

Universidade Federal de Minas Gerais

Faculdade de Medicina

LUCÉLIA COIMBRA DA SILVA

ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO E MOLECULAR DE GLIOMAS

Belo Horizonte

2014

LUCÉLIA COIMBRA DA SILVA

ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO E MOLECULAR DE GLIOMAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas Farmacologia Bioquímica e Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Armando De Marco

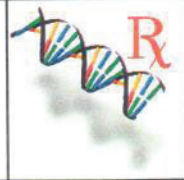
Belo Horizonte

2014

S586e Silva, Lucélia Coimbra da.
Estudo imuno-histoquímico e molecular de gliomas [manuscrito]. /
Lucélia Coimbra da Silva. - - Belo Horizonte: 2014.
81f.: il.
Orientador: Luiz Armando De Marco.
Área de concentração: Medicina Molecular.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de
Medicina.

1. Glioma. 2. Imuno-Histoquímica. 3. Fator de Crescimento
Transformador beta. 4. Mutação. 5. Dissertações Acadêmicas. I. De Marco,
Luiz Armando. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de
Medicina. III. Título.

NLM: QZ 380



ATA DA DEFESA DE TESE DA ALUNA LUCÉLIA COIMBRA DA SILVA - 2010717125

Realizou-se, no dia 28 de fevereiro de 2014, às 14:30 horas, faculdade de medicina, sala 029, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de tese, intitulada *ESTUDO MOLECULAR E IMUNO-HISTOQUÍMICO DE GLIOMAS*, apresentada por LUCÉLIA COIMBRA DA SILVA, número de registro 2010717125, graduada no curso de Medicina Veterinária, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em Ciências Biológicas: Farmacologia Bioquímica e Molecular, à seguinte Comissão Examinadora: Prof. Luiz Armando Cunha De Marco (UFMG) – presidente da banca, Prof.^a Débora Marques de Miranda (UFMG), Prof.^a Carolina Cavalieri Gomes (UFMG), Prof(a). Daniele Valadão Freitas Rosa, Prof. Alexandre Guimarães de Almeida Barros (SCBH).

A Comissão considerou a tese:

- Aprovada
 Aprovada condicionalmente, sujeita a alterações, conforme folha de modificações, anexa
 Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.


Belo Horizonte, 28 de fevereiro de 2014.


Prof. Luiz Armando Cunha De Marco (UFMG)
Orientador


Prof.^a Débora Marques de Miranda (UFMG)


Prof.^a Carolina Cavalieri Gomes (UFMG)

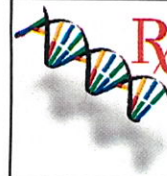

Prof.^a Daniela Valadão Freitas Rosa


Prof. Alexandre Guimarães de Almeida Barros (SCBH)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR



FOLHA DE APROVAÇÃO

ESTUDO MOLECULAR E IMUNO-HISTOQUÍMICO DE GLIOMAS

LUCÉLIA COIMBRA DA SILVA

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia Bioquímica e Molecular, como requisito para obtenção do grau de Doutora em Ciências Biológicas: Farmacologia Bioquímica e Molecular - área de concentração Farmacologia Bioquímica e Molecular.

Aprovada em 28 de fevereiro de 2014, pela banca constituída pelos membros:

Prof. Luiz Armando Cunha De Marco (UFMG)

Prof.^a Débora Marques de Miranda (UFMG)

Prof.^a Carolina Cavalieri Gomes (UFMG)

Prof.^a Daniela Valadão Freitas Rosa

Prof. Alexandre Guimarães de Almeida Barros (SCBH)

Belo Horizonte, 28 de fevereiro de 2014.

DEDICATÓRIA

Dedico essa tese à memória
de minha mãe, que adorava
dizer que a filha seria doutora...

" O adversário mais difícil de ser vencido é você mesmo."

"A ostra, para fazer uma pérola, precisa ter dentro de si um grão de areia que a faça sofrer. Sofrendo, a ostra diz para si mesma:

'Preciso envolver essa areia pontuda que me machuca com uma esfera lisa que lhe tire as pontas...'

Ostras felizes não fazem pérolas...

Pessoas felizes não sentem a necessidade de criar. O ato criador, seja na ciência ou na arte, surge sempre de uma dor, Não é preciso que seja uma dor doída...Por vezes a dor aparece como aquela coceira que tem o nome de curiosidade.

(RUBEM ALVES)

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Luiz Armando de Marco, por ter me aceito com prontidão em seu laboratório e pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

À professora Paula Vidigal, pela ajuda e contribuição essenciais na construção desse trabalho.

À professora Débora Marques de Miranda pelas sugestões valiosas durante e após o meu processo de qualificação.

Ao professor Marcelo Magaldi, pela contribuição no fornecimento das amostras.

Às técnicas do departamento de histopatologia da UFMG, pelo auxílio na busca de blocos de parafina e laudos histopatológicos. Especialmente à técnica Fernanda pela disponibilidade e calma nas horas de sufoco.

A todas as garotas do laboratório, Cristina Sábado, Nayra Soares, Helena Sarubi, Mariana Rossete, Franciele Bianchi e Renalice Vieira, pela ajuda técnica e principalmente emocional nos momentos decisivos da minha trajetória. Conviver com vocês tornou os dias mais alegres e divertidos. Especialmente à Patrícia Couto, Flávia Melo e Nancy Binda.

À Luciana Bastos Rodrigues pela experiência pessoal, profissional e científica compartilhada.

Aos colegas da Medicina Molecular pelas palavras de incentivo e troca de experiências.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por ter me propiciado essa oportunidade.

À Ariadna, por me ajudar, através de palavras dóceis, a enxergar o melhor caminho a ser seguido.

À minha família, Ludimila Coimbra, Alexandre Luiz Candeia, Walter Clério e Francine Campolina e aos meus amigos, pelo apoio, amor e convivência.

Ao Rodrigo Pontes, por sempre se fazer presente, pelas correções, interesse em me ouvir e partilhar cada detalhe desse trabalho e da minha vida. Por me ajudar a agir nos momentos certos e determinantes para a conclusão dessa etapa.

À minha mãe que partiu durante essa etapa da minha vida, mas o que me ensinou durante trinta anos sempre permanecerá em mim e foi quem me permitiu chegar até aqui.

Ao meu pai, por descobrir que sempre é tempo para amar.

A Deus, por me dar vida, saúde e principalmente, oportunidade de crescimento ao errar e acertar através das experiências vivenciadas e dificuldades encontradas.

Tenho plena certeza que sem a contribuição de cada uma das pessoas citadas, não seria possível a concretização desse trabalho.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Tumores do Sistema Nervoso Central	13
1.1.2 Incidência de tumores do SNC	13
1.1.3 Gliomas	14
1.2 Justificativa	30
2. OBJETIVOS.....	32
2.1. Objetivo geral.....	32
2.2. Objetivos específicos	32
3. PACIENTES E MÉTODOS	33
3.1. Pacientes.....	33
3.1.2. Dados clínicos e anátomo-patológicos	33
3.1.3. Revisão histopatológica.....	33
3.1.4. Coleta das amostras	33
3.2. Estudo molecular	34
3.2.1. Extração de DNA de tecido fresco.....	34
3.2.2 Extração de DNA de material incluído em parafina	34
3.2.3. Amplificação e seqüenciamento das amostras.....	34
3.3. Imuno-histoquímica.....	36
3.3.1. <i>PTEN</i> , <i>BRAF</i> , <i>TβRII</i> e <i>Ki-67</i>	36
3.3.2 Avaliação dos resultados de imuno-histoquímica	37
3.4. Análise estatística	38
4. RESULTADOS	39
4.1 Características clínicas dos pacientes	39
4.2 Análise de sequenciamento	41
4.2.1 <i>PTEN</i>	41
4.2.2 <i>BRAF</i>	42
4.2.3 <i>KRAS</i>	42
4.2.4 <i>IDH1</i> e <i>IDH2</i>	42
4.3 Achados imunoistoquímicos	44
4.3.1 Associação do grau histológico com a proliferação celular (Ki-67)	44
4.3.2 <i>PTEN</i>	46

4.3.3 BRAF	48
4.3.4 TGF- β	51
5. DISCUSSÃO.....	55
6- CONCLUSÕES	66
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µl microlitro

µM micromolar

AFIP Patologia das Forças Armadas Americanas

BCPCs células de propagação do câncer (cancer stem cell-like)

BRAF “V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1”

CBTRUS Centro de Registro de Tumores Cerebrais dos Estados Unidos

CTN células tronco neurais

DMV Densidade micro-vascular

DNA Ácido desoxirribonucleico

dNTPs “Deoxyribonucleotide triphosphate”; termo genérico que define os quatro deoxiribonucleotídeos (dATP, dGTP, dTTP, dCTP)

EDTA Ácido etileno di-amino tetra-acético (*ethylenediaminetetraacetic acid*)

EGFR Receptor do fator de crescimento epidérmico (Epidermal Growth Factor Receptor)

GAPs “GTPase activating proteins”

GBM Glioblastoma multiforme

GDP Guanosina-difosfato

GEFs “Guanine nucleotide exchange factors”

GTP Guanosina-trifosfato

HE Hematoxilina-Eosina

HRAS “V-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog”

IDH gene isocitrato desidrogenase

IDH1 gene isocitrato desidrogenase codificador da enzima citosólica 1

IDH2 gene isocitrato desidrogenase 2

INCA Instituto Nacional do Cancer

KRAS “V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog”

LOH Perda de heterozigose

M Molar

MEC matriz extracelular

MMP2 Metaloprotease 2

MMP3 Metaloprotease 3

MMP9 Metaloprotease 9

mg miligramas

MgCl₂ Cloreto de Magnésio

ml mililitro

mM miliMolar

MMAC “Mutated in multiple advanced cancers”

NaCl Cloreto de Sódio

NRAS “Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog”

OMS Organização Mundial da Saúde

PBS Tampão salino fosfatado (“phosphate buffered saline”)

PCR Reação em cadeia da polimerase (“*Polymerase chain reaction*”) PI3K

“Phosphatidylinositol 3 kinase”

PIP2 Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato

PIP3 Fosfatidilinositol-3,4,5 trifosfato

PTEN “Phosphatase and tensin homolog”

ROS Espécies reativas do oxigênio

SDS “Sodium dodecyl sulfate”

SNC (Sistema Nervoso Central)

SNP “Single-Nucleotide Polymorphism”

TBE Tris Base EDTA

TE Tampão Tris-EDTA

TβRI Receptor de TGF-β do tipo I

TβRII Receptor de TGF-β do tipo II

TGF-β Fator de crescimento transformante beta (Transforming growth factor beta)

TK Tirosina quinase

TNF-α Fator de necrose tumoral alfa

Tp53 Proteína 53

VEGF Receptor do fator crescimento endotelial vascular

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características de amplificação por PCR dos genes estudados	35
Tabela 2: Anticorpos primários utilizados para a imuno-histoquímica, com respectivas diluições, soluções de recuperação antigênica e controles positivos utilizados	37
Tabela 3: Classificação histológica e graduação tumoral dos pacientes com gliomas	39
Tabela 4: Características clínicas dos pacientes portadores de gliomas.....	40
Tabela 5: Percentagem da expressão de BRAF de acordo com a graduação histológica de gliomas.....	49

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1: Diferenciação normal do SNC e início da formação tumoral.	15
Figura 2: Células de origem, tipos e subtipos de gliomas com sua respectiva classificação da OMS.	19
Figura 3: Transdução de sinal de TGF- β	25
Figura 4: Representação gráfica da graduação histológica dos tumores	40
Figura 5: Representação gráfica da distribuição quanto à raça de pacientes com gliomas.....	41
Figura 6: Eletroferograma mostrando a mutação G1937A no exon 6 de <i>PTEN</i>	42
Figura 7: Eletroferograma mostrando a mutação missense p.R132H (rs121913500) em heterozigose no exon 4 de <i>IDH1</i>	43
Figura 8: Eletroferogramas representativos do polimorfismo (CTG> CTC) na posição L143L (rs144712130) no exon 4 de <i>IDH2</i>	43
Figura 9: Associação da expressão da proteína <i>Ki-67</i> em gliomas com o grau de malignidade histológica.....	44
Figura 10: Fotomicrografia de glioblastoma multiforme e expressão da proteína <i>Ki-67</i> em 40% dos núcleos.....	45
Figura 11: Fotomicrografia de glioblastoma multiforme demonstrando a expressão da proteína <i>Ki-67</i> em 50% dos núcleos.	45
Figura 12: Representação gráfica da expressão de <i>PTEN</i> em relação à graduação histológica de gliomas.....	46
Figura 13: Fotomicrografia demonstrando expressão fracamente positiva de <i>PTEN</i> em oligodendroglioma (GRAU II).	47
Figura 14: Fotomicrografia demonstrando expressão moderadamente positiva de <i>PTEN</i> em glioma de baixo grau.	47
Figura 15: Fotomicrografia demonstrando expressão fortemente positiva de <i>PTEN</i> em glioma de baixo grau. Notar núcleos marcados de coloração marrom escura (aumento de 400X).	48
Figura 16: Representação gráfica da expressão de <i>BRAF</i> em relação à graduação histológica de gliomas.....	49
Figura 17: Fotomicrografia demonstrando expressão fortemente positiva de <i>BRAF</i> em GBM (GRAU IV).	50
Figura 18: Fotomicrografia demonstrando expressão moderadamente positiva de <i>BRAF</i> em GBM (GRAU IV).	50
Figura 19: Representação gráfica da expressão de T β RII em gliomas em relação aos tecidos normais.....	51

Figura 20: Representação gráfica da expressão de TβRII em relação à graduação histológica de gliomas.....	52
Figura 21: Representação gráfica da expressão de TβRII em relação à graduação histológica de gliomas.....	52
Figura 22: Fotomicrografia demonstrando ausência de expressão de TβRII em tecido normal.	53
Figura 23: Fotomicrografia demonstrando expressão de TβRII em GBM (GRAU IV)..	53
Figura 24: Fotomicrografia demonstrando expressão fortemente positiva de TβRII em GBM (GRAU IV).	54

RESUMO

Os gliomas são os tumores cerebrais primários mais frequentes, representando mais de 70% de todas as neoplasias primárias do SNC. São neoplasias histologicamente heterogêneas e classificadas pela Organização Mundial de Saúde em diferentes graus, de acordo com suas características celulares e sua capacidade de invasão. Os astrocitomas, oligodendrogliomas e os tumores de células endimárias representam os tipos de gliomas. Em gliomas ocorrem alterações de diferentes vias de sinalização e a partir do conhecimento dessas alterações poderão ser estabelecidas formas de diagnóstico desses tumores; bem como poderá ser feito um melhor prognóstico. Além disso, essas vias de sinalização são importantes como potenciais alvos terapêuticos. As alterações moleculares presentes nos diversos tipos e subtipos de gliomas podem ser diferentes, sendo importante para o conhecimento da doença e podendo ser útil para o diagnóstico. Assim, estudamos no presente trabalho, por métodos moleculares e imuno-histoquímicos, a frequência de polimorfismos e mutações em *PTEN*, *KRAS*, *BRAF*, *IDH1* e *IDH2* e a expressão de *PTEN*, *BRAF*, *TGF-β* e *Ki-67* em associação com as características clínicas de 38 pacientes com gliomas. Na análise de sequenciamento, detectamos uma mutação silenciosa em *PTEN* em uma paciente portadora de glioblastoma multiforme e a mutação R132H em *IDH1* em um paciente portador de astrocitoma de baixo grau. Nos demais genes avaliados, não detectamos mutações ou polimorfismos. Encontramos diferença significativa entre a maior expressão de *Ki-67* nos tumores de alto grau quando comparados aos tumores de baixo grau, bem como, superexpressão de *BRAF* nos gliomas de grau II e IV, quando comparados aos gliomas de grau I. Na análise de expressão do receptor de *TGF-β* II, observamos expressão aumentada da proteína nos gliomas em comparação aos tecidos normais. Tanto em *TβRII* quanto em *PTEN*, não observamos correlação entre a expressão e o estadiamento de gliomas. Nossos dados demonstram que gliomas apresentam superexpressão de *BRAF*, independente da presença da mutação *BRAFV600E*. A alteração de expressão entre os graus pode estar associada a progressão maligna desses tumores. Gliomas apresentam expressão aumentada de *TβRII*, independente do grau histológico dos tumores, indicando um papel da via de *TGF-β* na patogênese dos gliomas. A associação da expressão de *PTEN* e gliomas não pode ser demonstrada. Não detectamos alterações nos genes *KRAS* e *BRAF*, entretanto não podemos descartar a importância de tais genes na formação dos gliomas. Estudos com números maiores de amostras de gliomas com o mesmo estadiamento tumoral são necessários para avaliar a influência de *PTEN*, *KRAS* e *BRAF* na formação e progressão de gliomas.

ABSTRACT

Gliomas are the most common primary brain tumor, accounting for over 70% of all primary CNS neoplasms. They are histologically heterogeneous tumors and classified by the World Health Organization to varying degrees, according to their cellular characteristics and its invasiveness. The astrocytomas, oligodendrogliomas and ependymal cell tumors represent the types of gliomas. In gliomas, changes occur in different signaling pathways and from the knowledge of such changes it may be established ways of diagnosis of these tumors; and a better prognosis can be made. Moreover, these signaling pathways are important as potential therapeutic targets. The molecular alterations present in various types and subtypes of gliomas may be different, and it is important for the understanding of the disease and may be useful for diagnosis. Thus, we studied in this work, molecular and immunohistochemical methods, the frequency of polymorphisms and mutations in PTEN, KRAS, BRAF, IDH1 and IDH2 and the expression of PTEN, BRAF, TGF- β and Ki-67 in association with clinical features of 38 patients with glioma. In sequence analysis, we detected a silent mutation in PTEN in a patient with glioblastoma multiforme, and the R132H mutation in IDH1 in a patient with low-grade astrocytoma. In the remaining genes, we did not detect mutations or polymorphisms. We found a significant difference between the highest Ki-67 expression in high grade tumors compared to low grade tumors, as well as overexpression in BRAF II and grade IV gliomas, when compared to the I grade gliomas. In expression analysis TGF- β II receptor, increased expression of the protein observed in the glioma compared to normal tissues. Both T β RII as in PTEN, we found no correlation between the expression and the stages of gliomas. Our data demonstrate that gliomas have superexpression of BRAF, regardless of the presence of BRAFV600E mutation. The change in expression between grades may be associated with malignant progression of these tumors. Gliomas have increased expression of T β RII, irrespective of the histological grade of the tumors, suggesting a role for TGF- β pathway in the pathogenesis of gliomas. The association of PTEN expression and gliomas can not be demonstrated. We did not detect changes in the KRAS and BRAF genes, but we can not rule out the importance of these genes in the formation of gliomas. Studies with larger numbers of samples of gliomas with the same tumor stages are needed to assess the influence of PTEN, KRAS and BRAF in the formation and progression of gliomas.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Tumores do Sistema Nervoso Central

Os tumores do Sistema Nervoso Central (SNC) são representados por um grupo heterogêneo de neoplasias benignas e malignas, incluindo gliomas, meningiomas, meduloblastomas, schwannomas, craniofaringiomas e gangliogliomas.

As características e complexidade desse sistema dificultam o tratamento dos processos neoplásicos, sendo a sobrevida média dos pacientes curta, apesar de serem utilizadas terapias agressivas que incluem cirurgia, radio e quimioterapia (Louis, 2006).

Assim, esses tumores representam um grande desafio para pacientes, médicos e pesquisadores. Geralmente, estão localizados em regiões de acesso difícil, complicando ou até mesmo, impossibilitando o procedimento cirúrgico de ressecção. O risco de comprometimento das funções do cérebro e o caráter essencial da integridade do SNC para a vida humana demonstram a necessidade de estratégias novas e mais eficazes de diagnóstico, prognóstico e tratamento dessas neoplasias (Louis, 2006; Gupta, 2012; Ricard, 2012).

1.1.2 Incidência de tumores do SNC

Os tumores primários do SNC tem origem no tecido cerebral e são classificados pelo tipo de células do qual se originam (Louis, 2006; Louis *et al.*, 2007).

Essas neoplasias são mais frequentes entre a quinta a oitava décadas de vida e, embora raros, sua incidência e mortalidade têm aumentado em muitos países, incluindo o Brasil, especialmente entre a população idosa. (Monteiro & Koifman, 2003; Dolecek *et al.*, 2012).

Dados mundiais da incidência de tumores do SNC revelaram que a incidência é mais elevada em homens do que em mulheres, ocorrendo cerca de 3,7 e 2,6 casos em cada 100.000 pessoas por ano, respectivamente. Na Europa Ocidental, a incidência de tumores do SNC é mais elevada, aproximadamente, 6,7 e 4,5 casos em cada 100.000 homens e mulheres por ano, respectivamente (Dolecek *et al.*, 2012).

O diagnóstico de tumores do SNC nos países mais desenvolvidos é mais frequente do que nos países menos desenvolvidos. Estas diferenças podem ser consequência de práticas diferentes de diagnóstico e acesso a tratamentos de saúde mais adequados (Ohgaki & Kleihues, 2005).

A análise étnica de 8.947 casos de tumores primários do sistema nervoso central, realizados pelo Instituto de Patologia das Forças Armadas Americanas (AFIP), mostrou que os gliomas são duas vezes mais frequentes em caucasianos do que em negros. De modo semelhante, o Centro de Registro de Tumores Cerebrais dos Estados Unidos (CBTRUS) mostra que a taxa de incidência dos glioblastomas e de gliomas é aproximadamente duas vezes maior em caucasianos do que em negros (Fan e Pezeshkpour, 1992).

Dentre os tumores cerebrais primários, os gliomas são os mais frequentes, representando mais de 70% de todas as neoplasias primárias do SNC (Ohgaki & Kleihues, 2005; Louis *et al.*, 2007; Ohgaki & Kleihues, 2009).

1.1.3 Gliomas

Os gliomas são neoplasias histologicamente heterogêneas, sendo classificados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em diferentes graus, de acordo com suas características celulares e sua capacidade de invasão. A classificação da OMS representa uma escala de malignidade, considerando o comportamento clínico e biológico das neoplasias, o perfil genético e o prognóstico dos tumores, influenciando a escolha de terapias, incluindo protocolos de radioterapia e quimioterapia (Louis *et al.*, 2007).

Ao contrário de alguns tipos de tumores, a adoção de certas medidas preventivas, como mudanças de estilo de vida, não são eficientes no tratamento dos gliomas. Os métodos diagnósticos e de tratamento precoce utilizados até o presente, não modificam de maneira significativa o prognóstico e os resultados, inviabilizando a utilização de métodos de rastreamento para esta doença (Omuro & De Angelis, 2013).

A gliomagênese, assim como ocorre em outros tecidos, acontece por um acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas que podem afetar a regulação do ciclo celular, sobrevivência das células, invasão tecidual e angiogênese.

