



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

ARETHUSA DE SOUZA

AVALIAÇÃO DIGITAL DA IMUNOMARCAÇÃO E DA DISTRIBUIÇÃO TECIDUAL DA
FORMA MUTANTE R132H DA ISOCITRATO DESIDROGENASE (IDH) 1 E DAS
ISOFORMAS SELVAGENS DA IDH1 E 2 EM ASTROCITOMAS DIFUSOS DE
BAIXO E ALTO GRAU HISTOLÓGICO DE ADULTOS

CAMPINAS
2024

ARETHUSA DE SOUZA

AVALIAÇÃO DIGITAL DA IMUNOMARCAÇÃO E DA DISTRIBUIÇÃO TECIDUAL DA
FORMA MUTANTE R132H DA ISOCITRATO DESIDROGENASE (IDH) 1 E DAS
ISOFORMAS SELVAGENS DA IDH1 E 2 EM ASTROCITOMAS DIFUSOS DE
BAIXO E ALTO GRAU HISTOLÓGICO DE ADULTOS

**Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciências.**

ORIENTADOR: PROFESSOR DOUTOR FÁBIO ROGERIO

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA
ALUNA ARETHUSA DE SOUZA E ORIENTADA
PELO PROF. DR. FÁBIO ROGERIO

CAMPINAS

2024

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

So89a Souza, Arethusa de, 1989-
Avaliação digital da imunomarcagem e da distribuição tecidual da forma mutante R132H da isocitrato desidrogenase (IDH) 1 e das isoformas selvagens da IDH1 e 2 em astrocitomas difusos de baixo e alto grau histológico de adultos / Arethusa de Souza. – Campinas, SP : [s.n.], 2024.

Orientador: Fábio Rogerio.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Faculdade de Ciências Médicas.

1. Glioma. 2. Astrocitoma. 3. Isocitrato desidrogenase. 4. Imuno-histoquímica. 5. Análise digital. I. Rogerio, Fábio, 1977-. II. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Digital evaluation of immunohistochemical and tissue distribution of the R132H mutant form of isocitrate dehydrogenase (IDH) 1 and the wild type isoforms of IDH1 and 2 in diffuse astrocytomas of low and high histological grade in adults

Palavras-chave em inglês:

Glioma
Astrocytoma
Isocitrate dehydrogenase
Immunohistochemical
Digital analysis

Área de concentração: Fisiopatologia Médica

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Fábio Rogerio [Orientador]
Simone Aparecida Teixeira
Simoni Helena Avansini

Data de defesa: 30-08-2024

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0009-0009-4903-3819>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/5354753470072390>

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

ARETHUSA DE SOUZA

ORIENTADOR: FÁBIO ROGERIO

MEMBROS TITULARES:

1. PROF. DR. FÁBIO ROGERIO

2. PROFA . DRA . SIMONE APARECIDA TEIXEIRA

3. PROFA . DRA . SIMONI HELENA AVANSINI

Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

Data de Defesa: 30/08/2024

AGRADECIMENTO

Primeiramente, agradeço a Deus por todas as oportunidades e bênçãos que me proporciona, à minha mãe Maria Aparecida Rodrigues de Souza que está sempre me apoiando em todas as circunstâncias e ao meu pai Aparecido Pereira de Souza (*in memoriam*), por sempre incentivar e apoiar as minhas decisões.

Ao meu orientador Prof. Dr. Fábio Rogerio pela paciência, conhecimento científico, didática e toda presteza e tempo dispensados na construção desta Dissertação.

Ao Prof. Dr. Roger Frigério Castilho por todo apoio e aporte financeiro.

Aos meus familiares por sempre torcerem pelo meu sucesso (tias, tios, primos, primas) e às amigas Erika Egal e Bruna Queli Garcia por todo apoio e incentivo.

Ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Unicamp e à Sra. Regina, Secretária do Programa, por toda atenção e gentileza.

Aos meus amigos e companheiros de trabalho da Área de Anatomia Patológica do Departamento de Patologia da FCM e do Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da Unicamp Elisabeth, Maria Do Carmo, Ana Claudia, Adilson, Mayara, Thainá Liu, Luis Felipe, Rogério, Dário, Ingrid Damas, Profa. Dra. Maria Leticia Cintra e Profa. Dra. Fernanda Mariano agradeço por todo apoio e incentivo.

Aos amigos Guilherme Rossi Assis de Mendonça, João Figueira Scarini e João Vitor Gerdulli Tamanini, por colaborarem com a análise estatística e escrita.

Ao estatístico da FCM da Unicamp Marcelo Tavares de Lima pelo excelente trabalho.

Ao Dr. Leandro Luiz Lopes de Freitas por disponibilizar o Serviço do Laboratório Multipat.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; Processo nº 2017/17728-8).

RESUMO

Introdução: Gliomas difusos são tumores primários comuns do sistema nervoso central. Tais lesões incluem os astrocitomas, sendo que características moleculares, como a presença da mutação da enzima isocitrato desidrogenase (IDH), são fundamentais para o estabelecimento do diagnóstico. Duas isoformas selvagens da IDH - 1 (citoplasmática) e 2 (mitocondrial) - convertem isocitrato em α -cetoglutarato (α CG), promovendo a redução de NADP⁺ a NADPH. Tanto o α CG como o NADPH são antioxidantes. A forma mutante mais comum da IDH1 (R132H) apresenta ganho de função em que converte o α CG em D2-hidroxiglutarato, um composto oncogênico que consome NADPH. Assim, observa-se relação funcional entre IDH1, IDH2 e IDH1R132H. **Objetivos:** Realizar a caracterização neuropatológica de astrocitomas difusos de adultos acompanhados em serviço terciário brasileiro, bem como investigar a expressão e eventual alteração da distribuição tecidual da IDH1, IDH2 e IDH1R132H, considerando-se a presença da mutação IDH1R132H e o grau histológico da lesão. **Material e Métodos:** Avaliamos 25 espécimes cirúrgicos de adultos com gliomas difusos, os quais foram caracterizados imunofenotípica e molecularmente como astrocitomas de baixo (n=10) ou alto (n=15) grau histológico (2 ou 4, respectivamente), conforme os critérios atuais da Organização Mundial de Saúde. Ainda, analisamos o padrão de marcação imuno-histoquímica da IDH1, IDH2 e IDH1R132H, assim como a distribuição tecidual (% médio de positividade) das três enzimas por meio do software *ImageJ*[®], em função da presença da mutação R132H e do grau histológico da lesão. **Resultados:** Considerando a idade ao diagnóstico (< ou $\geq$ 55 anos) e a imunopositividade para R132H, as lesões foram classificadas como: astrocitoma, IDH-mutante, grau 2 (5/25); astrocitoma, sem outras especificações (SOE), grau 2 (5/25); glioblastoma, IDH-selvagem, grau 4 (9/25) ou astrocitoma, SOE, grau 4 (6/25). IDH1, IDH2 e IDH1R132H apresentaram padrão de marcação citoplasmático difuso, independente do grau. Ao comparar lesões de baixo e alto grau, a distribuição tecidual da positividade para IDH1 foi menor no primeiro ($14,20 \pm 1,70\%$ e $16,40 \pm 1,60\%$, respectivamente; $p = 0,0051$), não sendo observada diferença com relação à IDH2 ($15,10 \pm 1,80\%$ e $14,90 \pm 2,0\%$; $p=0.6773$) e R132H ($5,20 \pm 5,60\%$ e $1,80 \pm 4,80\%$; $p = 0,1234$). Especificamente, as lesões de baixo grau com (5/10) e sem (5/10) a mutação não apresentaram diferenças com relação à distribuição

