. Maresch J, Birner P, Zakharinov M, et al: Additive effect on survival of Raf kinase inhibitor protein and signal transducer and activator of transcription 3 in high-grade glioma. *Cancer*, 2010
83. Jacob K, Quang-Khuong DA, Jones DT, et al: Genetic aberrations leading to MAPK pathway activation mediate oncogene-induced senescence in sporadic pilocytic astrocytomas. *Clin Cancer Res* 17:4650-60, 2011
84. Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS, et al: BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* 436:720-4, 2005
85. Raabe EH, Lim KS, Kim JM, et al: BRAF activation induces transformation and then senescence in human neural stem cells: a pilocytic astrocytoma model. *Clin Cancer Res* 17:3590-9, 2011
86. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, et al: Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88:593-602, 1997
87. Coulthard SA, Redfern CP, Vikingsson S, et al: Increased sensitivity to thiopurines in methylthioadenosine phosphorylase-deleted cancers. *Mol Cancer Ther* 10:495-504, 2011

88. Kadariya Y, Yin B, Tang B, et al: Mice heterozygous for germ-line mutations in methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) die prematurely of T-cell lymphoma. *Cancer Res* 69:5961-9, 2009
89. Bertino JR, Waud WR, Parker WB, et al: Targeting tumors that lack methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) activity: Current strategies. *Cancer Biology & Therapy* 11:627-632, 2011
90. Schmid M, Sen M, Rosenbach MD, et al: A methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) fusion transcript identifies a new gene on chromosome 9p21 that is frequently deleted in cancer. *Oncogene* 19:5747-54, 2000
91. Lubin M, Lubin A: Selective killing of tumors deficient in methylthioadenosine phosphorylase: a novel strategy. *PLoS One* 4:e5735, 2009
92. Conway C, Beswick S, Elliott F, et al: Deletion at chromosome arm 9p in relation to BRAF/NRAS mutations and prognostic significance for primary melanoma. *Genes Chromosomes Cancer* 49:425-38, 2010
93. Alhebshi HM, Pant I, Kaur G, et al: Methylthioadenosine phosphorylase expression in cutaneous squamous cell carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev* 9:291-4, 2008
94. Hellerbrand C, Muhlbauer M, Wallner S, et al: Promoter-hypermethylation is causing functional relevant downregulation of methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) expression in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 27:64-72, 2006
95. Kirovski G, Stevens AP, Czech B, et al: Down-regulation of methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) induces progression of hepatocellular carcinoma via accumulation of 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine (MTA). *Am J Pathol* 178:1145-52, 2011
96. Stadler WM, Olopade OI: The 9p21 region in bladder cancer cell lines: large homozygous deletion inactivate the CDKN2, CDKN2B and MTAP genes. *Urol Res* 24:239-44, 1996
97. Su CY, Chang YC, Chan YC, et al: MTAP is an independent prognosis marker and the concordant loss of MTAP and p16 expression predicts short survival in non-small cell lung cancer patients. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*, 2014
98. Watanabe F, Takao M, Inoue K, et al: Immunohistochemical diagnosis of methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) deficiency in non-small cell lung carcinoma. *Lung Cancer* 63:39-44, 2009
99. Crespo I, Tao H, Nieto AB, et al: Amplified and homozygously deleted genes in glioblastoma: impact on gene expression levels. *PLoS One* 7:e46088, 2012
100. Crespo I, Vital AL, Nieto AB, et al: Detailed characterization of alterations of chromosomes 7, 9, and 10 in glioblastomas as assessed by single-nucleotide polymorphism arrays. *J Mol Diagn* 13:634-47, 2011
101. Brat DJ, James CD, Jedlicka AE, et al: Molecular genetic alterations in radiation-induced astrocytomas. *Am J Pathol* 154:1431-8, 1999
102. Nobori T, Karras JG, Della Ragione F, et al: Absence of methylthioadenosine phosphorylase in human gliomas. *Cancer Res* 51:3193-7, 1991
103. Schneider JH, Jr., Raffel C, McComb JG: Benign cerebellar astrocytomas of childhood. *Neurosurgery* 30:58-62; discussion 62-3, 1992
104. Neder L, Marie SK, Carlotti CG, Jr., et al: Galectin-3 as an immunohistochemical tool to distinguish pilocytic astrocytomas from diffuse astrocytomas, and glioblastomas from anaplastic oligodendrogliomas. *Brain Pathol* 14:399-405, 2004
105. Capper D, Weissert S, Balss J, et al: Characterization of R132H mutation-specific IDH1 antibody binding in brain tumors. *Brain Pathol* 20:245-54, 2010
106. Bubendorf L, Nocito A, Moch H, et al: Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. *J Pathol* 195:72-9, 2001
107. Pinto F, Pertega-Gomes N, Pereira MS, et al: T-box transcription factor brachyury is associated with prostate cancer progression and aggressiveness. *Clin Cancer Res* 20:4949-61, 2014
108. Becker AP, Menezes, W., Sheren, J., Scapulatempo-Neto, C., Aisner, D. Bidinotto, L.T., Neder, L., Varella-Garcia, M., Reis, R.M.: Molecular characterization of MAPK pathwa and oncogene-induced senescence in a Brazilian cohort of pilocytic astrocytoma

patients., 46th Congress of the International Society of Paediatric Oncology. Toronto, Pediatric Blood & Cancer, 2014, pp S105-S433

109. Stepanenko AA, Kavsan VM: Karyotypically distinct U251, U373, and SNB19 glioma cell lines are of the same origin but have different drug treatment sensitivities. *Gene* 540:263-5, 2014

110. Toschi L, Finocchiaro G, Nguyen TT, et al: Increased SOX2 gene copy number is associated with FGFR1 and PIK3CA gene gain in non-small cell lung cancer and predicts improved survival in early stage disease. *PLoS One* 9:e95303, 2014

111. Aisner DL, Nguyen TT, Paskulin DD, et al: ROS1 and ALK fusions in colorectal cancer, with evidence of intratumoral heterogeneity for molecular drivers. *Mol Cancer Res* 12:111-8, 2014

112. Ait Khelifa-Gallois N, Laroussinie F, Puget S, et al: Long-term functional outcome of patients with cerebellar pilocytic astrocytoma surgically treated in childhood. *Brain Inj* 29:366-73, 2015

113. Villarejo F, de Diego JM, de la Riva AG: Prognosis of cerebellar astrocytomas in children. *Childs Nerv Syst* 24:203-10, 2008

114. Zuzak TJ, Poretti A, Drexel B, et al: Outcome of children with low-grade cerebellar astrocytoma: long-term complications and quality of life. *Childs Nerv Syst* 24:1447-55, 2008

115. Gutmann DH, McLellan MD, Hussain I, et al: Somatic neurofibromatosis type 1 (NF1) inactivation characterizes NF1-associated pilocytic astrocytoma. *Genome Res* 23:431-9, 2013

116. Borges CB, Bernardes ES, Latorraca EF, et al: Galectin-3 expression: a useful tool in the differential diagnosis of posterior fossa tumors in children. *Childs Nerv Syst* 27:253-7, 2011

117. Park SH, Min HS, Kim B, et al: Galectin-3: a useful biomarker for differential diagnosis of brain tumors. *Neuropathology* 28:497-506, 2008

118. Ueba T, Takahashi JA, Fukumoto M, et al: Expression of fibroblast growth factor receptor-1 in human glioma and meningioma tissues. *Neurosurgery* 34:221-5; discussion 225-6, 1994

119. Turcan S, Chan TA: MAPping the genomic landscape of low-grade pediatric gliomas. *Nat Genet* 45:847-9, 2013

120. Zhang J, Wu G, Miller CP, et al: Whole-genome sequencing identifies genetic alterations in pediatric low-grade gliomas. *Nat Genet* 45:602-12, 2013

121. Fischbach A, Rogler A, Erber R, et al: Fibroblast Growth Factor Receptor (FGFR) amplifications are rare events in bladder cancer. *Histopathology*, 2014

122. Wynes MWH, T.K.; Gao, D.; Martini, M.; Marek, L.; Ware, K.E. et al: FGFR1 mRNA and protein expression, not gene copy number, predict FGFR TKI sensitivity across all lung cancer histologies. *Clin Cancer Res* 20:11, 2014

123. Soria JC, DeBraud F, Bahleda R, et al: Phase I/IIa study evaluating the safety, efficacy, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of lucitanib in advanced solid tumors. *Ann Oncol* 25:2244-51, 2014

124. Nakanishi Y, Akiyama N, Tsukaguchi T, et al: The fibroblast growth factor receptor genetic status as a potential predictor of the sensitivity to CH5183284/Debio 1347, a novel selective FGFR inhibitor. *Mol Cancer Ther* 13:2547-58, 2014

125. El-Osta H, Falchook G, Tsimberidou A, et al: BRAF mutations in advanced cancers: clinical characteristics and outcomes. *PLoS One* 6:e25806, 2011

126. Menzies AM, Haydu LE, Visintin L, et al: Distinguishing clinicopathologic features of patients with V600E and V600K BRAF-mutant metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 18:3242-9, 2012

127. Rubinstein JC, Sznol M, Pavlick AC, et al: Incidence of the V600K mutation among melanoma patients with BRAF mutations, and potential therapeutic response to the specific BRAF inhibitor PLX4032. *J Transl Med* 8:67, 2010

128. Bautista F, Paci A, Minard-Colin V, et al: Vemurafenib in pediatric patients with BRAFV600E mutated high-grade gliomas. *Pediatr Blood Cancer* 61:1101-3, 2014

129. Robinson GW, Orr BA, Gajjar A: Complete clinical regression of a BRAF V600E-mutant pediatric glioblastoma multiforme after BRAF inhibitor therapy. *BMC Cancer* 14:258, 2014
130. Sievert AJ, Lang SS, Boucher KL, et al: Paradoxical activation and RAF inhibitor resistance of BRAF protein kinase fusions characterizing pediatric astrocytomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:5957-62, 2013
131. Jones DT, Kocialkowski S, Liu L, et al: Oncogenic RAF1 rearrangement and a novel BRAF mutation as alternatives to KIAA1549:BRAF fusion in activating the MAPK pathway in pilocytic astrocytoma. *Oncogene* 28:2119-23, 2009
132. Chidlow G, Wood JP, Sharma S, et al: Ocular expression and distribution of products of the POAG-associated chromosome 9p21 gene region. *PLoS One* 8:e75067, 2013
133. Diez-Vives C, Gay M, Garcia-Matas S, et al: Proteomic study of neuron and astrocyte cultures from senescence-accelerated mouse SAMP8 reveals degenerative changes. *J Neurochem* 111:945-55, 2009
134. Garcia-Matas S, Gutierrez-Cuesta J, Coto-Montes A, et al: Dysfunction of astrocytes in senescence-accelerated mice SAMP8 reduces their neuroprotective capacity. *Aging Cell* 7:630-40, 2008
135. Venkatramani R, Ji L, Lasky J, et al: Outcome of infants and young children with newly diagnosed ependymoma treated on the "Head Start" III prospective clinical trial. *J Neurooncol* 113:285-91, 2013
136. Warwick AB, Malempati S, Krailo M, et al: Phase 2 trial of pemetrexed in children and adolescents with refractory solid tumors: a Children's Oncology Group study. *Pediatr Blood Cancer* 60:237-41, 2013
137. Basu I, Locker J, Cassera MB, et al: Growth and metastases of human lung cancer are inhibited in mouse xenografts by a transition state analogue of 5'-methylthioadenosine phosphorylase. *J Biol Chem* 286:4902-11, 2011

Anexo A – Capítulo “Pilocytic Astrocytoma: Anatomic, pathological and molecular aspects.” – Capítulo em *Open access*, disponível em <http://www.intechopen.com/books/clinical-management-and-evolving-novel-therapeutic-strategies-for-patients-with-brain-tumors/pilocytic-astrocytoma-anatomic-pathological-and-molecular-aspects>

Chapter 6

Pilocytic Astrocytoma: Anatomic, Pathological and Molecular Aspects

Aline Paixao Becker, Cristovam Scapulatempo-Neto,
Luciano Neder, Leila Chimelli and Rui M. Reis

Additional information is available at the end of the chapter

<http://dx.doi.org/10.5772/53956>

1. Introduction

1.1. Epidemiology

Brain tumors are rare neoplasms, however, they represent the second commonest cancer in childhood (the first being hemato-lymphoid neoplasms) and correspond to the main solid tumor in the pediatric context (ages 0-19 years) [1]. In this setting, gliomas, and particularly astrocytomas are the leading group. Pilocytic astrocytoma (PA) is the commonest brain tumor in the ages 5-14 years and the second in the age ranges 0-4 years and 15-19 years, although it represents about only 6% of all gliomas, according to the last Central Brain Tumors Registry (CBTRUS) Report [1]. PA affects males and females equally, and the main affected ages are 6 to 13 years-old, with 75% of cases occurring at this ages [2; 3].

PAs present a good prognosis in general, with 10-year survival >90% [4]. However, about 10-20% of patients suffer with recurrence of completely excised lesions or growing of residual lesions [4]. Besides, 2-3% of the cases may disseminate through the spinal cord [2; 4]. These aggressive tumors are particularly more frequent in adults and older patients, which explains the difference in the 10-year survival [5]. Overall, the prognosis between children and adults is significantly different [5]. While in children and young adults the 5-year survival is >90%, in the group of 60+ years patients, this value is about 52% [5]. Likewise, the mortality rates related to PAs are higher in adults than in children. Despite this could be explained by differences in the location of these tumors in adults many evidences suggest that PA is in fact a more aggressive neoplasm in older age groups [5].

2. Anatomical location and neuroradiological features

The main location of PA is the cerebellum, with more than 60% of the cases occurring in cerebellar hemispheres, however, it can arise all through the neuraxis, including hypothalamic region, the optic-chiasmatic tract and spinal cord, with some cases involving the whole spinal cord ("holocord pilocytic astrocytoma") [2; 3; 6]- [9]. This wide distribution in the central nervous system (CNS) may, in part, explain the differences in the prognosis of PA, since GTR of a lesion located near or in eloquent areas of the CNS may be unachievable. In addition, some locations present special features or are related to specific conditions. For example, multiple tumors and tumors located in the optic-chiasmatic region are far more common in patients with neurofibromatosis 1 (NF1), while supratentorial and spinal cord PAs are more frequent in adults than in children [2; 5].

At neuroradiological exams, the typical finding is, generally, a non-infiltrative, well delimited biphasic lesion, with a cystic, hypointense, area associated with a mural nodule, which can be contrast-enhanced at magnetic resonance image (MRI) and computed tomography (CT), however, diverse patterns as solid nodule or complete cystic lesions can be seen [2; 10] (Figure 1). In any case, perilesional edema is not commonly observed, as it is in high-grades primary brain tumors [11]. Anecdotally, PA can be manifested as cerebral hemorrhage [12].

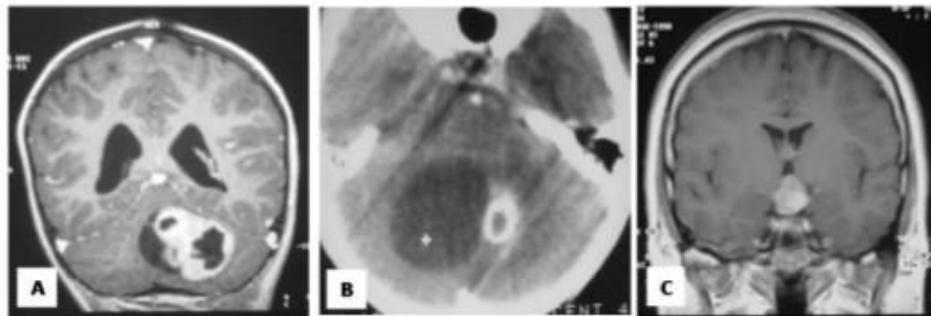


Figure 1. Neuroradiological features of Pilocytic Astrocytomas, after endovenous contrast injection. Note the absence of perilesional edema, even in voluminous lesions. A- Cerebellar lesion – solid with cystic areas. This is the commonest pattern of PA (MRI, coronal view). B- Cerebellar lesion, predominantly cystic with a mural nodule (CT, axial view). C- solid, suprasellar lesion (MRI, coronal view).

3. Clinical signs and symptoms

Due to its highly variable location in the neuraxis, the signs and symptoms of PA depend on the affected area. As the most common location is the cerebellum, headache and neck pain, vomiting, gait disturbance and visual abnormalities are usually referred [2; 3; 6; 13]. In supratentorial tumors, the occurrence of seizures may be seen and is related to cortical involvement [6]. In the hypothalamic area, PA may present with hormonal dysfunctions, for example, diabetes insipidus, obesity [3; 11] and the diencephalic syndrome – emaciation, hyperkinesia, irritability and accelerated growth [11]. The involvement of the optical pathway is related to visual loss or visual-field deficits [6; 11]; proptosis presents only in large, intraorbital tumors [6].

Clinical signs of intracranial hypertension, as hydrocephalus, papilledema, nistagmus, nausea and vomiting are common in virtually all locations, because of the mass effect impinged by the neoplasm [2; 3; 11]. On the other hand, smaller lesions may remain asymptomatic by some variable time [11].

4. Histopathological aspects

Some histopathological features of PA are well-established, for instance, biphasic pattern, with high- and low-cellularity areas; elongated (piloid) and rounded, oligodendroglial-like, cells mixed in various proportions; microcystic areas; Rosenthal fibers, and eosinophilic granular bodies are the commonest findings [2; 6] (Figure 2). In general, these findings support a diagnosis of a low-grade astrocytoma (grade I), according to the World Health Organization (WHO) criteria. However, features like microvascular proliferation, necrosis and degenerative nuclear atypia, more commonly present in infiltrative, high-grade gliomas, may be seen (Figure 3B, C). Diverse from infiltrative tumors, though, these features shall not be interpreted as malignancy signs, unless they are associated to high mitotic activity [2; 3; 10]. Leptomeningeal dissemination is quite common, and apparently is not related to aggressive behavior [14]. Calcification, hemorrhage and perivascular lymphocytic infiltration are less common (Figure 3A, D), but may be seen in some cases [10; 14]. Eventually, neuronal cells can be observed, intermingled in the tumor, but they lack neoplastic features, and can be interpreted as entrapped neurons [6; 10; 14].

Because of the great variation in histopathological appearance, the diagnosis of PA is usually challenging, especially in minute biopsies, and greatly dependent upon correlation with neuroradiological aspects [2; 3]. This can be such a dilemma, that some authors refer huge discordance between pathologists, with half of PAs misdiagnosed as higher-grade tumors at primary diagnosis [15].

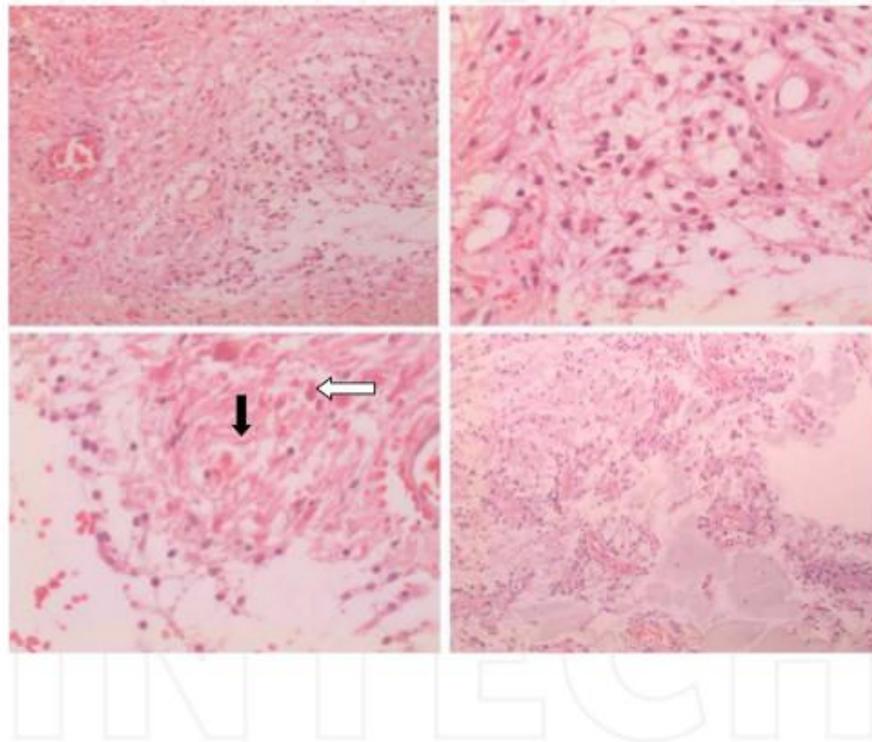


Figure 2. Histopathological aspects of Pilocytic Astrocytoma. All microphotographs represent H&E stain. A- Biphasic pattern – high cellularity at left and lower cellularity at bottom right (100x). B- Round and piloid cells constitute this tumor. Note the vasculature, with typical endothelia (200x). C- Rosenthal fibers (black arrow) and eosinophilic granular body (white arrow) can be seen in higher cellular areas (200x). D- At bottom, a microcystic area is seen (40x).