A origem dos gliomas ainda é desconhecida e gera muitas controvérsias, uma vez que não está determinado se resultam da transformação de uma célula tronco neural, de células precursoras indiferenciadas ou de células gliais diferenciadas (Sanson *et al.*, 2004; Louis *et al.*, 2007). A idéia mais aceita atualmente, considera que os gliomas se originam a partir de células gliais diferenciadas. No entanto, evidências recentes sugerem que um subconjunto de células cancerosas, denominado células de propagação do câncer (BCPCs) ou cancer stem cell-like, possa ser a base do crescimento de diferentes tipos de câncer (Cariati & Purushotham, 2008). As BCPCs foram isoladas a partir de diferentes tipos de tumores, incluindo tumores cerebrais

primários, tais como o glioblastoma, meduloblastoma e ependimoma (Figura 1) e constituem um foco importante de estudos, atraindo atenção considerável de pesquisadores (Singh *et al*, 2004; Sanai *et al*, 2005; Hadjipanayis CG & Van Meir EG, 2009; Baronchelli *et al*, 2013).

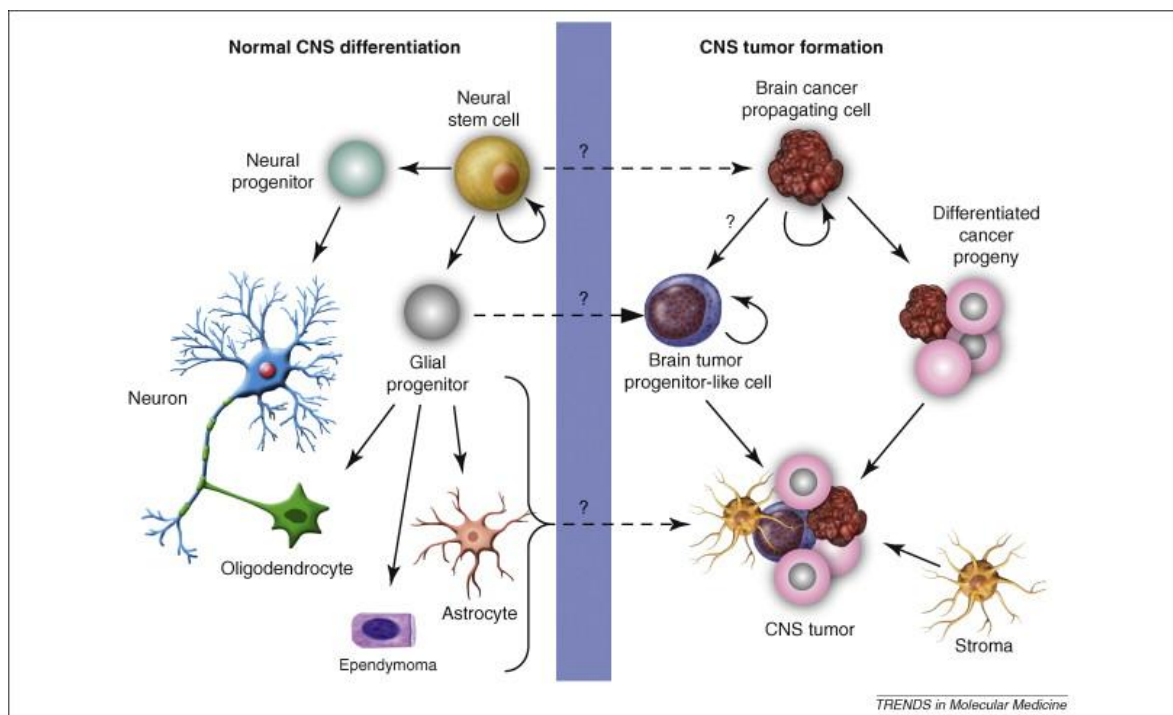


Figura 1: Diferenciação normal do SNC e início da formação tumoral.

As células tronco neurais (CTN) irão se diferenciar em células progenitoras neurais e gliais. Os progenitores neurais irão se diferenciar em neurônios, enquanto os progenitores gliais, poderão originar astrócitos, oligodendrócitos ou ependimócitos. Os tumores do SNC podem se originar da transformação das CTNs em células de propagação do câncer (BCPCs) ou cancer stem cell-like. Os progenitores gliais podem se transformar em células tumorais semelhantes às progenitoras e originar tumores do SNC (GBMs, meduloblastomas e ependimomas). O pensamento tradicionalmente aceito é que a transformação de neurônios e células da glia seja a origem dos tumores de SNC. As BCPCs podem diferenciar-se em células semelhante às progenitoras e nas células gliais diferenciadas, o que conduziria a formação de tumores cerebrais. As células do estroma podem ser essenciais para a manutenção, progressão e recorrência do tumor.

Fonte: Hadjipanayis CG e Van Meir EG. Brain cancer propagating cells: biology, genetics and targeted therapies. *Trends in Molecular Medicine* V.15 N.11, 2009.

As células da glia ou neurógliia incluem astrócitos, oligodendrócitos e células ependimárias, sendo essas derivadas do mesmo progenitor glial (Figura 1) e, ainda, microglíocitos. Os microglíocitos são componentes do sistema retículo-endotelial, funcionam como células fagocíticas e até o momento, não se tem conhecimento de sua participação direta na formação de gliomas (Morest & Silver, 2003; Rao, 2003; Ohgaki & Kleihues, 2005).

Dentre as células da glia, os astrócitos são as maiores, mais numerosas e de maior diversidade funcional, sendo responsáveis pela nutrição e sustentação dos neurônios. Por meio de seus prolongamentos, eles envolvem os capilares sanguíneos formando junções oclusivas que constituem a barreira hematoencefálica. Os astrócitos também enviam seus prolongamentos à superfície dos órgãos do SNC, onde formam uma camada, logo abaixo da pia-máter denominada superfície pial subglial ou glia limitante. Desse modo, os astrócitos delimitam um compartimento funcional com os íons e moléculas adequadas à fisiologia dos neurônios (Blackburn *et al.*, 2009).

Os oligodendrócitos produzem as bainhas de mielina que servem de isolante elétrico para os neurônios do SNC. As células ependimárias são células epiteliais colunares que revestem os ventrículos cerebrais e o canal da medula espinhal e auxiliam na regulação da difusão do fluido cerebrospinal para as regiões cerebrais periventriculares (Rao, 2003).

Os astrocitomas, oligodendrogliomas e os tumores de células ependimárias representam os tipos de gliomas (Rao, 2003; Ohgaki & Kleihues, 2009). A figura 2 apresenta os tipos de gliomas com os seus respectivos subtipos.

1.1.3.1 Astrocitomas

Os astrocitomas, gliomas originados de astrócitos representam aproximadamente 60% dos tumores primários do SNC e compõem um grupo de neoplasias que se diferem quanto a faixa etária, sexo, localização, morfologia, capacidade de invasão e de crescimento, curso clínico e prognóstico.

Eles são classificados de acordo com a OMS em graus de I a IV através da quantificação da presença de indicadores, tais como proliferação endotelial, atipia nuclear, mitoses e necrose (Ohgaki & Kleihues, 2000; Louis *et al.*, 2007; Ohgaki & Kleihues, 2009). Assim, a graduação tumoral é determinada pelo número de critérios indicadores, sendo os astrocitomas de grau I e II, considerados de baixo grau e os de grau III e IV como alto grau.

O astrocitoma pilocítico não apresenta características de malignidade, e, conseqüentemente, é classificado como grau I; o astrocitoma difuso e o xantoastrocitoma pleomórfico classificam-se como grau II, por possuírem um indicador de malignidade, geralmente, atipia nuclear; o astrocitoma anaplásico é classificado como grau III, por apresentar dois indicadores, comumente atipia nuclear e mitoses e por fim, o glioblastoma multiforme (GBM) recebe a classificação de grau IV, por apresentar dois ou três critérios como atipia nuclear, mitoses, proliferação endotelial

e/ou áreas de necrose (Ohgaki & Kleihues, 2000; Louis, 2006; Louis *et al.*, 2007; Ohgaki & Kleihues, 2009; Dias-Santagata *et al.*, 2010).

1.1.3.1.1 Glioblastoma multiforme (GBM)

O glioblastoma multiforme (GBM) é considerado um dos cânceres humanos mais agressivos, sendo o tumor astrocítico mais maligno e de pior prognóstico. Representam cerca de 50% dos astrocitomas e, por conseguinte, são os mais frequentes entre os gliomas. Pode se desenvolver em qualquer faixa etária, sendo mais prevalente em homens adultos entre 45 e 70 anos de idade (Ohgaki, 2005; Okezie *et al.*, 2009; Kanu *et al.*, 2009; Ohgaki e Kleihues, 2009; Ricard *et al.*, 2012).

É caracterizado histologicamente por astrócitos pouco diferenciados, pleomorfismo celular, áreas de necrose com celularidade periférica em pseudopaliçada, atividade mitótica e proliferação microvascular (Louis, 2006).

OS GBMs são divididos em dois subtipos, glioblastoma primário, representando cerca de 90% dos casos e glioblastoma secundário. Embora apresentem alterações histológicas e prognóstico semelhantes, os GBMs primários e secundários constituem entidades patológicas distintas, que se diferem quanto à faixa etária afetada e alterações genéticas presentes. O GBM primário desenvolve-se em um período curto, sem evidências clínicas ou histológicas de um tumor maligno precursor, afetando indivíduos de idade mais avançada, entre a quinta e sexta décadas de vida (Ohgaki, 2005; Okezie *et al.*, 2009; Ohgaki e Kleihues, 2009; Ricard *et al.*, 2012).

Já os GBMs secundários desenvolvem-se lentamente por progressão de astrocitomas difusos ou anaplásicos, sendo mais comum em pessoas entre a terceira e quarta década de vida (Kanu *et al.*, 2009).

Apesar dos avanços terapêuticos, a sobrevida média dos pacientes é de um ano após o diagnóstico de glioblastoma multiforme (Ohgaki & Kleihues, 2005; Kanu *et al.*, 2009; Wakimoto *et al.*, 2009; Verhaak *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2012).

1.1.3.2 Oligodendrogliomas

Os oligodendrogliomas são neoplasias localizadas geralmente nos hemisférios cerebrais, bem diferenciadas, de crescimento lento e infiltrativo compostas predominantemente por oligodendrócitos e classificadas pela OMS como grau II. O Oligodendroglioma anaplásico (OMS grau III) é um tumor focal ou difuso com características histológicas de malignidade e, portanto, um prognóstico menos

favorável. O Oligoastrocitoma (OMS grau II) é composto por dois tipos diferentes de células neoplásicas morfológicamente semelhantes às células de oligodendrogliomas e astrocitomas de baixo grau. O oligoastrocitoma anaplásico (OMS grau III) apresenta uma característica histológica de malignidade. Em relação ao prognóstico, oligoastrocitomas são intermediários entre os astrocitomas difusos e oligodendrogliomas (Ohgaki & Kleihues, 2009).

1.1.3.3 Ependimomas

Os Ependimomas são tumores cerebrais raros originados de células endimárias ou endimócitos. Ocorrem principalmente em crianças e adolescentes, sendo raro em adultos (Louis *et al.*, 2007). Na infância, endimomas representam o terceiro tumor cerebral mais comum, depois do astrocitoma pilocítico e do meduloblastoma (Ellison *et al.*, 2011).

São classificados pela OMS em graus de I a III. Em adultos, os endimomas apresentam menor gravidade, possuem grau I, sendo divididos em subependimoma e raramente em endimoma mixopapilar. Os endimomas intracranianos pediátricos são o endimoma clássico (grau II) e o endimoma anaplásico (grau III) (Louis *et al.*, 2007). Histologicamente, os endimomas de locais anatômicos diferentes são muito semelhantes e a classificação da OMS é um desafio até mesmo para neuropatologistas experientes. O prognóstico é dependente da localização tumoral e do tipo histológico. A terapia padrão consiste na ressecção cirúrgica completa quando viável, porém, os endimomas, particularmente, os mixopapilares, tendem a ocorrer na coluna vertebral lombar, dificultando ou impedindo a ressecção cirúrgica adequada (Ellison *et al.*, 2011).

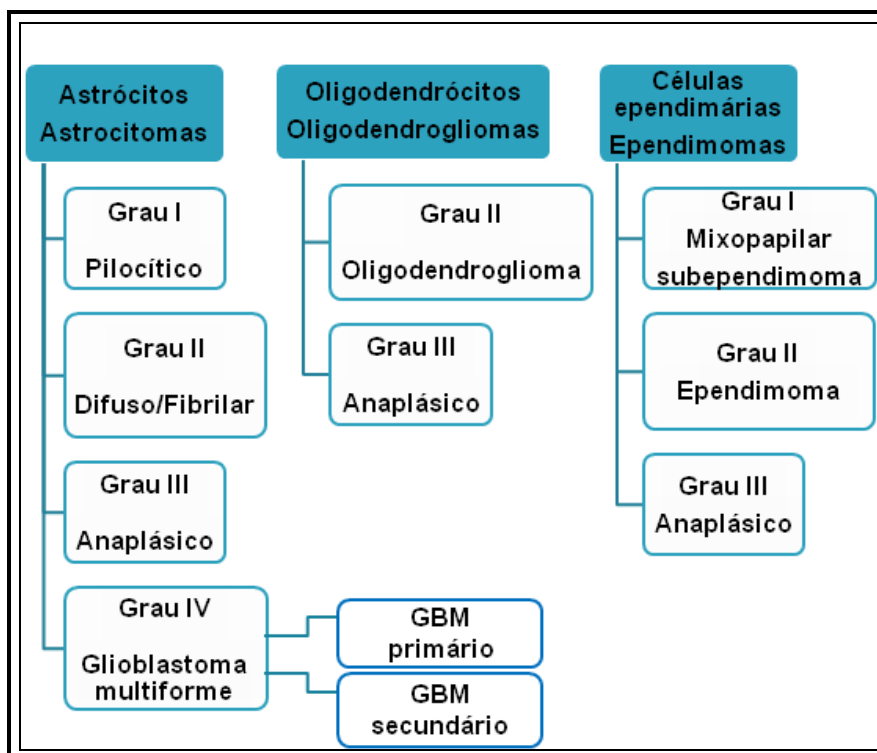


Figura 2: Células de origem, tipos e subtipos de gliomas com sua respectiva classificação da OMS.

1.1.3.4 Fatores de risco para Gliomas

Algumas síndromes hereditárias são correlacionadas ao risco aumentado de gliomas, incluindo neurofibromatose tipo 1 e 2, schwannomatose familiar e esclerose tuberosa (Kelly & Weiss, 2013). Os indivíduos portadores de Neurofibromatose tipo 1 apresentam predisposição ao desenvolvimento de tumores do sistema nervoso central e periférico, geralmente gliomas do nervo óptico, principalmente em crianças (Rodriguez *et al.*, 2008; Patil & Chamberlain, 2012). Raramente, observa-se uma história familiar de gliomas. Um fator de risco conhecido para esses tumores é a exposição à radiação ionizante. No entanto, a radiação utilizada em procedimentos diagnósticos, não apresenta associação com essas neoplasias (Bondy *et al.*, 2008, Omuro & De Angelis, 2013). Entretanto, Pearce e colaboradores (2012) demonstraram o efeito tumorigênico da radiação em estudo realizado com crianças com leucemia que receberam radioterapia por períodos longos.

Não há associação consistente entre o risco aumentado de desenvolvimento de gliomas e exposição a telefones celulares, lesões traumáticas na cabeça, alimentos e produtos químicos. O uso de telefones celulares e ocorrência de tumores do SNC atraiu atenção da população e de pesquisadores, entretanto, não existem dados consolidados que comprovem tal hipótese. As variações no tempo de exposição aos

aparelhos celulares e a diversidade tecnológica existente entre os modelos, são fatores limitantes desses experimentos. Além do mais, a incidência de gliomas não aumentou quando comparada ao aumento expressivo de telefones celulares observado recentemente. Todavia, mais estudos são necessários, sobretudo em crianças que são expostas aos telefones celulares desde o início da vida (Bondy *et al.*, 2008; Corle, Makale & Kesari, 2011).

1.1.3.4 Genes e vias moleculares envolvidos com os gliomas

A biologia molecular das neoplasias tem sido intensivamente estudada, em busca de melhor compreensão sobre sua patogênese. O conhecimento das alterações genômicas é especialmente importante nos gliomas, sobretudo pela possibilidade de oferecer ao paciente um melhor prognóstico, além de influenciar a classificação e estadiamento dos tumores do SNC. A identificação de alterações genéticas no tumor como, por exemplo, a inativação de genes que podem controlar a proliferação celular e induzir apoptose, tem gerado avanços importantes auxiliando a compreensão da tumorigênese dos gliomas (Cancer Genome Atlas Research Network, 2008).

Em gliomas ocorrem alterações de diferentes vias de sinalização e a partir do conhecimento dessas alterações poderão ser estabelecidas formas de diagnóstico desses tumores; bem como poderá ser feito um melhor prognóstico. Além disso, destaca-se a importância dessas vias de sinalização como potenciais alvos terapêuticos.

1.1.3.4.1 PTEN e a via EGFR/PTEN/PI3K/AKT/mTOR

PTEN é considerado um gene supressor de tumor importante e mutações neste gene estão associadas a vários tipos de câncer (Teng *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 2003; Yin & Shen, 2008; Ding *et al.*, 2012; Mirantes *et al.*, 2013). *PTEN* age em fosfatidilinositol-3,4,5 trifosfato (PIP3), removendo o fosfato da posição três do anel inositol, para criar o fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2) e assim, antagonizar diretamente a sinalização da via fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K). Dessa forma, *PTEN* antagoniza ações de PI3K negativamente, regulando diversos processos celulares dessa via de sinalização, incluindo crescimento, proliferação, sobrevivência, apoptose, metabolismo e migração celular (Maehama & Dixon, 1998). Mutações germinativas em *PTEN* causam predisposição ao câncer, bem como diversas anormalidades neurológicas, demonstrando papéis especializados de *PTEN* no desenvolvimento e manutenção da integridade do sistema nervoso (Fults & Pedone, 2000).

Mutações somáticas em *PTEN* ocorrem frequentemente como eventos tardios em tumores cerebrais. O comprometimento da função de *PTEN* pode contribuir para a gliomagenese através da inibição da regulação de proliferação, migração e invasão celulares, angiogênese e regulação de outras vias de genes supressores de tumor, como *p53*. Achados clínicos em gliomas de alto grau sugerem que alterações no gene *PTEN* estão associados com pior prognóstico e podem influenciar a resposta terapêutica (Liu *et al.*, 1997; Endersby & Baker, 2008; Zheng *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2011).

Alterações genéticas envolvendo *PTEN* são mais frequentes em GBMs primários e estão associadas à progressão tumoral de astrocitomas. Sua inativação seja por deleção ou mutação, ativa as vias P13K/AKT/mTOR (Endersby & Baker, 2008).

1.1.3.4.2 *KRAS*

A superfamília das proteínas *RAS* desempenha papel importante no ciclo celular. Existem três proteínas dessa família: *HRAS*, *KRAS* e *NRAS*, sendo que *KRAS* está expressa em quase todos os tipos celulares (Downward, 2003). As proteínas *RAS* estão acopladas no lado citoplásmico da membrana plasmática através de ligação covalente a um grupo de lipídeos. Vários estudos mostraram que *RAS* desempenha importante papel na mitogênese, transmitindo sinal da superfície celular para outras estruturas no interior da célula (Cotran *et al.*, 1999; Alberts *et al.*, 2002).

As proteínas *RAS* controlam vias de sinalização que são reguladoras-chave de vários aspectos do crescimento celular normal e da transformação maligna. Elas são alteradas na maioria dos tumores humanos devido a mutações ativadoras nos genes *RAS*, especialmente em *KRAS* (v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) (Downward, 2003).

1.1.3.4.3 *BRAF* e a via *RAS/RAF/MEK/ERK*

A proteína *BRAF* pertence à família de quinases de serina-treonina *RAF*, tendo sido descritas três isoformas funcionais nas células de mamíferos: *ARAF*, *BRAF* e *CRAF*. Entre estes, o *BRAF*, cujo gene codificante está localizado no cromossoma 7q34, é o mais potente ativador da via de *MAPK* (Trovisco *et al.*, 2006; Cantwell-Dorris *et al.*, 2011).

BRAF exerce a função de regular a via *MAPK/ERK* que é conservada em todos os eucariotos (Robinson *et al.*, 1997). A via de *RAS/RAF/MEK/ERK* age como

transdutor entre o meio extracelular e o núcleo. Sinais extracelulares como hormônios, citocinas e vários outros fatores de crescimento interagem com seu receptor e ativam a família *RAS*. *RAS* ativo induz alterações conformacionais em *RAF* que permite seu recrutamento para a membrana celular, promovendo mudanças no estado de fosforilação e estimulando sua atividade quinase (Garnett & Marais, 2004). *BRAF* ativa envia sinais através *MEK* para ativar *ERK*, que, por sua vez, ativa fatores de transcrição a jusante para induzir uma série de processos bioquímicos, incluindo a diferenciação, proliferação, crescimento celular e apoptose. Tem sido demonstrado que a hiperativação de *BRAF* pode dar início a tumorigênese (Davies *et al.*, 2002).

BRAF esta mutado em uma ampla gama de cânceres humanos, incluindo melanomas (40-70%), câncer de tireóide papilar (45%), câncer colo-retal (10%) e também em cânceres de ovário, mama e pulmão (Davies *et al.*, 2002; Xing *et al.*, 2005; Dhomen e Marais *et al.*, 2009). Mais de quarenta mutações diferentes em *BRAF* já foram identificadas em cânceres humanos. Noventa por cento delas são representadas pela mutação somática do tipo “missense”, que consiste na transversoão de timina por adenina (T1799A), no exon 15, que resulta na mudança do resíduo 600, substituindo valina por glutamina (*BRAFV600E*) (Davies *et al.*, 2002; Cantwell-Dorris *et al.*, 2011). A troca do aminoácido ativa a proteína, pois propicia a fosforilação constitutiva dos aminoácidos adjacentes, conferindo capacidade oncogênica (Wan *et al.*, 2004).

Nucera e colaboradores (2011) mostraram que tumores que apresentam *BRAFV600E* são mais invasivos e agressivos. A associação de mutações em *BRAF* e gliomas ainda não está bem estabelecida. Apesar de avanços atuais significativos, o papel desse gene na patogênese e seu potencial como marcador biológico é desconhecido (Dougherty *et al.*, 2010; von Deimling *et al.*, 2010). Dias-Santagata e colaboradores (2010) demonstraram a presença de 60% da mutação *BRAFV600E* em pacientes portadores de xantastrocitoma pleomórfico. Recentemente, tem sido descrita a ativação da via *MAPK* por *BRAF* entre os astrocitomas pilocíticos e alguns estudos descrevem a mutação *BRAFV600E* como um fator importante na patogênese de tumores astrocitários pediátricos de baixo grau (von Deimling *et al.*, 2010; Ida *et al.*, 2012).