tecidual da positividade para IDH1 ($14,40 \pm 2,30\%$ e $14,10 \pm 0,90\%$, respectivamente; $p=0,2963$) ou IDH2 ($15,60 \pm 1,0\%$ e $14,70 \pm 2,40\%$; $p=0,8345$). Independente do grau histológico, não houve correlação entre a expressão tecidual de R132H e de IDH1, bem como de R132H e de IDH2. **Conclusões:** Na presente casuística a forma mutante IDH1R132H foi mais frequente em neoplasias astrocitárias de grau 2, em comparação com aquelas de grau 4. Ainda, nossos dados colocam como possibilidade que (1) tal mutação não interfira com as expressões teciduais das formas selvagens da IDH1 ou IDH2 e (2) o alelo não mutado do *IDH1* garanta a síntese proteica em níveis fisiológicos.

Abstract

Introduction: Diffuse gliomas are common primary tumors of the central nervous system. These lesions include astrocytomas, and molecular characteristics, such as the presence of a mutation in the enzyme isocitrate dehydrogenase (IDH), are fundamental for establishing the diagnosis. Two wild isoforms of IDH - 1 (cytosolic) and 2 (mitochondrial) - convert isocitrate into α -ketoglutarate (α CG), promoting the reduction of NADP⁺ to NADPH. Both α CG and NADPH are antioxidants. The most common mutant form of IDH1 (R132H) has a gain of function in which α CG is converted into D2-hydroxyglutarate, an oncogenic compound that consumes NADPH. Thus, a functional relationship is observed between IDH1, IDH2 and IDH1R132H.

Objectives: To perform neuropathological characterization of adult diffuse astrocytomas followed up in a Brazilian institution, as well as to investigate the expression and possible alteration of IDH1, IDH2 and IDH1R132H tissue distribution, considering the presence of the R132H mutation and the histological grade. **Material**

and Methods: We evaluated 25 surgical specimens from adults with diffuse gliomas, which were characterized immunophenotypically and molecularly as astrocytomas of low (n=10) or high (n=15) histological grade (2 or 4, respectively), according to the current criteria presented by the World Health Organization. We also analyzed the immunohistochemical staining pattern of IDH1, IDH2 and IDH1R132H, as well as their tissue distribution (mean % of immunopositivity assessed by using ImageJ® software) taking into account R132H mutation and the histological grade of the lesion. **Results:**

Considering age at diagnosis ($<$ or $\geq$ 55 years) and R132H immunopositivity, the lesions were classified as: astrocytoma, IDH-mutant, grade 2 (5/25); astrocytoma, not otherwise specified (NOS), grade 2 (5/25); glioblastoma, IDH-wildtype, grade 4 (9/25) or astrocytoma, NOS, grade 4 (6/25). IDH1, IDH2 and IDH1R132H showed a diffuse cytoplasmic staining pattern, regardless of grade. When comparing low-grade and high-grade lesions, the tissue distribution of IDH1 positivity was lower in the former ($14.20 \pm 1.70\%$ and $16.40 \pm 1.60\%$, respectively; $p = 0.0051$), no difference being observed for IDH2 ($15.10 \pm 1.80\%$ and $14.90 \pm 2.0\%$; $p=0.6773$) and R132H ($5.20 \pm 5.60\%$ and $1.80 \pm 4.80\%$; $p = 0.1234$). Specifically, low-grade lesions with (5/10) and without (5/10) the mutation showed no differences regarding tissue distribution of IDH1 positivity ($14.40 \pm 2.30\%$ and $14.10 \pm 0.90\%$, respectively; $p=0.2963$) or IDH2 ($15.60 \pm 1.0\%$ and $14.70 \pm 2.40\%$; $p=0.8345$). Regardless of the histological grade, there was

correlation neither between tissue expressions of R132H and IDH1 nor between R132H and IDH2. **Conclusions:** In the present series, IDH1R132H mutation was more frequent in grade 2 than in grade 4 lesions. Furthermore, our data suggest that (1) such mutation does not interfere with tissue expression of wild-type IDH1 and IDH2, and (2) the wild-type *IDH1* allele would ensure protein synthesis at physiological levels.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT - Alongamento alternativo dos telômeros