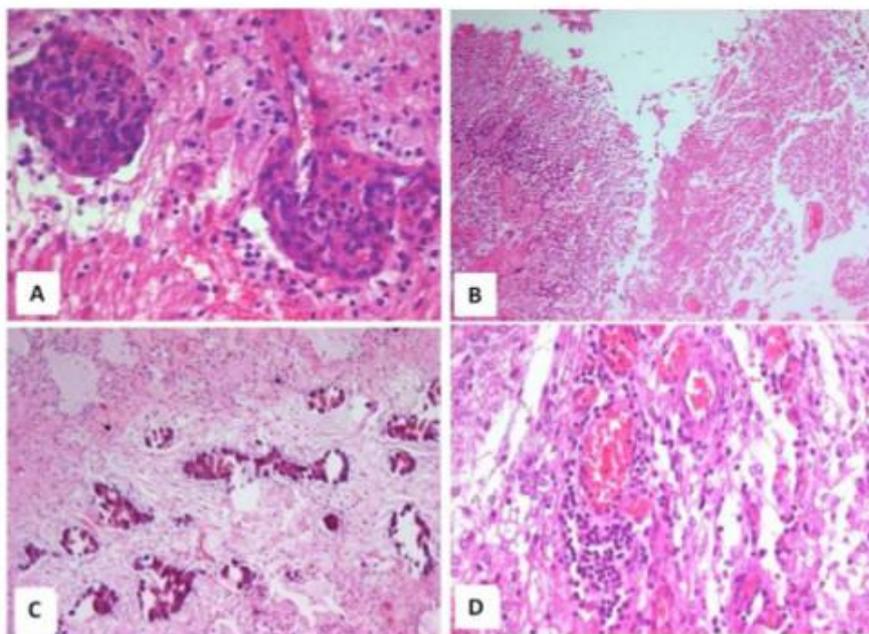


Figure 3. Some other histopathological aspects of Pilocytic Astrocytoma at the H&E stain. A- Microvascular proliferation (200x) B- Areas of necrosis may be seen in some tumors – in this case, the necrosis is at right (40x). C- Calcification foci near a microcystic area of tumor (40x). D- Lymphocytic cuffs may be present (200x).

4.1. Differential diagnosis

Differential diagnoses of PA include low- and high-grade gliomas and the identification of different entities has great importance in the treatment choice and prognosis of patients.

Among low-grade tumors, the most important differential diagnoses include ganglioglioma; pleomorphic xanthoastrocytoma (PXA); grade II oligodendroglioma; and diffuse astrocytoma. In these cases, tumor location, neuroradiological and immunohistochemical features can help in the definition, and this will be better discussed later in next sections. Moreover, hypothalamic lesions, especially in infants, must also be distinguished from pilomixoid astrocytoma, a recently described tumor, stated as grade II variant of PA in the last WHO classification [2; 3].

On the other hand, anaplastic astrocytoma and anaplastic oligodendroglioma (WHO grade III) are some of the high grade lesions that can be confounded with PA [2; 3] when there are degenerative atypia and/or oligodendroglial-like areas in the tumor. Finally, glioblastoma (GBM – WHO grade IV), the commonest and most aggressive astrocytoma, share various histological and neuroradiological features with PA, which makes the diagnosis problematic in some cases [16]- [18]. In these cases, clinical correlation and immunohistochemical markers can be used for better defining the diagnosis.

5. Immunohistochemistry in the diagnosis of pilocytic astrocytoma

In order to reduce misdiagnoses, some immunohistochemical markers can be used to elucidate complicated cases. There are no specific markers for PA, but differences between expressions of standard antibodies can help in the task. Some of the main immunohistochemical markers are described herein:

5.1. Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)

GFAP is a cytoplasmatic intermediate filament, component of the cytoskeleton of normal and neoplastic astrocytes [3]. Like in all astrocytomas, GFAP is persistently, diffusely expressed in PAs, which does not permit the delineation between PA and diffuse astrocytomas. However, it may be a useful tool to differentiate PA from other gliomas, such as ependymomas and oligodendrogliomas.

As described earlier, some PAs may present perivascular lymphocytic cuffs and neuronal cells entrapped among the neoplastic astrocytes. These characteristics are also seen in gangliogliomas [6]. To rule out this possibility, GFAP may help, as stated since 1970s by Eng and Rubinstein [19], since the neoplastic neuronal cells in this tumor are negative and may be highlighted in contrast to the strongly positive neoplastic astrocytes with this marker – this pattern corroborates the mixed nature of ganglioglioma. There are other immunohistochemical markers that help in this differential diagnosis, in addition to GFAP, for example, CD34 (positive in gangliogliomas and negative in PAs) and Neu N (neuronal marker, useful in the identification of neoplastic and entrapped neurons).

Secondly, since PAs may present oligodendroglial-like areas and calcifications, another utility for the use of GFAP is to differentiate these areas (in a small sample, for example) from oligodendrogliomas. Oligodendroglial tumors are mostly negative, however, a peculiar pattern of perinuclear immunoreactivity was recognized after the description of the protoplasmatic oligodendrocytes, present in almost 80% of oligodendrogliomas [17; 20]. Even in those positive cases, the pattern contrasts to the cytoplasmatic, diffuse positivity seen in the PAs. Other immunohistochemical markers can be used in a panel in order to refine this diagnosis, for instance, OLIG-2, a transcription factor involved in oligodendroglial differentiation [21]. Although some weak immunopositivity may be seen in astrocytomas (low and high grades) and more than 70% of PAs may be immunoreactive for OLIG-2 [22], according to some authors, OLIG-2 can significantly distinguish oligodendroglial and astrocytic tumors [20; 21]. As these both markers (GFAP and OLIG-2) can be simultaneously expressed by PAs and oligodendrogliomas, the interpretation of these immunohistochemical tests must take in account other histopathological findings and even neuroradiological features.

Finally, although GBM is also a tumor of astrocytic lineage, it may present a different pattern of GFAP immunopositivity. Opposed to the diffuse positivity in PA, GBM is heterogeneously immunoreactive, predominant at the periphery of the tumor or only focal. This happens because the immunoeexpression of GFAP tends to decrease with the malignant progression of astrocytomas [16; 17; 23].

In summary, GFAP is an important marker of astrocytic differentiation and can help to distinguish PA from other low- and high grade gliomas, both through the presence or absence of its immunoeexpression and the different patterns (subcellular location and distribution over the tumor areas) of immunopositivity.

5.2. Ki67

The non-histone nuclear protein ki67 is a protein codified by genes present in the chromosome 10 [24; 25]. It is expressed in the nuclei of cells in all but G0 and early G1 phases of the cellular cycle [26], which allows a faithful estimative of the proliferative index of a neoplasm. As PA is a grade I astrocytoma, low proliferative index is the rule in these tumors [2; 3] (Figure 4A) with medium values about 2% [14; 27], however medium values as high as 4,4% have been related [10; 28].

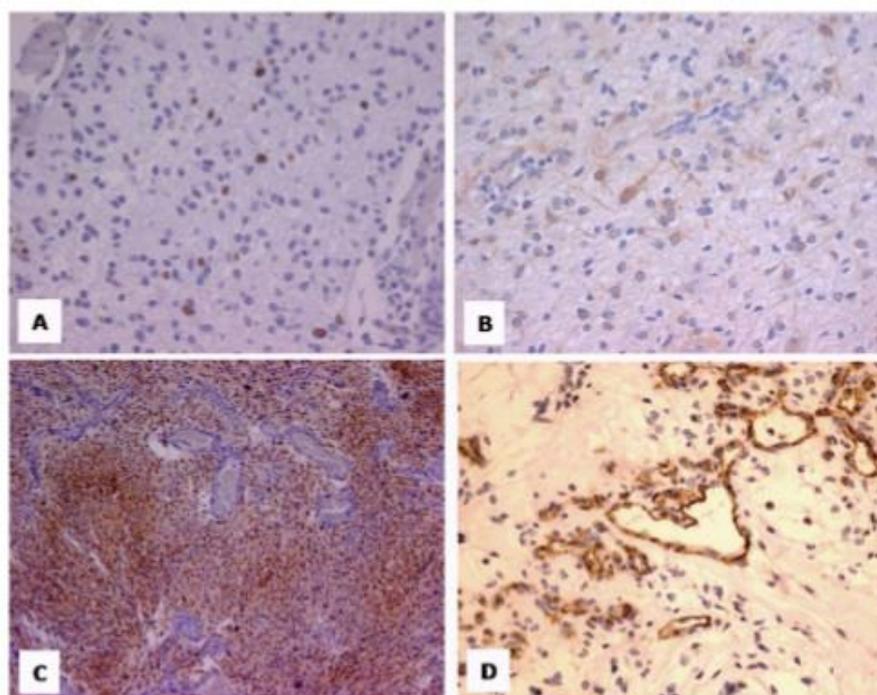


Figure 4. Immunohistochemical aspects, with avidin-biotin-peroxidase technique. A- Ki67 – nuclear positivity in about 2% of neoplastic cells(100x). B- Galectin-3 – this case showed weak, diffuse immunopositivity and predominant cytoplasmatic location (100x). C- Galectin-3 strong, diffuse positivity and the vascular endothelium showed no reaction (100x). D- CD31 reaction in the endothelia – delicate vessels in the tumor (200x).

Proliferative index by ki67 expression is a well established prognostic factor in diffuse astrocytomas [29], yet, its role in the prognosis of PA is controversial. In 2002, Roessler et al did not show significant differences between cerebellar PA when comparing groups according to the proliferative index with a cut-off value of 5% [28] and this result was further corroborated by other study with even lower cut-off value of 3% [10]. Shortly after, Bowers et al (2003) described a subset of PA with worse prognosis, when the proliferative index determined by Ki67 was >2% [27]. More recently higher medium values (>10%) were described in recurrent and more aggressive PAs [10], and this exceptionally high value is similar to the medium value of proliferative index for GBM (12,28%) described earlier by the same group [29].

Although the proliferative index is still a questionable independent prognostic factor of PAs, it is well accepted that a strict follow up is needed in the cases with high proliferative activity [10; 27].

5.3. Galectin-3

Galectin-3 (gal-3) is a carbohydrate-binding protein that binds specifically to β -galactosides sugars. This protein is involved in various biological processes, such as cellular proliferation, apoptosis, transcriptional regulation, intracellular signalization, adhesion and migration [30; 31]. The expression of gal-3 may be seen in both cytoplasm and nuclei of neoplastic cells (particularly carcinomas) from various organs, such as thyroid, pancreas and prostate [32], but the relation between hyper- or loss of expression and biologic behavior of the tumor varies among the different organs [32].

In APs, gal-3 is expressed in the nuclei and cytoplasm of neoplastic cells in all cases of PA described by various authors [2; 10; 32; 33], but lacks the expression in the vascular endothelia (Figure 4B, C), contrary to what it is seen in non-neoplastic brain parenchyma [10; 33] and in astrocytomas grades II and III and oligodendroglial tumors, which permits a faithful delineation from PA when facing tough cases [17; 31].

Gal-3 is not specific of PA, since other low-grade tumors, such as ependymomas and PXA also present diffuse expression of gal-3 [10; 32; 33]. Interestingly, focal (heterogenous) expression of gal-3 is also seen in GBM [2; 18; 32], and although the vast differences between the biological behavior and molecular pathways of these tumors, this expression may be related to microvascular proliferation and breaking of hematological barrier (and contrast-enhancement at neuroimage) seen in these both entities [10; 18].

Although various studies have tried to relate the intensity and extension of gal-3 expression to the clinical behavior of PA, no prognostic significance was proved until now. Still, as gal-3 expression is a conspicuous finding in PAs, in a pattern that can be differentiated from other grades of astrocytoma, this marker may be very useful in the tumor diagnosis [10; 18; 32; 33]. Besides, recently a group of authors described a close relationship between expression of gal-3 and activation of the RAF-MEK-ERK pathway in pancreatic cancer [34] and, as we shall see later in this chapter, that is an important molecular pathway in the genesis of PA, so gal-3 may be soon proved as a potential target for future treatments.

6. Molecular biology of pilocytic astrocytomas

Since no prognostic factors have been identified to differentiate regular from the more aggressive Pas [5; 10; 14], the genetic characteristics of the PAs have recently been investigated to better understand and try to predict the behavior of this tumor. Among these alterations, chromosomal abnormalities (structural or numerical, as the aneuploidies), single-gene mutations and epigenetic damage are mechanisms that could launch the molecular pathway of oncogenesis.

The molecular pathways of oncogenesis differ in PAs and diffuse astrocytomas. For example, two growth factor receptors, EGFR and PDGFR, related to invasion and malignant progression, which are frequently hyperexpressed in infiltrative diffuse astrocytomas had a lower expression in PAs observed by different groups [35; 36]. Besides, other genes characteristically altered in diffuse gliomas, as *TP53* and *PTEN* are normally expressed in Pas [2; 35; 37].

No cytogenetic abnormalities were detected in PA at first, and the majority of PAs presented normal karyotype, similar to fetal astrocytes [37], and the majority of the altered tumors were from female and adult patients [2]. Since then, a lot of genes have been investigated. We shall see the most studied genes in PAs in the subsequent sessions.

6.1. *NF1* gene

The first genetic studies tried to establish some differences between sporadic PAs and NF1-PA, which present a more aggressive behaviour. It was known that NF1-PAs present germline mutations of *NF1* (in contrast to somatic mutations in GBM of this gene) and this results in a loss of expression of the gene and, at protein level, results in a defective protein, neurofibromin [3], which lastly permits a constitutive activation of the RAS-RAF-MERK-ERK molecular pathway [4], or the mTOR/AKT pathway, activated in more aggressive Pas [4].

The detection of *NF1* mutations can be achieved by molecular methods, by verifying the expression of the gene or even at IHC, through the expression (or loss of expression) of neurofibromin. [2; 3]

6.2. The RAS-RAF-MEK-ERK signaling pathway

The studies of *NF1* gene were “the initial indication that *Mitogen-activated protein kinase* (MAPK) signaling might play a role in the development of PAs”, as stated by Jones et al (2011) [4]. Since then, various groups have investigated the participant proteins of these pathways.

The MAPK pathways regulate fundamental biologic processes. In mammalian, there are 4 well-described MAPK pathways [38; 39] (Figure 5) and the most studied is the *extracellular signal-regulated kinase* (ERK)1/2 [39]. Alterations of this pathway are described in both low and high-grade astrocytomas [4], but molecular mechanisms differ between them.

In summary, the ERK1/2 pathway is triggered by the binding of soluble peptides to a Tyrosin-kinase receptor (TKR) at the cell surface, and initiates a cascade of events that terminates in the appropriated cellular response [40]. This pathway is related to various

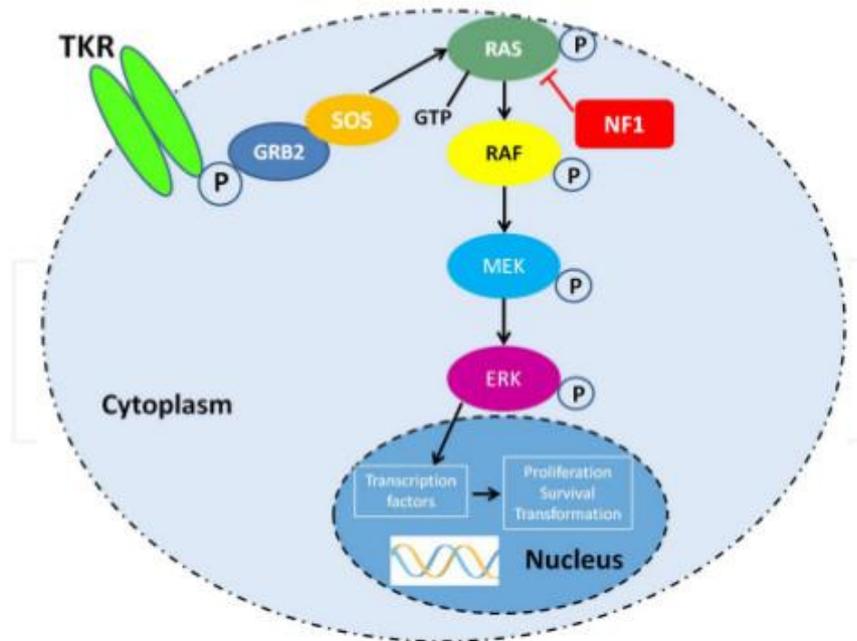


Figure 5. Integration of the MAPK pathways in the cellular response to various environmental stimuli. The sequential phosphorylation of RAS-RAF-MEK-ERK, after dimerization of TKR, and the role of negative regulation of NF1.

fundamental cellular processes, such as proliferation, cellular differentiation, survival, migration, and angiogenesis [41; 42].

The ERK cascade is constituted by RAS, Raf, MEK and ERK proteins [39], which are subsequently activated during the process. After the binding of the extracellular peptide with the TKR and its dimerization, it activates the RAS protein, which then activates the Raf family, MEK and, finally, ERK protein [40; 43], that is present in the nucleus, to effectuate the response to the initiator sign [43]. The RAS-Raf league is considered the regulatory center of the ERK cascade and mutations of any of these genes result in ERK pathway misregulation. It is important to note that the mutations of these proteins are mutually exclusive [39].

The proteins of Raf family are the main effectors of RAS and their action is in phosphorylating MEK 1 and MEK2 [44]. This family is a cytoplasmatic group of proteins, constituted by A-Raf, B-Raf and C-Raf [43], proteins that present similar structure and biological features [44], although they show different tissue distribution and capacity of activating the MEK proteins [45].

6.2.1. Oncogene BRAF

In humans, the most studied Raf protein is the B-Raf (BRAF), which is mutated in about 8% of all human neoplasms [44], and in melanomas this rate can be as high as 60% of the cases, with

the commonest mutation being point mutation V600E [46; 47]. In the setting of PA, mutations with constitutive activation of BRAF were demonstrated in up to 80% of cases, while they are very rare in diffuse astrocytomas [48]. The mechanisms that explain a constitutive activation of the BRAF are: i) point mutation V600E [44; 49; 50]; ii) duplication of a region in chromosome 7q [51; 52]; and iii) fusion between oncogenes *BRAF* and *KIAA1549*.

The point mutation V600E refers to a single glutamic acid for valin substitution at codon 600 of *BRAF* gene [44], which is the commonest BRAF missense mutation in human cancer [44; 46]. This mutation is not specific for PA and can be detected in various brain tumors, including PXAs, gangliogliomas, and in up to 6% of GBMs [49; 50] and other tumors, such as thyroid cancers and melanomas [44].

The BRAF duplications are due to a somatic rearrangement of the gene in sporadic PAs. It was the first described genetic alteration of PAs [51; 52]. They are more frequent in gliomas in non-cerebellar [52] location, including that of the optical pathways [53], both in NF1-related tumors and in those sporadic ones. Nevertheless, other authors did not identify BRAF duplications in NF1-related tumors, and suggested the activation of a different pathway (mTOR) in the genesis of these frequently more aggressive tumors [54]

Finally, the fusion *BRAF-KIAA1549* is present in 50-100% of the patients with PA [4; 55; 56]. This alteration is highly specific for PAs, and there is a growing tendency for using this marker as a powerful tool of molecular diagnosis in surgical pathology routine [57]. Although this fusion has recently been described in some other low-grade tumors, such as pilomixoid astrocytoma, glioneuronal tumors and unclassifiable low grade gliomas [57; 58], clinical and pathological correlation permit the diagnosis of PA in cases where diffuse component is predominant at histology [57]. Also, this fusion is significantly more frequent in infratentorial and optical pathways-located tumors [57].