Dougherty e colaboradores (2010) observaram a mutação *BRAFV600E* em 14 de 31 gliomas pediátricos, incluindo ganglioglioma, ganglioglioma desmoplásico infantil e xantastrocitoma. Estudos anteriores do mesmo grupo demonstraram mutações em *BRAF* em três gangliogliomas de 31 tumores estudados.

O entendimento das vias genéticas relacionadas ao gene *BRAF* pode contribuir para a classificação molecular dos gliomas e determinação do valor preditivo e prognóstico para o paciente (von Deimling *et al.*, 2010; Horbinski, 2013).

1.1.3.4.4 *IDH1* e *IDH2*

O gene isocitrato desidrogenase, que codifica a enzima citosólica 1 (*IDH1*) é um dos genes envolvidos na patogênese dos gliomas mais estudados atualmente (Parsons *et al.*, 2008; Dang *et al.*, 2009; von Deimling *et al.*, 2010; Prensner & Chinnaiyan, 2011; Yan *et al.*, 2012; Sabha *et al.*, 2014). O *IDH1* está presente no citosol, cataliza a carboxilação oxidativa de alfa cetoglutarato isocitrato, resultando na produção de NADPH e desempenha um papel no controle celular do dano oxidativo (Dang *et al.*, 2009).

Este gene tem atraído atenção considerável de pesquisadores do mundo inteiro desde a descoberta em 2008 de sua relação com os gliomas humanos. As mutações em *IDH1* possuem grande relevância clínica e diagnóstica devido à contribuição na classificação desses tumores (von Deimling *et al.*, 2010). Em análise recente de genômica mutacional dos glioblastomas, mutações somáticas em *IDH1* foram encontradas (Yan *et al.*, 2012).

Mutações em *IDH1* ocorrem em um único resíduo de aminoácido do sítio *IDH1*, resultando em perda da capacidade da enzima para catalisar a conversão de isocitrato a α -cetoglutarato (Parsons *et al.*, 2008; Ducray *et al.*, 2009). Convém ressaltar que apenas uma única cópia do gene está mutado em tumores, levantando a possibilidade de que as mutações não resultem em uma simples perda de função. Estudos estruturais demonstraram que, quando a arginina 132 é mutada para histidina, ocorre redução da descarboxilação oxidativa de isocitrato e aquisição da capacidade de converter α -cetoglutarato a R (-)-2-hidroxi-glutarato 2HG. Acúmulo excessivo de 2HG foi relacionado a um elevado risco de tumores cerebrais malignos em pacientes com erros inatos do metabolismo (Prensner & Chinnaiyan, 2011).

É importante salientar que a mutação R132H é mais frequente em pacientes jovens e em portadores de GBM secundário, tumores que se desenvolvem a partir de astrocitomas de baixo grau e ainda em oligoastrocitomas e oligodendrogliomas. Acredita-se que essas mutações poderiam conduzir a progressão de um glioma de baixo grau para um glioblastoma (Parsons *et al.*, 2008).

A presença das mutações em *IDH* em glioblastomas é considerada um bom prognóstico (Metellus *et al.*, 2011). De acordo com Dang *et al.*, (2009), após cirurgia e

tratamento com radioterapia esses pacientes possuem sobrevida média de 27,1 meses.

1.1.3.4.5 TGF- Beta

A superfamília de TGF- β é composta por citocinas que incluem, inibinas, ativinas, BMPs (proteínas morfogenéticas do osso), GDNF (fator neurotrófico derivado de células gliais), fator de crescimento transformante (TGF- β), dentre outros (Massague, 1990; Moustakas & Heldin, 2009).

Muitas células normais expressam TGF- β constitutivamente e produzem-no em maiores quantidades quando estimuladas. Estas incluem plaquetas, macrófagos, linfócitos T e B, fibroblastos, osteoblastos, osteoclastos, astrócitos e células microgliais (Massague, 1990; Massague, 2000; Moustakas & Heldin, 2009).

O TGF- β apresenta cinco isoformas reconhecidas, sendo três dessas identificadas em mamíferos, TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3. As três isoformas de TGF- β em mamíferos são codificadas por genes diferentes, porém possuem a mesma organização genômica, com sete éxons e uma cascata de sinalização comum (Roberts, 1991).

As citocinas da família TGF- β compartilham uma estrutura molecular protéica semelhante, sendo homo ou heterodímeros compostos por subunidades de 12,5 kDa. (Wakefield *et al.*, 1988). A forma biologicamente ativa é composta por 110 a 140 aminoácidos altamente conservados (Massague, 1990; Kingsley, 1994). A isoforma mais estudada dessa família é TGF- β 1, sendo sua forma ativa composta por uma proteína dimérica com cada subunidade formada por 112 aminoácidos (Geiser *et al.*, 1990). Devido aos efeitos diferentes em diversos tipos celulares, a citocina TGF- β 1 é considerada multifuncional, pois pode atuar tanto como estimuladora da proliferação de fibroblastos, quanto como inibidora da proliferação de células epiteliais, mielóides, linfóides, mesenquimais e de alguns tipos de tumores (Shi & Massague, 2003).

Os receptores para TGF- β são expressos pela maioria dos tipos celulares. Foram identificados três tipos, os quais foram nomeados tipos I, II e III, baseados nos seus tamanhos aproximados de 53, 70 a 80, e 200 a 300 kDa, respectivamente (Massague, 1990; Lin e Lodish, 1993; Attisano *et al.*, 1994). Os receptores do tipo I e II são proteínas transmembranas com atividade serina-treonina quinase (T β RI e T β RII) (Lin *et al.*, 1992).

A via de sinalização ocorre através da ligação de TGF- β ao seu receptor T β RII, que promove fosforilação de T β RI. T β RI ativado se auto-fosforila e fosforila as

proteínas alvo. Dentre elas, a família mais importante de mediadores da via de sinalização de TGF- β são as Smads. Smad 2 e 3 são diretamente fosforiladas por T β RI e formam um complexo com Smad 4, o qual se transloca para o núcleo, controlando vários genes efetores. Como mecanismo de autorregulação, entre os genes ativados por TGF- β está Smad 7, que age inibindo a fosforilação de Smads 2 e 3 através de sua ligação com T β RI, regulando assim a intensidade ou duração do sinal (Figura 3) (Massague, 2000; Shi & Massague, 2003; Moustakas & Heldin, 2009; Nicklas & Saiz, 2013; Pickup, Novitskiy & Moses, 2013).

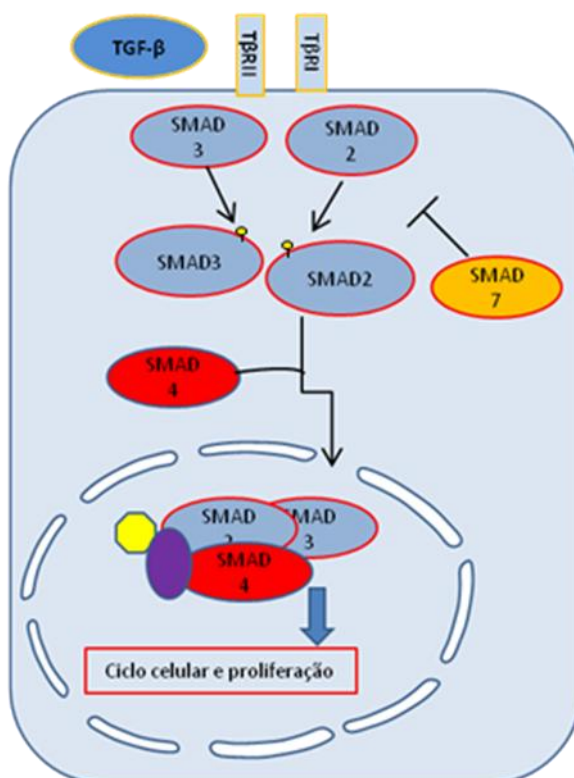


Figura 3: Transdução de sinal de TGF- β .

A ativação da transdução do sinal de TGF- β inicia com a ligação de uma das isoformas de TGF- β ao seu receptor tipo II (T β RII), recrutando seu receptor tipo I, levando à fosforilação das SMADs 2 e 3. Este complexo se associa à proteína SMAD4 e transloca-se para o núcleo, onde determinará a transcrição de diversos genes-alvo.

Ilustrado por Lucélia Coimbra da Silva

1.1.3.4.5.1 TGF- β e câncer

Em condições fisiológicas, a via de sinalização de TGF- β exerce papel inibitório na proliferação de células epiteliais ao regular a homeostase e suprimir a progressão tumoral. Portanto, quando essas células adquirem características de malignidade, ocorrem alterações nos mecanismos que controlam a proliferação, ocasionando uma

multiplicação descontrolada (Massague, 2000; Massague, Blain & Lo, 2000; Moustakas & Heldin, 2009; Nicklas & Saiz, 2013; Pickup, Novitskiy & Moses, 2013).

Em 2008, Massagué, descreve mecanismos pelos quais a desregulação de TGF- β pode resultar em tumorigênese. As células malignas podem escapar dos efeitos supressores de tumor de TGF- β , através da inativação de componentes da via, tais como os seus receptores ou por alterações que inativam somente a parte supressora de tumor da via de sinalização. Este último mecanismo é importante, pois assim, as células neoplásicas podem usurpar as funções regulatórias de TGF- β que permaneceram e adquirir vantagens, tais como, capacidade de invasão, produção de mitógenos autócrinos ou liberação de citocinas prometastáticas. Outro ponto relevante para o desenvolvimento do câncer são os efeitos de TGF- β no estroma tumoral. TGF- β possui um papel chave na tolerância imunológica, assim, os tumores que produzem níveis elevados dessa citocina, podem tornar-se protegidos contra ação do sistema imune. Além disso, este fato pode levar a inflamação crônica e produção de um ambiente protumorigênico. TGF- β derivado de células tumorais, podem ainda recrutar outras células do estroma, tais como, miofibroblastos, osteoclastos (em metástases ósseas), e outras, facilitando a disseminação do tumor.

Alterações genéticas ou expressão desregulada de membros efetores da via de TGF- β são observadas em tumores colorretais (Tomsic *et al.*, 2010, Slattery *et al.*, 2011), pancreáticos (Geismann *et al.*, 2009; Leung *et al.*, 2013), gástricos (Wu *et al.*, 2012), hepáticos (Han *et al.*, 2010; Dzieran *et al.*, 2013) e pulmonares (Ko *et al.*, 2010). A deleção de SMAD4 apresenta alta incidência em carcinomas pancreáticos, sendo demonstrada também em outros tumores originários de células epiteliais. Itatani e colaboradores em 2013, descrevem que a inativação de SMAD4 aumenta o poder de invasão tecidual e facilita a metástase hepática em tumores colorretais.

A via de sinalização de TGF- β é intensamente estudada, sobretudo no que diz respeito ao câncer. Essa citocina desperta interesse e atenção crescentes, devido ao seu papel duplo e conflitante de atuar tanto como supressora de tumor quanto como promotora de tumorigênese (Massague, 2000; Massague, 2008). Recentemente, a via de sinalização de TGF- β está sendo intensamente pesquisada como um alvo terapêutico em potencial (Massague, 2008; Joseph *et al.*, 2013; Neuzillet *et al.*, 2013; Nicklas & Saiz, 2013; Sheen *et al.*, 2013).

Em gliomas de alto grau, a busca por novas estratégias terapêuticas é altamente relevante, pois o glioblastoma multiforme ainda é resistente aos tratamentos convencionais disponíveis e apresenta uma das piores taxas de sobrevivência entre todos os cânceres humanos (Louis, 2006; Gupta, 2012; Ricard, 2012; Joseph *et al.*, 2013). Nesse contexto, a utilização de inibidores com alvo em agentes da via de TGF-

β são promissores. No entanto, o papel de TGF- β nos gliomas não está totalmente esclarecido e a investigação de possíveis alterações nos componentes da superfamília de TGF- β poderá contribuir para melhorar a compreensão a respeito de sua atuação nesses tumores.

1.1.3.5 Invasão tumoral, angiogênese e proliferação celular nos gliomas

1.1.3.5.1 Invasão tumoral

A matriz extracelular é uma rede complexa de macromoléculas que proporciona um arcabouço estrutural para os tecidos e influencia o comportamento das células com as quais mantém contato. Recentemente, a matriz extracelular tem despertado bastante atenção, devido a sua participação na adesão e sinalização celulares, bem como na diferenciação, proliferação, sobrevivência e migração das células. A matriz extracelular também é responsável pela modulação de diversos fatores de crescimento, dentre eles, o TGF- β (Hynes, 2009).

Ao contrário da maioria dos órgãos, a matriz extracelular no cérebro é escassa e mal-definida, constituída basicamente por ácido hialurônico, sendo assim, desprovida de barreiras rígidas compostas por colágeno, fibronectina e laminina, exceto ao redor dos vasos sanguíneos e da superfície glial subpial (glia limitante) (Gladson, 1999).

Um fator prognóstico crítico em gliomas é o seu comportamento invasivo. Esses tumores apresentam um padrão de invasão distinto e raramente metastatizam em outros locais. As células neoplásicas podem se espalhar para qualquer lugar do cérebro, porém, envolvem preferencialmente os espaços onde a matriz extracelular é bem definida. A invasão tumoral ocorre através da interação entre célula-célula e célula- matriz extracelular. Essas células neoplásicas criam um micro-ambiente apropriado depositando componentes permissivos de matriz extracelular favoráveis à invasão de tecidos (Bellaila *et al.*, 2004).

A degradação da matriz extracelular por proteases permite o mecanismo de invasão tumoral e, além disso, remodela o ambiente facilitando o crescimento da célula neoplásica. Os astrocitomas de alto grau frequentemente expressam metaloproteases *MMP2*, *MMP9* e a *MMP3* (Rao, 2003; Onishi *et al.*, 2011). As metaloproteases de matriz (MMPs) são uma família de endopeptidases com atividade hidrolítica para um amplo espectro de proteínas da matriz extracelular. Muitas *MMPs* estão envolvidas com a progressão de neoplasias malignas (Rao, 2003).

Infelizmente, as células invasoras que permanecem após a ressecção cirúrgica, muitas vezes determinam o óbito dos pacientes. Assim, componentes da matriz extracelular, proteases, moléculas de adesão celular e as suas vias de sinalização, tornaram-se um dos focos principais de investigação em gliomas, sendo que cada componente pode ser visto como um alvo terapêutico em potencial (Bellaila *et al.*, 2004).

1.1.3.5.2 Angiogênese nos gliomas

Angiogênese é o termo utilizado em referência ao processo de neoformação de estruturas vasculares a partir de capilares e vênulas pós-capilares pré-existentes em resposta a diversos estímulos, denominados estímulos angiogênicos (Folkman & Haudenschild, 1980; Folkman & Klagsbrun, 1987).

Os mecanismos celulares e moleculares envolvidos no crescimento vascular diferem nos vários tecidos. Assim, os neovasos terão aspectos morfológicos e funcionais de acordo com as necessidades de cada tecido. Essa heterogeneidade das células endoteliais é determinada pela expressão e atividade de fatores angiogênicos que variam entre os tecidos e por fatores angiogênicos órgão-específicos que determinam a alteração angiogênica, mas de modo particular para os diferentes órgãos (Carmeliet, 2000; Carmeliet, 2003).

A angiogênese é essencial para o crescimento da maioria dos tumores primários e suas metástases. O controle da angiogênese tumoral envolve o equilíbrio entre fatores angiogênicos ativadores e fatores antiangiogênicos inibidores que podem ser liberados pelas células tumorais, células do tecido infiltrado, bem como por macrófagos e fibroblastos. Entre os fatores de crescimento e citocinas que modulam a angiogênese, destaca-se como fator ativador, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Bernardini *et al.*, 2003).

Conforme mencionado anteriormente, TGF- β 1 é um importante regulador tecidual e inibidor potente da proliferação na maioria dos tipos de células (Massague *et al.* , 2000). No entanto, pode atuar como indutor da expressão de VEGF e/ou outros fatores angiogênicos em alguns tipos celulares, além de possivelmente estar envolvido diretamente na angiogênese (Pardali & Moustakas, 2007). Embora vários estudos tenham investigado o papel de tais fatores de crescimento na angiogênese, suas interações nas células endoteliais ainda não estão elucidadas (Ferrari *et al.*, 2009).

Os gliomas são caracterizados pelo alto índice de proliferação vascular, sendo a angiogênese considerada um fator fundamental para o crescimento e progressão

contínua dessas neoplasias. A neo-vascularização correlaciona-se diretamente com o grau de malignidade, capacidade de recidiva, agressividade biológica e inversamente com a sobrevida dos pacientes (Onishi *et al.*, 2011; Swanson *et al.*, 2011).

Os GBMs são os gliomas com maiores índices de proliferação vascular, sendo esta uma característica essencial para a agressividade dos mesmos. Nos GBMs, existe uma rede extensa de vasos tortuosos formando estruturas glomerulóides, desorganizadas, permeáveis e hiperplásicas (Swanson *et al.*, 2011). Entretanto, os mecanismos de angiogênese e da origem das células endoteliais tumorais permanecem pouco definidos (Onishi *et al.*, 2011). Em 2010, Wang e colaboradores, demonstraram que existe uma subpopulação de células endoteliais no interior de glioblastomas abrigando as mesmas mutações somáticas identificadas nas células tumorais, como exemplo, a amplificação de *EGFR*. Além disso, eles demonstraram que uma subpopulação de células tumorais originam células endoteliais através de um progenitor intermediário.

Uma compreensão melhor da relação entre a progênie de linhagens celulares tumorais e endoteliais provavelmente fornecerá esclarecimentos sobre a biologia tumoral dessas células. Devido a forte correlação entre o grau histológico e vasculatura em gliomas, os agentes bloqueadores da transição endotelial de células tumorais pode proporcionar estratégias terapêuticas novas para esta doença considerada incurável atualmente (Wang *et al.*, 2010).

1.1.3.5.3 Proliferação celular

Alterações no ciclo celular, processo onde ocorre a duplicação do genoma nas células eucariontes resultam no desenvolvimento de diversas neoplasias malignas. Dessa forma, o conhecimento dos processos envolvidos no ciclo celular pode indicar a importância de determinados marcadores de proliferação na biologia de tumores malignos (van Diest *et al.*, 1998).

A proteína *Ki-67* é um conhecido marcador biológico de proliferação celular. A *Ki-67* foi descoberta por Gerdes *et al.*, em 1983, no núcleo de células de linfoma de Hodgkin. A proteína possui cerca de 395 KDa, e é produzida por um gene localizado no braço longo do cromossomo 10 (10q25). Durante o ciclo celular, a *Ki-67* está presente nas fases G1, S, G2 e M, mas está ausente na fase G0, início de G1, e durante os processos de reparação do DNA (Gerdes *et al.*, 1984; Key *et al.*, 1994). Sasaki *et al.* (1987) relataram que a expressão da proteína aumenta com a progressão do ciclo celular, alcançando picos nas fases G2 e Guillaud *et al.* (1989) observaram este mesmo evento tanto em linhagem de células normais como neoplásicas. Diversos

estudos relacionam a expressão de *Ki-67* com o comportamento clínico das neoplasias, prognóstico e com a sobrevivência dos pacientes.

Em um trabalho de metanálise envolvendo 16 publicações sobre astrocitomas de diferentes graus, Johannessem e Torp em 2006 concluíram que a marcação nuclear de *Ki-67* funcionou como um marcador clínico importante nos astrocitomas humanos principalmente na distinção de astrocitomas difusos e astrocitomas anaplásicos. Embora descrevam a necessidade de estudos com amostras maiores, os autores justificam a utilização desse marcador nos diagnósticos de rotina em pacientes com astrocitoma. Habberstad, Gulati & Torp (2011) testaram diversos marcadores de proliferação celular em astrocitomas anaplásicos por imuno-histoquímica e constataram que a *Ki-67*, pode auxiliar no diagnóstico histopatológico, principalmente porque a presença de mitose, característica importante para diferenciar astrocitomas de grau II e III, pode ser de difícil detecção pelo exame histológico de rotina.

A determinação da atividade proliferativa avaliada pela utilização do anticorpo monoclonal *Ki-67*/MIB-1 tornou-se uma ferramenta importante para diagnóstico e prognóstico de meningiomas mais agressivos, pois o exame histológico nem sempre corresponde a apresentação clínica fidedigna desses tumores (Abry *et al.*, 2010).

Abrya *et al* (2010), pesquisaram 53 artigos em bases de dados (Pubmed / Medline) correlacionando a *Ki-67* e meningiomas. Em todos os artigos, foram observadas correlações positivas entre *Ki-67* e grau de malignidade histológica, concluindo, portanto, que a hiperexpressão da proteína *Ki-67* é considerada um indicador de prognóstico adverso, atividade mitótica elevada, indiferenciação celular e maior tendência a invasão tecidual. No entanto, deve ser interpretada com cautela em casos individuais e deve estar associada a outros parâmetros, como padrão radiológico, critérios histopatológicos e sinais e sintomas clínicos.

1.2 Justificativa

Os gliomas são tumores heterogêneos em relação a sua biologia, prognóstico e resposta terapêutica (Ohgaki, 2005; Ohgaki & Kleihues, 2011). Uma melhor compreensão dos aspectos moleculares, do microambiente tumoral e das interações imunológicas com o hospedeiro é necessária para um efeito benéfico significativo na vida dos pacientes que sofrem com essa doença (Ohgaki e Kleihues, 2009; Omuro & DeAngelis, 2013). No decorrer dos últimos anos, inúmeros trabalhos focaram em investigar e traçar um perfil molecular de gliomas. Progressos consideráveis foram alcançados, entretanto, o diagnóstico ainda é baseado na análise histopatológica do

tumor. A classificação histopatológica de gliomas é insatisfatória, devido a sua falta de precisão em termos de prognóstico e dificuldade em classificar casos imprecisos. Tais limitações estão relacionadas com a subjetividade dos critérios para determinação do fenótipo e para a classificação. Além do mais, um subtipo histológico pode englobar diferentes subtipos moleculares com prognósticos diferentes (Ducray & Idhah, 2009; Masui *et al.*, 2011; Von Deimling *et al.*, 2011).

Além disso, a despeito das terapias aplicadas, o impacto na sobrevida dos pacientes ainda é limitado. Nesse contexto destaca-se a importância do glioblastoma, um tumor particularmente difícil de ser tratado, devido a, entre outros fatores, à infiltração de células cancerosas para o tecido cerebral, o que impossibilita a ressecção cirúrgica completa (Ohgaki & Kleihues, 2005; Kanu *et al.*, 2009; Wakimoto *et al.*, 2009; Verhaak *et al.*, 2010; Onishi *et al.*, 2011; Yan *et al.*, 2012).