ATRX - do inglês, *Alpha-thalassemia/mental retardation, X-linked*

α -CG - Alfa cetogluturato

DAB - Diaminobenzidina

DAPI - 4,6-diamidino-2-fenilindole

D-2HG - D-2-hidroxiglutarato

EGF - Fator de crescimento endotelial

FISH - Hibridação *in situ* por fluorescência

GFAP - Proteína ácida fibrilar glial

HE - Hematoxilina e eosina

HIF - do inglês, *Hypoxia inducible fator*

IDH 1 - Isocitrato desidrogenase 1 selvagem

IDH 1 R132H - Isocitrato desidrogenase 1 forma mutante

IDH 2 - Isocitrato desidrogenase 2 selvagem

NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato

NEC - do inglês, *Not elsewhere classified*

NOS - do inglês, *Not otherwise specified*

OMS - Organização Mundial da Saúde

PTEN - do inglês, *Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*

SOE - Sem outras especificações

SNC - Sistema Nervoso Central

TERT - do inglês, *Telomerase reverse transcriptase*

TMA - do inglês, Tissue Microarray

WHO CNS5 - do inglês, *The fifth edition of the WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVOS.....	30
2.1. Geral	30
2.2. Específicos	30
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1. Critérios de inclusão	31
3.2. Critérios de exclusão	32
3.3. Análise microscópica dos espécimes cirúrgicos e diagnóstico histológico.....	32
3.4. Confeção de bloco de <i>tissue microarray</i> (TMA)	36
3.5. Reações de imuno-histoquímica.....	36
3.6. Análises das imunomarcações	38
3.7. Hibridação <i>in situ</i> por fluorescência (FISH)	40
3.8. Análise estatística	44
4. RESULTADOS	46
4.1. Características clínicas dos grupos	46
4.2. Características histopatológicas dos grupos	48
4.2.1. Caracterização das neoplasias em função da imunoexpressão da forma mutante R132H da IDH1.....	51
4.2.2. Caracterizações molecular e imunofenotípica da linhagem glial e do grau das neoplasias	55
4.2.3. Diagnóstico neuropatológico das neoplasias no presente estudo.....	61
4.2.4. Expressão da forma mutante IDH1R132H e das isoformas 1 e 2 da IDH nos tumores de baixo e alto grau.....	62
4.2.5. Expressão das isoformas 1 e 2 da IDH com base no status da mutação IDH1R132H nos tumores de baixo grau	68
4.2.6. Correlação entre a expressão da forma mutante IDH1R132H e a expressão das isoformas selvagens 1 e 2 da IDH	68

5.	DISCUSSÃO.....	69
6.	CONCLUSÕES.....	74
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
8.	ANEXO.....	88

Justificativa de Originalidade do Trabalho

Neste trabalho, apresentamos a caracterização neuropatológica de espécimes cirúrgicos de astrocitomas difusos de indivíduos adultos brasileiros, conforme os critérios mais recentes estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (2021) e utilizando técnicas laboratoriais acessíveis para instituições brasileiras. Tal caracterização ainda é escassa na literatura e poderá contribuir com o delineamento de estudos futuros sobre estes tumores, especificamente com relação à identificação das amostras. Além disso, utilizamos método digital original para investigar a expressão tecidual (positividade imuno-histoquímica) da forma mutante mais comum da isocitrato desidrogenase (IDH), a qual é essencial para a classificação destas lesões. Por fim, visando contribuir com o melhor conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos, estudamos eventual repercussão da expressão da forma mutante sobre a imunomarcagem de formas selvagens da IDH nas células neoplásicas.

1. INTRODUÇÃO

Gliomas são os tumores cerebrais primários mais comuns. O comportamento biológico destas neoplasias varia de crescimento lento e bem delimitado até lesões rapidamente proliferativas e infiltrativas (1). Historicamente, a classificação dos gliomas era baseada em achados morfológicos que apontassem semelhanças entre as células neoplásicas e alguma linhagem celular específica normal. No entanto, com a introdução da 5ª edição da Classificação de Tumores do Sistema Nervoso Central (SNC) da Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO CNS5; do inglês, *The fifth edition of the WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System*), aspectos moleculares passaram a ganhar importância significativa para a definição e classificação dos gliomas (2 e 3). Especificamente, dentre os diversos tipos de gliomas, encontram-se os difusos do tipo adulto, que correspondem à família mais frequente de tumores do SNC (2 e 3). Do ponto de vista histológico, os gliomas difusos se caracterizam por apresentarem padrão de crescimento infiltrativo no tecido nervoso adjacente, ou seja, as células alteradas se distribuem de forma isolada e aleatória, permeando os tipos celulares normais das substâncias branca e cinzenta (2). Desta forma, não é possível delimitar com precisão os limites do comprometimento do tecido normal pela neoplasia. Para a definição e classificação dos diferentes tipos de gliomas difusos, é essencial o conhecimento das seguintes informações moleculares e histológicas complementares: *status* da codeleção 1p/19q e da mutação da enzima isocitrato desidrogenase (IDH) (3).

Especificamente, a codeleção 1p/19q consiste na perda completa do braço curto do cromossomo 1 (1p) e do braço longo do cromossomo 19 (19q) e apresenta relevância na oncogênese de gliomas difusos humanos (4). Acredita-se que a codeleção decorra da translocação não balanceada de um braço completo entre os cromossomos 1 e 19 e perda do cromossomo híbrido resultante (4 – 6). A ocorrência desta codeleção, por sua vez, promove alteração da expressão gênica, que inclui redução dos níveis de diversos supressores tumorais e aumento da expressão de vários oncogenes (7). Ademais, alguns dos genes afetados mostraram impacto significativo em vias de sinalização relevantes para oncogênese. Particularmente, Gladitz *et al.* identificaram o *ELDT1* como um destes genes (7). O *ELDT1*, que já foi funcionalmente validado como oncogene em gliomas humanos, codifica um receptor

acoplado a proteína G e apresenta ação angiogênica (7–9). Assim, nota-se que a codeleção 1p/19q promove alteração da expressão gênica e da atividade de vias de sinalização celular que, em conjunto, promovem a gênese de gliomas humanos.

Considerando-se a atual classificação de gliomas difusos do tipo adulto proposta pela OMS, a relevância de se detectar perdas completas de ambos os braços cromossômicos 1p e 19q (codel 1p19q) é que tal achado corresponde à assinatura molecular diagnóstica de neoplasia de linhagem oligodendroglial (oligodendrogliomas). Tal achado exclui, desta forma, que a lesão tenha origem astrocitária (astrocitoma), a qual corresponde a outra linhagem celular que pode ser detectada em gliomas difusos de indivíduos adultos. De fato, astrocitomas são reconhecidos por não apresentarem a codeleção 1p19q (2 e 3).

Além do estudo da codeleção 1p/19q, a investigação do *status* da mutação da IDH também é, atualmente, critério essencial para a classificação e definição de gliomas difusos do tipo adulto. Particularmente, existem três isoformas da enzima IDH: IDH1 e IDH2, que compartilham 70% de identidade, e IDH3 (10). A IDH1 é encontrada no citoplasma e peroxissomos, ao passo que a IDH2 e IDH3 ocorrem nas mitocôndrias (10). Quanto à isoforma IDH3, sua mutação não foi descrita em gliomas (10 e 11). Ao contrário, alterações na expressão das isoformas 1 e 2 têm sido demonstradas nas últimas décadas como tendo valor prognóstico e/ou preditivo com relação a resposta a tratamento quimioterápico (2, 3, 12, 13).