The importance of studying the genetic mutations in PAs has grown, since many target therapies against the MAPKs pathway components are recently being developed. For example, concerning tumors with the V600E mutation, in 2012 two groups described the use of Vemurafenib, a BRAF inhibitor, in melanoma [59] and in lung cancer [60], with good results. In addition, other proteins of the ERK cascade can be targeted by novel drugs, as Trametinib, a specific MEK inhibitor, that has also been used successfully in patients with melanomas that present V600E mutation [61]. It is still unknown whether tumors harboring the fusion *BRAF-KIAA1549* are responsive to Vemurafenib and Trametinib. Concerning the former, the distinct studies showed the lack of patient's response in the wildtype BRAF [62]

At last, it is important to note that the resultant protein of the fusion *BRAF-KIAA1549* is cancer-specific and it is potentially a target for future treatments. The most representative example of this possibility is the identification of the fusion *BCR-ABL* in chronic myeloid leukemia (CML), in a similar molecular mechanism. The knowledge of this fusion permitted the development of a target-drug, Imatinib, in the middle 2000's [63]. This drug has changed the treatment and prognosis of the CML patients by controlling the disease, with excellent tolerability.

The molecular pathways of PAs are beginning to be faithfully recognized and some of the molecules of these pathways have already some kind of target drug available for inhibition, with efficacy proved in other kinds of tumors. As there are no studies with these novel drugs in PAs, this can become a good direction for future clinical research.

7. Conclusion

Pilocytic astrocytoma is usually a tumor with good prognosis; however some eloquent locations do not permit the total resection of lesions. In these cases and in the ones that can recur even after gross total resection, the patients can suffer with physical limitations and even death. The study of the molecular pathways of PA's oncogenesis may represent a hope for longer and better quality life for these patients. There is a wide field for research in order to better understand this intriguing tumor, since the understanding of these mechanisms can turn a potentially fatal in a controllable disease.

Acknowledgements

The authors appreciatively thank Dr. Ricardo Santos de Oliveira, M.D., PhD and Dr. Hélio Rubens Machado, M.D., PhD (Department of Neurosurgery- FMRP-USP) for the neuro-radiological exams photographs and the Surgical Pathology Department of FMRP-USP (SER-PAT) for the microphotographs of the cases.

Author details

Aline Paixao Becker^{1,2}, Cristovam Scapulatempo-Neto^{1,3}, Luciano Neder⁴, Leila Chimelli⁵ and Rui M. Reis^{1,6}

1 Molecular Oncology Research Center, Barretos Cancer Hospital, Barretos, São Paulo, Brazil

2 School of Medicine, University of Ribeirão Preto (UNAERP), Brazil

3 Department of Pathology, Barretos Cancer Hospital, Barretos, São Paulo, Brazil

4 Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo (FMRP-USP), Brazil

5 Division of Pathology National Institute of Cancer, Brazil

6 Life and Health Sciences Research Institute (ICVS), Health Sciences School, University of Minho, Braga, Portugal

References

- [1] CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in (2012). Ref Type: Report
- [2] Scheithauer, B. W, Hawkins, C, & Tihan, T. VandenBerg SR, Burger PC. Pilocytic astrocytoma. In: David N.Louis, Hiroko Ohgaki, Otmar D.Wiestler, eds. *WHO Classification of tumours of the central nervous system*. Lyon: IARC, (2007). , 2007, 14-21.
- [3] Louis, D. N, Reifenberger, G, Brat, D. J, & Ellison, D. W. Tumours: introduction and neurepithelial tumours. In: Seth Love, David N.Louis, David W.Ellison, eds. *Greenfield's Neuropathology*. London: Hodder Arnold, (2008). , 2008, 1855-60.
- [4] Jones, D. T, Gronych, J, Lichter, P, Witt, O, & Pfister, S. M. MAPK pathway activation in pilocytic astrocytoma. *Cell Mol Life Sci* (2011).
- [5] Johnson, D. R, Brown, P. D, Galanis, E, & Hammack, J. E. Pilocytic astrocytoma survival in adults: analysis of the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program of the National Cancer Institute. *J Neurooncol* (2012). , 187-93.
- [6] Burger, P. C, & Scheithauer, B. W. Pilocytic astrocytoma. In: Burger PC, Scheithauer BW, eds. *Tumors of Central Nervous System*. Washington: The Armed Forces Institute of Pathology, (1994). , 1994, 77-94.
- [7] Sandalcioglu, I. E, Gasser, T, Wiedemayer, H, Horsch, S, & Stolke, D. Favourable outcome after biopsy and decompression of a holocord intramedullary spinal cord astrocytoma in a newborn. *Eur J Paediatr Neurol* (2002). , 6, 179-82.
- [8] Tobias, M. E, Mcgirt, M. J, Chaichana, K. L, et al. Surgical management of long intramedullary spinal cord tumors. *Childs Nerv Syst* (2008). , 24, 219-23.
- [9] Burger, P. C, & Scheithauer, B. W. Tumors of neuroglia and choroid plexus epithelium- Glioblastoma multiforme. In: P.C.Burger, B.W.Scheithauer, eds. *Tumors of the central nervous system*. Washington: Armed Forces Institute of Pathology., (1994). , 1994, 25-161.
- [10] Paixao, B. A, De Oliveira, R. S, Saggiaro, F. P, Neder, L, Chimelli, L. M, & Machado, H. R. In pursuit of prognostic factors in children with pilocytic astrocytomas. *Childs Nerv Syst* (2010). , 26, 19-28.
- [11] Koeller, K. K, & Rushing, E. J. From the archives of the AFIP: pilocytic astrocytoma: radiologic-pathologic correlation. *Radiographics* (2004). , 24, 1693-708.
- [12] Matsumoto, K, Akagi, K, Abekura, M, et al. Hypothalamic Pilocytic Astrocytoma Presenting with Intratumoral and Subarachnoid Hemorrhage- Case Report. *Neural Med Chir (Tokyo)* (1997). , 849-52.

- [13] Abdollahzadeh, M, Hoffman, H. J, Blazer, S. I, et al. Benign cerebellar astrocytoma in childhood: experience at the Hospital for Sick Children 1980-1992. *Childs Nerv Syst* (1994). , 10, 380-3.
- [14] Fernandez, C, Figarella-branger, D, Girard, N, et al. Pilocytic astrocytomas in children: prognostic factors--a retrospective study of 80 cases. *Neurosurgery* (2003). , 53, 544-53.
- [15] Aldape, K, Simmons, M. L, & Davis, R. L. Discrepancies in diagnoses of neuroepithelial neoplasms: The San Francisco Bay Area Adult Glioma Study. *Cancer* (2000). , 2342-9.
- [16] Kleihues, P, Burger, P. C, & Aldape, K. D. et al. Glioblastoma. In: David N.Louis, Hiroko Ohgaki, Otmar D.Wiestler, Webster K.Cavenee, eds. *WHO Classification of tumors of the Central Nervous System*. Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC), (2007). , 2007, 33-49.
- [17] Louis, D. N, Reifenberger, G, Brat, D. J, & Ellison, D. W. Tumors: introduction and neuroepithelial tumors- Glioblastoma. In: Seth Love, David N.Louis, David W.Ellison, eds. *Greenfield's Neuropathology*. London: Edward Arnold Publishers, (2008). , 2008, 1821-2000.
- [18] Neder, L, Marie, S. K, Carlotti, C. G, et al. Galectin-3 as an immunohistochemical tool to distinguish pilocytic astrocytomas from diffuse astrocytomas, and glioblastomas from anaplastic oligodendrogliomas. *Brain Pathol* (2004). , 14, 399-405.
- [19] Eng, L. F, & Rubinstein, L. J. Contribution of immunohistochemistry to diagnostic problems of human cerebral tumors. *J Histochem Cytochem* (1978). , 26, 513-22.
- [20] Ikota, H, Kinjo, S, Yokoo, H, & Nakazato, Y. Systematic immunohistochemical profiling of 378 brain tumors with 37 antibodies using tissue microarray technology. *Acta Neuropathol* (2006). , 111, 475-82.
- [21] Mokhtari, K, Paris, S, Aguirre-cruz, L, et al. Olig2 expression, GFAP, and 1p loss analysis contribute to glioma subclassification. *Neuropathol Appl Neurobiol* (2005). , 53.
- [22] Takei, H, Yogeswaren, S. T, Wong, K. K, et al. Expression of oligodendroglial differentiation markers in pilocytic astrocytomas identifies two clinical subsets and shows a significant correlation with proliferation index and progression free survival. *J Neurooncol* (2008). , 86, 183-90.
- [23] Becker, A. P, Caravina, G, Clara, C, & Reis, R. M. *The Role of Immunohistochemistry in Diagnosis and Prognosis of Glioblastoma Patients*. Nova Publishers, (2012).
- [24] Schonk, D. M, Kuijpers, H. J, Van Drunen, E, et al. Assignment of the gene(s) involved in the expression of the proliferation-related Ki-67 antigen to human chromosome 10. *Hum Genet* (1989). , 83, 297-9.

- [25] Gerdes, J, Li, L, Schlueter, C, et al. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol* (1991). , 138, 867-73.
- [26] Burger, P. C, Shibata, T, & Kleihues, P. The use of the monoclonal antibody Ki-67 in the identification of proliferating cells: application to surgical neuropathology. *Am J Surg Pathol* (1986). , 10, 611-7.
- [27] Bowers, D. C, Gargan, L, Kapur, P, et al. Study of the MIB-1 labeling index as a predictor of tumor progression in pilocytic astrocytomas in children and adolescents. *Clin Oncol* (2003). , 2968-73.
- [28] Roessler, K, Bertalanffy, A, Jeza, H, et al. Proliferative activity as measured by MIB-1 labeling index and long-term outcome of cerebellar juvenile pilocytic astrocytomas. *J Neurooncol* (2002). , 141-56.
- [29] Neder, L, Colli, B. O, Machado, H. R, & Carlotti, C. G. Jr., Santos AC, Chimelli L. MIB-1 labeling index in astrocytic tumors--a clinicopathologic study. *Clin Neuropathol* (2004). , 23, 262-70.
- [30] Perillo, N. L, Marcus, M. E, & Baum, L. G. Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death. *J Mol Med (Berl)* (1998). , 76, 402-12.
- [31] Stillman, B. N, Mischel, P. S, & Baum, L. G. New roles for galectins in brain tumors--from prognostic markers to therapeutic targets. *Brain Pathol* (2005). , 15, 124-32.
- [32] Park, S. H, Min, H. S, Kim, B, Myung, J, & Paek, S. H. Galectin-3: a useful biomarker for differential diagnosis of brain tumors. *Neuropathology* (2008). , 28, 497-506.
- [33] Borges, C. B, Bernardes, E. S, Latorraca, E. F, et al. Galectin-3 expression: a useful tool in the differential diagnosis of posterior fossa tumors in children. *Childs Nerv Syst* (2011). , 27, 253-7.
- [34] Shumei Song, Baoan Ji, Vijaya Ramachandran et al. Overexpressed Galectin-3 in Pancreatic Cancer Induces Cell Proliferation and Invasion by Binding Ras and Activating Ras Signaling. *PLoS ONE* (2012). , 7, 1-11.
- [35] Huang, H, Hara, A, Homma, T, Yonekawa, Y, & Ohgaki, H. Altered expression of immune defense genes in pilocytic astrocytomas. *J Neuropathol Exp Neurol* (2005). , 64, 891-901.
- [36] Rorive, S, Maris, C, Debeir, O, et al. Exploring the distinctive biological characteristics of pilocytic and low-grade diffuse astrocytomas using microarray gene expression profiles. *J Neuropathol Exp Neurol* (2006). , 65, 794-807.
- [37] Beatriz, M, Lopes, S, & Scott, R. VandenBerg. Tumors of the central nervous system. In: Christopher D.M.Fletcher, ed. *Diagnostic Histopathology of Tumors*. Philadelphia: Elsevier, (2007). , 2007, 1653-732.

- [38] Roberts, P. J. Der CJ. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* (2007). , 26, 3291-310.
- [39] Dhillon, A. S, Hagan, S, Rath, O, & Kolch, W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* (2007). , 26, 3279-90.
- [40] Marshall, C. J. Ras effectors. *Curr Opin Cell Biol* (1996). , 8, 197-204.
- [41] Dunn, K. L, Espino, P. S, Drobic, B, He, S, & Davie, J. R. The Ras-MAPK signal transduction pathway, cancer and chromatin remodeling. *Biochem Cell Biol* (2005). , 83, 1-14.
- [42] Yoon, S, & Seger, R. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* (2006). , 24, 21-44.
- [43] Mckay, M. M, & Morrison, D. K. Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene* (2007). , 26, 3113-21.
- [44] Vakiani, E, & Solit, D. B. KRAS and BRAF: drug targets and predictive biomarkers. *J Pathol* (2011). , 223, 219-29.
- [45] Wellbrock, C, Karasarides, M, & Marais, R. The RAF proteins take centre stage. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2004). , 5, 875-85.
- [46] Davies, H, Bignell, G. R, Cox, C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* (2002). , 417, 949-54.
- [47] Fisher, R, & Larkin, J. Vemurafenib: a new treatment for BRAF-mutated advanced melanoma. *Cancer Manag Res* (2012). , 600
- [48] Riemenschneider, M. J, Jeuken, J. W, Wesseling, P, & Reifenberger, G. Molecular diagnostics of gliomas: state of the art. *Acta Neuropathol* (2010). , 120, 567-84.
- [49] Basto, D, Trovisco, V, Lopes, J. M, et al. Mutation analysis of B-RAF gene in human gliomas. *Acta Neuropathol* (2005). , 109, 207-10.
- [50] Schindler, G, Capper, D, Meyer, J, et al. Analysis of BRAF mutation in 1,320 nervous system tumors reveals high mutation frequencies in pleomorphic xanthoastrocytoma, ganglioglioma and extra-cerebellar pilocytic astrocytoma. *Acta Neuropathol* (2011). , 600E
- [51] Bar, E. E, Lin, A, Tihan, T, Burger, P. C, & Eberhart, C. G. Frequent gains at chromosome 7q34 involving BRAF in pilocytic astrocytoma. *J Neuropathol Exp Neurol* (2008). , 67, 878-87.
- [52] Pfister, S, Janzarik, W. G, Remke, M, et al. BRAF gene duplication constitutes a mechanism of MAPK pathway activation in low-grade astrocytomas. *J Clin Invest* (2008). , 118, 1739-49.

- [53] Rodriguez, F. J, Ligon, A. H, Horkayne-szakaly, I, et al. BRAF Duplications and MAPK Pathway Activation Are Frequent in Gliomas of the Optic Nerve Proper. *J Neuropathol Exp Neurol* (2012). , 71, 789-94.
- [54] Jentoft, M, Giannini, C, Cen, L, et al. Phenotypic variations in NF1-associated low grade astrocytomas: possible role for increased mTOR activation in a subset. *Int J Clin Exp Pathol* (2010). , 4, 43-57.
- [55] Tian, Y, Rich, B. E, Vena, N, et al. Detection of KIAA1549-BRAF fusion transcripts in formalin-fixed paraffin-embedded pediatric low-grade gliomas. *J Mol Diagn* (2011). , 13, 669-77.
- [56] Jones, D. T, Kocalkowski, S, Liu, L, Pearson, D. M, Ichimura, K, & Collins, V. P. Oncogenic RAF1 rearrangement and a novel BRAF mutation as alternatives to KIAA1549:BRAF fusion in activating the MAPK pathway in pilocytic astrocytoma. *Oncogene* (2009). , 28, 2119-23.
- [57] Ida, C. M, Lambert, S. R, Rodriguez, F. J, et al. BRAF alterations are frequent in cerebellar low-grade astrocytomas with diffuse growth pattern. *J Neuropathol Exp Neurol* (2012). , 71, 631-9.
- [58] Lin, A, Rodriguez, F. J, Karajannis, M. A, et al. BRAF alterations in primary glial and glioneuronal neoplasms of the central nervous system with identification of 2 novel KIAA1549:BRAF fusion variants. *J Neuropathol Exp Neurol* (2012). , 71, 66-72.
- [59] Yadav, V, Zhang, X, Liu, J, Estrem, S, Li, S, Gong, X-Q, Buchanan, S, Henry, J. R, Starling, J. J, & Peng, S-B. Reactivation of Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Pathway by FGF Receptor 3 (FGFR3)/Ras Mediates Resistance to Vemurafenib in Human B-RAF Mutant Melanoma. *Journal of Biological chemistry*, 1-20. (2012). Ref Type: In Press, 600E
- [60] Gautschi, O, Pauli, C, Strobel, K, Hirschmann, A, Printzen, G, Aebi, S, & Diebold, J. A patient with BRAF lung adenocarcinoma responding to Vemurafenib. *Journal of Thoracic Oncology* 28. (2012). Ref Type: In Press, 600E
- [61] Flaherty, K. T, Robert, C, Hersey, P, et al. Improved Survival with MEK Inhibition in BRAF-Mutated Melanoma. *The New England Journal of Medicine* (2012). , 367, 107-14.
- [62] Flaherty, K. T, Puzanov, I, Kim, K. B, et al. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med* (2010). , 363, 809-19.
- [63] Druker, B. J, Guilhot, F, & Brien, O. SG et al. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* (2006). , 355, 2408-17.

Anexo B- Aprovação no Comitê de Ética do HCB.



FUNDAÇÃO PIO XII - HOSPITAL
DE CÂNCER DE BARRETOS

PROJETO DE PESQUISA

Título: Avaliação da via MAPK na oncogênese dos astrocitomas pilocíticos

Área Temática:

Área 9. A critério do CEP.

Versão: 2

CAAE: 03151612.8.0000.5437

Pesquisador: Aline Nazareth de Paiva Paixão Becker

Instituição: Fundação Pio XII

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 87362

Data da Relatoria: 17/08/2012

Considerações Finais a critério do CEP:

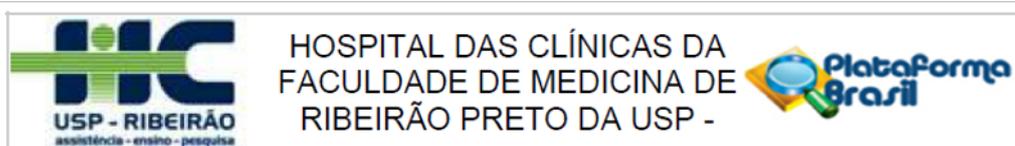
O Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Pio XII, Hospital de Câncer de Barretos analisou as pendências do referido projeto e decidiu que o mesmo encontra-se APROVADO. Solicitamos que sejam encaminhados ao CEP:

1. Relatórios parciais e final sendo previsto para agosto de 2013.
2. Comunicar toda e qualquer alteração no Projeto.
3. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer Evento Adverso Grave ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
4. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos, após conclusão da pesquisa, para possível auditoria dos órgãos competentes.

BARRETOS, 31 de Agosto de 2012

Assinado por:
Ednise Woyciechowski

Anexo C - Aprovação no Comitê de Ética do HCRP

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**Título da Pesquisa:** Avaliação da via MAPK na oncogênese dos astrocitomas pilocíticos**Pesquisador:** Aline Nazareth de Paiva Paixão Becker**Área Temática:** Área 9. A critério do CEP.**Versão:** 2**CAAE:** 03151612.8.0000.5437**Instituição Proponente:** Fundação Pio XII**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio**DADOS DO PARECER****Número do Parecer:** 212.313**Data da Relatoria:** 10/09/2012**Considerações Finais a critério do CEP:**

De acordo com o parecer da Proponente.