Diversas vias de sinalização e mecanismos moleculares de invasão e proliferação estão envolvidos na formação e progressão de gliomas. Estudos investigando o papel dessas vias são de grande relevância para determinar métodos mais eficazes de prevenção, diagnóstico e tratamento dos gliomas. Esses possíveis marcadores moleculares detectados por sequenciamento genético ou a expressão de diversas proteínas, avaliadas e quantificadas por imuno-histoquímica, podem ser ferramentas de grande importância para avaliar a resposta de pacientes portadores de gliomas ao tratamento e possibilitar uma classificação molecular mais precisa dessas neoplasias.

Uma vez que o perfil de alterações moleculares presentes nos diversos tipos e subtipos de gliomas pode ser diferente, sendo importante para o conhecimento da doença e podendo ser útil para o diagnóstico, nos propusemos a estudar, por métodos moleculares e imuno-histoquímicos, a frequência de polimorfismos e mutações em *PTEN*, *KRAS*, *BRAF*, *IDH1* e *IDH2* e a expressão de *PTEN*, *BRAF*, *TGF-β* e *Ki-67* em associação com as características clínicas de pacientes com gliomas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar e correlacionar características clínicas de pacientes com gliomas aos achados moleculares e imuno-histoquímicos.

2.2. Objetivos específicos

- Caracterizar os pacientes quanto ao sexo, idade, etnia, tipo histológico, localização e recidiva tumoral, tipo de ressecção cirúrgica e sobrevida.
- Detectar e estimar possíveis alterações genéticas em *KRAS*, *BRAF*, *PTEN*, *IDH1* e *IDH2* em pacientes com gliomas.
- Detectar e estimar a frequência da expressão de *PTEN*, *BRAF*, *TGF- β* e *Ki-67* através da técnica de imuno-histoquímica.
- Verificar se existe correlação entre os resultados das diferentes marcações imuno-histoquímicas.
- Identificar se há correlação entre os achados moleculares e imuno-histoquímicos com as características clínicas.

3. PACIENTES E MÉTODOS

3.1. Pacientes

Foram selecionados trinta e oito pacientes com diagnóstico histopatológico de gliomas. Todos os casos foram diagnosticados de acordo com a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) de 2007 (Louis *et al.*, 2007).

3.1.2. Dados clínicos e anátomo-patológicos

Os dados clínicos foram obtidos pela análise de prontuários médicos e as informações sobre a classificação histológica dos tumores foram obtidas através dos laudos anátomo-patológicos. Os dados coletados foram idade, sexo, raça, localização tumoral, classificação histológica, presença de recidiva, tratamento realizado, tipo de ressecção cirúrgica, presença de outras doenças concomitante ou associadas aos tumores e sobrevida média.

3.1.3. Revisão histopatológica

As lâminas originais coradas pelo método de hematoxilina-eosina (HE), referentes aos casos selecionados, foram reavaliadas pela professora e patologista Paula Vieira Vidigal e pela aluna Lucélia Coimbra. A revisão histopatológica inclui reavaliação do tipo e grau histológico dos tumores e análise quantitativa e qualitativa de parâmetros como pleomorfismo celular, necrose, mitoses e proliferação vascular e celular.

3.1.4. Coleta das amostras

Amostras provenientes de tecidos incluídos em blocos de parafina referente a 44 casos de pacientes diagnosticados com gliomas no período de 2009 a 2012 foram obtidas por pesquisa realizada nos arquivos do departamento de Anatomia Patológica da UFMG. Desses 44 casos, seis foram excluídos por não haver disponibilidade de blocos de parafina para estudo imuno-histoquímico. Assim, o número total de amostras selecionadas com dados clínicos e blocos incluídos em parafina disponíveis foi 38.

Dentre os casos selecionados conforme descrito acima, dezesseis amostras frescas de tecido tumoral foram coletadas durante procedimento cirúrgico realizado no

Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e acondicionadas em tubo eppendorf contendo solução RNAlater® e armazenadas a -80°C, até o momento da extração de DNA. As coletas foram realizadas no período de 2009 a 2011. Este procedimento teve a colaboração do professor Marcelo Magaldi.

O diagnóstico histopatológico foi realizado pelo departamento de Anatomia Patológica da UFMG com a colaboração da professora Paula Vieira Vidigal.

3.2. Estudo molecular

3.2.1. Extração de DNA de tecido fresco

O DNA genômico proveniente de 16 amostras de tecido tumoral foi extraído utilizando Proteinase K. As amostras foram maceradas e colocadas em um tubo de 1,5 µl, juntamente a 200 µl de tampão de lise e Proteinase K 20mg/ml. Os tubos foram mantidos em banho-maria a 65°C por 30 minutos. Após esse período, foi adicionado mais 200 µl de tampão de lise, as amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 15 minutos e, depois, centrifugadas por 20 minutos a 11.000xg. O sobrenadante foi coletado e, adicionados a ele, 2 volumes de etanol 100% e 10% do volume do sobrenadante de NaAc 3M, pH 8,2. As amostras foram agitadas suavemente até que a massa de DNA foi visualizada. O pellet foi lavado em etanol 70% e, após a secagem, eluído em 200 µl de TE (Tris-HCL 10mM; EDTA 1mM, pH 7,0-8,0 e armazenados a 4°C.

3.2.2 Extração de DNA de material incluído em parafina

Os tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina referentes a 15 amostras foram desparafinizados em um banho de xilol e digeridos com proteinase K. O DNA foi extraído com Qlamp® DNA FFPE Tissue, de acordo com as recomendações do fabricante (Qiagen, Hilden, NRW, Germany).

3.2.3. Amplificação e seqüenciamento das amostras

Um conjunto de iniciadores (primers) específicos para a amplificação dos diferentes exons de *BRAF*, *KRAS*, *PTEN* e *IDH1* e *IDH2* foram desenhados utilizando o programa Primer3 v.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) e estão listados na Tabela 1.

Tabela 1: Características de amplificação por PCR dos genes estudados

Gene	Seqüência dos Primers (forward/reverse)	Tm°C	Tamanho do Produto (pb)
BRAF		55	179
Exon15	5'-TCATAATGCTTGCTGTGATAGGA-3'/5' GGCCAAAAATTTAATCAGTGGA-3'		
KRAS		55	170
Exon 2	5'-GTGTGACATGTTCTAATATAGTCA-3'/5'-GAATGGTCTGCACCAGTAA-3'		
Exon 3	5'-CCAGACTGTGTTTCTCCCTC-3'/5'-TGCATGGCATTAGCAAAGAC-3'	55	245
PTEN		55	206
Exon 1	5'-GCAGCTTCTGCCATCTCTCT-3'/5'-TTTTCGCATCCGTCTACTCC-3'		
Exon 2	5'-TTTGATTGCTGCATATTTTCCAGA-3'/5'-CATCACAAAGTATCTTTTTCTGTGG-3'	55	239
Exon 3	5'-GGTGGCTTTTTGTTTGTG-3'/5'-CAATGCTCTTGGACTTCTTGA-3'	55	231
Exon 4	5'-AAAGATTCAAGCAATGTTTGT-3'/5'-TCTCACTCGATAATCTGGTGAC-3'	55	235
Exon 5	5'-TGAGGTTATCTTTTTACCACAG-3'/5'-GGAAAGGAAAAACATCAAAA-3'	55	291
Exon 6	5'-TTTTTCAATTTGGCTTCTTTTT-3'/5'-TGTTCCAATACATGGAAGGATG-3'	55	220
Exon 7	5'-AAAGGCATTTCTGTGAAATAA-3'/5'-TTTGGATATTCTCCCAATGAA-3'	55	250
Exon 8	5'-GTCATTTTCTTTTCTTTTCTTTT-3'/5'-CAACAACCCCAACAAATGT-3'	52	300
Exon 9	5'-TGGGTTTTTCAATTTAAATTTCTTTC-3'/5'-CATGGTGTTTATCCCTCTTGA-3'	55	250
IDH 1		53	419
Exon 4	5'-CCATTTGTCTGAAAACTTTGCT-3'/5'AAGAATAAAACACATACAAGTTGGAAA-3'		
IDH 2		53	325
Exon 4	5'- AATTTTAGGACCCCTCTG-3'/5' CTAGGCGAGGAGCTCCAGT-3'		

* Tm: Temperatura de anelamento.

O DNA extraído dos tumores foi quantificado e as Reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas utilizando 50ng/µl de DNA, 2.5µl de Tampão IIB 10x (NaCl 40mM; Tris HCl 10mM, pH 8.4; Triton X-100 0.1%; MgCl₂ 1.5mM), 2.5 µl de dNTPs (0.2mM), 0.5µl de cada par de primers (10pmol/ml) e 0.25µl de Taq polimerase (0.625U). Os produtos foram amplificados em termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient, utilizando as seguintes etapas: desnaturação a 94oC por 3 minutos, e, 35 ciclos de desnaturação a 94oC por 30 segundos. Anelamento a 55-60oC por 30 segundos e extensão a 72oC por 30 segundos. Ao término dos ciclos, as reações passaram por uma extensão final a 72oC por 5 minutos.

Os produtos de PCR foram purificados com o kit de purificação Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare), seguindo as instruções contidas no manual. A visualização das bandas foi realizada em um gel de poliacrilamida 6.5%. O protocolo de coloração envolveu uma etapa de fixa o em ácido acético glacial 10%, lavagem em água destilada por 3 minutos; etapa de impregna o em soluço de nitrato de prata (10.5g AgNO₃, q.s.p 100ml H₂O, formaldeído 37%, q.s.p 50ml de água destilada) lavagem em água destilada por 15 segundos e a etapa de revela o em uma soluço contendo 50ml de carbonato de sódio (3g de NaCO₃, q.s.p 100ml H₂O 75ml de formaldeído 100% e 20µl de tiosulfato de sódio 10mg/ml).

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando BigDye Terminator v.3.1 cycle sequencing kit, seguindo as instruções do fabricante (Applied Biosystems). As sequências foram obtidas em sequenciador ABI 3130 Genetic Analyzer 4 capillaries (Applied Biosystems) e analisadas utilizando o programa Sequencher v.4.9.

3.3. Imuno-histoquímica

3.3.1. *PTEN, BRAF, TβRII e Ki-67*

As trinta e oito amostras provenientes de tecidos incluídos em blocos de parafina obtidos do acervo foram cortados e corados por Hematoxilina-Eosina (HE), para a identificação das áreas de tumor. Os cortes foram desparafinizados em xilol e re-hidratados em água, após banho em álcool. O bloqueio da peroxidase foi realizado em peróxido de hidrogênio a 1%, durante 15 minutos. Após este período, foram enxaguados em água corrente. A recuperação antigênica foi realizada utilizando solução tampão de EDTA (pH 8.0), em panela de vapor a 94°C por 30 minutos. Após o resfriamento à temperatura ambiente, os cortes foram incubados com os anticorpos primários previamente diluídos (descritos na tabela 2) por 18 horas. Na reação imuno-histoquímica para Ki-67, a incubação com o anticorpo primário foi realizada por 30 minutos e a recuperação antigênica foi feita utilizando solução de citrato pH6,0. Após enxágüe com PBS, os cortes foram cobertos com o reagente amplificador de sinal (DAKO EnVision Visualization System) durante 30 minutos, novamente enxaguados em PBS e incubados em solução cromógeno-substrato (DAB-DAKO Em Vision Visualization System) por 7 minutos. Após este período, os cortes foram lavados em água destilada, contra-corados com hematoxilina e montados com Entellan.

Para cada anticorpo foi incluído na mesma bateria um controle positivo (tabela 2) e um controle negativo, no qual o anticorpo primário foi omitido.

Tabela 2: Anticorpos primários utilizados para a imuno-histoquímica, com respectivas diluições, soluções de recuperação antigênica e controles positivos utilizados

	Código	Fabricante	Clone	Diluição	Recuperação antigênica	Controle positivo
Ki-67	M7240	DAKO	MIB-1	1:50	Citrato pH 6,0	Tonsila
PTEN	NCL-PTEN	NovoCastra, Newcastle, UK	28H6	1:100	EDTA pH 8,0	Tonsila
BRAF	sc-9002	Santa Cruz biotechnology	H-145	1:100	EDTA pH 8,0	Tecido glandular
TGFβ Receptor II	NB100-91994	Novus biologicals	Policlonal	1:100	EDTA pH 8,0	Tecido nervoso

3.3.2 Avaliação dos resultados de imuno-histoquímica

A imuno-marcação foi avaliada utilizando-se microscopia de luz (aumento de 400x).

A expressão da proteína *PTEN* foi investigada utilizando um anticorpo marcador de *PTEN* nuclear. A reatividade de *PTEN* foi avaliada individualmente em todas as amostras. A análise da imunoexpressão foi feita em grau 1 (Imunomarcação fracamente positiva das células neoplásicas), grau 2 (Imunomarcação moderadamente positiva das células neoplásicas), grau 3 (Imunomarcação fortemente positiva das células neoplásicas) e 0 na ausência de imunomarcação.

O anticorpo anti-*BRAF* é um marcador citoplasmático e a expressão da proteína *BRAF* foi avaliada individualmente em todas as amostras, através da análise de áreas normais e tumorais observadas na mesma lâmina. A imuno-marcação foi classificada em grau 1 (imuno-marcação fracamente positiva das células neoplásicas), grau 2 (imuno-marcação moderadamente positiva das células neoplásicas), grau 3 (imuno-marcação fortemente positiva das células neoplásicas) e 0 na ausência de imunomarcação.

A análise da imunolocalização de *Ki-67* foi realizada utilizando-se um retículo de contagem para delimitação de campos observados ao microscópio de luz. Em cada campo delimitado pelo retículo de contagem, foi mensurado o número total de células e o número de células positivas para a proteína *Ki-67*. Foram consideradas positivas

as células que apresentaram núcleo com coloração castanha, como resultado da precipitação do crómogeno diaminobenzidina, independentemente da intensidade de coloração. Em cada campo avaliado, foram quantificados o número total de células e o número de células positivas. A partir dos dados obtidos pela avaliação de todos os campos, foi calculado o índice de marcação pela fórmula:

$$\text{Índice de marcação} = \frac{\text{soma do número de células positivas nos campos}}{\text{soma do número total de células nos campos}} \times 100$$

O índice de marcação indica, portanto, a percentagem de células positivas sobre o número total de células do campo avaliado.

A expressão de TβRII foi avaliada estimando-se a percentagem (P) de células normais e tumorais mostrando a coloração característica (0% a 100%) e a intensidade da coloração (I) (1= fraca; 2= moderada; 3= forte). Os resultados foram obtidos pela multiplicação da percentagem de células positivas pela intensidade da marcação para gerar um score numérico, de acordo com Zuo *et al*, 2012, conforme descrito abaixo:

0= negativo (ausência de coloração)

1= fracamente positiva (coloração pálida)

2= moderadamente positiva (amarelo escuro)

3= fortemente positiva (marrom)

A partir da multiplicação dos valores obtidos na porcentagem e intensidade da marcação, foi obtido um score final como se segue:

Score 1 notas 0 a 4 = negativo ou marcadamente reduzido

Score 2 notas 6 a 8 = fracamente ou moderadamente positivo

Score 3 notas 9 a 12 = fortemente positivo

Todas as reações foram avaliadas por um único pesquisador (LCS), sem o conhecimento prévio da classificação do grau histológico.

Os dados gerados foram transferidos para planilhas do programa Excel, e armazenados para a realização dos testes estatísticos.

3.4. Análise estatística

Os valores das áreas marcadas por imuno-histoquímica de cada lâmina foram utilizados para o cálculo das médias. As correlações entre os dados obtidos por imuno-histoquímica e a graduação histológica dos tumores foram feitas pelo teste *t de Student* para correlação entre dois grupos ou ANOVA para correlação entre mais grupos através do software GraphPad Prism 5.0, www.graphpad.com. O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

4. RESULTADOS

4.1 Características clínicas dos pacientes

Dos 38 casos analisados, 13 foram diagnosticados como gliomas de grau I, 11 como gliomas de grau II, três como gliomas de grau III e 11 como gliomas de grau IV. O valor em percentagem e o estadiamento tumoral de todos os sub-tipos está demonstrado na tabela 3 e na figura 4. As outras características clínicas dos pacientes estão demonstradas na Tabela 4. Dezoito pacientes pertenciam ao sexo masculino e vinte ao sexo feminino. Em relação à raça, um (2.63%) era negro, sete eram caucasianos (18.42%) e 30 (78.94) eram pardos, conforme representado na figura 5. A idade variou de um a 72 anos, sendo a média de 36,5 anos, sendo 10 crianças e 28 adultos.

Tabela 3: Classificação histológica e graduação tumoral dos pacientes com gliomas

Classificação histológica dos pacientes com gliomas			
Tipo histológico	Grau do tumor (OMS)	N	%
Total de casos		38	100
Astrocitoma pilocítico	grau I da OMS	11	28,94
Astrocitoma subependimário	grau I da OMS	1	2,63
Ependimoma mixopapilar	grau I da OMS	1	2,63
Ependimoma	grau II da OMS	1	2,63
Astrocitoma difuso/fibrilar	grau II da OMS	7	18,42
Oligoastrocitoma	grau II da OMS	1	2,63
Oligodendroglioma	grau II da OMS	1	2,63
Xantoastrocitoma pleomórfico	grau II da OMS	1	2,63
Astrocitoma anaplásico	grau III da OMS	2	5,26
Oligodendroglioma anaplásico	grau III da OMS	1	2,63
Glioblastoma multiforme (GBM)	grau IV da OMS	11	28.94

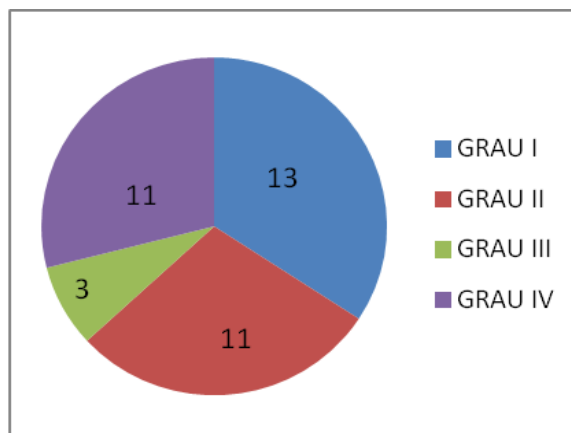


Figura 4: Representação gráfica da graduação histológica dos tumores

Variantes		N	N%
Idade (anos)	0-20	10	26,31
	20-40	7	18,42
	40-60	16	42,10
	60-80	4	10,52
	Não informado	1	2,63
Recidiva	Sim	19	50
	Não	19	50
Sobrevida média (anos)	GRAU I	4,77	
	GRAU II	1,72	
	GRAU III	1,33	
	GRAU IV	1,3	
Quimioterapia	Sim	6	15,78
	Não	20	52,63
	Não informado	12	31,57
Radioterapia	Sim	8	21,05
	Não	18	47,36
	informado	12	31,57

Tabela 4: Características clínicas dos pacientes portadores de gliomas

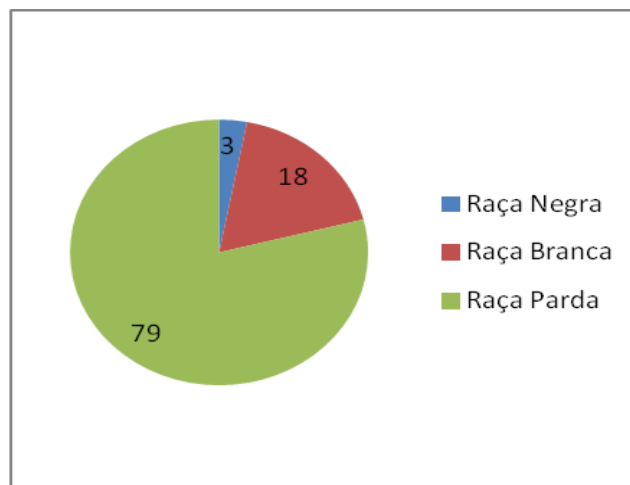


Figura 5: Representação gráfica da distribuição quanto à raça de pacientes com gliomas

A metade dos pacientes apresentou recidiva tumoral, sendo que sete vieram a óbito em um período inferior a dois anos.

4.2 Análise de sequenciamento

4.2.1 *PTEN*

No seqüenciamento do gene *PTEN*, foi detectada uma mutação, G1937A, no exon 6 que não havia sido descrita anteriormente na literatura. Esta apresenta-se em heterozigose e não acarreta troca de aminoácidos. Esta mutação foi identificada em um paciente do sexo feminino portador de glioblastoma multiforme. Não foi detectada qualquer alteração na seqüência dos exons 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8 e 9 desse gene.

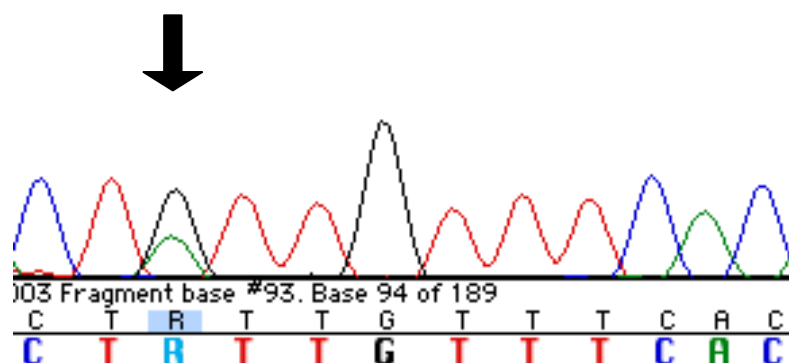


Figura 6: Eletroferograma mostrando a mutação G1937A no exon 6 de *PTEN*

4.2.2 *BRAF*

Em nenhum dos pacientes analisados foram detectadas mutações ou polimorfismo no exon 15 do gene *BRAF*.

4.2.3 *KRAS*

Em nossa análise não foram detectadas mutações ou polimorfismos nos exons 2 e 3 de *KRAS*.

4.2.4 *IDH1* e *IDH2*

No sequenciamento do exon 4 de *IDH1* observamos a presença da mutação missense R132H (rs121913500) em um paciente diagnosticado com astrocitoma difuso/fibrilar grau II da OMS.