Tanto a IDH1 quanto a IDH2 participam da respiração celular. Em condições fisiológicas (isoformas selvagens), estas enzimas catalisam a conversão de isocitrato a α -cetoglutarato, a qual é uma reação de descarboxilação oxidativa em que há síntese de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) a partir da redução de NADP⁺. Tanto o α -cetoglutarato quanto o NADPH produzidos são substâncias consideradas protetoras contra danos oxidativos (Figura 1) (10, 12) (14).

Em gliomas, todas as mutações do *IDH1* e *IDH2* conhecidas são somáticas, heterozigóticas, exclusivamente do tipo *missense* e afetam o aminoácido arginina em uma posição específica na sequência de aminoácidos da proteína. Na IDH1, a posição afetada pertence a uma região altamente conservada ao longo da evolução e se localiza no sítio ativo da enzima, onde ocorre a ligação do isocitrato (15, 16). Especificamente, as mutações do *IDH1* ocorrem no códon correspondente ao aminoácido da posição 132. Neste caso, a alteração mais comum determina a substituição de arginina (R) por histidina (H) e leva à geração da proteína anômala

IDH1R132H. No *IDH2*, as mutações são identificadas em códon análogo àquele afetado no *IDH1*, isto é, no códon 172 (17). A alteração mais frequente determina a mudança do aminoácido arginina (R) por lisina (K) (12 e 13) (Figuras 1 e 2). Fato relevante para a investigação da histogênese de gliomas difusos é que apenas a proteína mutante IDH1R132H pode ser detectada por técnica imuno-histoquímica. Por outro lado, esta e as demais mutações conhecidas da IDH1 e da IDH2 podem ser detectadas por sequenciamento genético (2 e 3).

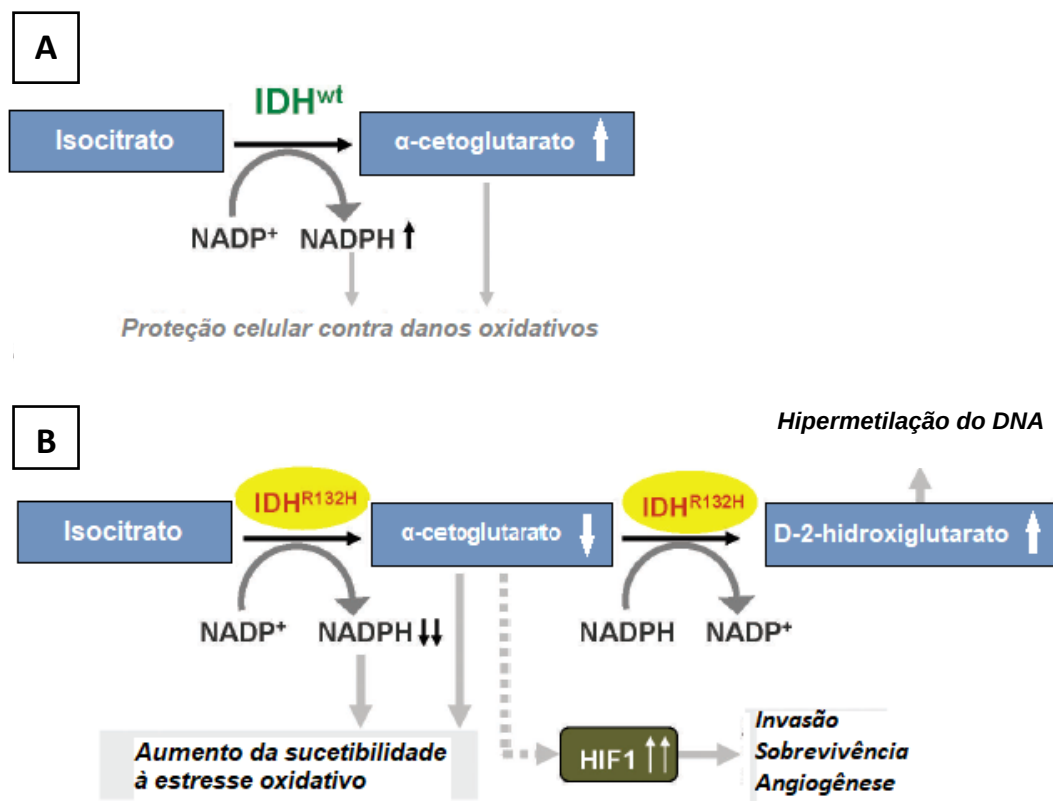


Figura 1. Mecanismos de ação das isoformas selvagem (A) e mutante (B) da isocitrato desidrogenase (IDH1). Para detalhes, vide texto. IDH^{wt}: isoforma selvagem; IDH^{R132H}: forma mutante R132H da IDH1 (Adaptado de Nikiforova et al., 2011 (14)).

A)					
<i>IDH1</i>	ATA I ¹³⁰	GGT G ¹³¹	CGT R ¹³²	CAT H ¹³³	GCT A ¹³⁴
<i>IDH2</i>	ATT I ¹⁷⁰	GGC G ¹⁷¹	AGG R ¹⁷²	CAC H ¹⁷³	GCC A ¹⁷⁴
↓					
B)					
<i>IDH1</i>	ATA I ¹³⁰	GGT G ¹³¹	CAT H ¹³²	CAT H ¹³³	GCT A ¹³⁴
<i>IDH2</i>	ATT I ¹⁷⁰	GGC G ¹⁷¹	AAG K ¹⁷²	CAC H ¹⁷³	GCC A ¹⁷⁴

Figura 2 . Mutações mais comuns envolvendo os genes das isoformas 1 e 2 da isocitrato desidrogenase (*IDH1* e *IDH2*, respectivamente). No painel A estão representadas as seqüências de DNA da forma selvagem das enzimas, enquanto em B estão as seqüências mutantes. As linhas inferiores correspondem à seqüência de aminoácidos das proteínas normais (A) ou mutantes (B) nos respectivos códons (Adaptado de Yan et al. 2009 (12)).