RIBEIRAO PRETO, 06 de Março de 2013

Assinador por:
Ricardo de Carvalho Cavalli
(Coordenador)

Anexo D – Ficha de coleta de dados clínicos

Projeto de pesquisa: Avaliação da Via MAPK na oncogênese dos astrocitomas pilocíticos

P.I. Aline Becker

1	Identificação	1	
2	Nome	2	
3	Registro hospitalar	3	
4	Data de nascimento DD-MM-AAAA	4	
5	Sexo 1- Feminino; 2- Masculino	5	
6	Local do tumor 0- Não cerebelo; 1- Cerebelo; 99- Ignorado	6	
7	Relação com neurofibromatose 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	7	
8	Data da cirurgia DD-MM-AAAA	8	
9	Tipo de cirurgia 1- Total; 2- Parcial; 99- Ignorado	9	
10	Outro tratamento adjuvante ESPECIFIQUE	10	
11	Recidiva local 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	11	
12	Data da recidiva local DD-MM-AAAA	12	
13	Crescimento (dissecção parcial) 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	13	
14	Data da última informação DD-MM-AAAA	14	
15	Status 1- Óbito por CA; 2- Óbito por outras causas; 3- Vivo com doença; 4- Vivo sem doença	15	

Anexo E – Carta de aceite de manuscrito na Pathobiology (Fator de impacto: 2.48).

----- Forwarded message -----

From: **Reber, Christoph** <c.reber@karger.com>

Date: 2015-04-28 10:03 GMT-03:00

Subject: Pathobiology, DOI: 430956

To: "ruireis.hcb@gmail.com" <ruireis.hcb@gmail.com>

Expression of methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) in pilocytic astrocytomas

Becker et al.

DOI: 10.1159/000430956

Dear Dr. Reis,

I am pleased to inform you that the above-mentioned paper has been accepted for publication and handed over to the production editing department for copyediting and typesetting. From now on, I will be your contact person for the further processing of your manuscript. Should you have any questions or need more detailed information, please do not hesitate to contact me. Please always quote journal name and DOI number (430956) of your article in the subject line of any correspondence.

Please find attached our Quote for COLOR ILLUSTRATIONS. Save this document on your PC and complete it. Please send it back by email. Alternatively, print out this form, complete it and return it by fax ([+41 61 306 12 34](tel:+41613061234)).

Visit 'www.karger.com\Pathology' for Karger titles that may be of interest to you. Please note that you are entitled to a 35% discount on any Karger publication you order directly from us using the Promotion Code DISCAUT.

To keep up-to-date on what is being published in your fields of interest, subscribe to our Alert-Service at MyKarger <http://www.karger.com/mykarger>.

To find out about the various options Karger makes available to you as an author go to <http://www.karger.com/authors>.

Kind regards,
S. Karger AG

Anexo F – Artigo “Expression of methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) in pilocytic astrocytomas.” (Reprodução proibida)

Original Paper

Pathobiology

Pathobiology
DOI: 10.1159/000430956

Received: December 16, 2014
Accepted after revision: April 27, 2015
Published online: ■■■

Expression of Methylthioadenosine Phosphorylase (MTAP) in Pilocytic Astrocytomas

Aline Paixão Becker^{a, d} Cristovam Scapulatempo-Neto^b Weder P. Menezes^a
Carlos Clara^c Hélio R. Machado^d Ricardo S. Oliveira^d Luciano Neder^d
Rui Manuel Reis^{a, e, f}

^aMolecular Oncology Research Center, Departments of ^bPathology and ^cNeurosurgery, Barretos Cancer Hospital, Barretos, ^dRibeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil; ^eLife and Health Sciences Research Institute (ICVS), Health Sciences School, University of Minho, Braga, and ^fICVS/3B's – PT Government Associate Laboratory, Braga/Guimarães, Portugal

Key Words

Brain tumors · Glioma · Immunohistochemistry · Pilocytic astrocytoma

Abstract

Background/Objectives: Pilocytic astrocytomas (PAs) are the most frequent astrocytomas in children and adolescents. *Methylthioadenosine phosphorylase (MTAP)* is a tumor-suppressor gene, the loss of expression of which is associated with a poor prognosis and better response to specific chemotherapy in leukemia and non-small-cell lung cancer. The expression of MTAP in brain tumors remains largely unknown and its biological role in PA is still unexplored. Our aims were to describe the immunohistochemical MTAP expression in a series of PAs and relate it to the clinicopathological features of the patients. **Methods:** We assessed MTAP expression on immunohistochemistry in 69 pediatric and adult patients with PA in a tissue microarray platform. **Results:** Retained expression of MTAP was seen in >85% of the tumors compared to in the nonneoplastic adjacent tissue. Only 3 supratentorial tumors showed a complete loss of MTAP expression. No significant association with clinicopathological features or over-

all survival of the patients was found. **Conclusions:** MTAP expression is retained in PAs and is not an outcome predictor for these tumors. Nevertheless, a subset of patients with PAs exhibiting a loss of MTAP could potentially benefit from treatment with specific chemotherapy, especially when lesions are recurrent or surgical resection is not recommended.

© 2015 S. Karger AG, Basel

Introduction

Pilocytic astrocytoma (PA) is the commonest brain tumor in children and teenagers in the USA [1] and Brazil [2, 3]. PAs are considered benign, exhibiting an indolent nature. PAs in adults are rare and usually more aggressive [4]. Although the majority of cases occur as sporadic disease, PAs can arise in the heredity context of type 1 neurofibromatosis (Nf1) [5–7]. Nf1-PAs are usually less aggressive and located at extracerebellar sites [8]. The overall prognosis for PAs is good, but in some cases they are aggressive, leading to death [9–11]. Extension of resection and high mitotic activity are key factors related to a poor prognosis in PAs [10, 11].

KARGER 125

© 2015 S. Karger AG, Basel
1015–2008/15/0000–0000\$39.50/0

E-Mail karger@karger.com
www.karger.com/pat

Rui Manuel Reis, PhD
Molecular Oncology Research Center, Barretos Cancer Hospital
Rua Antenor Duarte Vilela 1331
Barretos - SP 14784-400 (Brazil)
E-Mail ruireis.hcb@gmail.com

© S. Karger AG, Basel

**PROOF Copy
for personal
use only**

ANY DISTRIBUTION OF THIS
ARTICLE WITHOUT WRITTEN
CONSENT FROM S. KARGER
AG, BASEL IS A VIOLATION
OF THE COPYRIGHT.

The molecular pathogenesis of PAs has been extensively studied, particularly the constitutive activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway through *BRAF* proto-oncogene alterations [9, 12–21], such as *KIAA1549-BRAF (K:B)* fusion (in up to 80% of cases, mainly in cerebellar lesions) and *V600E BRAF* point mutation (in 10% of cases, more frequent in supratentorial lesions) [9, 22, 23]. Recently, point mutations in the *fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1)* gene, a MAPK upstream receptor, were described in extracerebellar tumors as an alternative mechanism for MAPK activation [20].

Canonically, the MAPK pathway leads to increased cell proliferation; however, it may also cause oncogene-induced senescence in cells [9]. Oncogene-induced senescence restricts the progression of benign tumors, such as melanocytic nevi and PAs, in response to *V600E BRAF* mutation [19, 24]. In PAs, the ectopic expression of the *V600E BRAF* mutation results in induction of the *INK4a/ARF* locus, at 9p21, with subsequent overexpression of *p16*, a known senescence marker [19, 25], the loss of expression of which correlates with a shorter overall survival (OS) in sporadic PAs [19] and a more aggressive course in some *Nf1*-PAs [26].

Additionally, the 9p21 locus harbors the tumor suppressor gene *methylthioadenosine phosphorylase (MTAP)* [27–29], which is coexpressed with *p16^{INK4a}* in various malignant tumors [29–33]. Homozygous deletion of *MTAP* upregulates de novo synthesis of purine (DNPS) and increases the proliferation of cancer cells [29, 30]. Interestingly, *MTAP* deletion increases the sensitivity of neoplastic cells to DNPS inhibitors such as methotrexate, L-alanosine and pemetrexed [27, 30], particularly in leukemia [29, 30] and other solid tumors, e.g. in the lung, liver and breast [30, 33–35]. In tumors of the central nervous system, deletion and gene copy-number breakpoints of *MTAP* have been reported in glioblastomas [36, 37], and in pediatric high-grade gliomas [38], respectively. However, none of these studies assessed *MTAP* expression by immunohistochemistry.

The biological role of *MTAP* in PAs is still unexplored. Our aims were to describe the immunohistochemical *MTAP* expression in a series of PAs and relate it to the clinicopathological features of the patients.

Materials and Methods

Patients

From 1993 to 2013, 69 patients with PA were retrieved from the Pathology Department of the Barretos Cancer Hospital (HCB) and the Hospital Clinics of the Ribeirão Preto School of Medicine, Uni-

versity of São Paulo (HCRP), Brazil. Recurrent lesions from 5 patients, 1 with 2 relapsed lesions, were also analyzed, totalling 75 samples. The patients were grouped according to gender, age (pediatric: ≤ 19 years old and adult: ≥ 20 years old) and tumor location, i.e. cerebellar or extracerebellar. Patients with *Nf1*-PAs ($n = 5$) had confirmed clinical diagnosis of *Nf1* by standardized criteria. Surgical resection was classified as gross total resection or partial resection, measured by immediate postsurgical CT scan [39]. The outcome of patients was categorized as favorable (stable, partially resected lesions and totally resected lesions) or unfavorable (progressive or recurrent lesions, patients with a Karnofsky index < 70 and/or death). An event was defined as the growth of a residual lesion or the recurrence of a totally resected lesion, detected clinically or by radiological exam. This study was approved by the Ethics Committees of both institutions (HCB/87362 and HCRP/212313).

Tissue Microarray Construction

After review of the cases by two independent neuropathologists, two blocks of tissue microarray (TMA) were constructed from the formalin-fixed, paraffin-embedded samples, using the Beecher Instruments™ TMA platform, with 1.0-mm (HCB cases) and 1.5-mm (HCRP cases) needles. To represent the heterogeneity of the tumors, we obtained 1–8 cores from each case (average: 3.6 cores/case). In 9 cases, adjacent nonneoplastic cerebellum was represented in the samples and included in the TMA.

Western Blot Analysis

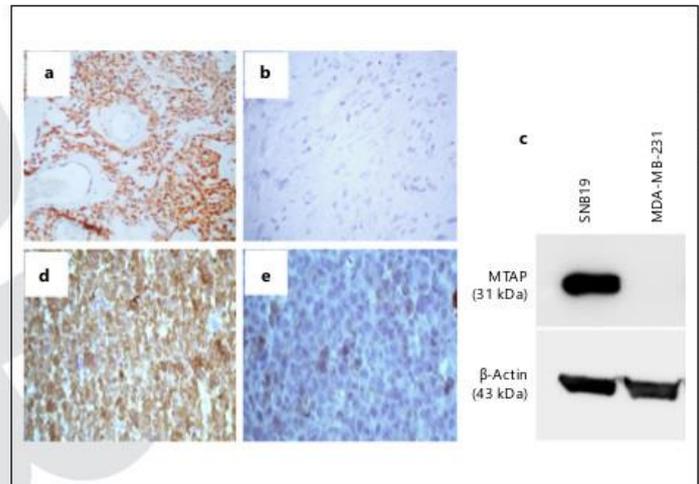
Cells from the SNB19 and MDA-MB231 cell lines, known to, respectively, express and not express *MTAP* [40, 41] were grown in 25-cm² flasks (3×10^6 cells) to 80% cell confluence, scraped in standardized lysis buffer and then centrifuged to extract total protein. After electrophoresis, the blots were performed and incubated with 5% nonfat dry milk in TBS-T for 1 h at room temperature, with *MTAP* polyclonal antibody for 15 h at 4°C (Proteintech, Chicago, Ill., USA; 1:800) and β -actin (Cell Signaling, Boston, Mass., USA; 1:5,000) as a control for 1 h at 4°C. Ultimately, the blots were washed with TBS-T and incubated with anti-rabbit IgG (for *MTAP*) or anti-mouse IgG (for β -actin) HRP-linked antibody (Cell Signaling; 1:5,000 for both antibodies). Immunodetection was done with Amersham ECL Western blotting detection reagents in automatic ImageQuant LAS 4000 mini (GE Healthcare).

Immunohistochemical Analysis

To confirm the diagnosis of PA, we initially performed immunohistochemical analysis of galectin-3 [42] and mutated *IDH-1* [43] from the TMA slides. The reactions were accomplished using the established protocols for Ventana Benchmark Ultra platform (Ventana-Roche, Tucson, Ariz., USA) and the monoclonal antibodies anti-galectin 3 (Diagnostic BioSystem, Pleasanton, Calif., USA; clone 9C4, dilution 1:50), and anti-mutated *IDH-1* (R132H; DIANOVA, Hamburg, Germany; clone H09, dilution 1:50). The results were classified as negative or positive, when at least 10% of the tumor cells exhibited cytoplasmic positivity for each marker.

For *MTAP* evaluation, we performed a manual immunohistochemical assay on the TMA slides. Briefly, following sample dehydration and antigen retrieval with a mixed buffer (citrate 10 mM/EDTA 1 mM, pH 6.0) for 4 min at 125°C and 20 min at 90°C, the slides were incubated with the *MTAP* polyclonal antibody (Pro-

Fig. 1. **a** Immunohistochemical cytoplasmic expression of galectin-3. $\times 100$. **b** A sample of PA, negative for mutated IDH-1 (400 \times). **c** Western blot assay showing expression of MTAP in the SNB19 cell culture and no expression in the MDA-MB-231 cell culture. Immunocytochemistry shows cytoplasmic expression of MTAP in the SNB19 cell line (**d**) and a lack of MTAP expression in the MDA-MB-231 cell line (**e**). $\times 400$.



teintech; 1:300) at room temperature overnight. Then slides were incubated with secondary antibody and streptavidin peroxidase, stained with 3,3' diaminobenzidine chromogen and counterstained with hematoxylin.

The subcellular localization (cytoplasmic and/or nuclear), extension and intensity of the reaction were further evaluated and scored. The extension of reaction was measured as: 0 (negative), 1 ($\leq 25\%$ of positive cells), 2 (25–50% of positive cells) or 3 ($\geq 50\%$ of positive cells). Intensity was measured as: 0 (negative), 1 (weak), 2 (moderate) or 3 (strong). The sum of these parameters resulted in scores assumed as reduced expression (0–3) or retained expression (4–6). Endothelial positivity was the internal positive control. External controls for both TMAs were normal liver and prostate, in addition to the cell-blocks of SNB19 and MDA-MB231 (fig. 1c–e). Average values were considered in cases with >1 core on the TMA.

Statistical Analysis

The statistical analysis was performed using SPSS version 20 for Windows™ (IBM, Chicago, Ill., USA) with $p < 0.05$ considered statistically significant for the Fisher exact test, Pearson χ^2 test and McNemar test. Event-free survival (EFS) and OS were calculated by the Kaplan-Meier method.

Results

The clinicopathological features of the series are summarized in table 1. Patients' age ranged from 0.3 to 53.4 years old (median: 9.1 years old). Four pediatric patients died of disease (3 females and 1 male), 1 due to a recurrent tumor and 3 due to the progressive growth of lesions, within 1.7, 2.6, 6.5 and 10.7 years after the first surgery.

Table 1. Clinicopathological features of patients with PA

	Patients, n	MTAP expression			p value
		0	≤ 3	≥ 4	
Patients (total)	69				
Male	38	3	2	33	0.127
Female	31	0	5	26	
Age group					
Pediatric	60	3	6	51	1.0
Adult	9	0	1	8	
Nf1					
Yes	5	1	0	4	0.271
No	64	2	7	55	
Location					
Cerebellar	36	0	5	31	0.163
Extracerebellar	33	3	2	28	
Extension of resection					
Total	31	1	3	27	1.0
Partial	38	2	4	32	
Outcome					
Favorable	41	2	5	34	0.865
Unfavorable	28	1	2	25	
Recurrence					
Yes	5	0	1	4	0.525
No	26	1	2	23	
Progression					
Yes	17	1	0	16	0.145
No	21	1	4	16	
Death					
Yes	4	0	1	3	0.474
No	65	3	6	56	

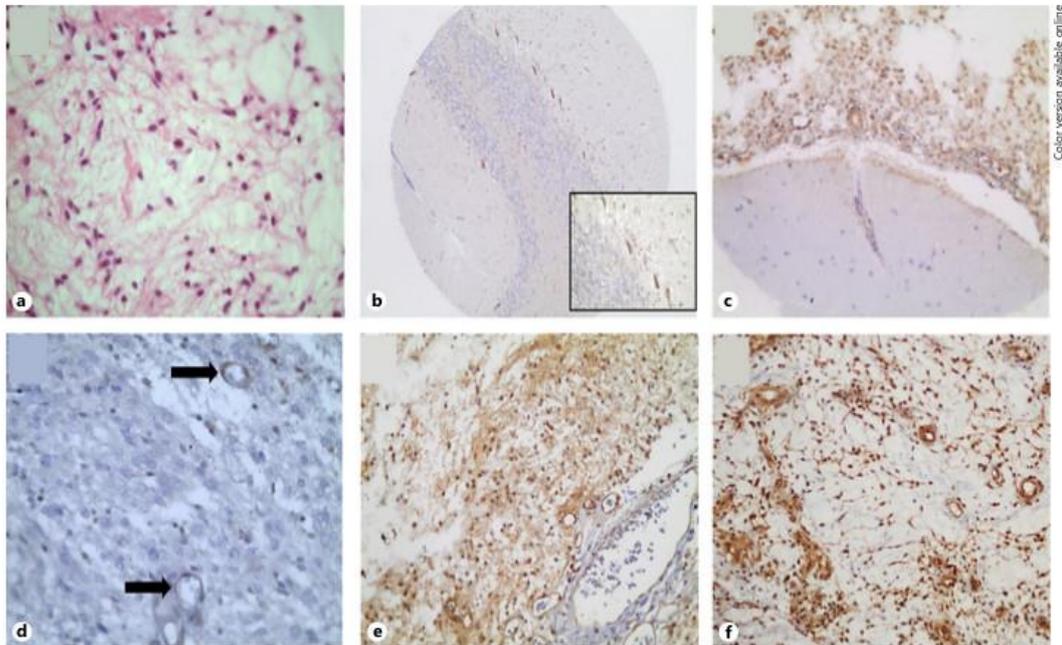


Fig. 2. Patterns of immunohistochemical MTAP expression in adjacent normal tissue and in PAs. **a** A PA with piloid and round cells in a loose background with Rosenthal fibers. HE. $\times 400$. **b** Normal cerebellum, depicting strong reaction in Purkinje cells and astrocytes lacking MTAP expression. $\times 20$. **Inset:** strong cytoplasmic re-

action of Purkinje cells. $\times 200$. **c** Normal cerebellum-tumor transition - the tumor showed a moderate reaction. $\times 100$. **d** Tumor with loss of MTAP expression and positive endothelial reaction (arrows). $\times 400$. **e** Moderate cytoplasmic MTAP staining. $\times 100$. **f** Strong cytoplasmic MTAP reaction in piloid area of a PA. $\times 100$.

The median EFS and OS for the entire cohort was 3.5 (0.1–16.3) and 4.0 (0.6–16.6) years, respectively. Patients with relapsed tumors had a shorter EFS (0.1–10.7 years, median 0.9) and OS (0.7–16.2 years, median 2.7). All the relapsed lesions maintained the histopathological criteria for PA.

Galectin-3 was expressed in 95.7% of the series and all cases lacked mutated IDH-1 (R132H) expression (fig. 1a, b), confirming the diagnosis of PA.

Following MTAP antibody validation by Western blot and immunocytochemistry in the SNB19 and MDA-MB231 tumor cell lines (fig. 1), we achieved adequate results in 67/69 of the primary lesions and in 5/6 of the relapsed lesions. We observed cytoplasmic MTAP expression in 59/67 primary tumors (88.1%; fig. 2). Ten cases (14.5%) presented reduced expression, including 3 that lost MTAP expression completely (fig. 2d).