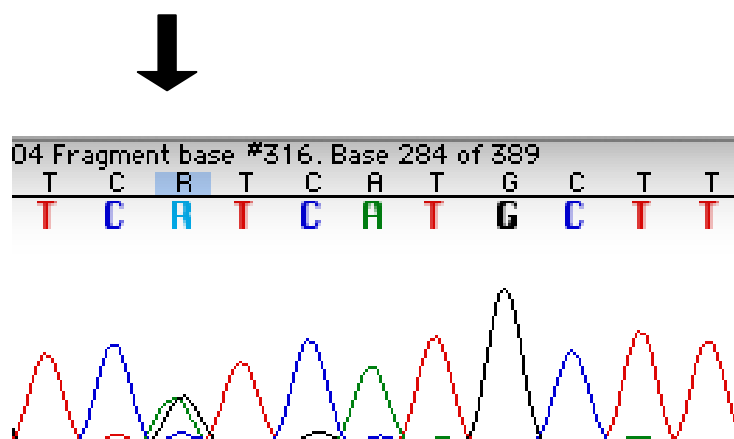


Figura 7: Eletroferograma mostrando a mutação missense p.R132H (rs121913500) em heterozigose no exon 4 de IDH1.

No exon 4 de *IDH2*, um polimorfismo previamente relatado foi identificado: a substituição de base silenciosa (CTG> CTC) na posição p.L143L (rs144712130) em um paciente diagnosticado com astrocitoma difuso/fibrilar grau II da OMS.

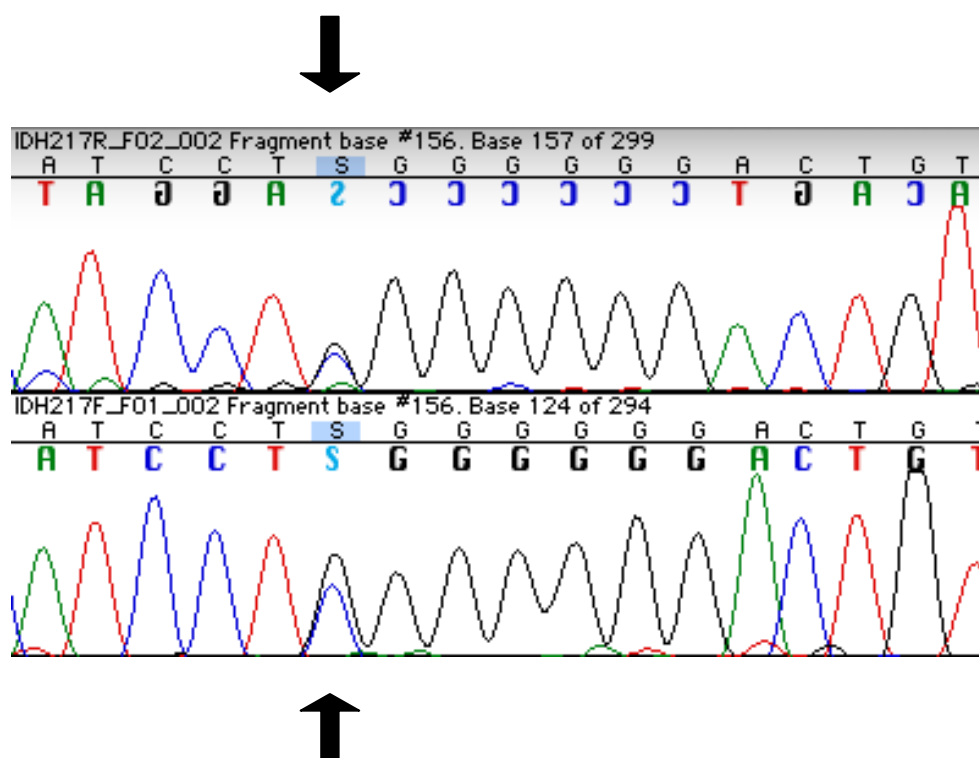


Figura 8: Eletroferogramas representativos do polimorfismo (CTG> CTC) na posição L143L (rs144712130) no exon 4 de IDH2.

4.3 Achados imunoistoquímicos

4.3.1 Associação do grau histológico com a proliferação celular (Ki-67)

A associação do grau histológico com a proliferação celular está representada na figura 9. A análise foi feita por meio da percentagem de expressão da proteína Ki-67. Na representação gráfica está representada a média da percentagem em tumores considerados de baixo grau e de alto grau. Encontramos diferença significativamente maior entre a expressão de Ki-67 nos tumores de alto grau quando comparados aos tumores de baixo grau. As figuras 10 e 11 demonstram a percentagem de imunomarcagem da proteína *Ki-67*.

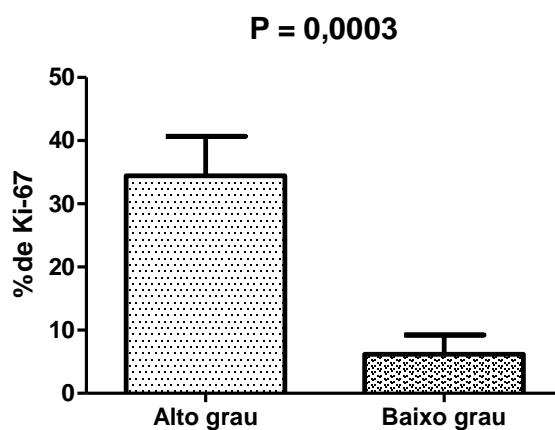


Figura 9: Associação da expressão da proteína *Ki-67* em gliomas com o grau de malignidade histológica.

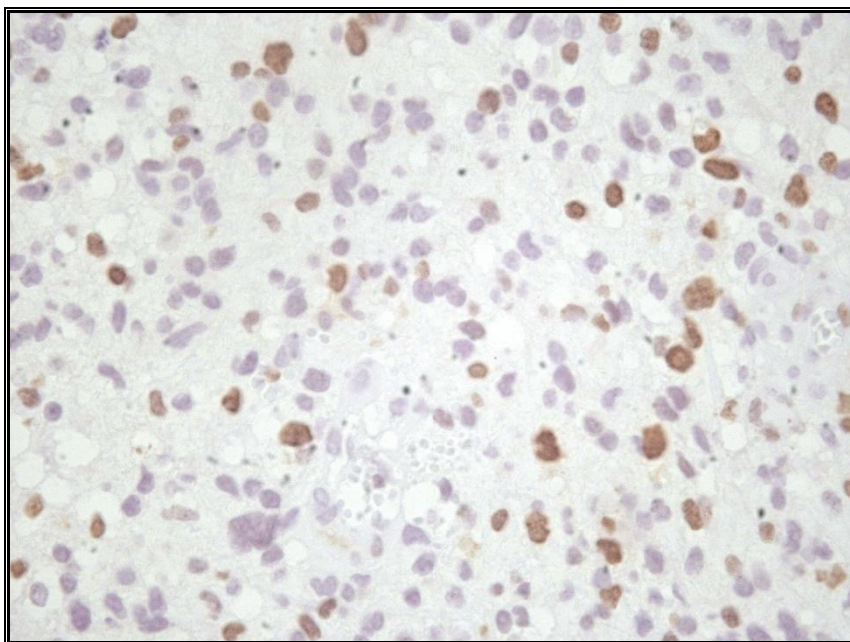


Figura 10: Fotomicrografia de glioblastoma multiforme e expressão da proteína *Ki-67* em 40% dos núcleos.

Notar núcleos de células em proliferação imunomarcados de coloração acastanhada em comparação às células que não estão proliferando coradas em azul-arroxeadado por contra-coloração com hematoxilina (aumento de 400x).

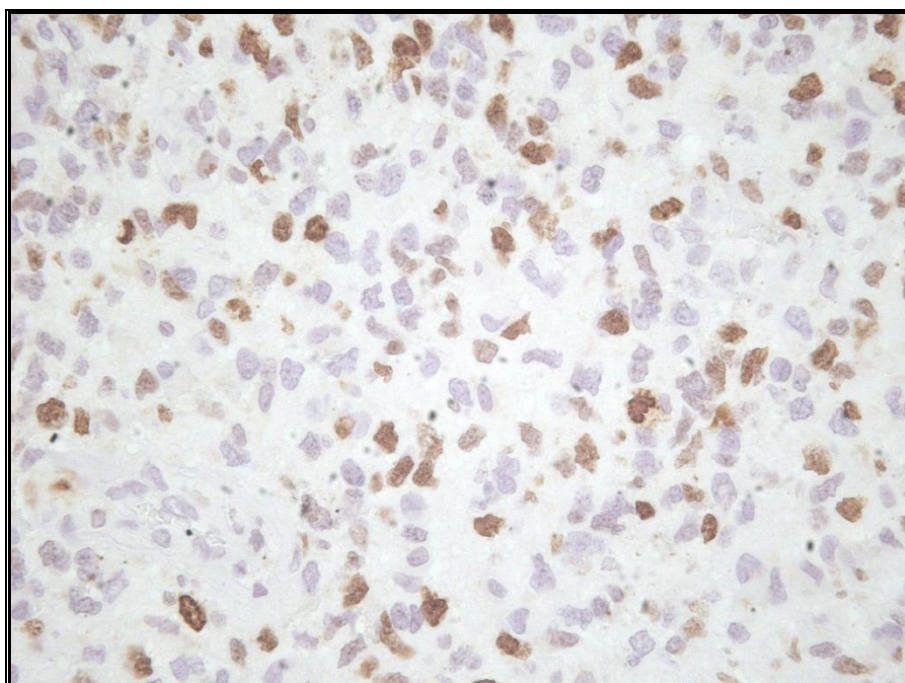


Figura 11: Fotomicrografia de glioblastoma multiforme demonstrando a expressão da proteína *Ki-67* em 50% dos núcleos.

Notar núcleos de células em proliferação imunomarcados de coloração acastanhada em comparação às células que não estão proliferando coradas em azul-arroxeadado por contra-coloração com hematoxilina (aumento de 400x).

4.3.2 PTEN

Avaliamos e classificamos a imunomarcção de PTEN correlacionando-a com os graus dessas neoplasias (figura 12).

Em 11 gliomas de grau I, verificamos que 67% apresentaram imunomarcção moderadamente positiva, 16,6% fortemente positiva, 8,2% fracamente positiva e 8,3% não apresentaram imunomarcção. Em dois casos de pacientes grau I não foi possível avaliar as lâminas devido a escassez de material emblocado em parafina.

Em 11 gliomas de grau II, observamos 10% de imunomarcção fortemente positiva, 50% de imunomarcção moderadamente positiva, 30% fracamente positiva e 10% sem marcação. Nos três casos classificados como grau III, identificamos 80% de imunomarcção fracamente positiva e 20% moderadamente positiva.

Em 11 GBMs, tumores considerados grau IV, os mais agressivos, encontramos 70% núcleos fracamente marcados e 30% moderadamente imunomarcados. As figuras 13, 14 e 15 são fotomicrografias representativas da imunomarcção nuclear de PTEN em gliomas.

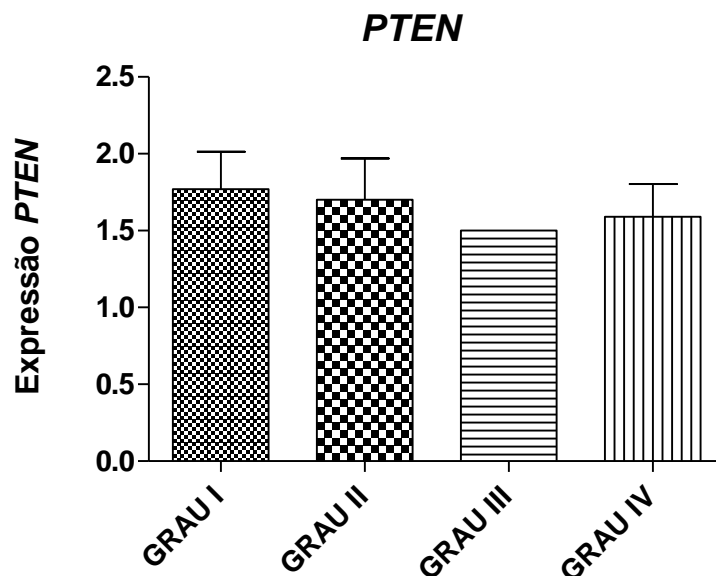


Figura 12: Representação gráfica da expressão de PTEN em relação à graduação histológica de gliomas

$P > 0.66$

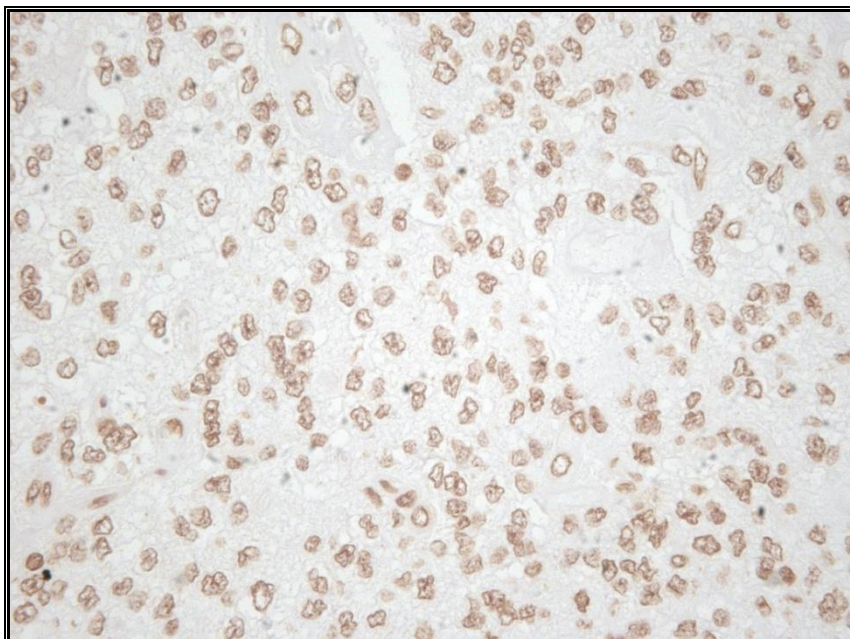


Figura 13: Fotomicrografia demonstrando expressão fracamente positiva de PTEN em oligodendroglioma (GRAU II).

Notar núcleos marcados de coloração marrom clara (aumento de 400X).

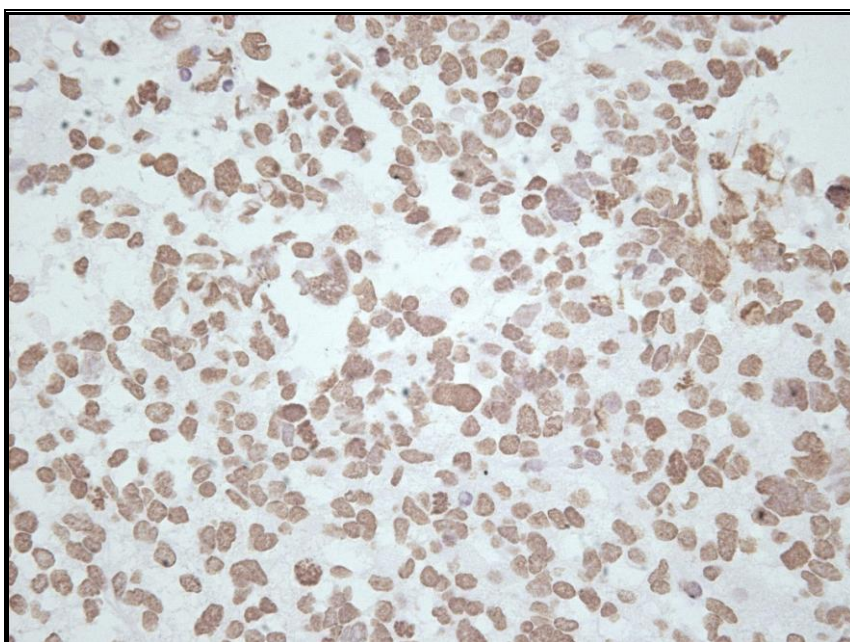


Figura 14: Fotomicrografia demonstrando expressão moderadamente positiva de PTEN em glioma de baixo grau.

Notar núcleos marcados de coloração marrom (aumento de 400X).

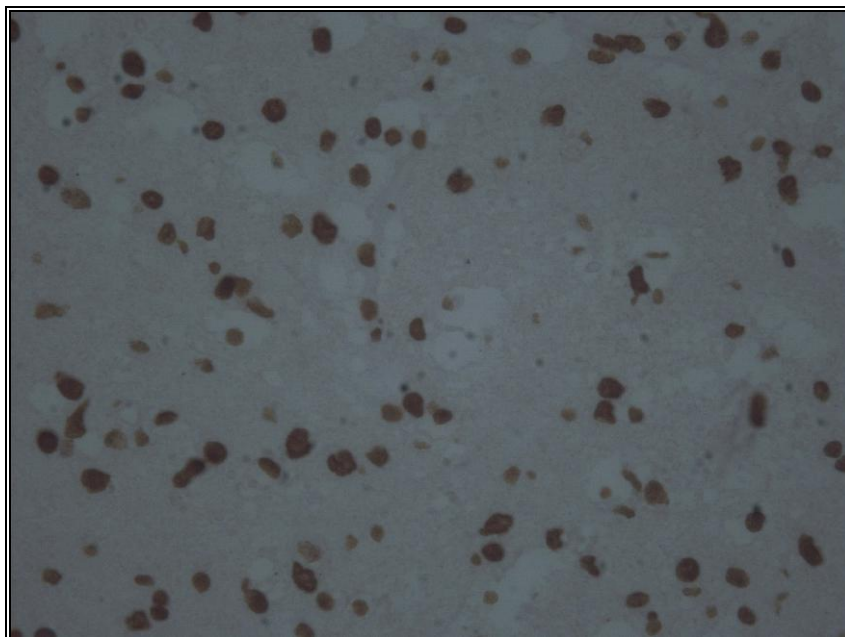


Figura 15: Fotomicrografia demonstrando expressão fortemente positiva de PTEN em glioma de baixo grau. Notar núcleos marcados de coloração marrom escura (aumento de 400X).

4.3.3 BRAF

A expressão da proteína BRAF foi avaliada individualmente em todas as amostras, através da análise de áreas normais e tumorais observadas na mesma lâmina. Verificamos diferença significativa entre a expressão da proteína nos gliomas de grau I quando comparados aos gliomas de grau II e grau IV, sendo observada maior expressão de BRAF nos graus II e IV (figura 16). A tabela 5 representa a percentagem da expressão da proteína em cada grupo classificado quanto ao grau histológico dos tumores.

As figuras 17 e 18 são fotomicrografias representativas da imunomarcação citoplasmática de BRAF em gliomas.

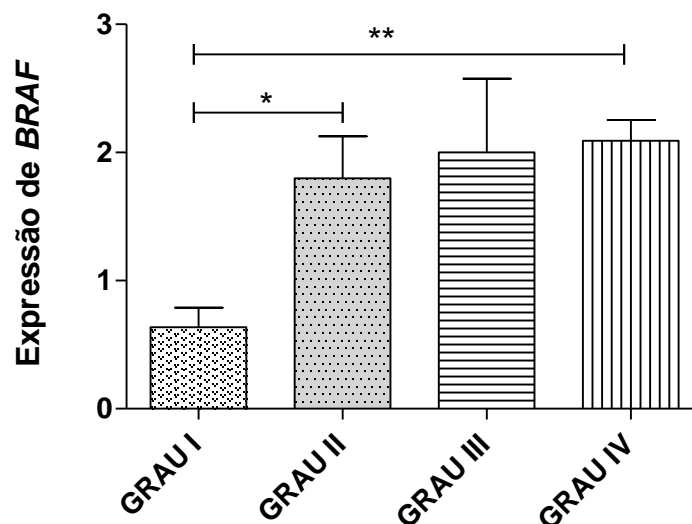


Figura 16: Representação gráfica da expressão de BRAF em relação à graduação histológica de gliomas.

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

Tabela 5: Percentagem da expressão de BRAF de acordo com a graduação histológica de gliomas

Expressão de BRAF %	GRADUAÇÃO HISTOLÓGICA			
	GRAU I	GRAU II	GRAU III	GRAU IV
0 Ausência de marcação	36.36	10	0	0
1 Fracamente positiva	63.63	30	33.3	0
2 Moderadamente positiva	0	30	33.3	80
3 Fortemente positiva	0	30	33.3	20

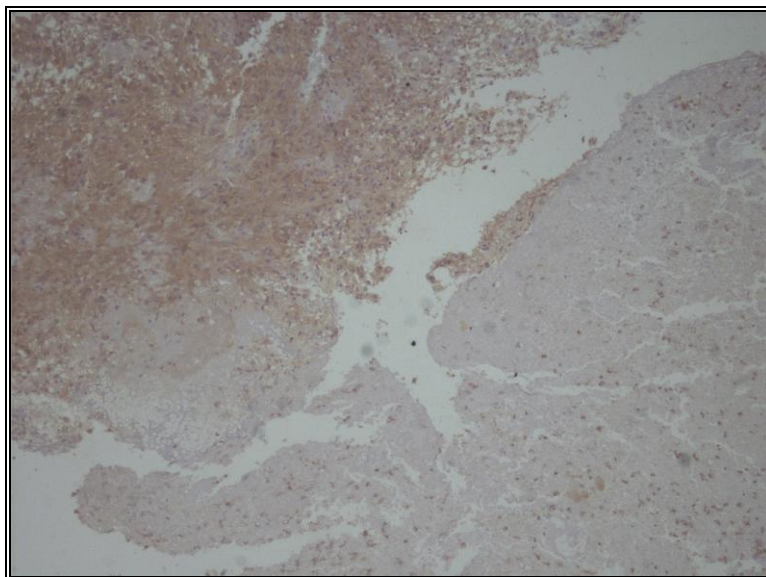


Figura 17: Fotomicrografia demonstrando expressão fortemente positiva de BRAF em GBM (GRAU IV).

Notar área tumoral apresentando hiperplasticidade de coloração marrom escura em contraste com área de tecido normal contra-colorada por hematoxilina (aumento de 200X).

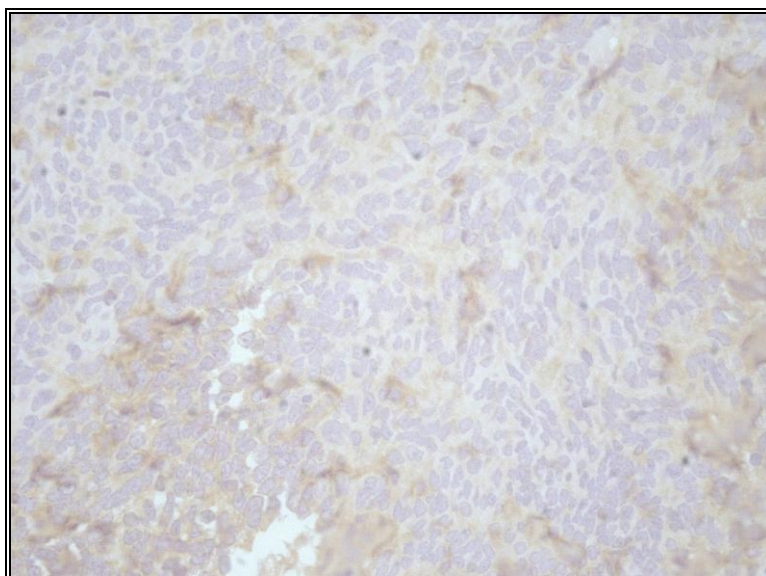


Figura 18: Fotomicrografia demonstrando expressão moderadamente positiva de BRAF em GBM (GRAU IV).