Do ponto de vista funcional, as mutações da IDH em gliomas promovem ganho de atividade enzimática levando à conversão de α -CG para D-2-hidroxiglutarato (D-2HG) utilizando NADPH como cossubstrato (18) (Figura 1). Por sua vez, o D-2HG é um metabólito que leva a aumento da metilação do DNA das células neoplásicas, estabelecendo um perfil de alterações do material genético conhecido como fenótipo de hipermetilação de ilhas CpG (G-CIMP, do inglês, glioma-associated CpG island methylator phenotype). Neste contexto, há silenciamento da expressão de diversos genes que promovem a diferenciação celular normal e, em paralelo, ativação de diversas vias oncogênicas (3, 19 - 21). Particularmente, o aumento dos níveis de D-2HG inibiria, de forma competitiva, as oxigenases dependentes de α -CG, visto que esta última molécula é estruturalmente semelhante ao D-2HG. Tais oxigenases têm funções que incluem reparo de DNA, modificação do maquinário ribossômico e

regulação epigenética. Dessa forma, sua inibição pode implicar consequências oncogênicas (22). Ademais, alguns estudos associam mutação da IDH com aumento da expressão do gene do Fator induzível por hipoxia (HIF; do inglês, *hypoxia inducible factor*) que levaria a aumento da expressão do Fator de crescimento endotelial (EGF; do inglês, *endotelial growth factor*) e consequente proliferação microvascular em gliomas difusos (23 – 25). Também é importante notar que as mutações da IDH1 e IDH2 levam a um desequilíbrio nas quantidades de NADP⁺ e NADPH. Tais enzimas, em condições fisiológicas, catalisam reações que geram NADPH, elemento importante para proteger a célula de estresse oxidativo, bem como para síntese de ácidos graxos (10). Dessa forma, pode-se propor que a mutação da IDH torne a célula mais susceptível a estresse oxidativo, favorecendo mutações e tumorigênese (10, 26, 27).

Todavia, a despeito da atividade oncogênica da mutação do *IDH*, estudos prévios verificaram melhor prognóstico em pacientes portadores de gliomas com tal alteração gênica (17, 28). Diversas explicações foram propostas para esta verificação. Dentre elas, a menor produção de NADPH e consequente aumento de susceptibilidade a estresse oxidativo poderiam tornar o tumor mais sensível à radio e quimioterapia, promovendo melhor resposta terapêutica e maior sobrevida (29 e 30). Além disso, os pacientes com mutações da IDH são, em média, cerca de 15 anos mais novos que aqueles que não as apresentam (30 e 32). Assim, parte do ganho de sobrevida dos pacientes com lesões IDH mutantes dever-se-ia ao fato de que eles próprios são mais jovens (29).

Em relação ao sistema NADP⁺/NADPH, tais moléculas consistem em cofatores essenciais para manutenção do equilíbrio oxidativo celular, fornecendo proteção contra radicais livres de oxigênio (33). Especificamente, o conteúdo celular de NADPH e NADP⁺, assim como as vias metabólicas a eles associadas, relacionam-se a tumorigênese e prognóstico (34). Células tumorais apresentam níveis elevados de NADPH em comparação com células saudáveis possivelmente permitindo maior resistência contra estresse oxidativo e maior síntese de compostos importantes para crescimento celular (35 e 36).

Assim, conforme as definições apresentadas na WHO CNS5, a partir das informações sobre o *status* da codeleção 1p/19q e da mutação do *IDH* em gliomas difusos em indivíduos adultos, consideram-se três possíveis classes de tumores primários do SNC: (i) astrocitoma, IDH-mutante; (ii) oligodendroglioma, 1p/19q-

codeletado e IDH-mutante e (iii) glioblastoma, IDH-selvagem (3). Especificamente, os gliomas difusos do tipo adulto sem a codeleção 1p/19q e com mutação da IDH são classificados como astrocitomas, IDH-mutantes (3). Tais lesões apresentam frequentemente mutações que inativam os genes *TP53* e *ATRX*, sendo que a investigação da manifestação tecidual destas mutações também auxilia na caracterização da natureza astrocitária do glioma difuso (1,3,37-39).

TP53 é um gene supressor tumoral com papel relevante na oncogênese de vários tumores primários, inclusive do SNC (40–42). A proteína codificada por este gene (p53) atua como um fator de transcrição com dezenas de genes alvos e múltiplos mecanismos de ação (43). Um mecanismo, desencadeado por dano ao material genético, promove a interação da p53 com diversos cofatores que estimulam a expressão de moléculas pró-apoptóticas, como o modulador de apoptose p53-supraregulado (44 e 45). Assim, células com defeitos genéticos passam por processos apoptóticos, limitando o potencial desenvolvimento de neoplasias. Ademais, a p53 exerce mecanismos antitumorais independentes de apoptose. Por exemplo, a transcrição da proteína p21, uma inibidora de quinase dependente de ciclina, promove interrupção do ciclo celular em um processo mediado pela p53 (44). A consequência da suspensão do ciclo celular é o reparo do material genético antes da duplicação celular, contribuindo, dessa forma, com a menor incidência de neoplasias. Caso tal reparo não seja possível, o desfecho final seria a apoptose ou senescência celular (43 e 44). Quanto à senescência, essa pode ser atingida por meio de diversas proteínas transcritas a partir da atividade da p53 como o Inibidor de ativação do plasminogênio 1, que age como importante mediador de senescência celular, ou a própria p21 (44, 46). Assim, verifica-se que apoptose ou senescência, após dano ao material genético, representam importantes mecanismos antineoplásicos da p53. Tais achados são evidências da relevância desta proteína p53 como um supressor tumoral.

Em astrocitomas, IDH-mutantes, estima-se que 90% das mutações do *TP53* são do tipo *missense*, em que a alteração de um par de base do DNA leva à substituição de um aminoácido na proteína codificada. Além de interferir com as funções de manutenção do genoma, estas alterações gênicas levam a aumento da meia-vida da p53, permitindo a detecção de seu acúmulo no núcleo das células neoplásicas, inclusive por meio de técnica imuno-histoquímica (47, 48, 3). De acordo com os critérios atuais da OMS, espera-se encontrar imunoexpressão nuclear forte da p53 em mais de 10% das células tumorais (Quadro 1e 2).