In the nonneoplastic cerebellum, Purkinje cells showed strong cytoplasmic positivity for MTAP, while the non-

neoplastic astrocytes were negative (score: 0) in 8/9 cases (fig. 2b, c) and faintly positive in 1 case (score: ≤ 3). The difference between neoplastic and nonneoplastic astrocytes was statistically significant in the Wilcoxon test ($p = 0.005$). In contrast, there were no significant differences in MTAP expression between groups (table 1).

PAs in the optic pathways showed strongest MTAP expression (4/4 lesions, score: 6). The 3 tumors with a complete loss of MTAP expression were located in the cerebral hemispheres (table 2). Among these patients, 1 showed an Nf1-PA context and 1 had multiple recurrences (not analyzed in this study).

The relapsed lesions displayed similar expression to their primary counterparts ($p = 0.5$, McNemar test). One patient had stronger expression in the relapsed lesion (score: 4 and 6) and the patient with 3 available samples presented decreasing MTAP expression over time (score: 6, 5 and 4, respectively).

Table 2. MTAP expression according to the location of the tumor

	MTAP score			total
	negative	≤3	≥4	
Cerebellum	0	5	31	36
Brain stem	0	1	3	4
Medullary	0	0	5	5
Suprasellar	0	0	6	6
Optic pathways	0	0	4	4
Cerebral hemispheres	3	1	10	14
Total	3	7	59	69

Finally, MTAP expression did not influence the OS or EFS, as seen in the Kaplan-Meier curves ($p = 0.645$, $p = 0.736$).

Discussion

To the best of our knowledge, this is the first study to assess MTAP expression on immunohistochemistry in central nervous system tumors. We report that MTAP expression is retained in the majority of PAs. The few studies that have analyzed MTAP in gliomas reported MTAP deletions and reduced mRNA expression in pediatric [38] and adult glioblastomas [36, 37, 40, 44]. We also observed reduced MTAP tumor expression in a small number of infiltrative diffuse astrocytomas (i.e. WHO grades II–IV), with a trend towards lower expression in high-grade tumors (data not published), which suggests that the loss of MTAP expression is associated with increased glioma malignancy.

In this series of PAs, the loss of MTAP expression observed in a few cases did not influence prognosis, and we could not confirm that MTAP is a predictor of outcome. In contrast, the loss of expression of the neighbor gene *p16* has a prognostic impact on PAs [19]. Recently, it was described that the simultaneous loss of expression of *p16* and MTAP determines shorter survival of patients with non-small-cell lung cancer [45].

The normal distribution of MTAP in the central nervous system is not properly defined [46]. We describe that nonneoplastic astrocytes had virtually a complete loss of MTAP expression as opposed to the adjacent neoplastic astrocytes. In experimental studies on dementia, MTAP overexpression has been related to senescence and loss of neuroprotective function compared to normal astrocytes [47, 48]. We therefore hypothesized that the adjacent cells

play an essential role in the establishment of boundaries to the growth of PAs by avoiding these cells from senescence, thereby maintaining their neuroprotective role. This, associated with the oncogene-induced senescence in the tumor cells, would help to explain the indolent behavior of PAs. Finally, the increased expression in specific cell subtypes, such as in the astrocytes of the optic nerve and retina, suggested by previous investigations [46], may explain why the tumors located in the optic pathways displayed stronger expression of MTAP in our series.

The great interest in assessing the expression of MTAP in tumors arises from the therapeutic potential of DNSP inhibitors, such as methotrexate, L-alanosine and pemetrexed [27]. It has been reported that a loss of MTAP expression sensitizes cancer cells to DNSP inhibitors, as shown in studies on leukemia and lung cell lines [30] and various malignant neoplasms [27]. This is particularly relevant for lymphomas, leukemias [27, 29] and non-small-cell lung carcinoma [34, 45]. Nevertheless, chemotherapy regimens with pemetrexed were not effective for pediatric patients with medulloblastomas, ependymomas and high-grade gliomas [49], and the addition of methotrexate in the chemotherapeutic treatment of infratentorial ependymomas did not improve the response to these drugs [50]. However, none of these studies assessed MTAP expression in the tumors. In the light of the knowledge about MTAP expression, further clinical studies could help to elucidate the poor results of DNSP inhibitors in pediatric brain tumors. Although it is a small subset, patients with PAs that exhibit a loss of MTAP expression could potentially benefit from treatment with DNSP inhibitors, especially when lesions are recurrent or unachievable to surgical resection.

To conclude, understanding the role of MTAP in an indolent neoplasm, such as PA, may help to uncover the mechanisms by which the activation of MAPK leads to senescence, instead of stimulating cell proliferation in these tumors. Additional studies, with larger cohorts, comparisons with other glioma subtypes and correlations with different molecular mechanisms of MAPK activation are needed to confirm and extend our findings and to elucidate the role of MTAP in gliomagenesis.

Acknowledgments

This study was partially supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2012/19590-0) and an HCB program of financial support (Programa de Apoio e Incentivo à Pesquisa).

References

- 1 Dolecek TA, et al: 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–v49.
- 2 Rosemberg S, Fujiwara D: Epidemiology of pediatric tumors of the nervous system according to the WHO 2000 classification: a report of 1,195 cases from a single institution. *Childs Nerv Syst* 2005;21:940–944.
- 3 Camargo BD, et al: Câncer na criança e no adolescente no Brasil dados dos registros de base populacional e de mortalidade. Rio de Janeiro, Instituto Nacional do Câncer, 2008.
- 4 Johnson DR, et al: Pilocytic astrocytoma survival in adults: analysis of the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program of the National Cancer Institute. *J Neurooncol* 2012;108:187–193.
- 5 Burger PC, Scheithauer BW (eds): Pilocytic astrocytoma, in Tumors of the Central Nervous System. Washington, The Armed Forces Institute of Pathology, 1994.
- 6 Scheithauer BW, et al: Pilocytic astrocytoma; in David N et al. (eds): WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. Lyon, IARC Press, 2007, pp 13–21.
- 7 Becker AP, et al: Pilocytic astrocytoma: anatomic, pathological and molecular aspects. *INTECH Open Access*, 2013.
- 8 Listerick R, Charrow J, Gutmann DH: Intracranial gliomas in neurofibromatosis type 1. *Am J Med Genet* 1999;89:38–44.
- 9 Jones DT, et al: MAPK pathway activation in pilocytic astrocytoma. *Cell Mol Life Sci* 2012; 69:1799–811.
- 10 Fernandez C, et al: Pilocytic astrocytomas in children: prognostic factors – a retrospective study of 80 cases. *Neurosurgery* 2003;53:544–553.
- 11 Paixao AB, et al: In pursuit of prognostic factors in children with pilocytic astrocytomas. *Childs Nerv Syst* 2010;26:19–28.
- 12 Bar EE, et al: Frequent gains at chromosome 7q34 involving BRAF in pilocytic astrocytoma. *J Neuropathol Exp Neurol* 2008;67:878–87.
- 13 Capper D, et al: Assessment of BRAF V600E mutation status by immunohistochemistry with a mutation-specific monoclonal antibody. *Acta Neuropathol* 2011;122:11–19.
- 14 Cin H, et al: Oncogenic FAM131B-BRAF fusion resulting from 7q34 deletion comprises an alternative mechanism of MAPK pathway activation in pilocytic astrocytoma. *Acta Neuropathol* 2011;121:763–774.
- 15 Forshaw T, et al: Activation of the ERK/ MAPK pathway: a signature genetic defect in posterior fossa pilocytic astrocytomas. *J Pathol* 2009;218:172–181.
- 16 Gronych J, et al: An activated mutant BRAF kinase domain is sufficient to induce pilocytic astrocytoma in mice. *J Clin Invest* 2011;121: 1344–1348.
- 17 Hawkins C, et al: BRAF-KIAA1549 fusion predicts better clinical outcome in pediatric low-grade astrocytoma. *Clin Cancer Res* 2011;17:4790–4798.
- 18 Jacob K, et al: Duplication of 7q34 is specific to juvenile pilocytic astrocytomas and a hallmark of cerebellar and optic pathway tumours. *Br J Cancer* 2009;101:722–733.
- 19 Jacob K, et al: Genetic aberrations leading to MAPK pathway activation mediate oncogene-induced senescence in sporadic pilocytic astrocytomas. *Clin Cancer Res* 2011;17:4650–4660.
- 20 Jones DT, et al: Recurrent somatic alterations of FGFR1 and NTRK2 in pilocytic astrocytoma. *Nat Genet* 2013;45:927–932.
- 21 Riemenschneider MJ, et al: Molecular diagnostics of gliomas: state of the art. *Acta Neuropathol* 2010;120:567–584.
- 22 Jones DT, et al: Oncogenic RAF1 rearrangement and a novel BRAF mutation as alternatives to KIAA1549:BRAF fusion in activating the MAPK pathway in pilocytic astrocytoma. *Oncogene* 2009;28:2119–2123.
- 23 Tian Y, et al: Detection of KIAA1549-BRAF fusion transcripts in formalin-fixed paraffin-embedded pediatric low-grade gliomas. *J Mol Diagn* 2011;13:669–677.
- 24 Michaloglou C, et al: BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* 2005;436:720–724.
- 25 Raabe EH, et al: BRAF activation induces transformation and then senescence in human neural stem cells: a pilocytic astrocytoma model. *Clin Cancer Res* 2011;17:3590–3599.
- 26 Tada K, et al: Preliminary observations on genetic alterations in pilocytic astrocytomas associated with neurofibromatosis 1. *Neuro Oncol* 2003;5:228–234.
- 27 Bertino JR, et al: Targeting tumors that lack methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) activity: current strategies. *Cancer Biol Ther* 2011;11:627–632.
- 28 Conway C, et al: Deletion at chromosome arm 9p in relation to BRAF/NRAS mutations and prognostic significance for primary melanoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2010;49:425–438.
- 29 Kadariya Y, et al: Mice heterozygous for germline mutations in methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) die prematurely of T-cell lymphoma. *Cancer Res* 2009;69:5961–5969.
- 30 Coulthard SA, et al: Increased sensitivity to thiopurines in methylthioadenosine phosphorylase-deficient cancers. *Mol Cancer Ther* 2011;10:495–504.
- 31 Lubin M, Lubin A: Selective killing of tumors deficient in methylthioadenosine phosphorylase: a novel strategy. *PLoS One* 2009;4:e5735.
- 32 Schmid M, et al: A methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) fusion transcript identifies a new gene on chromosome 9p21 that is frequently deleted in cancer. *Oncogene* 2000;19:5747–5754.
- 33 Schmadeke R, Harmon BE, Singh M: Triple-negative breast carcinoma: current and emerging concepts. *Am J Clin Pathol* 2014;141:462–477.
- 34 Basu J, et al: Growth and metastases of human lung cancer are inhibited in mouse xenografts by a transition state analogue of 5'-methylthioadenosine phosphorylase. *J Biol Chem* 2011;286:4902–11.
- 35 Helderbrand C, et al: Promoter-hypermethylation is causing functional relevant downregulation of methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) expression in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 2006;27:64–72.
- 36 Crespo I, et al: Amplified and homozygously deleted genes in glioblastoma: impact on gene expression levels. *PLoS One* 2012;7:e46088.
- 37 Crespo I, et al: Detailed characterization of alterations of chromosomes 7, 9, and 10 in glioblastomas as assessed by single-nucleotide polymorphism arrays. *J Mol Diagn* 2011;13:634–647.
- 38 Carvalho D, et al: The prognostic role of intragenic copy number breakpoints and identification of novel fusion genes in paediatric high grade glioma. *Acta Neuropathol Commun* 2014;2:23.
- 39 Schneider JH Jr, Raffel C, McComb JG: Benign cerebellar astrocytomas of childhood. *Neurosurgery* 1992;30:58–62; disc 62–63.
- 40 Nobori T, et al: Absence of methylthioadenosine phosphorylase in human gliomas. *Cancer Res* 1991;51:3193–3197.
- 41 Stepanenko AA, Kavsian VM: Karyotypically distinct U251, U373, and SNB19 gliomacellines are of the same origin but have different drug treatment sensitivities. *Gene* 2014;540:263–265.
- 42 Paixao Becker A, et al: In pursuit of prognostic factors in children with pilocytic astrocytomas. *Childs Nerv Syst* 2010;26:19–28.
- 43 Capper D, et al: Characterization of R132H mutation-specific IDH1 antibody binding in brain tumors. *Brain Pathol* 2010;20:245–254.
- 44 Brat DJ, et al: Molecular genetic alterations in radiation-induced astrocytomas. *Am J Pathol* 1999;154:1431–1438.
- 45 Su CY, et al: MTAP is an independent prognosis marker and the concordant loss of MTAP and p16 expression predicts short survival in non-small cell lung cancer patients. *Eur J Surg Oncol* 2014;40:1143–1150.
- 46 Chidlow G, et al: Ocular expression and distribution of products of the POAG-associated chromosome 9p21 gene region. *PLoS One* 2013;8:e75067.
- 47 Diez-Vives C, et al: Proteomic study of neuron and astrocyte cultures from senescence-accelerated mouse SAMP8 reveals degenerative changes. *J Neurochem* 2009;111:945–955.
- 48 Garcia-Matas S, et al: Dysfunction of astrocytes in senescence-accelerated mice SAMP8 reduces their neuroprotective capacity. *Aging Cell* 2008;7:630–640.
- 49 Warwick AB, et al: Phase 2 trial of pemetrexed in children and adolescents with refractory solid tumors: a Children's Oncology Group study. *Pediatr Blood Cancer* 2013;60:237–241.
- 50 Venkatramani R, et al: Outcome of infants and young children with newly diagnosed ependymoma treated on the 'Head Start' III prospective clinical trial. *J Neurooncol* 2013;113:285–291.

6

Anexo G- Carta de aceite de manuscrito no Journal of Neuropathology and Experimental Neurology (Fator de impacto: 4.372).

From: JNEN <em@editorialmanager.com>
Date: 2015-05-06 18:06 GMT-03:00
Subject: JNEN Decision
To: Rui Manuel Reis <ruireis.hcb@gmail.com>

May 06, 2015

RE: JNEN 15-030R1, entitled "KIAA1549:BRAF gene fusion and FGFR1 hotspot mutations are prognostic factors in pilocytic astrocytomas"

Dear Dr. Reis,

I am pleased to inform you that your revisions are satisfactory. I am pleased to accept the revised paper for publication in Journal of Neuropathology and Experimental Neurology.

OPEN ACCESS

If you have indicated in the revision stage that you would like your submission, upon acceptance to be made open access, please go directly to step 2. If you have not yet indicated that you would like your accepted article to be open access, please follow these steps to complete the process:

1. Email the journal office claiming you would like this article to be available open access. Please send your Email to jnen@pathology.wisc.edu. Please include your article title and manuscript number.
2. A License to Publish (LTP) form must be completed for your submission to be made available open access. Please download and sign the form here <http://links.lww.com/LWW-ES/A49> and Email the completed form to the journal office.
3. Go to <http://wolterskluwer.qconnect.com> to pay for open access. You will be asked for the following information, please enter exactly as shown:
 - a. Article Title - KIAA1549:BRAF gene fusion and FGFR1 hotspot mutations are prognostic factors in pilocytic astrocytomas
 - b. Manuscript Number - JNEN 15-030R1

Thank you for considering our journal for your paper.

With Kind Regards,

Raymond A. Sobel, MD
Editor-in-Chief
Journal of Neuropathology and Experimental Neurology

Anexo H - Artigo "KIAA1549:BRAF gene fusion and FGFR1 hotspot mutations are prognostic factors in pilocytic astrocytomas." – Artigo em *Open access*, disponível em <http://journals.lww.com/jneuropath/toc/2015/07000>

ORIGINAL ARTICLE

OPEN

KIAA1549:BRAF Gene Fusion and FGFR1 Hotspot Mutations Are Prognostic Factors in Pilocytic Astrocytomas

Aline Paixão Becker, MD, MSc, Cristovam Scapulatempo-Neto, MD, PhD, Adriana C. Carloni, MSc, Alessandra Paulino, BSc, Jamie Sheren, PhD, Dara L. Aisner, MD, PhD, Evelyn Musselwhite, MSc, Carlos Clara, MD, PhD, Hélio R. Machado, MD, PhD, Ricardo S. Oliveira, MD, PhD, Luciano Neder, MD, PhD, Marileila Varella-Garcia, PhD, and Rui M. Reis, PhD

Abstract

Up to 20% of patients with pilocytic astrocytoma (PA) experience a poor outcome. *BRAF* alterations and *Fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1)* point mutations are key molecular alterations in PAs, but their clinical implications are not established. We aimed to determine the frequency and prognostic role of these alterations in a cohort of 69 patients with PAs. We assessed *KIAA1549:BRAF* fusion by fluorescence in situ hybridization and *BRAF* (exon 15) mutations by capillary sequencing. In addition, *FGFR1* expression was analyzed using immunohistochemistry, and this was compared with gene amplification and hotspot mutations (exons 12 and 14) assessed by fluorescence in situ hybridization and capillary sequencing. *KIAA1549:BRAF* fusion was identified in almost 60% of cases. Two tumors harbored mutated *BRAF*. Despite high *FGFR1* expression overall, no cases had *FGFR1* amplifications. Three cases harbored a *FGFR1* p.K656E point mutation. No correlation was observed between *BRAF* and *FGFR1* alterations. The cases were predominantly pediatric (87%), and no statistical differences were observed in molecular alterations–related patient ages. In summary, we confirmed the high frequency of *KIAA1549:BRAF* fusion in PAs and its association with a better outcome. Oncogenic mutations of *FGFR1*, although rare, occurred in a subset of patients with worse outcome. These

molecular alterations may constitute alternative targets for novel clinical approaches, when radical surgical resection is unachievable.

Key Words: *BRAF*, Brain tumor, *FGFR1*, Glioma, Molecular diagnosis, Pilocytic astrocytoma, Prognosis.

INTRODUCTION

Pilocytic astrocytomas (PAs) are the major solid neoplasms in children and teenagers (1, 2). According to data from the Central Brain Tumor Registry of the United States, it is the main neoplasm in the 5- to 14-year-old range in the United States (3). Similarly in Brazil, PAs are the second most common neoplasm in pediatric patients after leukemias (4), accounting for almost 20% of primary brain tumors in children (5). Pilocytic astrocytomas are less frequent in adults in whom they are associated with more aggressive clinical courses (1, 6). According to the World Health Organization (WHO), PAs are grade I tumors because of their well-limited and usually indolent nature (1). The 5-year survival rate is >90% in children (1, 7), and 52% in adults (8). Despite the overall good prognosis of PAs, up to 20% of patients will have a poor outcome, with recurrence, growth of incompletely resected lesions, or dissemination through the cerebrospinal fluid, and ultimately death due to disease (1, 7).

Pilocytic astrocytomas can occur throughout the neuroaxis, but the most common location of sporadic tumors is the cerebellum (1). Extracerebellar tumors, particularly those located in the cerebral hemispheres and in the optic pathways, have a known association with neurofibromatosis 1 (NF1), a familial tumor predisposition syndrome with autosomal dominant inheritance (1, 9). Approximately 10% of all PAs are related to NF1 (NF1-PAs), and conversely, PAs are the most frequent brain tumor related to NF1 (49% of cases) (10, 11). When these PAs arise in locations where gross total resection is difficult to achieve, they usually follow a more benign course than sporadic PAs (11).

Molecular studies based on the relationship between PAs and NF1 allowed the discovery of germline and somatic mutations with silencing of the tumor suppressor gene *NF1* in NF1-PAs. These were recently defined as point mutations, splice mutations or nonsense mutations (germline mutations) and loss of heterozygosity and epigenetic changes, such as

From the Molecular Oncology Research Center (APB, ACC, AP, RMR), and Department of Pathology (CSN), Barretos Cancer Hospital, Barretos, São Paulo, Brazil; Cancer Center (JS, DLA), and School of Medicine (EM, MVG), University of Colorado, Aurora, Colorado; Department of Neurosurgery(CC), Barretos Cancer Hospital, Barretos, São Paulo, Brazil; Department of Surgery (RSO), and Department of Pathology and Forensic Medicine (APB, LN), Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo (FMRP-USP), São Paulo, Brazil; Life and Health Sciences Research Institute (ICVS), Health Sciences School, University of Minho (RMR), Braga, Portugal; and ICVS/3B's – PT Government Associate Laboratory(RMR), Braga/Guimarães, Portugal.