Notar área tumoral apresentando hiperplasticidade de coloração marrom e núcleos arroxeados contra-colorados por hematoxilina (aumento de 400X).

4.3.4 TGF- β

A expressão da proteína do receptor II de *TGF- β* (T β RII) foi avaliada individualmente em todas as amostras, através da análise de áreas normais e tumorais observadas na mesma lâmina. Verificamos diferença significativa entre a expressão aumentada da proteína nos gliomas em comparação aos tecidos normais (figura 20). As figuras 21, 22 e 23 são fotomicrografias representativas da imunomarcagem de T β RII em gliomas.

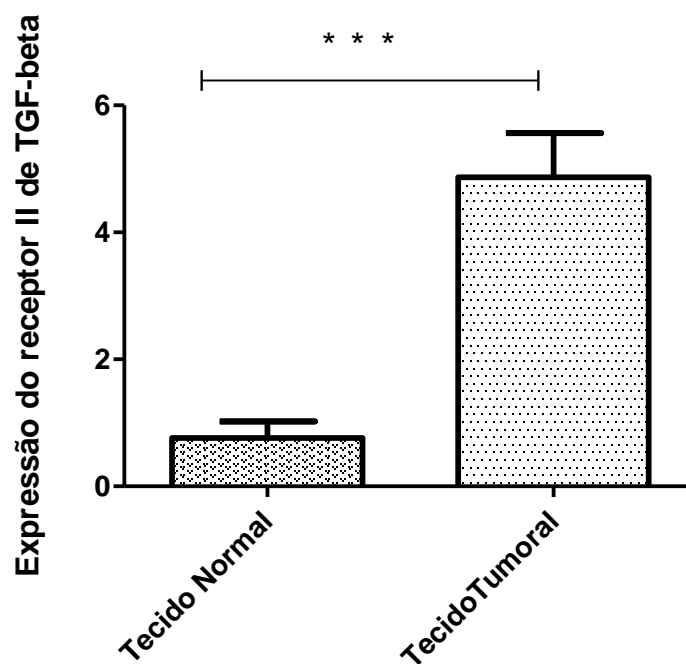


Figura 19: Representação gráfica da expressão de T β RII em gliomas em relação aos tecidos normais.

* $p < 0.001$

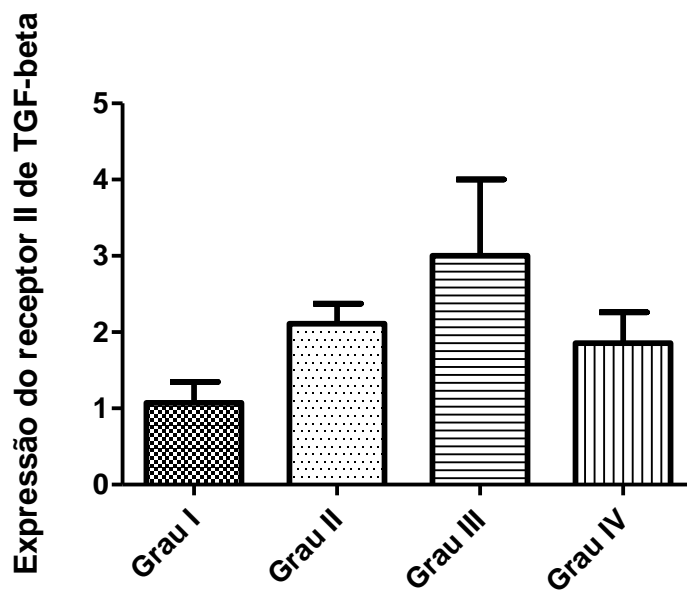


Figura 20: Representação gráfica da expressão de TβRII em relação à graduação histológica de gliomas.

P > 0.08

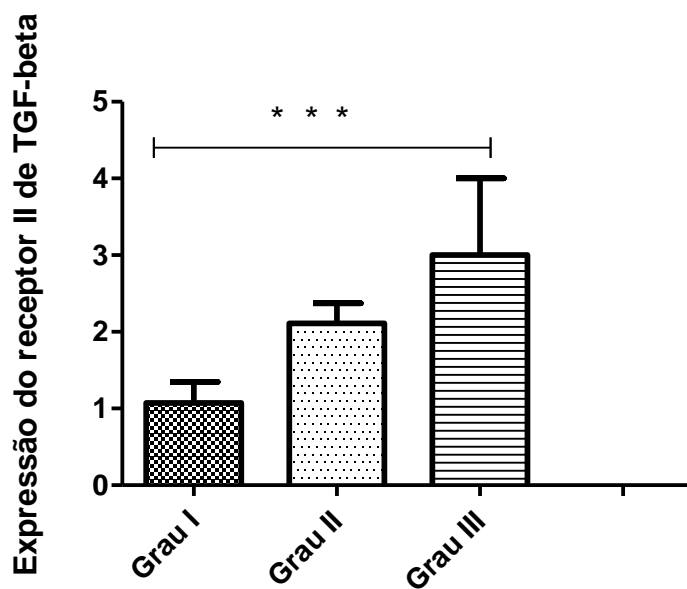


Figura 21: Representação gráfica da expressão de TβRII em relação à graduação histológica de gliomas.

P > 0.04

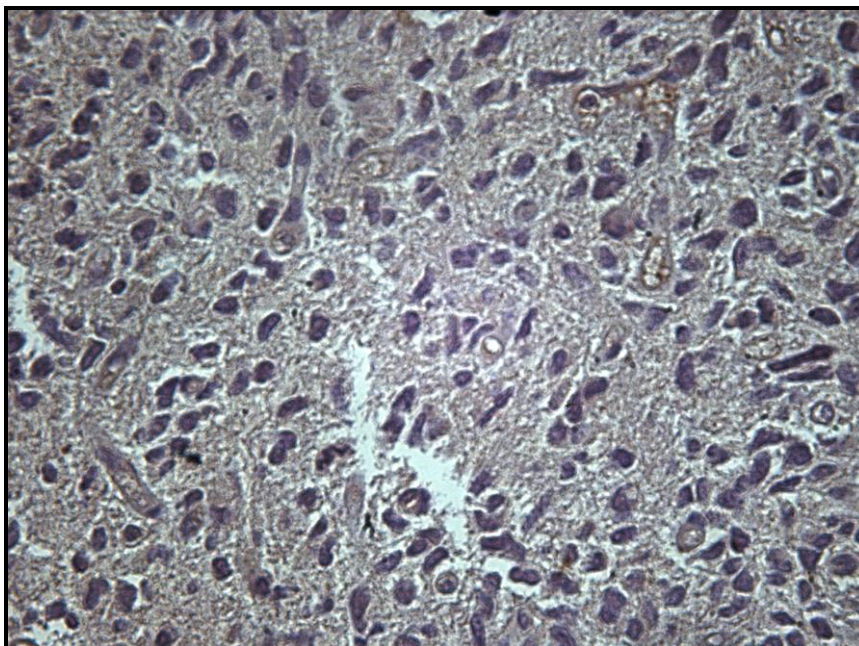


Figura 22: Fotomicrografia demonstrando ausência de expressão de TβRII em tecido normal.

Notar núcleos arroxeados contra-corados por hematoxilina (aumento de 400X).

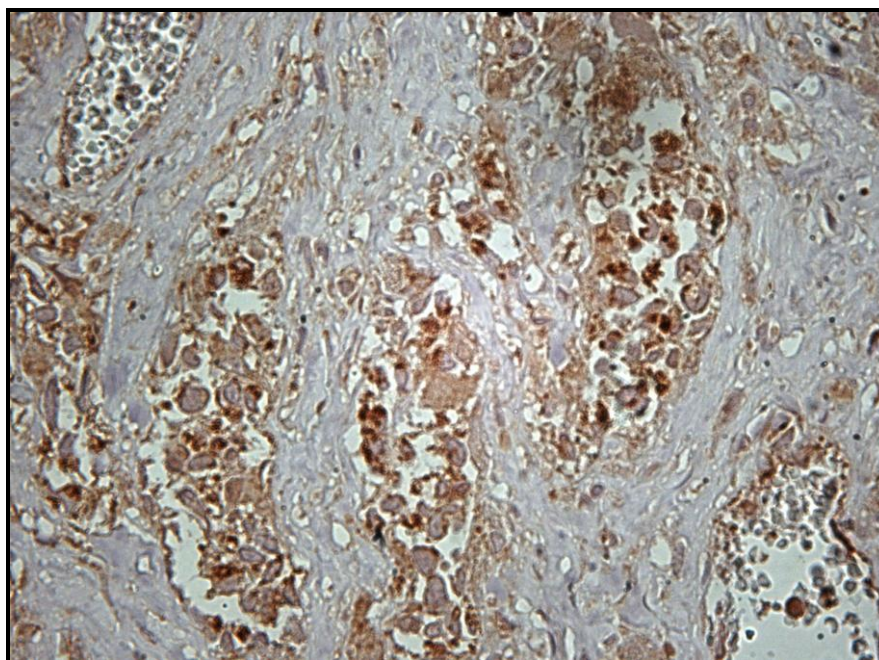


Figura 23: Fotomicrografia demonstrando expressão de TβRII em GBM (GRAU IV).

Notar células tumorais apresentando imunomarcção de coloração marrom e núcleos e estroma tumoral contra-corados por hematoxilina (aumento de 400X).

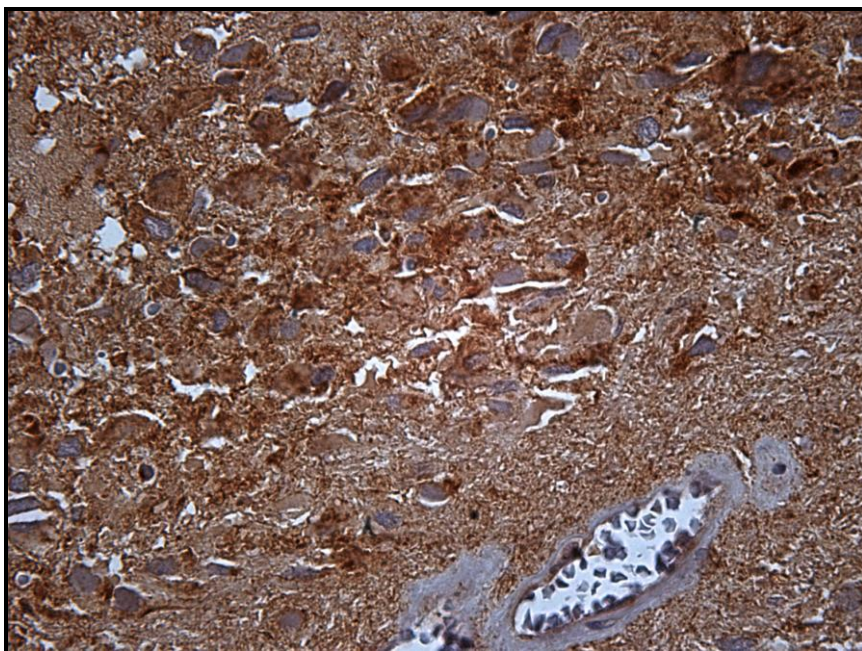


Figura 24: Fotomicrografia demonstrando expressão fortemente positiva de TβRII em GBM (GRAU IV).

Notar área tumoral apresentando hiper celularidade de coloração marrom e núcleos e estroma tumoral contra-corados por hematoxilina (aumento de 400X).

5. DISCUSSÃO

Apesar de avanços recentes a cerca da biologia tumoral, a gênese dos gliomas permanece complexa e não totalmente esclarecida. Os genes envolvidos nesse processo são considerados marcadores moleculares em potencial, associados com a susceptibilidade ao câncer. Portanto, um melhor entendimento de alterações genéticas e nas diversas vias de sinalização relacionadas é de grande relevância para o progresso de terapias novas bem como diagnóstico e prognóstico mais específicos permitindo uma sobrevida aumentada dos pacientes. Um fato que exemplifica essa complexidade é a pequena percentagem de história familiar de glioma nos indivíduos doentes. Algumas síndromes como a Neurofibromatose tipo 1 e 2 estão relacionadas a formação desses tumores e fatores ambientais podem também estar envolvidos, porém, o papel determinante dos mesmos, ainda não está bem estabelecido (Hambardzumyan *et al.*, 2011). Em nosso estudo, uma paciente diagnosticada com astrocitoma pilocítico (grau I da OMS) apresenta em concomitância neurofibromatose do tipo 2 com histórico de diversas ressecções cirúrgicas de meningiomas e astrocitoma pilocítico.

De acordo com a literatura estudada, as alterações moleculares presentes nos gliomas envolvem diversas vias de sinalização e podem apresentar significados e frequência diversos. Neste trabalho, procuramos investigar o perfil de alterações genéticas nos genes *PTEN*, *BRAF*, *KRAS*, *IDH1* e *IDH2*, bem como a expressão das proteínas de *PTEN*, *BRAF*, *TGF- β* e *Ki-67* em gliomas, buscando contribuir para a compreensão do papel desses genes na patogênese molecular desses tumores.

Os tumores astrocíticos são os tumores intracranianos primários mais frequentes e dentre estes, o GBM é mais comum e também o mais agressivo e letal, sendo classificado como grau IV. Nossos dados clínicos correspondem ao descrito na literatura, sendo que em 38 casos estudados, 34 (89,4%) exibem componente astrocítico. Porém, encontramos frequência maior de astrocitomas pilocíticos, classificados como grau I. Estes representam 34,2% ao passo que os GBMs corresponderam a 28,9% das nossas amostras. Dos onze GBMs analisados no presente estudo, nove são primários e em dois não foi possível distinguir entre primários e secundários devido a ausência de dados clínicos suficientes para esclarecer essa condição. Desse modo, temos uma percentagem de no mínimo 81,8 desses tumores primários, corroborando com a frequência mais elevada destes em relação aos GBMs secundários (Ohgaki, 2005).

Apesar dos esforços em melhorar a terapia para GBMs, os mesmos ainda não foram suficientes para mudar consideravelmente a sobrevida dos portadores. Em uma meta-análise recente de 12 experimentos clínicos randomizados, a taxa de sobrevida global de pacientes com gliomas grau IV foi de 40% durante um ano, e apenas um pouco mais elevada (46%) após a adição de terapias adjuvantes (Parsons, 2008).

Definimos a associação do grau histológico com a proliferação celular por meio da percentagem de expressão da proteína Ki-67. O Ki-67 é um antígeno nuclear específico associado à proliferação celular sendo utilizado amplamente em diversos tipos de câncer para determinar o grau de proliferação e conseqüentemente a atividade tumoral (Gerdes *et al.*, 1984).

Muitos estudos tem se concentrado sobre o valor clínico da atividade proliferativa em tumores, especialmente o índice de marcação Ki-67 (Pich *et al.*, 2004). Esses dados corroboram com nossos resultados que apontaram diferença significativa entre o índice de proliferação celular pelo Ki-67 em gliomas considerados de baixo grau, nos quais a imunomarcação foi consideravelmente menor em relação ao percentual de gliomas de alto grau, sobretudo nos glioblastomas multiformes.

Células tumorais apresentam uma maior atividade proliferativa, e por isso o estudo de marcadores de proliferação celular como Ki-67, se torna imprescindível para avaliar o potencial de malignidade e prognóstico dos tumores malignos. Além disso, os marcadores de proliferação celular também podem auxiliar no diagnóstico de tumores com características morfológicas semelhantes, mas com diferentes padrões de atividade proliferativa (van Diest *et al.*, 1998).

Sabe-se que o prognóstico de pacientes com GBM está intimamente associado com a invasão, migração e alto potencial de crescimento das células tumorais que leva a formação de áreas necróticas presentes no tecido afetado. Além disso, as vias de angiogênese que apresentam características peculiares nesses tumores possuem um papel importante na sua gênese (Wang *et al.*, 2010). Estudos direcionados pela base molecular e conseqüentemente terapias-alvo fornecem uma perspectiva promissora para os doentes com essa doença universalmente fatal.

Nesse sentido, um gene extensivamente estudado recentemente é o *IDH*. As mutações em *IDH1* e *IDH2* foram inicialmente identificadas por Parsons e colaboradores em 2008 através de análise genômica em glioblastomas. Estudos subsequentes demonstraram que mutações no gene *IDH1* são bastante frequentes, ocorrendo em cerca de 80% dos gliomas de baixo grau e em glioblastomas secundários principalmente em pacientes jovens. Em contrapartida, essas mutações parecem ser raras nos astrocitomas pilocíticos e glioblastomas primários e ausentes em endimomas e em outros tumores tanto do SNC como em outras partes do corpo.

No *IDH2*, embora menos frequente, são descritas mutações em astrocitomas e oligodendrogliomas (Bleeker *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2009).

Portanto, mutações em *IDH1* parecem ser um marcador seletivo de GBMS secundários, tornando-se um critério importante para complementação de exames histológicos diferenciando-os dos glioblastomas primários já que os dois tipos são indistinguíveis morfológicamente (Ducray *et al.*, 2009; von Deimling *et al.*, 2010; Metellus *et al.*, 2011).

Detectamos a mutação missense R132H (substituição da arginina por histidina) (rs121913500) no exon 4 de *IDH1* em um paciente diagnosticado com astrocitoma difuso/fibrilar grau II da OMS de 28 anos. Esta é a mutação mais frequente do *IDH*, sendo observada em 83-91% de todas as mutações encontradas. As mutações identificadas no gene *IDH1* foram todas mutações *missense*, em heterozigose (Yan *et al.*, 2009). No exon 4 de *IDH2*, um polimorfismo previamente relatado foi identificado: a substituição de base silenciosa (CTG> CTC) na posição L143L (rs144712130) em um paciente diagnosticado com astrocitoma difuso/fibrilar grau II da OMS.

Um grande desafio na rotina prática de neuropatologia é a distinção entre a gliose reativa, que pode ser devido a condições neoplásicas e não neoplásicas e os astrocitomas difusos (OMS grau II). Especialmente, em relação a biópsias com pouca disponibilidade de material histológico. Considerando as diferenças marcantes no prognóstico e terapia entre estes dois processos após um diagnóstico patológico, torna-se essencial investir em estudos que possam viabilizar o uso de ferramentas que otimizem o diagnóstico diferencial entre essas alterações. A mutação R132H no *IDH1* pode se tornar um marcador de astrocitomas difusos, oligodendrogliomas e glioblastomas secundários, auxiliando no diagnóstico e prognóstico de pacientes (Rivera-Zengotita & Yachnis, 2012). Ainda, a ausência de mutações no *IDH* em astrocitomas pilocíticos de grau I, pode ser importante para distingui-los de outros subtipos de grau II em casos ambíguos (Capper *et al.*, 2009).

Em nosso estudo, não encontramos a mutação R132H nos casos de astrocitomas pilocíticos estudados, corroborando com o descrito por Parsons e colaboradores (2008) e por Capper e colegas (2009). Tendo em vista que o curso clínico dos astrocitomas pilocíticos raramente evolui para transformação maligna, essa característica aponta que estes tumores surgem a partir de um mecanismo diferente dos de alto grau.

O paciente portador da mutação em *IDH1* foi diagnosticado em 2011 e até o presente momento não apresentou recidiva tumoral. Este fato possivelmente pode estar relacionado com o melhor prognóstico conferido pela presença da referida mutação. O mecanismo responsável pela maior sobrevida nesses pacientes ainda não

é conhecido. Postula-se que como resultado da diminuição dos níveis de α -cetoglutarato e aquisição da capacidade de converter α -cetoglutarato a R(-)-2-hidroxioglutarato 2HG, ocorra aumento no estresse oxidativo celular e, portanto, uma maior sensibilidade à quimioterapia e radioterapia (Dang *et al.*, 2009). Considerando que não são todos os pacientes que recebem tratamento adicional além da ressecção cirúrgica, inclusive o paciente do presente estudo, acreditamos que outros fatores possam estar envolvidos.

Acreditamos que a detecção de R132H em apenas um paciente foi devida ao número restrito de amostras disponíveis para sequenciamento genético e a diversidade entre os graus dos tumores nessas amostras. Além disso, em nossa amostragem, possuímos um maior número de casos referente a GBMs primários e astrocitomas pilocíticos, subtipos que normalmente não abrigam mutações em *IDH1*. Portanto, para determinar o papel de *IDH1* em gliomas de grau II, III e GBMs secundários, estudos adicionais são necessários.

Yan e colaboradores (2009) verificaram que em casos, onde não houve a identificação da mutação R132H no exon 4 de *IDH1*, foi detectado por vezes, mutações no resíduo R172 no exon 4 de *IDH2* sugerindo que este apresente uma função análoga à do gene *IDH1*. Ainda, estes autores, assim como Watanabe *et al.*, (2009) verificaram que a aquisição de mutação *IDH1/IDH2* ocorre anteriormente à aquisição de mutações *TP53* ou à codelecção 1p/19q, sugerindo que estas mutações são alterações genéticas iniciais na evolução dos gliomas, podendo afetar uma população de células precursoras comuns. Tanto os astrocitomas como os oligodendrogliomas contêm, frequentemente, mutações somáticas no *IDH1* ou *IDH2*, mas não partilham de outras alterações genéticas que ocorrem no desenvolvimento destas duas linhagens celulares tumorais. Isso é um ponto interessante e intrigante das mutações em *IDH1*, pois, antes dessa descoberta, era muito difícil distinguir esses dois tumores por alterações moleculares. Assim, a presença dessas mutações nas duas entidades sugere uma origem comum a partir de uma mesma célula precursora. Os glioblastomas primários, raramente, apresentam mutações em *IDH1*, sugerindo que glioblastomas primários e secundários podem originar-se a partir de células precursoras diferentes (von Deimling *et al.*, 2010).

Ao contrário de mutações em *IDH1*, alterações genéticas envolvendo *PTEN* são mais frequentes em GBMs primários que em GBMs secundários. Esse gene está relacionado ao desenvolvimento e manutenção da integridade do SNC.

PTEN é um gene supressor de tumor, localizado no cromossomo 10q23.3 e mutações somáticas neste gene foram identificadas em vários tipos de tumores humanos. Muitos estudos afirmam que *PTEN* é um dos genes mais frequentemente

mutado, deletado e silenciado em câncer (Cantley & Neel, 1999; Simpson & Parsons, 2001; Pandolfi, 2008).