Por sua vez, o gene *ATRX* (do inglês, *alpha-thalassemia/mental retardation, X-linked*), que foi inicialmente descrito em pacientes portadores de alfa-talassemia e retardo mental ligados ao cromossomo X, também possui papel relevante na classificação e definição de gliomas difusos do tipo adulto (49). Especificamente, a proteína *ATRX* é parte de uma família de moléculas remodeladoras de cromatina (49). A *ATRX* tem diversas funções em condições fisiológicas (variante selvagem), inclusive ligar-se a regiões do DNA garantindo a manutenção de sua conformação e, consequentemente, diminuir a ocorrência de mutações (49). Em gliomas, a mutação do *ATRX* e a respectiva perda da expressão da proteína foram associadas a dano ao material genético, instabilidade genômica e desregulação epigenética global, com consequente morte celular dependente da p53 (3). Além disso, mutações do *ATRX* também foram relacionadas a alongamento alternativo dos telômeros (ALT; do inglês, *alternative lengthening of telomeres*), que consistem de mecanismos independentes de telomerase e que levam à manutenção patológica dos telômeros (49). Tais vias, por sua vez, cursam com alteração do número de cópias de cromossomos, translocações não recíprocas, deleções, rearranjos cromossômicos complexos e alterações de ploidia (49). Todos esses achados podem contribuir para dano ao material genético e, consequente, oncogênese (37 e 38, 3). Dessa forma, pode-se verificar a relevante ação fisiológica da *ATRX* selvagem para manutenção da integridade genômica, bem como a participação de sua forma mutada na fisiopatogênese de gliomas.

Em adultos, mutações do *ATRX* são encontradas em aproximadamente 90% dos astrocitomas, IDH-mutantes supratentoriais (3). Desta forma, a OMS também propõe em sua classificação recente de tumores do SNC a identificação de perda da expressão nuclear de *ATRX* como um achado relevante para a definição da linhagem astrocitária deste tipo de glioma (Quadro 1) (29, 50 - 53).

Os critérios histológicos e moleculares para o diagnóstico de astrocitoma, IDH-mutante, em adultos, conforme a edição mais recente da Classificação de Tumores do SNC publicada pela OMS estão apresentados no Quadro 1.

Quadro 1 – Critérios diagnósticos para astrocitoma, IDH-mutante.

Essenciais: Glioma difuso E Mutação <i>missense</i> no códon 132 da IDH1 ou no códon 172 da IDH2 E Perda de expressão nuclear de ATRX ou mutação do gene <i>ATRX</i> OU Exclusão das deleções 1p e 19q (codeleção 1p/19q)
Desejáveis: – Forte expressão nuclear da proteína p53 em mais de 10% das células tumorais ou mutação do gene <i>TP53</i> – Perfil de metilação do DNA alinhado com aquele do astrocitoma, IDH-mutante – Características morfológicas de diferenciação astrocitária

Adaptado de Louis DN, Perry A et al., 2021 (2)

Para a graduação neoplásica, ao astrocitoma, IDH-mutante podem ser atribuídos os graus 2, 3 ou 4 da OMS. O tumor que recebe grau 2 consiste em uma lesão difusamente infiltrativa, bem diferenciada, com discretas atipias nucleares e atividade mitótica indetectável ou muito baixa. Em contrapartida, o astrocitoma, IDH-mutante grau 3 remete a lesão com anaplasia focal ou difusa e atividade mitótica significativa. Por fim, o tumor grau 4 exibe proliferação microvascular, necrose e/ou deleção homozigótica do *CDKN2A* e/ou do *CDKN2B* ou qualquer combinação desses achados. A título de informação complementar, em se considerando indivíduos adultos, a edição mais recente da classificação apresentada pela OMS estabelece o grau 1 para os seguintes gliomas astrocitários circunscritos (macroscopicamente bem delimitados): astrocitoma pilocítico e astrocitoma subependimário de célula gigantes. Desta forma, não se atribui grau 1 da OMS para astrocitoma difuso de adultos (astrocitoma, IDH-mutante) (2).

A respeito dos genes *CDKN2A* e *CDKN2B*, ambos têm papel fisiológico antitumoral, sendo que seus produtos consistem das proteínas p16 e p15, respectivamente. Especificamente, com relação ao *CDKN2A*, seu *splicing* alternativo leva à expressão da proteína p14^{ARF} (54). Todas as p14^{ARF}, p15 e p16 funcionam como inibidoras do ciclo celular ao promoverem sua parada. Neste contexto, a p14^{ARF} inibe a progressão do ciclo celular e induz apoptose mediada pela ativação da p53 (55). Esta ativação ocorre pela ligação da p14^{ARF} a uma ubiquitina ligase p53 específica denominada Mdm2 (do inglês, *p53-specific E3 ubiquitin ligase Mouse double minute 2 homolog X*). Uma vez ligadas, a p14^{ARF} impede que a Mdm2 promova a degradação da p53 por proteossomos (55). Dessa forma, a p14^{ARF} exerce propriedades antitumorais por meio de sua interação com p53 e consequente capacidade de promover apoptose. Sobre as proteínas p15 e p16, codificadas pelos genes *CDKN2B* e *CDKN2A*, respectivamente, ambas são inibidoras de quinases dependentes de ciclina (CDKs; do inglês, *cyclin-dependent kinases*) (56). As CDKs regulam a atividade proliferativa em resposta a estímulos intra e extracelulares, atuando em pontos de checagem do ciclo celular e em eventos transcricionais. (57). Especificamente, as proteínas p15 e p16 são transcritas a partir de estímulos anti-proliferativos e se ligam ao complexo CDK4/6-ciclina D. Tal ligação altera a função do complexo CDK4/6-ciclina D e interrompe o ciclo celular na fase G1 (57). Dessa forma, a perda da atividade reguladora do ciclo celular e anti-tumoral das proteínas p14^{ARF}, p15 e p16, por mutação dos genes *CDKN2A* e *CDKN2B*, é um fator relevante na oncogênese de gliomas humanos (57).

No Quadro 2, estão apresentados os achados microscópicos e moleculares considerados para a graduação de astrocitoma, IDH-mutante, segundo a edição mais recente da Classificação de Tumores do SNC publicada pela OMS. A relevância da graduação é indicar o prognóstico associado à lesão e servir de base para a estratificação terapêutica. De fato, quanto menor o grau, melhor o prognóstico. Em que se pesem variações protocolares entre diferentes centros de tratamento de gliomas, em geral, a tumores grau 2 reserva-se prioritariamente tratamento cirúrgico. Para lesões com graus 3 e 4 associam-se radioterapia e/ou quimioterapia (2-3; 58).

Quadro 2 – Critérios para a graduação de astrocitoma, IDH-mutante.