Send correspondence and reprint requests to: Rui Manuel Reis, PhD, Molecular Oncology Research Center, Barretos Cancer Hospital, Rua Antenor Duarte Vilela, 1331, Barretos-SP, Brazil; E-mail: ruireis.hcb@gmail.com

This study was partially supported by CNPq/Universal (475358/2011-2), and FAPESP (2012/19590-0) grants to RMR and to the NIH- P30CA046934 (CCSG Molecular Pathology/Cytogenetics) to MVG and DLA.

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 3.0 License, where it is permissible to download and share the work provided it is properly cited. The work cannot be changed in any way or used commercially.

methylation of the gene (somatic mutations) (9). These mutations result in loss of expression of neurofibromin, which is a negative signaling regulator of RAS proteins; this results in an increase of activated RAS levels and further activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway (12). The constitutive activation of the MAPK pathway increases survival and proliferation of cancer cells in various neoplasms (13, 14).

MAPK is a key signaling pathway in the development of PAs; it is altered in up to 90% of cases (7, 15, 16). The major alterations leading to constitutive activation of MAPK in PAs are gene fusions and point mutations involving the oncogene *BRAF* (7, 17–23). Gene fusions between *KIAA1549* and *BRAF* (*KIAA1549:BRAF* fusion) leading to the overexpression of the fusion protein affects up to 80% of PAs. There are decreasing rates with age, varying from 79% in children younger than 10 years to 7% in patients older than 40 years (16, 20); this is associated with a better prognosis in low-grade gliomas, including PAs (21). Less frequent fusions, such as *SRGAP3-RAF1* (24) and *FAM131B-BRAF* (25, 26), have also been described. Another mechanism of sustained *BRAF* activation in PAs is the point mutation V600E, which results in an amino acid substitution at codon 600 in *BRAF*, from a valine (V) to a glutamic acid (E) in the majority of cases, leading to the activation of the kinase domain of this oncogene (7, 18, 22, 27). Nevertheless, this finding is infrequent in PAs (approximately 6%) and may be detected more frequently in other brain tumor types, such as glioblastomas (22, 28), gangliogliomas, and particularly, pleomorphic xanthoastrocytomas (>60%) (16, 22).

Recent studies have identified upstream alterations in the MAPK pathway, mainly in the tyrosine-kinase receptor *Fibroblast growth factor receptor 1* (*FGFR1*), leading to constitutive activation of the growth cascade in PAs (15, 29). In contrast to the *FGFR1* amplification frequently observed in breast, ovary, and lung cancer (30, 31), gene fusions and duplications are described at low frequencies in brain tumors such as glioblastomas (32) and pediatric diffuse astrocytomas (16), respectively. In PAs, the newly described alterations of *FGFR1* are point mutations in the hotspot tyrosine kinase region, affecting mainly the codons 546 (p.N546K –asparagine-to-lysine substitution) and 656 (p.K656E –lysine-to-glutamate substitution) of the gene in extracerebellar PAs (15).

Despite the great improvement in the knowledge on the molecular oncogenesis of PAs in the last years, the main established prognostic factors for PAs remain in the clinical features, such as patient's age, feasibility of radical resection of lesion (33–35), exposure to radiation therapy (1), and the sporadic or hereditary nature of the tumor (12). The prognostic implications of *BRAF* and *FGFR1* alterations have not been fully explored, and advances in this field might identify potential targets for clinical treatment of PA, particularly for the tumors located in eloquent areas where radical resection is rarely achieved.

In this study, we aimed to determine the frequency of the molecular alterations in *BRAF* and *FGFR1* and to evaluate the prognostic role of these oncogenes in a series of Brazilian patients with PAs.

MATERIALS AND METHODS

Patients

Sixty-nine patients from the Barretos Cancer Hospital (HCB) and the Hospital of Clinics of Faculty of Medicine of Ribeirão Preto (HCRP), from 1993 to 2013, were included in this study. The patients were clustered according to sex, age group (≤ 19 years old vs ≥ 20 years old), clinical diagnosis of NF1 (confirmed by standardized clinical criteria), and lesion location (cerebellar vs extracerebellar). The outcome of patients was classified as “favorable” (i.e. patients without any events and/or with Karnofsky index ≥ 80 at follow-up) and “unfavorable” (i.e. occurrence of some event and/or Karnofsky index ≤ 70 at follow-up). We defined “event” as death, growth of a partially resected lesion, or the recurrence of a completely resected lesion confirmed by immediate postsurgical computed tomography (36), detected either clinically and/or through neuroradiologic examinations. The study was approved by both local Ethics Committee (protocols HCB 87362 and HCRP 212.313).

The series included 38 male and 31 female patients (ratio, 1.2:1), with ages ranging from 0.3 to 53.4 years old (median, 9.1 years old). The 5-year and 10-year survival of the series were > 95% and 80%, respectively. Overall, 35 cases (50.7%) had unfavorable outcomes according to our criteria: 8 patients (11.5%) had relapsing or growing residual tumors; 23 patients (33.3%) developed moderate to severe clinical deficits (Karnofsky index, 50–70); and 4 patients (5.8%) died of disease. The deaths occurred after 1.7, 2.6, 6.5, and 10.7 years of the diagnosis, respectively. Two deceased patients had cerebellar lesions with subsequent medullary dissemination of the tumor, 1 patient had a suprasellar lesion, and the other had an insular tumor. Table 1 summarizes clinical data of the patients.

Of the 69 patients included in this study, 5 had relapsed lesions analyzed, and 1 of these had yet a second relapsed lesion analyzed, totaling 75 samples. All cases were reviewed by 2 neuropathologists, according to the 2007 WHO diagnostic criteria (1); negative immunohistochemical reaction to mutated *IDH1* was found in all cases (37, 38).

We constructed 2 blocks of tissue microarray (TMA) from the formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) samples, using the Beecher Instruments TMA platform, with tissue cores at 1 mm diameter for the HCB cases and 1.5 mm for the HCRP cases. Because of the histologic heterogeneity of the PAs, we obtained up to 8 cores of each case (average, 3.6 cores/case), representing the different histologic patterns of the tumors. In 9 cases, adjacent nonneoplastic cerebellar tissue was available and included in the TMA.

Immunohistochemistry

Automated immunohistochemistry using Ventana BenchMark Ultra equipment (Ventana-Roche, Tucson, AZ) was performed in the TMA slides with 4- μ m-thick tissue sections, according to the manufacturer's protocols. First, the sections were deparaffinized and dehydrated, then the antigen retrieval process was done with a mixed citrate/EDTA buffer (pH 6.0, at 125 °C for 4 minutes and 95 °C for 25 minutes in pressure cooker). The monoclonal antibody used was anti-FGFR1 (Cell

Signaling, Danvers, MA, clone D8E4, dilution 1:50). As external controls for the immunohistochemical reaction, we used prostate epithelium and liver; internal control was the endothelial cytoplasmic reaction.

The cytoplasmic expression of FGFR1 was evaluated in a double-blind fashion following semiquantitative criteria based on the intensity (0 = negative, 1 = weak, 2 = moderate, 3 = strong) and extension of the reaction (0, 0% of positive cells; 1, <25% of positive cells; 2, 25%–50% of positive cells; and 3, >50% of positive cells) (39). With the sum of these analyses, we achieved scores ranging from 0 to 6. Samples with scores 0 to 2 were considered negative; those with scores 3 to 6 were considered positive (39). Tissues sections were also evaluated for nuclear expression; $\geq 25\%$ nuclear staining was considered positive, and cases with <25% of nuclear staining were considered negative. In the cases with more than 1 tissue core, we calculated the average score.

KIAA1549-BRAF and FGFR1 Fluorescence In Situ Hybridization Assay

For analysis of KIAA1549-BRAF fusion, fluorescence in situ hybridization (FISH) probes were created from BAC clones containing human DNA from regions homologous to the KIAA1549 and BRAF genes on chromosome 7, as identified through the Ensembl Genome Browser (GRCh37). The BRAF DNA was validated by polymerase chain reaction (PCR) using the following sequences as primers: 5'-CAGA GTTGTG CAGATGGTCCCTTT-3' (forward) and 5'-ACCATA TAATAGAAGCGCCTCCCA-3' (reverse). For the KIAA1549 DNA, the validation sequences were 3'-AGGTATTGTTGGA ACATTGAAGGCT-3' (forward) and 5'-CAGTCAAATGCTC GCAATGAATGAA-3' (reverse). DNA inserts were extracted from clone mini-cultures, purified and subjected to whole genome amplification using the REPLI-g Midi Kit from Qiagen (Cat# 150045, Qiagen, Düsseldorf, Germany).

An aliquot of 1 μg of each purified BRAF and KIAA1549 DNA were labeled, respectively, with SpectrumRed and SpectrumGreen conjugated dUTPs using the Vysis Nick Translation Kit (Cat# 32-801300, Abbott Molecular, Des Plaines, IL), as previously reported (40). Labeled DNA was coprecipitated with herring sperm DNA as carrier (1:50) and human Cot-1 DNA (1:10) for blocking of repetitive sequences then diluted 1:10 in t-DenHyb hybridization buffer (Insitus Biotechnologies, Albuquerque, NM). The labeled FISH probe mix was validated for chromosome mapping and quality of hybridization in interphase and metaphase cells prior to this study.

The FFPE slides were deparaffinized and dehydrated according to previously established protocols (41). The probe was applied to the selected areas, and hybridization was allowed to occur at 37 °C for 40 to 67 hours and, finally, the chromatin was counterstained with DAPI/anti-fade (0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in Vectashield mounting medium, Vector Laboratories, Burlingame, CA).

Analysis was performed on an epifluorescence microscope using single interference filter sets for green (fluorescein isothiocyanate), red (Texas red), and blue (DAPI), as well as dual (red/green) and triple (blue, red, and green) band pass filters. For each interference filter, monochromatic images were acquired and merged using CytoVision (Leica Microsystems Inc., Wetzlar, Germany). A minimum of 50 tumor nuclei was evaluated.

The specimen was considered positive for the KIAA1549-BRAF fusion when there were doublets of red and green signals very close or partially overlapping observed, as opposed to signals separated by >2 signal diameters, which characterize alleles with native status.

FGFR1 Amplification

The FGFR1/CEP8 enumeration assay measured 2 genomic targets using 2 commercial FISH probes provided as Analyte Specific Reagents (ASR) by Abbott Molecular (Ref. 08 N21-020 and Ref. 06 J37-018, respectively): Vysis LSI FGFR1 SpectrumRed FISH probe, which contains the entire FGFR1 gene, labeled with SpectrumRed fluorophore, and the CEP 8 (D8Z2) FISH probe, labeled with SpectrumGreen fluorophore.

The FFPE slides were processed and evaluated as previously described for the KIAA1549-BRAF fusion. The determination of low and high level of FGFR1 gene amplification followed the criteria proposed by Schultheis et al (42) based on the ratio $FGFR1/CEP\ 8 \geq 2.0$, or the average number of FGFR1 signals per nucleus ≥ 6 copies.

BRAF and FGFR1 Point Mutation Analyses

We first obtained serial 10- μm -unstained sections of FFPE blocks. One adjacent hematoxylin and eosin-stained section was used for identification and selection of tumor area by the pathologist. DNA was isolated from 1 or 2 unstained section from each specimen, depending on the size of the tissue fragment, as previously described (43). Briefly, tissues were deparaffinized and dehydrated. Selected areas of tumor were macrodissected using a sterile needle (18G \times 1½) (Becton Dickinson, Curitiba, Brazil), and carefully collected into a microtube. DNA was isolated using QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen, Hilden, Germany), following the manufacturer's instructions, followed by evaluation of DNA quantity and quality by Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE). DNA samples were then diluted to a final concentration of 50 ng/ μL and stored at -20 °C for further molecular analysis.

The whole exons of BRAF (exon 15; codon 600) and FGFR1 (exons 12 and 14; codons 546 and 656) were analyzed by PCR, followed by direct sequencing, with emphasis in the hotspot loci, as previously described (15, 28). Briefly, the PCR reaction was performed in a final volume of 15 μL , under the following conditions: 1 \times PCR buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA); 2 mmol/L MgCl_2 (Invitrogen); 10 mmol/L dNTPs (Invitrogen); 0.3 mmol/L of both sense and antisense primers (Sigma Aldrich, St. Louis, MO); 1 unit of Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen); and 50 ng of DNA. The BRAF primers used were TCATAATGCTTGCTCTGATAG GA (sense) and GGCCAAAAATTTAATCAGTGGA (antisense) (28), for FGFR1 exon 12 TCAAGTCCCAGGGAAAAGCAG (sense) and AGGCCCTGGGACTGATACCC (antisense), and for FGFR1 exon 14 GACAAGTCGGCTAGTTGCAT (sense) and CCCACTCCTTGCTTCTCAGAT (antisense). The PCR was performed in Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Austin, TX). The PCR products were evaluated by agarose gel electrophoresis prior to capillary sequencing.

TABLE 1. Clinicoepidemiologic Data of the PA Series

ID	Origin	Sex	Age (years)	Location	NF1	Extension of Resection	Event	Status	Follow-Up (months)	
1	P01	HCBC	M	4.8	C		Total	Recurrence	AWD	27
2	P02	HCBC	M	4.2	C		Total	No	AND	27.5
3	P03	HCBC	M	8.4	C		Total	No	AND	36.2
**4	P04	HCBC	M	8	C		Partial	Growth	AWD	34.1
*5	P05	HCBC	F	15.8	C		Partial	Growth	AND	24.4
6	P06	HCBC	M	20.8	C		Partial	No	AWD	16.8
7	P07	HCBC	F	35.4	SC		Partial	No	AWD	22.9
8	P08	HCBC	M	4.8	C		Partial	Growth	AWD	29.3
9	P10	HCBC	M	10.5	C		Total	No	AND	43
10	P12	HCBC	M	5.2	C		Total	No	AND	36.5
11	P13	HCBC	M	5.1	CH		Partial	No	AWD	53.5
12	P16	HCBC	M	53.4	C		Partial	Growth	AWD	34.1
13	P17	HCBC	F	19.2	C		Total	No	AND	60.3
14	P18	HCBC	F	17	CH		Total	No	AND	65.3
15	P20	HCBC	M	9.2	BS		Partial	No	AWD	63.3
16	P21	HCBC	M	3.5	C		Total	No	AND	66.6
17	P23	HCBC	M	16.4	CH	Yes	Total	No	AND	58.2
18	P24	HCBC	M	21.9	CH		Partial	No	AWD	12.9
19	P25	HCBC	F	2.1	C		Partial	No	AWD	7.1
20	P26	HCBC	M	10.2	C		Total	No	AND	39.2
21	P28	HCBC	F	7.5	C		Total	No	AND	86.3
22	P29	HCBC	F	5.2	C		Total	No	AND	8.8
23	P30	HCBC	M	15.3	C		Partial	Growth	AWD	8
24	P31	HCRP	F	11.3	C		Total	No	AND	133.2
25	P32	HCRP	F	18.1	C		Total	Recurrence	D	20.6
26	P33	HCRP	F	13.8	C		Partial	No	AWD	196.8
27	P34	HCRP	M	5.2	SC		Partial	Growth	AWD	194.7
28	P35	HCRP	M	12.7	C		Total	No	AND	179.1
29	P36	HCRP	F	3.8	C		Total	Recurrence	AND	168.6
30	P37	HCRP	M	11.1	SS		Partial	No	AWD	170.6
31	P38	HCRP	F	9	SC		Partial	Growth	AWD	155
32	P39	HCRP	M	12.8	CH		Partial	Growth	AWD	144.5
33	P40	HCRP	F	3.6	C		Total	No	AND	66.1
*34	P41	HCRP	M	9.6	C		Partial	Growth	D	128.8
35	P42	HCRP	M	5.9	C		Total	No	AND	51.7
36	P43	HCRP	M	3.6	C		Total	No	AND	116.5
37	P44	HCRP	F	2	C		Total	No	AND	115.7
38	P45	HCRP	M	7.1	C		Total	No	AND	112.8
39	P46	HCRP	F	9.9	BS		Partial	No	AWD	91.6
40	P47	HCRP	M	17.4	CH		Total	No	AND	63.7
41	P48	HCRP	F	2.2	C		Total	No	AND	83.2
42	P49	HCRP	F	5.8	BS		Partial	No	AWD	83.4
*43	P50	HCRP	F	5.3	C		Partial	Growth	AND	75.1
44	P51	HCRP	M	27.7	C		Total	No	AND	59.1
45	P52	HCRP	F	16.2	SS		Partial	Growth	D	79.2
46	P53	HCRP	F	11.7	C		Partial	No	AWD	68.6
47	P54	HCRP	M	4.5	OP		Partial	Growth	AWD	19.1
48	P55	HCRP	F	0.3	CH		Partial	Growth	D	31.5
49	P56	HCRP	F	4.1	SS		Partial	No	AWD	66.3
50	P57	HCRP	F	5.7	C		Total	Recurrence	AWD	58.3
51	P58	HCRP	M	3.1	SS		Partial	Growth	AWD	54.1
52	P59	HCRP	M	14.7	CH	Yes	Total	No	AWD	58.7
53	P60	HCRP	M	21.9	OP		Partial	No	AWD	18.9
54	P61	HCRP	M	32.2	CH		Total	No	AND	10.2
55	P62	HCRP	F	14.4	C		Total	No	AND	45.1

(Continued on next page)

TABLE 1. (Continued)

56	P63	HCRP	F	16.7	CH		Partial	No	AWD	47
57	P64	HCRP	M	24.8	CH		Partial	No	AWD	50.9
58	P65	HCRP	F	9.1	SC		Total	No	AND	46.1
59	P66	HCRP	F	15.3	CH	Yes	Total	No	AWD	46.9
60	P67	HCRP	M	7.2	BS		Partial	No	AWD	49
61	P68	HCRP	M	28.2	SC		Partial	No	AWD	44.8
62	P69	HCRP	M	4.1	SS		Partial	No	AWD	34.7
63	P70	HCRP	F	4.9	SS		Partial	Growth	AWD	31
64	P71	HCRP	M	5.7	C		Partial	Growth	AWD	22.8
65	P72	HCRP	M	17.4	CH		Total	Recurrence	AWD	18.4
66	P73	HCRP	F	6.9	OP	Yes	Partial	No	AWD	15.5
67	P75	HCRP	F	11	CH	Yes	Partial	No	AWD	7.5
68	P76	HCRP	F	8.5	OP		Partial	No	AWD	7.6
*69	P77	HCRP	M	12.5	C		Partial	Growth	AWD	8.4

AND, Alive, no evidence of disease; AWD, alive, with disease; BS, brainstem; C, cerebellum; CH, cerebral hemispheres; D, death; F, female; M, male; SC, spinal cord; SS, suprasellar; OP, optic pathway. *Patients with 2 samples in the TMA. **Patients with 3 samples in the TMA.

The PCR products of each analyzed exon were firstly purified with EXOSAP-IT (GE Technology, Cleveland, OH), then, PCR products were submitted to a sequencing reaction using 1 μ L of BigDye (Applied Biosystems), 1.5 μ L of sequencing buffer (Applied Biosystems) and 3.2 μ mol/L of primer. The sequencing reaction was followed by post-sequencing purification with EDTA, alcohol and sodium citrate. The purified products were eluted in HiDi (formamide) and incubated at 90 °C for 5 minutes and at 4 °C for at least 5 minutes. Direct sequencing was carried out on a Genetic Analyzer ABI PRISM® 3500 (Applied Biosystems). The analysis of each sample was done by comparison of electropherogram with Ensembl GeneBank sequence (*BRAF*: ENSG00000157764 and *FGFR1*: ENSG00000077782).

All cases with mutations were confirmed twice with a new PCR and direct sequencing starting from extracted DNA. In addition, for quality controls, a new DNA isolation and further mutation analyses were performed in 10% of cases.