É bem estabelecido na literatura a associação entre tumores do SNC e *PTEN* (Liu *et al.*, 1997; Endersby & Baker, 2008; Zheng *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2011; Mueller *et al.*, 2012), porém nossos resultados de sequenciamento genético não demonstraram essa correlação.

Na análise dos nove exons de *PTEN* detectamos uma troca silenciosa de base, G1937A, no exon 6 em uma paciente portadora de glioblastoma multiforme primário. Esta não havia sido descrita anteriormente na literatura, apresenta-se em heterozigose e não acarreta troca de aminoácidos. Fults & Pedone (2000), descrevem que a expressão da proteína *PTEN* apresenta-se significativamente diminuída em tumores com mutações genéticas em *PTEN* quando comparados a tumores sem mutações nesse gene. Apesar dessa característica, a prevalência da supressão na expressão da proteína é bem mais frequente que as alterações genéticas. Assim, procuramos investigar a imunexpressão da proteína *PTEN* por imunohistoquímica nas amostras disponíveis em blocos de parafina.

Encontramos uma tendência para menor expressão de *PTEN* nuclear em células neoplásicas quando comparada com células normais. Esses dados estão de acordo com Eng (2003) que descreveu alta expressão de *PTEN* nuclear em células normais e reduzida conforme a progressão neoplásica avançava, concomitante ao aumento da expressão citoplasmática de *PTEN*. Não verificamos em nossa análise correlação significativa entre o grau histológico do tumor e a expressão de *PTEN*.

A expressão de *PTEN* na paciente portadora da mutação silenciosa no exon 6, apresentou-se moderadamente diminuída. Entre os GBMs analisados, 56% apresentaram o mesmo padrão de imunomarcção, sugerindo que a mesma não influencia a expressão da proteína *PTEN*. Estudos prévios relataram que diferentes tipos de câncer e diferentes tipos de população apresentam características distintas quanto à expressão de *PTEN* (Eng, 2003; Hennenlotter *et al.*, 2008). Devido à ausência de correlação entre nossos resultados de sequenciamento e imunohistoquímica, é interessante realizar, como continuação dos estudos, sequenciamento de *PTEN* em um número maior de amostras com o mesmo estadiamento tumoral, e assim, traçar um perfil da expressão dessa proteína bem como de possíveis alterações genéticas.

Cerca de 20% dos tumores humanos têm mutações pontuais ativadoras em RAS, sendo mais frequentes em KRAS (85% do total), seguido por NRAS (15%), e HRAS (< 1%) (Bos, 1989). Em sua forma mutante *KRAS* fica permanentemente ativa

uma vez que as GAPs não hidrolisam o GTP e, portanto, promovem proliferação e crescimento celular intermitente (Robbins, 2010).

As mutações germinativas da proteína neurofibromina, da via de *RAS* em indivíduos com neurofibromatose tipo I parecem estar relacionadas à predisposição para desenvolver astrocitoma pilocítico. Isto sugere que a associação de ativação de vias sinalizadoras de *RAS* desempenha um papel fundamental no desenvolvimento de astrocitomas. Entretanto, Janzarik e colaboradores (2007) indicam que mutações somáticas em *KRAS* são raras em astrocitomas pilocíticos. Eles investigaram astrocitomas de grau I e II e identificaram a mutação somática G12A de *KRAS* em apenas um astrocitoma pilocítico entre 25 analisados. Esses achados estão de acordo com nossos resultados, pois em 16 amostras sequenciadas, não identificamos alterações em *KRAS*. Este fato pode ser explicado pela variação de graduação histológica em nossa amostragem.

Embora não totalmente estabelecida, estudos apontam associação importante de mutações em *BRAF* com gliomas pediátricos, principalmente, xantoastrocitoma pleomórfico e astrocitomas pilocíticos, representando um alvo molecular em potencial nestes subtipos histológicos em crianças (Dougherty *et al.*, 2010; von Deimling *et al.*, 2010). De acordo com Dias-Santagata e colaboradores (2010), a frequência dessa associação pode chegar a 60% de mutação *BRAFV600E* em xantoastrocitomas.

No entanto, assim como em *KRAS*, no presente trabalho, não detectamos a mutação *BRAFV600E*, foco de nossa pesquisa.

Dougherty e colaboradores, 2010 acreditam que somente a mutação *BRAFV600E* não seja suficiente para a formação de lesões malignas e que outras alterações genéticas adicionais sejam necessárias para a progressão das lesões. Avaliando 31 tumores pediátricos, incluindo ganglioglioma e xantoastrocitoma pleomórfico, eles detectaram a mutação *BRAFV600E* em 14 desses tumores. Então, os autores procuraram mutações no exon 4 de *IDH1*, nos exons 2 e 3 de *KRAS* e nos exons 2 a 9 de *P53* nos tumores com e sem a mutação *BRAFV600E*. Não foi identificada nenhuma mutação em *KRAS* e *p53*, sendo que somente um caso apresentou a mutação R132H em *IDH1*. Em parte, esses resultados são semelhantes aos nossos, por não termos detectados mutações em *KRAS* e apenas uma em *IDH*.

No presente estudo, observamos expressão aumentada de *BRAF* e expressão diminuída de *PTEN* no paciente portador de astrocitoma grau II e da mutação R132H em *IDH1*. Apesar das alterações citadas serem eventos na tumorigênese, é difícil avaliar a influência de correlação entre as mesmas, já que apenas um caso exibiu essa mutação.

Em melanomas, mutações ativas em *BRAF* e o silenciamento de *PTEN* são alterações genéticas comuns que contribuem para a melanogênese. Embora colaborem para as características fisiopatológicas agressivas do melanoma, a ativação oncogênica de *BRAF* em melanócitos é insuficiente para a transformação maligna efetiva. Assim, a progressão para o melanoma é acompanhada pelo silenciamento de um ou mais genes supressores de tumor (Tsao *et al.*, 2000). De fato, Dankort e colaboradores em 2009, demonstraram que a perda de *PTEN* é necessária para o desenvolvimento de melanoma em camundongos que possuem a mutação *BRAFV600E*. Após a indução da expressão específica de *BRAFV600E* em camundongos, os animais desenvolveram hiperplasias melanocíticas benignas sem evolução para melanoma ao longo de 15-20 meses. Em contrapartida, a expressão de *BRAFV600E* associada ao silenciamento de *PTEN*, promoveu o desenvolvimento de melanoma com metástases observadas nos linfonodos e pulmões. Estudos consistentes abrangendo diversas técnicas para investigar o papel de *BRAF* no desenvolvimento de astrocitomas de baixo grau e alterações desse gene e *PTEN* não foram realizados em gliomas pediátricos (Dougherty *et al.*, 2010).

Em nosso estudo, não conseguimos avaliar a correlação dessa associação em gliomas, por não termos encontrado mutações em *BRAF* e somente uma alteração em *PTEN*. Já na análise imuno-histoquímica, verificamos diferença significativa entre a expressão da proteína BRAF nos gliomas de grau I quando comparados aos gliomas de grau II e grau IV, sendo observada maior expressão de BRAF nos graus II e IV.

Nossos resultados sugerem que a superexpressão de BRAF pode estar envolvida com progressão dos gliomas. Davies e colaboradores em 2002 indicam que a hiperativação de *BRAF* pode dar início a tumorigênese (Davies *et al.*, 2002).

Como já citado, a via de *RAS/RAF/MEK/ERK* age como transdutor entre o meio extracelular e o núcleo. Sinais extracelulares como hormônios, citocinas e vários outros fatores de crescimento interagem com seu receptor e ativam a família *RAS*. *RAS* ativo induz alterações conformacionais em *RAF* que permite seu recrutamento para a membrana celular, promovendo mudanças no estado de fosforilação e provocando sua atividade quinase (Garnett & Marais, 2004).

Nossos dados nos permitem supor que outros componentes da via de *BRAF* podem influenciar a expressão da proteína, já que não detectamos alterações no gene *BRAF*. Trabalho publicado por Davies e colegas (2002), reforça nossa idéia ao descrever que as mutações em *BRAF* estão presentes em uma ampla variedade de tipos de câncer, porém, há uma tendência para a ocorrência das mesmas em tumores que também abrigam mutações em *RAS*, tais como, melanoma, câncer colorretal e carcinomas de ovário. A associação aparente entre essas duas mutações em

neoplasias semelhantes, sugere que a ativação da via *RAS/RAF/MEK/ERK* pode acontecer por mutação em vários níveis da mesma e que a sua ativação ocorre em uma proporção expressiva de casos. Assim, a partir dos nossos dados, para determinar quais fatores poderiam estar envolvidos é interessante realizar com o objetivo de melhorar o entendimento acerca do papel de *BRAF* na patogênese dos gliomas, avaliação da expressão ou análise genética de outros componentes da via *RAS/RAF/MEK/ERK*.

Com o objetivo de determinar as consequências funcionais de mutações em *BRAF* em uma série de tumores, Dougherty e colaboradores (2010), realizaram imuno-histoquímica para ERK fosforilada. Eles constataram um padrão variável de expressividade de ERK em tumores com e sem as mutações em *BRAF*. Os tumores com mutações em *BRAF* apresentaram expressão menos intensa do que nos tumores que não possuíam a mutação. Estes resultados sugerem que a ativação de ERK não é um indicador específico para a ativação de *BRAF* em tumores. Além disso, há provavelmente outros mecanismos que podem resultar na ativação de MAPK em tumores, como evidenciado pela imunodeteção em amostras sem alterações em *BRAF*.

É importante ressaltar que as alterações genéticas em *BRAF* são altamente relevantes do ponto de vista terapêutico, pois este gene é um dos mais frequentemente mutado em tumores humanos. A detecção da mutação *BRAFV600E* apresenta potencial para uso clínico como um marcador diagnóstico e prognóstico. Além disso, um grande esforço investigativo é investido em estratégias que inibem a sua atividade. Atualmente, experimentos clínicos envolvendo inibidores seletivos de *BRAF* exibiram resultados promissores em pacientes com melanoma metastático (Pakneshan *et al.*, 2013). No entanto, efeitos colaterais e mecanismos de resistência foram relatados.

Além da importância da mutação *BRAFV600E*, nossos dados demonstram que gliomas sem essa mutação apresentam superexpressão de *BRAF* e que esta aumenta de acordo com a progressão maligna. Consequentemente, a quantificação da expressão de *BRAF* pode ser útil para mensurar a progressão de gliomas e abre espaço para a busca de outros fatores que poderiam estar implicados na alteração de expressão apresentada pelo presente estudo.

Os dados disponíveis na literatura associados aos nossos resultados de imuno-histoquímica e sequenciamento para *BRAF*, permitem levantar uma discussão sobre tratamentos alternativos para gliomas que podem incluir não somente os medicamentos anti-*BRAF*, como também o uso de medicamentos que atuem na via *RAS/RAF/MEK/ERK*.

Assim, pesquisas futuras são necessárias para melhorar o entendimento sobre a utilização eficiente das mutações em *BRAF* bem como da expressão da proteína na prática clínica (Smalley, Nathanson & Flaherty, 2009; Pakneshan *et al.*, 2013).

No que diz respeito ao TGF- β , detectamos expressão de T β RII significativamente aumentada nos gliomas estudados em comparação ao tecido normal. Esse resultado foi independente da graduação histológica dos tumores. Apesar de não haver diferença significativa entre a superexpressão de T β RII entre os graus de gliomas, o valor de $p=0.08$ pode indicar uma tendência para maior expressão de T β RII em gliomas de maior grau histológico. Além disso, ao comparar a expressão de T β RII nos gliomas de grau I a III, observamos diferença significativa com valor de $p=0.04$. No entanto, ao incluir na análise, a avaliação dos GBMs, o tumor astrocítico mais agressivo e infelizmente também o mais comum, a diferença não foi significativa.

Masi e colaboradores em 2002, demonstraram expressão aumentada tanto das isoformas de TGF- β quanto em seus receptores em condrossarcomas quando comparados em lesões cartilaginosas benignas. Em contraposição ao que observamos em nosso trabalho, os autores verificaram correlação entre os níveis de expressão e a graduação histológica dos tumores.

Os dois receptores de TGF- β são expressos em diversos tipos celulares dos mamíferos. T β RII possui alta afinidade para todas as isoformas de TGF- β , ao contrário de T β RI. T β RI só entra em contato com TGF- β após sua ligação a T β RII (Massague, 2000).

As ações de TGF- β estão envolvidas com as funções de Smad, porém, esta não é a única que pode ativar ou ser modulada pelos receptores da via. Alguns relatos indicam que diversas MAPK podem ser ativadas por TGF- β num contexto altamente variável dependendo do tipo e condições celulares (Massague, Blain & Lo 2000). A correlação entre essas duas vias foi demonstrada por Knauf e colaboradores em 2011. Eles avaliaram o papel de TGF- β como indutor de um fenômeno conhecido como transição epitélio-mesênquima (EMT), que é associado com a invasão tumoral. Em culturas celulares primárias de camundongos que apresentavam carcinoma papilífero da tireóide e abrigavam mutação em *BRAF*, foram detectados marcadores da EMT por imuno-histoquímica, enquanto que as células selvagens da tireóide mantiveram suas características epiteliais. Assim, a iniciação tumorigênica por *BRAF* torna as células da tireóide mais suscetíveis a EMT induzida por TGF- β , sendo um processo dependente de MAPK.

Inibidores terapêuticos da via de sinalização de TGF- β surgem atualmente como agentes promissores no combate a diferentes tipos de cânceres humanos (Anido *et al.*, 2010; Joseph *et al.*, 2012; Neuzillet *et al.*, 2013).

TGF- β integra uma superfamília que controla eventos cruciais do desenvolvimento celular, como, proliferação, tumorigênese, diferenciação, deposição de matriz extracelular, adesão e migração, além de supressor tumoral (Massague *et al.*, 2005). Esse efeitos o colocam em destaque no cenário científico. Pesquisas recentes em fase clínica I tem utilizado anticorpos monoclonais contra T β RII em pacientes com tumores sólidos avançados. Até o momento, os resultados indicam que os inibidores de TGF- β serão úteis e auxiliarão na inibição da progressão tumoral e de metástases (Neuzillet *et al.*, 2013).

O papel dos integrantes da via de TGF- β em gliomas é controverso e de difícil entendimento. Por causa de sua atuação dupla na tumorigênese, é necessário um entendimento mais bem definido de suas ações em gliomas. Não é bem compreendido o momento em que TGF β deixa de agir como um supressor tumoral e passa a ser considerado estimulador da proliferação celular. Aparentemente em estágios precoces da tumorigênese atua como supressor e como estimulador tardiamente. Algumas evidências demonstram que a perda da capacidade de responder ao efeito inibitório de TGF- β sobre a proliferação é acompanhada da progressão do estágio de malignidade (Kesari *et al.*, 2007). Diante da importância de TGF- β , resolvemos estudar essa citocina em nossa amostragem. Nossos resultados não são conclusivos, porém demonstram que T β RII apresenta-se expressivamente aumentado em gliomas de diferentes graus e portanto, devem ser pesquisados em outros estudos e em conjunto com componentes da via de *BRAF*, já que ambos podem estar correlacionados, sendo que a presença de mutações em um dos dois genes pode influenciar a expressão do outro (Kesari *et al.*, 2007; Knauf *et al.*, 2011).

A análise de alterações genéticas e epigenéticas, bem como das diferentes vias moleculares envolvidas na progressão maligna dos gliomas, constitui uma etapa crítica para a identificação de alvos terapêuticos em potencial. Tal conhecimento poderia contribuir para o desenvolvimento de estratégias novas de terapia para essa doença cujo prognóstico é ruim e o tratamento atual é frustrante para pacientes e médicos.

Em nosso trabalho, utilizamos técnicas moleculares e imuno-histoquímicas, na tentativa de identificar alterações relacionadas aos gliomas. O método de imuno-histoquímica é uma técnica de execução relativamente rápida e que pode ser realizada em um serviço simples de patologia cirúrgica. Desse modo, é útil e poderia ser utilizado para determinar o perfil molecular de amostras incluídas em parafina de gliomas.

As alterações encontradas em nosso trabalho podem estar relacionadas com o desenvolvimento de gliomas, mas a continuação de estudos procurando associar

tanto alterações genéticas quanto variações de expressão em *BRAF* e TGF- β nos diferentes graus de gliomas com a expressão de outras proteínas da mesma via de sinalização se faz necessária para confirmar tais associações e auxiliar na compreensão da biologia molecular dos gliomas.

6- CONCLUSÕES

Nossos dados demonstram que gliomas apresentam superexpressão de BRAF, independente da presença da mutação *BRAFV600E*. A expressão da proteína BRAF correlaciona-se com a graduação histológica dos gliomas, apresentando-se aumentada de acordo com o aumento do grau histológico dos gliomas. Essa alteração de expressão entre os graus pode estar associada a progressão maligna desses tumores.

Gliomas apresentam expressão aumentada de T β RII, independente do grau histológico dos tumores, indicando um papel da via de TGF- β na patogênese dos gliomas.

A associação da expressão de PTEN e gliomas não pode ser demonstrada, porém acreditamos que tanto o gene PTEN quanto a expressão da proteína possa estar envolvida na patogênese de gliomas, pois percebemos uma tendência entre a menor expressão de PTEN e maior grau histológico. Acreditamos que para definir o papel de PTEN, estudos com números maiores de amostras de gliomas com o mesmo estadiamento tumoral sejam necessários.

A proteína Ki-67 é importante para confirmar a quantificação da presença de mitoses e assim contribui para a classificação de gliomas, já que a imunoexpressão encontra-se aumentada em gliomas de alto grau.

Não detectamos alterações nos genes *KRAS* e *BRAF*, entretanto não podemos descartar a importância de *BRAF* e *KRAS* na patogênese dos gliomas.

A mutação R132H em *IDH1* parece estar associada a gliomas de baixo grau, sendo importante para distingui-los de outras alterações de células gliais. No entanto, para avaliar a influência dessa mutação, assim como em *BRAF* e *KRAS* estudos futuros são necessários.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrya E, Thomassena IO, Salvesenb OO, Torpa, SH. 2010. The significance of Ki-67/MIB-1 labeling index in human meningiomas: A literature study. *Pathol Res Pract.* 206(12):810-815.
- Alberts B et al. 2002. *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. Garland Science, NY, USA.
- Anido J, Saez-Borderias A, Gonzalez-Junca A. 2010. TGF- β Receptor Inhibitors Target the CD44^{high}/Id1^{high} Glioma-Initiating Cell Population in Human Glioblastoma. *Cancer Cell.* 18 (6): 655–668.
- Anselmo N P, Rey JA, Almeida LO, Custódio AC, Almeida JR, Clara CA, Santos MJ, Casartelli C. 2009. Concurrent sequence variation of *TP53* and *TP73* genes in anaplastic astrocytoma. *Genet Mol Res.* 8(4): 1257-1263.
- Attisano L, Wrana JL, López-Casillas, et al. 1994. TGF- β receptors and actions. *Biochim Biophys Acta.* 1222(1):71-80.
- Baronchelli S, Bentivegna A, Redaelli S, Riva G, Butta V, et al. 2013. Delineating the Cytogenomic and Epigenomic Landscapes of Glioma Stem Cell Lines. *Plos one* 8 (2): 57462.
- Bellaila AC, Hunterb SB, Bratb DJ, et al. 2004. Microregional extracellular matrix heterogeneity in brain modulates glioma cell invasion. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 36(6):1046–1069.
- Bernardini G, Ribatti D, Spinetti G, Morbidelli L, Ziche, M, Santoni A, capogrossi MC, Napolitano M. 2003. Analysis of the role of chemokines in angiogenesis. *J Immunol Methods.* 273(1-2):83-101.
- Blackburn D, Sargsyan S, Monk PN, et al. 2009. Astrocyte Function and Role in Motor Neuron Disease: A Future Therapeutic Target? *GLIA* 57:1251–1264.
- Bleeker FE, et al. 2009. IDH1 mutations at residue p.R132 (IDH1(R132)) occur frequently in high-grade gliomas but not in other solid tumors. *Hum Mutat,*

30(1):7-11.

Bondy ML, Scheurer ME, Malmer B, et al. 2008. Brain tumor epidemiology: Consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium. *Cancer Supplement: 60th Anniversary Edition of Cancer*. 113 (7): 1953–1968.

Bos JL. 1989. Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res*. 49(17):4682-4689.

Cancer Genome Atlas Research Network. 2008. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*. 455 (7216):1061-1068.

Cantley L.C., Neel B.G. 1999. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci*. 96(8):240-4245.

Capper D. et al., 2009. Monoclonal antibody specific for IDH1 R132H mutation. *Acta Neuropathol*, 118 (5): 599-601.

Cariati M, Purushotham AD. 2008. Stem cells and breast cancer. *Histopathology*. 52(1):99-107.

Carmeliet P. 2000. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*. 6: 389-95.

Carmeliet P. 2003. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*, 9: 653-60.

Cantwell-Dorris E.R., O'Leary J.J., Sheils OM. 2011. BRAFV600E: Implications for Carcinogenesis and Molecular Therapy. Review. *Mol Cancer Ther*. 10(3):385-94.

Corle C, Makale M, Kesari S. 2012. Cell phones and glioma risk: a review of the evidence. *J Neurooncol*. 106(1):1-13.

Cotran RS, Kumar V, Collins T. 1999. *Robbins Pathologic Basis of disease*. W.B. Saunders, Philadelphia, PA, USA.

- Courtney C, Makale M, Kesari, S. 2011. Cell phones and glioma risk: a review of the evidence. *Journal of Neuro-Oncology*. DOI001 10.1007/s11060-011-0663-9.
- Dang L, White DW, Gross S, Bryson D. et al. 2009. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature*. 462(7274):739-44.
- Dankort D, Curley DP, Cartlidge RA, et al. 2009. BrafV600E cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma. *Nat Genet*. 41(5):544-552.
- Dias-Santagata D, Lam Q, Vernovsky K, Vena N, Lennerz JK, Borger DR, Batchelor TT, Ligon LK, Iafrate JA, Ligon AH, Louis DN, Santagata S. 2011. BRAF V600E Mutations Are Common in Pleomorphic Xanthoastrocytoma: Diagnostic and Therapeutic Implications. *Plos One*. 6(3) :17948.
- Ding M, Xin C, Xu HN, Fan JK, Huang HL, Yang DQ, Li YH, Wang J, Li R, Liu XY. 2012. Prostate Cancer-Specific and Potent Antitumor Effect of a DD3-Controlled Oncolytic Virus Harboring the PTEN Gene. *Plos One*. 7: 4
- Dhomen N. & Marais R. 2009. BRAF signaling and targeted therapies in melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am*. 23(3):529-45.
- Dolecek TA, Propp JM, Stroup NE, et al. 2012. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2005–2009. *Neuro Oncol*. 14 (5): 1 - 49.
- Dougherty MJ, Santi M, Brose MS, Ma C, Resnick AC, Sievert AJ, Storm PB, Biegel, JA. 2010. Activating mutations in BRAF characterize a spectrum of pediatric low-grade gliomas. *Neuro-Oncol* 12(7):621–630.
- Downward J. 2003. Targeting Ras Signalling Pathways In Cancer Therapy. *Nat Rev Cancer*. 3(1): 11-22.
- Ducray F, Marie Y & Sanson M. 2009. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med*. 360(21):2248-2249.