Grau 2 da OMS	- Astrocitoma difuso com uma mutação <i>IDH1</i> ou <i>IDH2</i>, bem diferenciado e sem achados microscópicos de anaplasia - Atividade mitótica indetectável ou muito baixa - Ausência de proliferação microvascular, necrose e de deleções homozigóticas dos genes <i>CDKN2A</i> e/ou <i>CDKN2B</i>
Grau 3 da OMS	- Astrocitoma difuso com uma mutação <i>IDH1</i> ou <i>IDH2</i>, com achados microscópicos focais ou dispersos de anaplasia e que apresenta atividade mitótica significativa - Ausência de proliferação microvascular, necrose e de deleções homozigóticas dos genes <i>CDKN2A</i> e/ou <i>CDKN2B</i>
Grau 4 da OMS	- Astrocitoma difuso com uma mutação <i>IDH1</i> ou <i>IDH2</i>, que apresenta proliferação microvascular ou necrose ou deleção homozigótica dos genes <i>CDKN2A</i> e/ou <i>CDKN2B</i>, ou qualquer combinação destes achados

Adaptado de Louis DN, Perry A et al., 2021 (2)

Por sua vez, glioblastomas correspondem a astrocitomas difusos que acometem predominantemente adultos, possuem evolução agressiva (recebem grau 4 da OMS) e que não demonstram expressão de isoforma mutante da IDH, ou seja, é uma neoplasia definida como IDH-selvagem (3). Neste sentido, a WHO CNS5 estabelece direcionamentos para investigação de IDH com mutação nestas lesões. Inicialmente, procede-se com a avaliação imuno-histoquímica da expressão da forma mutante mais comum IDH1R132H. Esta avaliação é considerada suficiente em indivíduos com idade de 55 anos ou mais ao diagnóstico. Tal ponto de corte etário leva em consideração que a chance de ocorrer outra forma mutante da IDH1 ou IDH2

é muito baixa (estimada em menos de 1%) em lesões de adultos a partir dos 55 anos. Além disso, o tumor deve possuir características histológicas de glioblastoma (atipias nucleares, figuras de mitose, bem como proliferação microvascular e/ou necrose) e não estar situado em topografia de linha média. Por fim, o indivíduo não deve apresentar histórico prévio de glioma difuso de menor grau histológico.

Caso uma das características de suficiência não sejam contempladas, idealmente, deve-se prosseguir com a investigação das formas mais raras de mutação da IDH1 e IDH2 (12) por meio de técnicas de sequenciamento gênico. Nesta situação, incluem-se ainda lesões com características histológicas clássicas de glioblastoma e perda da expressão nuclear de ATRX. Em se confirmando a ausência de mutações de IDH, caracteriza-se a lesão como portadora de IDH selvagem (2-3; 58). Por fim, a respeito da investigação de IDH mutante em tumores astrocitários difusos de indivíduos adultos, o mesmo protocolo técnico serve de base para a análise das lesões de graus 2 ou 3, levando-se em consideração os achados histológicos característicos de cada lesão.

Além da verificação do *status* da IDH selvagem, os critérios diagnósticos para glioblastoma, IDH-selvagem incluem: histona H3-selvagem (importante para distinguir esta lesão de outras de alto grau e que possuem forma alterada da H3, como gliomas difusos pediátricos de linha média ou hemisféricos) e pelo menos um dos seguintes achados: proliferação microvascular, necrose, mutação do promotor do gene da transcriptase reversa da telomerase (*TERT*; do inglês, *telomerase reverse transcriptase*), amplificação do receptor do Fator de crescimento endotelial (EGFR; do inglês, *endotelial growth factor receptor*) ou ganho do cromossomo 7 associado a perda do cromossomo 10 (+7/-10) (2).

Quanto à mutação do promotor do gene *TERT*, esta alteração leva à reativação da telomerase que se encontra normalmente silenciada em células somáticas (59). Tal enzima é responsável pelo alongamento dos telômeros que se encontram na extremidade de cada cromossomo (59). Por sua vez, os telômeros protegem a porção final dos cromossomos impedindo sua degradação e se tornam mais curtos a cada divisão celular (60). Quando o comprimento telomérico atinge um nível crítico, cascatas moleculares levam à interrupção do ciclo celular e senescência, o que marca o limite da capacidade proliferativa celular (60). Com a mutação do promotor do *TERT* e a reativação da telomerase, células neoplásicas passam a contar com um aparato

que permite o prolongamento indefinido dos telômeros (59). Assim, essas se tornam capazes de evadir a senescência por encurtamento dos telômeros, permitindo replicação contínua e ilimitada (59). Portanto, a reativação do *TERT* por mutação de seu promotor visto em glioblastoma representa um mecanismo oncogênico importante em gliomas humanos.

Ademais, dentre as alterações moleculares relevantes para o diagnóstico de glioblastoma, IDH-selvagem, consta a amplificação do gene *EGFR*. Particularmente, o *EGFR* é considerado um oncogene e suas alterações e mutações foram identificadas em uma série de neoplasias, dentre elas, gliomas (61). Em glioblastomas, a presença de amplificação da *EGFR* está relacionada a maior capacidade invasiva e proliferação celular. Nesse sentido, Li *et al* notaram que, ao infectarem células de camundongos que não expressam o gene supressor tumoral *PTEN* (do inglês, *phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*) com retrovírus que expressa *EGFR*, tais células levaram ao surgimento de tumores altamente mitóticos, com pleomorfismo nuclear, áreas necróticas e aumento da autorrenovação celular (62). Mazzoleni *et al.* reportaram que a expressão de *EGFR*, por transferência de gene, aumenta o comportamento agressivo de células-tronco oncogênicas obtidos de glioblastomas humanos. Além disso, tais autores verificaram que células expressando *EGFR* obtidas de gliomas humanos e inoculadas em ratos apresentavam capacidade tumorigênica aumentada, em comparação com células sem a expressão de *EGFR* (63). Ademais, Aibaidula *et al.* e Shinojima *et al.* identificaram amplificação do *EGFR* como fator prognóstico negativo independente em gliomas, estando associado a menor sobrevida quando comparado a lesões sem amplificação do *EGFR* (64,65). Especificamente, a ativação do *EGFR* leva à sua dimerização, o que induz autofosforilação de resíduos de tirosina na porção C-terminal do receptor e ativação de diversas proteínas. Consequentemente, tem-se ativação da via MAPK, sinalização da PI3K e *scr* quinase, bem como ativação do fator de transcrição STAT. Tais alterações promovem síntese de DNA e proliferação celular, destacando a relevância oncogênica da amplificação do *EGFR*.