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed with SPSS version 20 for Windows™ (IBM, Chicago, IL) with statistically significant values of $p < 0.05$. Differences in molecular alterations of *BRAF* and *FGFR1* between groups were verified by the Fisher exact and the Pearson chi-square tests. Overall survival (OS) and event-free survival (EFS) curves were determined by the Kaplan-Meier method.

RESULTS

Molecular Characterization of BRAF

The FISH assay for *KIAA1549:BRAF* fusion detection was successful in 64 (92.8%) of 69 primary lesions and in 4 of 5 relapsing lesions, which maintained the expression pattern of their primary counterparts (Fig. 1A, B). Thirty-seven primary lesions (57.8%) displayed *KIAA1549:BRAF* fusion, with strong positive association with a cerebellar location ($p < 0.001$), and negative association with clinical diagnosis of NF1 ($p = 0.011$)

(Table 2). There was a tendency for this alteration to be detected in the younger group, with 55.0% and 44.4% of patients positive for *KIAA1549:BRAF* fusion in the pediatric and adult group, respectively (Table 2). Nevertheless, this difference was not statistically significant. In addition, there were no differences between groups for sex or outcome (Table 2).

Because of compromised DNA quality in some specimens, we were able to obtain conclusive results of *BRAF* point mutations in 48 (69.6%) of 69 primary lesions and in 5 of 5 recurrences. Two cases (4.2%) showed *BRAF* point mutations (Fig. 1C, D). One recurrent suprasellar (hypothalamic) tumor of an 11-year-old male patient (P37, Table 1) had the p.V600E mutation, but the patient had only 1 sample available for molecular analysis, and this tumor was also positive for the *KIAA1549:BRAF* fusion in the FISH assay. In addition, a point mutation p.V600K, with a valine-to-lysine substitution at the codon 600 (Fig. 1D), was detected in a cerebellar PA of an 11-year-old female patient (P31, Table 1), who remains alive without evidence of disease after a long follow-up (11 years). None of these patients with tumors harboring mutated *BRAF* had the clinical diagnosis of NF1. Despite the small number of *BRAF*-mutated cases, we performed statistical analysis but did not identify significant associations between *BRAF* status and patients clinical features (Table 2).

Molecular Characterization of FGFR1

The immunohistochemical expression of *FGFR1* was tested in 74 of 75 samples. Nonneoplastic cerebellum showed cytoplasmic staining only in Purkinje cells and was absent or faintly expressed in the nonneoplastic astrocytes (Fig. 2A, B). In tumor areas, cytoplasmic staining was detected in 51 (73.9%) of 69 primary tumors, regardless of the histologic pattern of the PA (Fig. 2C, D) and no nuclear staining was observed. Forty-nine cases (71%) had scores ≥ 3 , and 19 cases (27.5%) were completely negative. No association was found between *FGFR1* immunohistochemical staining with the presence of the *KIAA1549:BRAF* fusion ($p = 0.272$), or with *BRAF* point mutations ($p = 0.456$) (data not shown). No significant

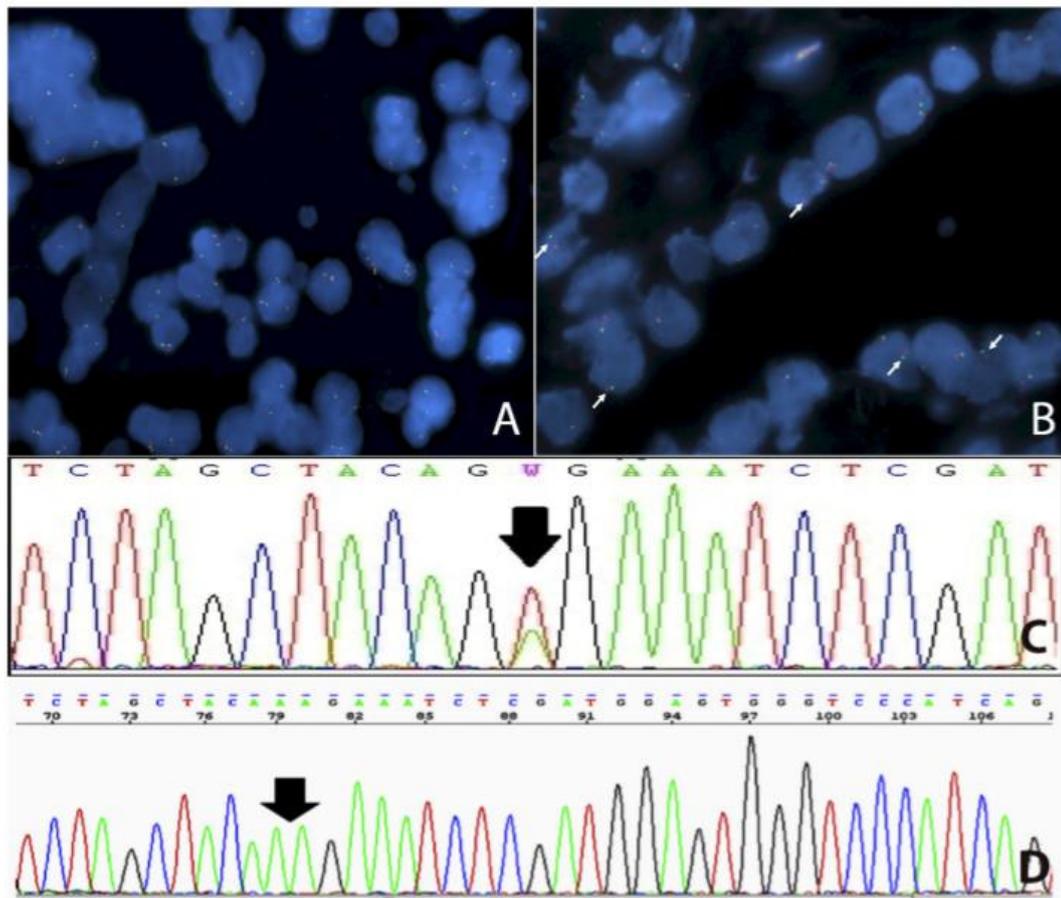


FIGURE 1. Molecular alterations in *BRAF*. (A, B) FISH assay for detection of *KIAA1549:BRAF* fusion showing a positive (A) and a negative (B) case (white arrows). (C, D) Point mutations detected by Sanger sequencing for V600E (C) and V600K (D).

TABLE 2. Clinical Features of Patients and Their Association with *BRAF* Changes

	(Total No. in the Series)	<i>KIAA1549:BRAF</i> Fusion		p	<i>BRAF</i> Point Mutation		p
		Positive	Negative		Wild Type	Mutated	
Sex	Female (31)	18	11	0.530	25	1	1.0
	Male (38)	19	16		21	1	
Age	≤19 years (60)	33	22	0.381	40	2	1.0
	≥20 years (09)	4	5		6	0	
NF1	Yes (05)	0	5	0.011	5	0	1.0
	No (64)	37	22		41	2	
Tumor location	Cerebellar (36)	27	6	<0.0001	27	1	1.0
	Extracerebellar (33)	10	21		19	1	
Outcome	Favorable (34)	22	16	0.987	26	1	1.0
	Unfavorable (35)	15	11		20	1	

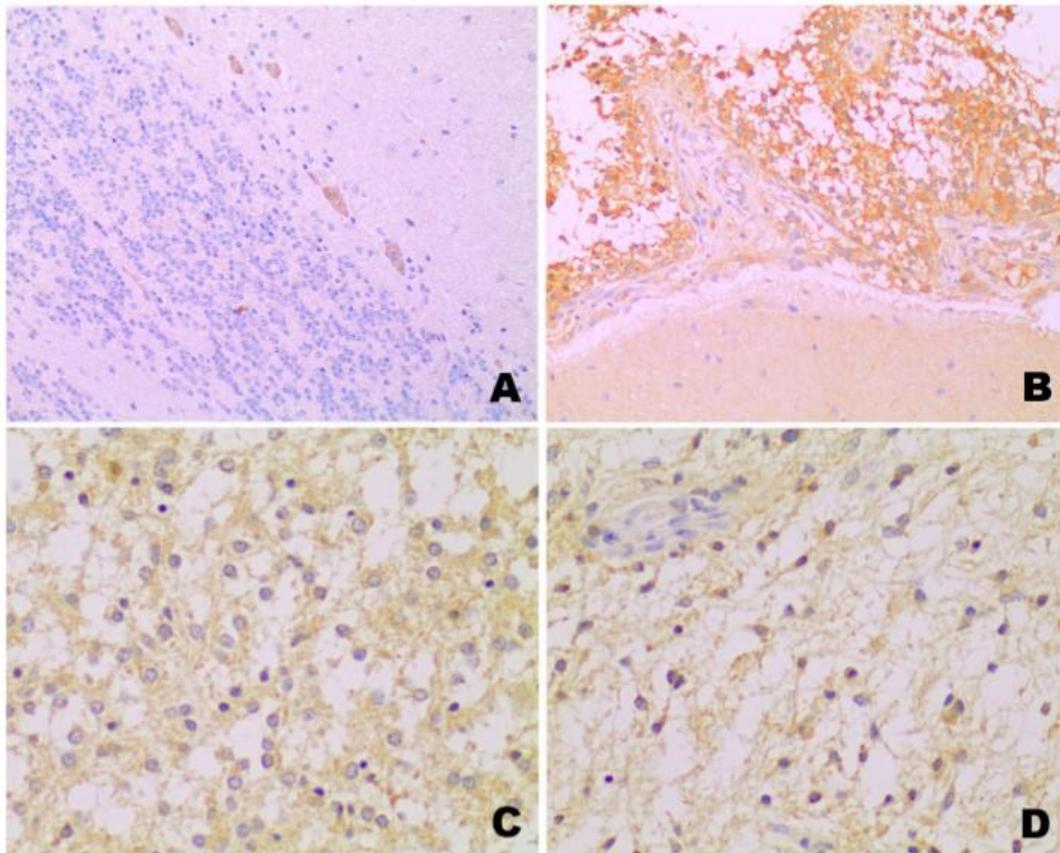


FIGURE 2. Immunohistochemical expression of FGFR1. **(A)** In normal cerebellum, expression is limited to Purkinje cells. **(B)** Neoplastic cells show overexpression when compared with nonneoplastic astrocytes (bottom). **(C)** Oligodendroglial pattern of PA, showing moderate FGFR1 expression. **(D)** Piloid pattern of PA with similar FGFR1 expression.

associations were seen between expression and clinical features of the patients (Table 3).

Sanger sequencing for *FGFR1* was performed in 45 (65.2%) of 69 primary lesions and in 5 of 5 relapsed lesions. Among primary lesions, 3 (6.7%) of 45 carried the p.K656E point mutation (Fig. 3A): an 18-year-old female (P32), a 3-year-old male (P21), and a 2-year-old female (P44) patient. All of these patients had cerebellar lesions (Tables 1 and 3). The older patient had recurrence of a completely resected lesion 8 months after the first surgery with cerebrospinal fluid dissemination despite adjuvant chemotherapy, and she died 21 months after the original surgery. On the other hand, the youngest patient had the best outcome of the subgroup (i.e. no evidence of disease after 9 years of follow-up), had a tumor that was also positive for the *KIAA1549:BRAF* fusion by FISH assay. No association was observed between *FGFR1* mutation and the patients' clinicopathologic characteristics

(Table 3) or FGFR protein expression ($p = 0.086$, data not shown), as 2 of the 3 mutated cases had positive scores and 1 had a negative immunohistochemical score.

The FISH assay for *FGFR1* was successful in 61 of the 69 primary lesions and in all 5 of the relapsed lesions; none showed gene amplification (Fig. 3B), but 7 (10.6%) of 66 cases had a low level of copy number gain (Fig. 3C), which was not statistically related to any clinical feature (Table 3). The patient who had a poor outcome (P32) had a concomitant *FGFR1* point mutation and low copy number gain of *FGFR1* by FISH. The association between low copy number gain of *FGFR1* and the immunohistochemical expression of FGFR1 was not significant ($p = 0.091$, data not shown).

Prognostic Role of *BRAF* and *FGFR1*

The Kaplan-Meier survival curves showed that the presence of *KIAA1549:BRAF* fusion was significantly associated

TABLE 3. Clinical Features of Patients and Their Association with *FGFR1* Changes

		<i>FGFR1</i> Expression			<i>FGFR1</i> leng			<i>FGFR1</i> Point Mutation		
		Positive	Negative	p	Positive	Negative	p	Wild Type	Mutated	p
Sex	Female	22	9	0.994	3	24	1.0	23	2	1.0
	Male	27	11		4	30		19	1	
Age	≤19 years	43	17	0.758	6	47	0.922	37	3	1.0
	≥20 years	6	3		1	7		5	0	
NF1	Yes	4	1	1.0	0	5	1.0	5	0	1.0
	No	45	19		7	49		37	3	
Tumor location	Cerebellar	27	9	0.446	5	26	0.425	24	3	0.264
	Extracerebellar	22	11		2	28		18	0	
Outcome	Favorable	22	12	0.255	2	33	0.125	25	2	1.0
	Unfavorable	27	8		5	21		17	1	

Legn, low copy number gain.

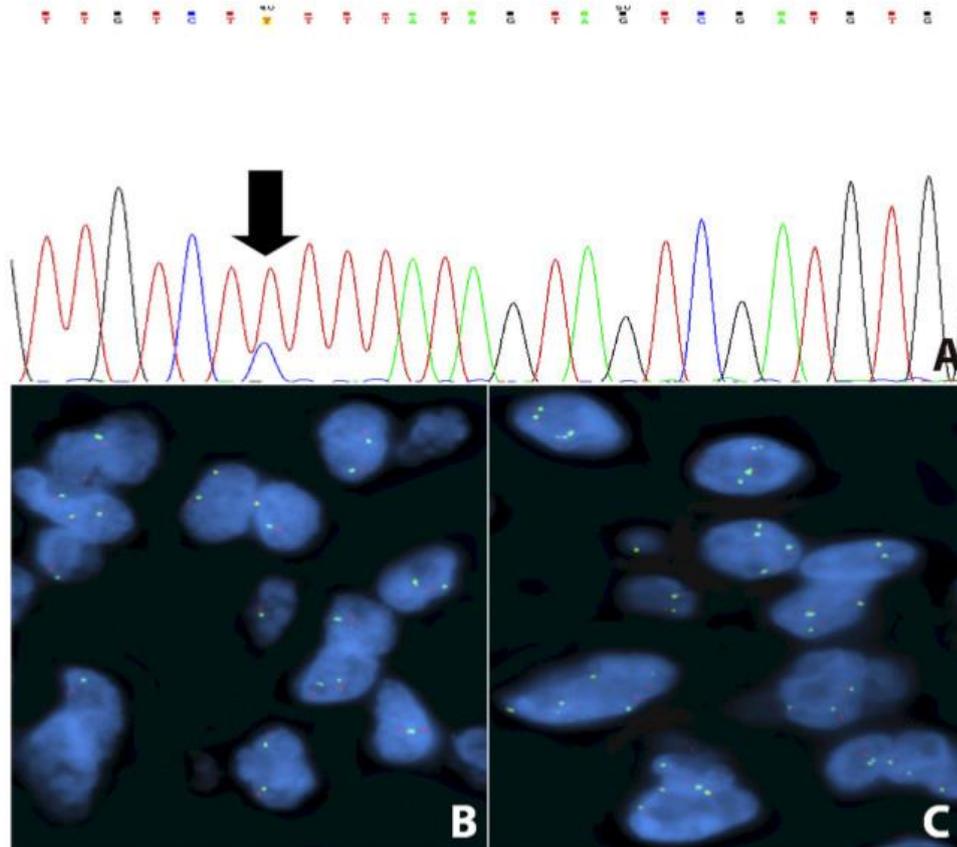


FIGURE 3. Molecular alterations of *FGFR1*. **(A)** Electropherogram showing the point mutation K656E. **(B, C)** FISH assay displaying a normal pattern **(B)**, and a case with low-copy number gain of the *FGFR1* signal **(C)**. The amount of *FGFR1* signals (green) did not reach the cutoff value needed for the diagnosis of gene amplification.

with patients' longer OS ($p = 0.009$) and EFS ($p = 0.018$) (Fig. 4A, B). *BRAF* point mutations were not associated with differences in the OS ($p = 0.527$), nor in the EFS ($p = 0.317$).

FGFR1 immunohistochemical expression and low copy number gain were not correlated with OS ($p = 0.103$) or EFS ($p = 0.923$). On the other hand, patients with the *FGFR1* p.K656E point mutation had significantly shorter OS ($p = 0.047$) and EFS ($p = 0.025$) when compared with patients with wild-type tumors (Fig. 4C, D).

Finally, we assessed the combined impact of *BRAF* and *FGFR1* alterations in patients OS and EFS. We found that patients with tumors positive for *KIAA1549:BRAF* fusion showed longer survival regardless of *FGFR1* status and FGFR1 immunohistochemical expression (Fig. 5A, B). Distinctively, among the tumors negative for *KIAA1549:BRAF* fusion, the ones with the *FGFR1* p.K656E point mutation had significantly worse prognosis ($p = 0.002$), whereas the overexpression of FGFR1 was related to a better prognosis ($p = 0.03$) (Fig. 5A, B).

DISCUSSION

We have shown in a series of 69 WHO grade I PAs that *KIAA1549:BRAF* fusions are present in most of the cases and that they are associated with better prognosis. In addition, we found that *FGFR1* is altered by oncogenic mutations in a small subset (~7%) of cases that were associated with an adverse outcome.

Despite the emergent interest in children's brain tumors, many studies have clustered PAs, diffuse astrocytomas (WHO grade II), and other neoplasms in a set of "low-grade gliomas" (16, 21, 23, 44–47). This has probably occurred because of the rarity of these brain tumors compared with the much more frequent adult tumors, such as glioblastoma (3). In addition, the studies tend to isolate adults from children (6, 8). As far as we are aware, this is the first study with a cohort composed exclusively of PAs, excluding the pilomyxoid astrocytoma variant of PA (WHO grade II), and comparing different age groups.

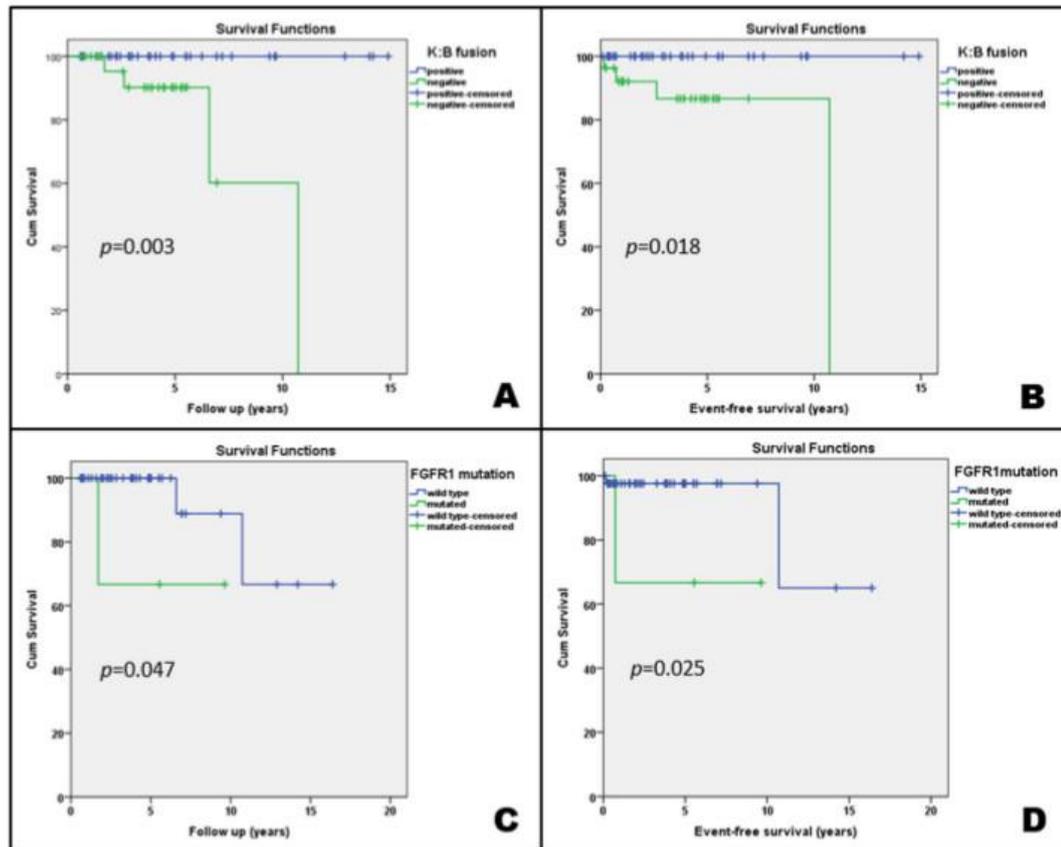


FIGURE 4. (A–D) Kaplan-Meier curves showing the impact of *KIAA1549:BRAF* (K:B) fusion (A, B) and *FGFR1* p.K656E point mutation (C, D) in the overall survival and event-free survival of the patients.