- Dzieran J, Fabian J, Feng T, et al. Comparative Analysis of TGF- β /Smad Signaling Dependent Cytostasis in Human Hepatocellular Carcinoma Cell Lines. *Plos One*. 8 (8) :72252.
- Ellison DW, Kocak M, Figarella-Branger D, et al. 2011. *J Negat Results Biomed*. Histopathological grading of pediatric ependymoma: reproducibility and clinical relevance in European trial cohorts 10:7.
- Endersby R. & Baker, S.J. 2008. PTEN signaling in brain: neuropathology and tumorigenesis. *Oncogene*. 27(41): 5416–5430.
- Eng C. 2003. PTEN: one gene, many syndromes. *Hum Mutat*. 22(3):183-98.
- Fan KJ & Pezeshkpour GH. 1992. Ethnic distribution of primary central nervous system tumors in Washington, DC, 1971 to 1985. *J Natl Med Assoc* 84(10): 858-863.
- Ferrari G, Brandoch D, Terushkin CV, et al. 2009. Transforming growth factor-beta 1 (tgf- β 1) induces angiogenesis through vascular endothelial growth factor (vegf)-mediated apoptosis. *J Cell Physiol*. 219(2):449–458.
- Frezza C, Tennant DA, Gottlieb E. 2010. IDH1 Mutations in Gliomas: When an Enzyme Loses Its Grip. *Cancer Cell* . 17(1):7-9.
- Folkman, J & Haudenschild, C. 1980. Angiogenesis in vitro. *Nature*. 11;288 (5791):551-6.
- Folkman, J & klagsbrun, M. 1987. Vascular physiology. A family of angiogenic peptides. *Nature*. 329(6141):671-2.
- Fults D & Pedone C. 2000. Immunocytochemical mapping of the phosphatase and tensin homolog (PTEN/MMAC1) tumor suppressor protein in human gliomas. *Neuro-Oncol*. 2(2):71-9.
- Garnett M. & Marais R. 2004. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell*.6(4):313-9.

- Geiser AG, Kim SJ, Roberts AB et al. 1991. Characterization of the mouse transforming growth factor-beta 1 promoter and activation by the Hras oncogene. *Mol. Cell. Biol.*, 11 (1): 84-92.
- Geismann C, Morscheck M, Koch D, et al. 2009. Transforming Growth Factor β 1- and Slug-Dependent: Role in Malignant Transformation of Pancreatic Cancer. *Cancer Res.* 69(10):4517-4526.
- Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. 1983. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer.* 31(1): 13-20.
- Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. 1984. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol.* 133(4): 1710-5.
- Gladson, C. L. 1999. The extracellular matrix of gliomas: Modulation of cell function. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology.* 58(10): 1029–1040.
- Guillaud P, du Manoir S, Seigneurin D. 1989. Quantification and topographical description of Ki-67 antibody labelling during the cell cycle of normal fibroblastic (MRC-5) and mammary tumour cell lines (MCF-7). *Anal Cell Pathol.* 1(1): 25-39.
- Gupta K, Salunke P. 2012. Molecular markers of glioma: an update on recent progress and perspectives. *J Cancer Res Clin Oncol.* 138(12):1971-1981.
- Habberstad AH, Gulati S, Torp SH. 2011. Evaluation of the proliferation markers Ki-67/MIB-1, mitotin, survivin, pHH3, and DNA topoisomerase II α in human anaplastic astrocytomas--an immunohistochemical study. *Diagn Pathol.* 24;6:43.
- Hadjipanayis CG & Van Meir EG. 2009. Brain cancer propagating cells: biology, genetics and targeted therapies. *Trends in Molecular Medicine.* 15(11):519-530.
- Hambardzumyan D, Cheng YK, Haeno H, Holland EC, Michor F. 2011. The probable cell of origin of NF1- and PDGF-driven glioblastomas. *PLoS One.* 6 (9):24454.

- Han C, Bowen WC, Li G, Demetris AJ, et al. 2010. Cytosolic Phospholipase A2a and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α Signaling Pathway Counteracts Transforming Growth Factor β -Mediated Inhibition of Primary and Transformed Hepatocyte Growth. *HEPATOL*. 52(2): 644- 655.
- Hennenlotter J, Ohneseit PA, Simon P, et al. 2008. PTEN and p27Kip1 are not downregulated in the majority of renal cell carcinomas--implications for Akt activation. *Oncol Rep*. 19(5):1141-7.
- Heng W, Vikas G, Haluska FG. 2003. PTEN signaling pathways in melanoma *Oncogene* 22(20):3113-3122.
- Horbinski C. 2013. To BRAF or not to BRAF: is that even a question anymore? *J Neuropathol Exp Neurol*. 72(1):2-7.
- Hynes RO, 2009. The Extracellular Matrix: Not Just Pretty Fibrils. *Science* 326(5957):1216-1219.
- Ida CM, Lambert SR, Rodriguez FJ. 2012. BRAF alterations are frequent in cerebellar low-grade astrocytomas with diffuse growth pattern. *J Neuropathol Exp Neurol*. 71(7):631-639.
- Itatani Y, Kawada K, Fujishita T, et al. 2013. Loss of SMAD4 From Colorectal Cancer Cells Promotes CCL15 Expression to Recruit CCR1D Myeloid Cells and Facilitate Liver Metastasis. *Gastroenterology*. 145(5):1064–1075.
- Janzarik WG, Kratz CP, Loges NT, et al. 2007. Further evidence for a somatic KRAS mutation in a pilocytic astrocytoma. *Neuropediatrics*. 38(2):61-63.
- Johannessen AL, Torp SH. 2006. The clinical value of Ki-67/MIB-1 labeling index in human astrocytomas. *Pathol Oncol Res*.12(3):143-7.

- Joseph JV, Balasubramaniyan V, Joseph AW et al. TGF- β as a therapeutic target in high grade gliomas – Promises and challenges. *Biochem Pharmacol.*85 (2013): 478–485.
- Kanu OO, Hughes B, Di C, Lin N, et al. 2009. Glioblastoma Multiforme Oncogenomics and Signaling Pathways. *Clin Med Oncol.* 8(3): 39–52.
- Knauf JA, Sartor MA, Medvedovic M, et al. 2011. Progression of BRAF-induced thyroid cancer is associated with epithelial-mesenchymal transition requiring concomitant MAP kinase and TGF β signaling. *Oncogene.* 30(28): 3153–3162.
- Kelly JP & Weiss AH. 2013. Detection of tumor progression in optic pathway glioma with and without neurofibromatosis type 1. *Neuro-Oncol.* 15 (11):1560–1567.
- Kesari S, Jackson-Grusby L & Stiles CD. 2007. “Smad”eningly Erratic: Target Gene Methylation Determines Whether TGF β Promotes or Suppresses Malignant Glioma. *Developmental Cell.*
- Key G, Kubbutat MH, Gerdes J. 1994. Assessment of cell proliferation by means of an enzyme-linked immunosorbent assay based on the detection of the Ki-67 protein. *J Immunol Methods.* 177(1-2): 113-7.
- Kingsley DM. 1994. The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev.* 8 (2): 133-146.
- Ko H, Soa Y, Jeona H, et al. 2013. TGF- β 1-induced epithelial–mesenchymal transition and acetylation of Smad2 and Smad3 are negatively regulated by EGCG in Human A549 lung cancer cells. *Cancer Letters.* 335(1): 205–213.
- Leung L, Radulovich N, Zhu CQ, et al. 2013. Loss of canonical Smad4 signaling promotes KRAS driven malignant transformation of human pancreatic duct epithelial cells and metastasis. *PLoS One.* 8(12):e84366.

- Lin HY & Lodish HF. 1993. Receptors for the TGF- β superfamily: multiple polypeptides and serine/threonine kinases. *Trends Cell Biol.* 1993 Jan;3(1):14-9.
- Lin HY, Wang XF, Ng-Eaton E, et al. 1992. Expression cloning of the TGF- β type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase. *Cell.* 68(4): 775–785.
- Lisa Leung L, Radulovich N, Zhu CQ et al. 2013. Loss of Canonical Smad4 Signaling Promotes KRAS Driven Malignant Transformation of Human Pancreatic Duct Epithelial Cells and Metastasis. *Plos one.* 8 (12): 84366.
- Liu W, James CD, Frederick L, Alderete BE, Jenkins RB. 1997. PTEN/MMAC1 mutations and EGFR amplification in glioblastomas. *Cancer Res.* 57(23): 5254-7.
- Louis DN, Holland EC, Cairncross, JG. 2001. Glioma classification. *Am. J. Pathol.* 159(3): 779-786.
- Louis D N. 2006. Molecular Pathology of Malignant Gliomas. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* (1): 97-117.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer W, Kleihues P. 2007. The 2007 WHO classification of tumours the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 114 (2): 97- 109.
- Maehama T, Dixon JE. 1998. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem.* 273(22):13375-13378.
- Massague J. 1990. THE TRANSFORMING GROWTH FACTOR- β FAMILY . *Annu. Rev. Cell Bio.* .6: 597-641.
- Massagué J.2000. HOW CELLS READ TGF- β SIGNALS. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 1(3):169-78.

- Massagué J, Blain SW, Lo RS. TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. 2000. *Cell*. 103(2):295-309.
- Massagué J. 2008. TGFβ in Cancer. *Cell*. 134(2): 215–230.
- Masi L, Malentacchi C, Campanacci D, Franchi A. 2002. Transforming growth factor-beta isoform and receptor expression in chondrosarcoma of bone. *Virchows Arch*. 440(5):491-7.
- Massui K, Cloughesy TF & Mischel PS. 2012. Review: Molecular pathology in adult high-grade gliomas: from molecular diagnostics to target therapies. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 38: 271–291.
- Metellus P, Colin C, • Taieb D, Guedj E, Nanni-Metellus I, Paula AM, Colavolpe C, Fuentes S, Dufour H, Barrie M, Chinot O, Ouafik L, Figarella-Branger D. 2011. IDH mutation status impact on in vivo hypoxia biomarkers expression: new insights from a clinical, nuclear imaging and immunohistochemical study in 33 glioma patients. *J Neurooncol*. 105(3):591-600.
- Mirantes C, Eritja N, Dosil MA, et al. 2013. An inducible knockout mouse to model the cell-autonomous role of PTEN in initiating endometrial, prostate and thyroid neoplasias. *Dis Model Mech*.6(3):710-20.
- Monteiro, G.T., Koifman, S. Brain tumors mortality in brazil, 1980-1998. 2003. *Cad. Saúde Pública*. 19: 1139-1151.
- Morest DK & Silver J. 2003. Precursors of Neurons, Neuroglia, and Ependymal Cells in the CNS: What Are They? Where Are They From? How Do They Get Where They Are Going? *GLIA* 43 (1):6–18.
- Moustakas A & Heldin CH. 2009. The regulation of TGFβ signal transduction. *Development* 136 (22): 3699-3714.
- Mueller S, Phillips J, Onar-Thomas A, Romero E, Zheng S, Wiencke JK, McBride SM, Cowdrey C, Prados MD, Weiss WA, Berger MS, Nalin Gupta N, Haas-Kogan DA. 2012. PTEN promoter methylation and activation of the PI3K/Akt/mTOR

pathway in pediatric gliomas and influence on clinical outcome. *Neuro-Oncol.* 14(9):1146–1152.

Nader S, Alvarez-Buylla A & Berger MS. 2005. Neural Stem Cells and the Origin of Gliomas. *N Engl J Med*; 353:811-22.

Neuzillet C, Gramont A, Tijeras-Raballand A, et al. 2013. Perspectives of TGF- β inhibition in pancreatic and hepatocellular carcinomas. *Oncotarget*.

Nicklas D & Saiz L. 2013. Characterization of Negative Feedback Network Motifs in the TGF- β Signaling Pathway. *Plos one.* 8 (12): 83531.

Nucera C., Lawler J., Parangi S. 2011. BRAFV600E and microenvironment in thyroid cancer : a functional link to drive cancer progression. *Cancer Res.* 71(7): 2417-22.

Ohgaki H, Kleihues P. 2000. Phenotype vs genotype in the evolution of astrocytic brain tumors. *Toxicol Pathol.* 28(1):164-170.

Ohgaki H e Kleihues P. 2005. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol.* 109(1): p. 93-108.

Ohgaki H. e Kleihues P. 2009. Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer Science.* 100 (12): 2235-2241.

Ohgaki H e Kleihues P. 2011. Genetic profile of astrocytic and oligodendroglial gliomas. *Brain Tumor Pathol.* 28:177–183.

Okezie OK, Hughes B, Chunhui D, Ningjing L, Jinrong F, Darell DB, Yan H e Adamson C. 2009. Glioblastoma Multiforme Oncogenomics and Signaling Pathways. *Clin Med Oncol.* 8 (3): 39–52.

Omuro A, DeAngelis LM. 2013. Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review. *JAMA.* 310(17):1842-50.

Onishi M, Ichikawa T, Kurozumi K, Isao D. 2011. Angiogenesis and invasion in glioma. *Brain Tumor Pathol* 28:13–24

- Pakneshan S, Salajegheh A, Smith RA, et al. 2013. Clinicopathological relevance of BRAF mutations in human cancer. *Pathology*. 45(4):346-56.
- Pandolfi PP. 2008. P-TEN exciting years: from the cytosol to the nucleus and back to keep cancer at bay. *Oncogene*. 27(41):5386.
- Pardali K, Moustakas A. 2007. Actions of TGF-beta as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer. *Biochim Biophys Acta*. 1775(1):21-62.
- Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P et al. 2008. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*. 321(5897):1807-1.
- Patil S & Chamberlain RS. 2012. Neoplasms Associated with Germline and Somatic NF1 Gene Mutations. *Oncologist*. 17(1):101-116.
- Pearce MS, Salotti JA, Little MP, et al. 2012. Radiation exposure from CT scans in childhood and subsequent risk of leukaemia and brain tumours: a retrospective cohort study. *Lancet*. 380 (9840):-499-505.
- Pich A, Chiusa L, Navone R. 2004. Prognostic relevance of cell proliferation in head and neck tumors. *Ann Oncol*. 15(9):1319-1329.
- Pickup M, Novitskiy S, Moses HL. 2013. The roles of TGFβ in the tumour microenvironment. *Nat Rev Cancer*. 13(11):788-99.
- Prensner JR & Chinnaiyan AM. 2011. Metabolism unhinged: IDH mutations in cancer. *Nat Med*. 17(3):291-293.
- Ramirez C, Bowman C, Muraige, CA et al. 2010. Loss of 1p, 19q, and 10q heterozygosity prospectively predicts prognosis of oligodendroglial tumors—towards individualized tumor treatment? *Neuro-Oncol*. 12(5):490-9.
- Rao JS. 2003. Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. *Nat Rev Cancer*. 3(7): 489-501.

- Ricard D, Idbaih A, Ducray F, Lahutte M, Hoang-Xuan K, Delattre JY. 2005. *Neuropathol. 25: 1–7* Review Article Genetic pathways to glioblastomas.
- Ricard D, Idbaih A, Ducray F, Lahutte M, Hoang-Xuan K, Delattre JY. 2012. Primary brain tumours in adults. *Lancet. 379(9830):1984-96.*
- Richard OW. *Hematol Oncol Clin N Am 26 (2012) 1185–1207*
<http://dx.doi.org/10.1016/j.hoc.2012.08.005>).
- Rivera-Zengotita M, Yachnis AT. 2012. Gliosis versus glioma?: don't grade until you know. *Adv Anat Pathol. 2012 Jul;19(4):239-49.*
- Roberts AB, Kim SJ, Noma T, et al. 1991. Multiple forms of TGF-beta: distinct promoters and differential expression. *Ciba Found Symp.;157:7-15.*
- Robinson M.J. & Cobb M.H. 1997. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol. 9(2):180-6.*
- Rodriguez FJ, Perry A, Gutmann DH, et al. 2008. Gliomas in Neurofibromatosis Type 1: A Clinicopathologic Study of 100 Patients. *J Neuropathol Exp Neurol. 67 (3): 240-249.*
- Sabha N, Knobbe CB, Maganti M, et al. 2014. Analysis of IDH mutation, 1p/19q deletion, and PTEN loss delineates prognosis in clinical low-grade diffuse gliomas. *Neuro Oncol.*
- Sanai N, Alvarez-Buylla A, Berger MS. 2005. Neural stem cells and the origin of gliomas. *N Engl J Med. 353(8):811-822.*
- Sanson, M., J. Thillet, and K. Hoang-Xuan, Molecular changes in gliomas. *Curr Opin Oncol, 2004. 16(6): 607-13.*
- Sasaki K, Murakami T, Kawasaki M, Takahashi M. 1987. The cell cycle associated change of the Ki-67 reactive nuclear antigen expression. *J Cell Physiol. 133(3): 579-84.*

- Sheen YY, Kim MJ, Park SA, et al. 2013. Targeting the Transforming Growth Factor- β Signaling in Cancer Therapy. *Biomol Ther (Seoul)*. 21(5):323-331.
- Shi Y & Massagué J. 2003. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*. 113(6):685-700.
- Simpson L. & Parsons R. 2001. PTEN: life as a tumor suppressor. *Exp Cell Res* 264(1):29-41.
- Singh SK, Clarke ID, Takuichiro Hide T, Dirks PB. 2004. Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene*. 23(43): 7267–7273.
- Slattery ML, Herrick JS, Lundgreen A, et al. 2011. Genetic Variation in the TGF- β Signaling Pathway and Colon and Rectal Cancer Risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*.20(1):57-69.
- Smalley KS, Nathanson KL, Flaherty KT. 2009. Genetic subgrouping of melanoma reveals new opportunities for targeted therapy. *Cancer Res*. 69(8):3241-4.
- Swanson KR, Rockne RC, Claridge J, Chaplain MA, Alvord Jr EC, Anderson ARA. 2011. Quantifying the Role of Angiogenesis in Malignant Progression of Gliomas: In Silico Modeling Integrates. *Imaging and Histology Cancer Res*. 71:24.
- Teng D, Hu R, Lin H, et al. 1997. MMAC1/PTEN Mutations in Primary Tumor Specimens and Tumor Cell Lines. *Cancer Res*. 57 (1): 5221-5225.
- Tomsic J, Guda K, Liyanarachchi S, et al. 2010. Allele-specific expression of TGFBR1 in colon cancer patients. *Carcinogenesis*. 31(10):1800-4.
- Trovisco V., Soares P., Sobrinho-Simões M. 2006. B-RAF mutations in the etiopathogenesis, diagnosis, and prognosis of thyroid carcinomas. *Hum Pathol*. 37(7):781-6.
- Tsao, H., Zhang, X., Fowlkes, K. & Haluska, F.G. 2000. Relative reciprocity of NRAS and PTEN/MMAC1 alterations in cutaneous melanoma cell lines. *Cancer Res*. 60 (7) 1800–1804.

- van Diest PJ, Brugal G, Baak JP. 1998. Proliferation markers in tumours: interpretation and clinical value. *J Clin Pathol.* 51(10):716-24.
- Verhaak RW et al. 2010. Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell.* 17(1): 98–110.
- von Deimling A, Korshunov A, Hartmann C. 2011. The Next Generation of Glioma Biomarkers: MGMT Methylation, BRAF Fusions and IDH1 Mutations. *Brain Pathology* 21(1): 74–87.
- Xing M. 2005. BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer.* 12(2):245-62.
- Wang R, Chadalavada K, Wilshire J, et al. 2010. Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. *Nature.* 468(7325):829-833.
- Wakefield LM, Smith DM, Flanders KC, et al. 1988. Latent transforming growth factor-beta from human platelets. A high molecular weight complex containing precursor sequences. *J Biol Chem.* 5;263(16).
- Wakimoto H, Kesari S, Christopher J. Farrell CJ et al. 2009. Human Glioblastoma-Derived Cancer Stem Cells: Establishment of Invasive Glioma Models and Treatment with Oncolytic Herpes Simplex Virus Vectors. *Cancer Res.* 69:3472-3481.
- Wan P.T., Garnett M.J., Roe S.M. et al. 2004. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell.* 116(6):855-67.
- Watanabe T, Nobusawa S, Kleihues P, et al. 2009. IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas. *Am J Pathol.* 174(4):1149-53.
- Witta HB, Korshunov A, Pfister SM, et al. 2012. Molecular approaches to ependymoma: the next step(s) Current opinion. 25(6): 1350-7540.
- Wrensch M et al. 2002. Epidemiology of primary brain tumors: current concepts

and review of the literature. *Neuro Oncol.* 4(4): 278-99.

Wu Y, Li Q, Zhou X, Yu J, et al. 2012. Decreased levels of active SMAD2 correlate with poor prognosis in gastric cancer. *PLoS One.* 7(4): 35684

Yan H, Parsons DW, Ji G, McLendon R, Rasheed AB, Yuan W, Kos I, Batinic-Haberle I, Jones S, Riggins GJ, Friedman H, Friedman A, Reardon D, Herndon J, Kinzler KW, Velculescu VE, Vogelstein B, Bigner DD. 2009. *IDH1* and *IDH2* Mutations in Gliomas. *N Engl J Med.* 360(8):765-73.

Yan W, Zhang W, You G, et al. 2012. Correlation of IDH1 Mutation with Clinicopathologic Factors and Prognosis in Primary Glioblastoma: A Report of 118 Patients from China. *PLoS ONE.* 7 :1 – 30339.

Yigong S & Massague J . 2003. Mechanisms of TGF- Signaling Review from Cell Membrane to the Nucleus. *Cell* 113: 685–700.

Yin Y. & Shen W.H. 2008. PTEN: a new guardian of the genome. *Oncogene.* 27(41):5443-5453.

Zheng H, Ying H, Yan H, Kimmelman AC, Hiller DJ, Chen AJ, Perry SR, Tonon G, Chu GC, Ding Z, Stommel JM, Dunn KL, Ruprecht Wiedemeyer R, You MJ, Brennan C Y, Wang A, Ligon KL, Wong WH, Chin L, DePinho RA. 2008. p53 and Pten control neural and glioma stem/ progenitor cell renewal and differentiation. *Nature.* 1038:443.

Zuo Q, Huang H, Shi M, et al. 2012. Multivariate analysis of several molecular markers and clinicopathological features in postoperative prognosis of hepatocellular carcinoma. *The Anatomical Record.* 295: 423-431.