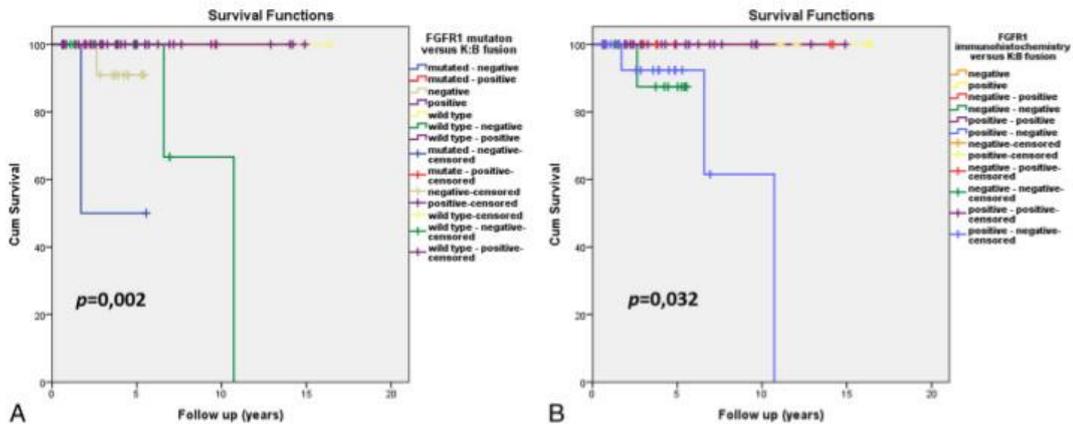


FIGURE 5. Kaplan-Meier curves comparing the simultaneous impact of *KIAA1549:BRAF* (*K:B*) fusion and *FGFR1* alterations on the overall survival of patients. **(A)** Impact of *FGFR1* p.K656E point mutation. **(B)** Impact of *FGFR1* expression assessed by immunohistochemistry (positive score ≥ 3 ; negative score ≤ 2).

Herein, we were able to evaluate gene fusions and point mutations in 67 of 69 cases and observed that nearly 60% of them had alterations in *BRAF* and/or *FGFR1*, which are triggers of the MAPK pathway, the dominant oncogenic pathway of PAs (15, 19). The high incidence of *KIAA1549:BRAF* fusion and its predominance in cerebellar lesions are in line with previous studies (7, 15, 16, 24, 26), confirming it as the most frequent molecular change of PAs (7). In addition, 2 of 5 tumors that harbored *BRAF* or *FGFR1* mutations had a coexisting *KIAA1549:BRAF* gene fusion. The occurrence of a concomitant *KIAA1549:BRAF* fusion and other changes in the same pathway is a rare occurrence, but it has been previously reported (7, 21, 26). Finally, the negative relationship between *KIAA1549:BRAF* fusions and clinical diagnosis of NF1 (thus with alterations in the *NF1* gene) has been previously reported (7). Further studies on *NF1* are necessary for a better understanding of this relationship.

The incidence of *BRAF* point mutations in our study (4.2%) is also similar to published data (22). The presence of this alteration did not show a clinical impact on prognosis, thereby confirming the previous findings of Bannykh et al, who showed that the *BRAF* V600E mutation did not imply higher aggressiveness to PAs (48). The usual p.V600E point mutation was detected only in an 11-year-old male patient who had an unstable hypothalamic lesion, which reinforces the occurrence of this mutation in extracerebellar lesions (7). Moreover, that patient also harbored the *KIAA1549:BRAF* fusion. We also observed 1 unusual *BRAF* point mutation in codon 600 of a cerebellar PA. The point mutation V600K was found in an 11-year-old female patient who had an excellent outcome after long follow-up (11.1 years). This mutation was previously described in 5% to 15% of melanomas and was related to metastatic disease and worse outcome (49–51); however, it has also been associated with a response to first-generation *BRAF* inhibitors (PLX4032, vemurafenib) (51). Patients with PAs have experienced adverse results after

treatment with vemurafenib (52), as opposed to the good response observed in patients with high-grade tumors (53, 54), probably because of the overall low frequency of p.V600E. Nevertheless, the subset of patients with *KIAA1549:BRAF* positive tumors could potentially benefit from treatment with the second-generation *BRAF* inhibitors such as PLX-PB3, which specifically target the fusion protein (52).

Most tumors in our series showed strong immunohistochemical *FGFR1* expression. These findings are in line with a previous study in gliomas, in which *FGFR1* overexpression was detected, although the underlying molecular mechanism was not explained at the time (55). Our FISH assays largely eliminated amplification as the underlying mechanism in the PAs, contrary to what is seen in a subset of breast and lung cancers (30, 31). *FGFR1* low copy number gain was rare and showed a nonstatistically significant trend toward immunohistochemical overexpression ($p = 0.094$, data not shown). The mutated form of *FGFR1* was also not associated with protein overexpression ($p = 1.0$).

With respect to the *FGFR1* mutation, we observed p.K656E point mutations at the tyrosine kinase domain in 6.7% of the PAs in this series, all of which were located in the cerebellum. The oncogenic *FGFR1* mutations, p.K656E and p.N456K, were recently described by Jones et al (15) as recurrent events in extracerebellar PAs. Those mutations were further described in rosette-forming glioneuronal tumor of the fourth ventricle, but 1 of the patients in that series had an earlier extracerebellar (diencephalic) PA with pilomyxoid features, which also harbored the p.K656E mutation (29).

FGFR1 is currently an attractive therapeutic target, and the immunohistochemical assessment of *FGFR1* may represent a good indicator of the management of PAs. Recent studies have related the efficacy of novel specific *FGFR1* inhibitors, such as ponatinib (AP 24534), in cases of lung cancer with *FGFR1* overexpression that were assessed by immunoblotting and mRNA quantification (56). Besides this drug, other

FGFR1 inhibitors, such as lucitanib (57) and CH5183284/Debio 1347 (58), may constitute future alternatives for the treatment of inoperable PAs. Nevertheless, further preclinical and clinical studies are needed to determine whether FGFR1 expression and hotspot mutations will modulate and predict patient response to these FGFR1-specific tyrosine inhibitors.

Concomitant *KIAA1549:BRAF* fusion and *FGFR1* mutations were not referred events in the study of Jones et al (15), but this was detected in 1 of the patients of our series. We further evaluated the impact of both the aforementioned alterations in the prognosis of the patients. The *KIAA1549:BRAF* fusion had a positive impact on patients' OS and EFS and was confirmed as a prognostic factor, corroborating the tendency to better outcome of PAs, similar to what happens in the complex group of low-grade gliomas described by Hawkins et al (21).

On the other hand, *FGFR1* mutations were significantly related to PA patients' shorter OS and EFS when compared with the wild-type group; however, the significance of this finding needs to be confirmed in larger series. To our knowledge, this the first study to indicate the prognostic role of *FGFR1* mutation in PAs and their occurrence in cerebellar lesions.

In conclusion, we confirmed the pivotal role of *KIAA1549:BRAF* fusion and, to a lesser extent, of *FGFR1* in MAPK activation in PAs. More exactly, we showed the usefulness of evaluating the *KIAA1549:BRAF* fusion as a prognostic biomarker, while *FGFR1* mutation may be a relevant prognostic marker in PAs. With further investigation, the molecular changes of *BRAF* and *FGFR1* may constitute potential therapeutic targets for inoperable or recurrent PAs.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Nathalia Campanella for the help in picture editing.

REFERENCES

- Scheithauer BW, Hawkins C, Tihan T, et al. Pilocytic astrocytoma. In: David N, Louis MD, Hiroko Ohgaki PD, Otmar D, Wiestler MD, Webster K, Cavenee PD, editors. *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. World Health Organization Classification of Tumours*. Lyon, France: IARC Press, 2007:13–21
- Ward E, DeSantis C, Robbins A, et al. Childhood and adolescent cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* 2014;64:83–103
- Dolecek TA, Propp JM, Stroup NE, et al. 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
- Camargo Bd, Felipe CFP, Noronha CP, et al. *Câncer na criança e no adolescente no Brasil dados dos registros de base populacional e de mortalidade*. Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Câncer, 2008
- Rosemberg S, Fujiwara D. Epidemiology of pediatric tumors of the nervous system according to the WHO 2000 classification: a report of 1,195 cases from a single institution. *Child Nerv Sys* 2005;21:940–4
- Theeler BJ, Ellezani B, Sadighi ZS, et al. Adult pilocytic astrocytomas: clinical features and molecular analysis. *Neuro Oncol* 2014 2014;16:841–7. doi: 10.1093/neuonc/not246
- Jones DT, Gronych J, Lichter P, et al. MAPK pathway activation in pilocytic astrocytoma. *Cell Molec Life Sci* 2012;69:1799–811
- Johnson DR, Brown PD, Galanis E, et al. Pilocytic astrocytoma survival in adults: analysis of the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program of the National Cancer Institute. *J Neuro-oncol* 2012;108:187–93
- Gutmann DH, McLellan MD, Hussain I, et al. Somatic neurofibromatosis type 1 (NF1) inactivation characterizes NF1-associated pilocytic astrocytoma. *Genome Res* 2013;23:431–9
- Rodríguez FJ, Perry A, Gutmann DH, et al. Gliomas in neurofibromatosis type 1: a clinicopathologic study of 100 patients. *J Neuropathol Exp Neurol* 2008;67:240–9
- Listernick R, Charrow J, Gutmann DH. Intracranial gliomas in neurofibromatosis type 1. *Am J Med Gen* 1999;89:38–44
- Tada K, Kochi M, Saya H, et al. Preliminary observations on genetic alterations in pilocytic astrocytomas associated with neurofibromatosis 1. *Neuro Oncol* 2003;5:228–34
- Dhanasekaran DN, Johnson GL. MAPKs: function, regulation, role in cancer and therapeutic targeting. *Oncogene* 2007;26:3097–9
- Murphy T, Hori S, Sewell J, et al. Expression and functional role of negative signalling regulators in tumour development and progression. *Int J Cancer* 2010;127:2491–9
- Jones DT, Hutter B, Jager N, et al. Recurrent somatic alterations of *FGFR1* and *NTRK2* in pilocytic astrocytoma. *Nature Gen* 2013;45:927–32
- Zhang J, Wu G, Miller CP, et al. Whole-genome sequencing identifies genetic alterations in pediatric low-grade gliomas. *Nature Gen* 2013;45:602–12
- Bar EE, Lin A, Tihan T, et al. Frequent gains at chromosome 7q34 involving *BRAF* in pilocytic astrocytoma. *J Neuropathol Exp Neurol* 2008;67:878–87
- Capper D, Preusser M, Habel A, et al. Assessment of *BRAF* V600E mutation status by immunohistochemistry with a mutation-specific monoclonal antibody. *Acta Neuropathol* 2011;122:11–9
- Forshev T, Tatevosian RG, Lawson AR, et al. Activation of the ERK/MAPK pathway: a signature genetic defect in posterior fossa pilocytic astrocytomas. *J Pathol* 2009;218:172–81
- Hasselblatt M, Riesmeier B, Lechtape B, et al. *BRAF-KIAA1549* fusion transcripts are less frequent in pilocytic astrocytomas diagnosed in adults. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2011;37:803–6
- Hawkins C, Walker E, Mohamed N, et al. *BRAF-KIAA1549* fusion predicts better clinical outcome in pediatric low-grade astrocytoma. *Clin Cancer Res* 2011;17:4790–8
- Schindler G, Capper D, Meyer J, et al. Analysis of *BRAF* V600E mutation in 1,320 nervous system tumors reveals high mutation frequencies in pleomorphic xanthoastrocytoma, ganglioglioma and extra-cerebellar pilocytic astrocytoma. *Acta Neuropathol* 2011;121:397–405
- Tian Y, Rich BE, Vena N, et al. Detection of *KIAA1549-BRAF* fusion transcripts in formalin-fixed paraffin-embedded pediatric low-grade gliomas. *J Molec Diag* 2011;13:669–77
- Jones DT, Kocalkowski S, Liu L, et al. Oncogenic *RAF1* rearrangement and a novel *BRAF* mutation as alternatives to *KIAA1549-BRAF* fusion in activating the MAPK pathway in pilocytic astrocytoma. *Oncogene* 2009;28:2119–23
- Roth JJ, Santi M, Pollock AN, et al. Chromosome band 7q34 deletions resulting in *KIAA1549-BRAF* and *FAM131B-BRAF* fusions in pediatric low-grade gliomas. *Brain Pathol* 2015;25:182–92
- Cin H, Meyer C, Herr R, et al. Oncogenic *FAM131B-BRAF* fusion resulting from 7q34 deletion comprises an alternative mechanism of MAPK pathway activation in pilocytic astrocytoma. *Acta Neuropathol* 2011;121:763–74
- Chen YH, Gutmann DH. The molecular and cell biology of pediatric low-grade gliomas. *Oncogene* 2014;33:2019–26
- Basto D, Trovisco V, Lopes JM, et al. Mutation analysis of B-RAF gene in human gliomas. *Acta Neuropathol* 2005;109:207–10
- Gessi M, Moneim YA, Hammes J, et al. *FGFR1* mutations in rosette-forming glioneuronal tumors of the fourth ventricle. *J Neuropathol Exp Neurol* 2014;73:580–4
- Dutt A, Ramos AH, Hammerman PS, et al. Inhibitor-sensitive *FGFR1* amplification in human non-small cell lung cancer. *PLoS One* 2011;6:e20351
- Theillet C, Adelaide J, Louason G, et al. *FGFR1* and *PLAT* genes and DNA amplification at 8p12 in breast and ovarian cancers. *Genes Chromosome Cancer* 1993;7:219–26
- Singh D, Chan JM, Zoppoli P, et al. Transforming fusions of *FGFR* and *TACC* genes in human glioblastoma. *Science* 2012;337:1231–5
- Colin C, Padovani L, Chappe C, et al. Outcome analysis of childhood pilocytic astrocytomas: a retrospective study of 148 cases at a single institution. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2013;39:693–705
- Fernandez C, Figarella-Branger D, Girard N, et al. Pilocytic astrocytomas in children: prognostic factors—a retrospective study of 80 cases. *Neurosurgery* 2003;53:544–53; discussion 54–5

35. Paixao Becker A, de Oliveira RS, Saggioro FP, et al. In pursuit of prognostic factors in children with pilocytic astrocytomas. *Childs Nerv Syst* 2010;26:19–28
36. Schneider JH Jr, Raffel C, McComb JG. Benign cerebellar astrocytomas of childhood. *Neurosurgery* 1992;30:58–62; discussion 3
37. Capper D, Weissert S, Balss J, et al. Characterization of R132H mutation-specific IDH1 antibody binding in brain tumors. *Brain Pathol* 2010;20:245–54
38. Mellai M, Piazzini A, Caldera V, et al. IDH1 and IDH2 mutations, immunohistochemistry and associations in a series of brain tumors. *J Neuro-oncol* 2011;105:345–57
39. Pinto F, Pertega-Gomes N, Pereira MS, et al. T-box transcription factor brachyury is associated with prostate cancer progression and aggressiveness. *Clinical Cancer Res* 2014;20:4949–61
40. Toschi L, Finocchiaro G, Nguyen TT, et al. Increased SOX2 gene copy number is associated with FGFR1 and PIK3CA gene gain in non-small cell lung cancer and predicts improved survival in early stage disease. *PLoS One* 2014;9:e95303
41. Aisner DL, Nguyen TT, Paskulin DD, et al. ROS1 and ALK fusions in colorectal cancer, with evidence of intratumoral heterogeneity for molecular drivers. *Molec Cancer Res* 2014;12:111–8
42. Schultheis AM, Bos M, Schmitz K, et al. Fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) amplification is a potential therapeutic target in small-cell lung cancer. *Mod Pathol* 2014;27:214–21
43. Yamane LS, Scapulatempo-Neto C, Alvarenga L, et al. KRAS and BRAF mutations and MSI status in precursor lesions of colorectal cancer detected by colonoscopy. *Oncology Rep* 2014;32:1419–26
44. Bhattacharjee MB, Armstrong DD, Vogel H, et al. Cytogenetic analysis of 120 primary pediatric brain tumors and literature review. *Cancer Gen Cytogen* 1997;97:39–53
45. Bigner SH, McLendon RE, Fuchs H, et al. Chromosomal characteristics of childhood brain tumors. *Cancer Gen Cytogen* 1997;97:125–34
46. Pfister S, Janzarik WG, Remke M, et al. BRAF gene duplication constitutes a mechanism of MAPK pathway activation in low-grade astrocytomas. *J Clin Invest* 2008;118:1739–49
47. Sievert AJ, Jackson EM, Gai X, et al. Duplication of 7q34 in pediatric low-grade astrocytomas detected by high-density single-nucleotide polymorphism-based genotype arrays results in a novel BRAF fusion gene. *Brain Pathol* 2009;19:449–58
48. Bannykh SI, Mirocha J, Nuno M, et al. V600E BRAF mutation in pilocytic astrocytoma is associated with a more diffuse growth pattern but does not confer a more aggressive clinical behavior. *Clin Neuropathol* 2014;33:388–98
49. El-Osta H, Falchook G, Tsimberidou A, et al. BRAF mutations in advanced cancers: clinical characteristics and outcomes. *PLoS One* 2011;6:e25806
50. Menzies AM, Haydu LE, Visintin L, et al. Distinguishing clinicopathologic features of patients with V600E and V600K BRAF-mutant metastatic melanoma. *Clinical Cancer Res* 2012;18:3242–9
51. Rubinstein JC, Sznol M, Pavlick AC, et al. Incidence of the V600K mutation among melanoma patients with BRAF mutations, and potential therapeutic response to the specific BRAF inhibitor PLX4032. *J Transl Med* 2010;8:67
52. Sievert AJ, Lang SS, Boucher KL, et al. Paradoxical activation and RAF inhibitor resistance of BRAF protein kinase fusions characterizing pediatric astrocytomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110:5957–62
53. Bautista F, Paci A, Minard-Colin V, et al. Vemurafenib in pediatric patients with BRAF V600E mutated high-grade gliomas. *Ped Blood Cancer* 2014;61:1101–3
54. Robinson GW, Orr BA, Gajjar A. Complete clinical regression of a BRAF V600E-mutant pediatric glioblastoma multiforme after BRAF inhibitor therapy. *BMC Cancer* 2014;14:258
55. Ueba T, Takahashi JA, Fukumoto M, et al. Expression of fibroblast growth factor receptor-1 in human glioma and meningioma tissues. *Neurosurgery* 1994;34:221–5; discussion 5–6
56. Wynes MW, Hinz TK, Gao D, et al. FGFR1 mRNA and protein expression, not gene copy number, predict FGFR TKI sensitivity across all lung cancer histologies. *Clin Cancer Res* 2014;20:3299–309
57. Soria JC, DeBraud F, Bahleda R, et al. Phase I/IIa study evaluating the safety, efficacy, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of lucitanib in advanced solid tumors. *Ann Oncol* 2014;25:2244–51
58. Nakanishi Y, Akiyama N, Tsukaguchi T, et al. The fibroblast growth factor receptor genetic status as a potential predictor of the sensitivity to CH5183284/Debio 1347, a novel selective FGFR inhibitor. *Molec Cancer Ther* 2014;13:2547–58