Quanto ao ganho do cromossomo 7 associado à perda do cromossomo 10, existem diferentes possibilidades de combinações destas alterações citogenéticas (66). Independente da possibilidade, tais alterações têm sido relacionadas a pior prognóstico em pacientes com gliomas. Nesse sentido, Balesaria *et al.* encontraram

associação tanto de pior *performance status* na apresentação quanto de menor sobrevida com qualquer forma de deleção do cromossomo 10 (67). Por sua vez, Roth *et al.* notaram um risco 4.7 vezes maior de recorrência em gliomas pediátricos com ganho de cromossomo 7, ao compará-los com lesões sem essa alteração (68). De forma similar, Wessels *et al.* identificaram que o ganho de cromossomo 7 em gliomas humanos está relacionada a piora de sobrevida (69). Ainda, foi identificado que, em 25% das lesões, o cromossomo 7 extra contém fusões gênicas como *KIAA1549-BRAF*, as quais podem contribuir para tumorigênese. Assim, esse e outros genes fundidos teriam expressão aumentada com o ganho do cromossomo 7 o que poderia contribuir para a piora do prognóstico (68). Ademais, a perda do cromossomo 10 leva à diminuição da expressão do gene supressor tumoral *ANXA7* o que promove, por sua vez, aumento da sinalização de EGFR e oncogênese.

Em resumo, os achados microscópicos e moleculares utilizados para o diagnóstico de glioblastoma, IDH-selvagem, segundo a edição mais recente da Classificação de Tumores do SNC publicada pela OMS estão apresentados no Quadro 3.

Quadro 3 –Critérios diagnósticos para glioblastoma, IDH-selvagem

Essenciais:

Astrocitoma difuso, IDH-selvagem, H3-selvagem

E

Um ou mais dos seguintes achados:

- Proliferação microvascular
- Necrose
- Mutação do promotor do gene *TERT*
- Amplificação do gene *EGFR*
- Alterações do número de cópias dos cromossomos 7 e 10 (+7/-10)

Desejável:

Perfil de metilação do DNA alinhado com aquele do glioblastoma, IDH-selvagem

Ainda com relação à recente nomenclatura de tumores do SNC elencados na edição mais recente da Classificação apresentada pela OMS, é oportuno destacar a orientação para uso dos sufixos NOS (do inglês, *not otherwise specified*) e NEC (do inglês, *not elsewhere classified*), os quais serão traduzidos aqui como “sem outras especificações (SOE)” e “não classificado em outra parte”, respectivamente. Também utilizados para gliomas difusos do tipo adulto, a finalidade destes sufixos é indicar que o diagnóstico apresentado para uma determinada neoplasia não está completamente elaborado conforme os critérios histopatológicos e moleculares indicados como obrigatórios nas definições correspondentes. Assim, o termo “NOS / SOE” indica ao leitor que informações (histológicas ou moleculares) necessárias para se realizar um diagnóstico específico não estão disponíveis, seja por falta de recursos ou por falha técnica de protocolo realizado. Já o termo “NEC” significa que testes complementares necessários foram realizados com sucesso, mas os dados não permitem estabelecer um diagnóstico específico, uma vez que não estão alinhados com informações clínicas, histológicas, imuno-histoquímicas e/ou genéticas apresentadas na última edição da Classificação da OMS. Desta forma, ainda que o tumor seja bem caracterizado (morfológica e molecularmente), é possível realizar apenas um diagnóstico descritivo do tumor (2, 3).

Em função da recente atualização da classificação de tumores do SNC pela OMS, a maior parte dos dados epidemiológicos associados aos gliomas difusos de baixo e alto grau em adultos correspondem aos critérios adotados em edições prévias. Feita esta ressalva, astrocitomas difusos cujas características histológicas remetem aos graus 2 e 3 atualizados são mais comumente detectados em homens adultos, a partir da terceira década de vida, sendo mais frequentes no compartimento supratentorial, especialmente nos lobos frontais. Por sua vez, glioblastoma (glioma difuso de grau 4, na classificação atual e prévias) é lesão que possui pico de incidência entre 50 e 80 anos, também sendo mais comuns em homens. Especificamente, estas últimas lesões progridem mais rapidamente que as primeiras, além de possuírem pior prognóstico, não raro com desfecho fatal (2-3, 58). Independentemente do grau histológico, a etiologia dos gliomas astrocitários difusos é desconhecida e sua gênese ocorreria a partir de células precursoras intraparenquimatosas, com características gliais e neurais e em topografia cerebral periventricular. Na gliomagenese, em que se estima que uma das primeiras alterações envolveria a mutação da IDH, diversos fatores estariam associados, como alteração de eventos moleculares relacionados a

proliferação, crescimento e/ou diferenciação celulares, bem como interações com outros tipos celulares, inclusive do sistema imunológico. Espera-se que a WHO CNS5 contribua com a melhor definição e categorização dos gliomas difusos não só para o contexto terapêutico, mas também para pesquisas futuras visando a melhor compreensão da origem e evolução biológica destas neoplasias. (3, 70-73).

Até onde sabemos, não há relatos prévios na literatura a respeito da avaliação da distribuição tecidual da forma mutante R132H da IDH1 em gliomas difusos de baixo e alto grau histológico em amostras de indivíduos tratados em instituição terciária brasileira. Da mesma forma, não temos conhecimento a respeito das distribuições teciduais das isoformas selvagens da IDH1 e IDH2, bem como de eventual repercussão em suas expressões, nos tumores com a enzima mutante IDH1R132H. Assim, o presente estudo visa conhecer a distribuição tecidual destas três enzimas (IDH1R132H, IDH1 e IDH2) em astrocitomas difusos de baixo e alto grau histológico, por meio de técnica imuno-histoquímica, e investigar a hipótese de haver diferença entre os espécimes com e sem IDH1R132H. A partir do conhecimento de tais expressões e distribuições teciduais, pretendemos obter dados morfológicos que possam contribuir com a melhor caracterização destas amostras e fornecer dados para estudos futuros sobre outras proteínas relacionadas ao funcionamento das células neoplásicas.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Estudar a expressão e a distribuição tecidual, utilizando técnica imuno-histoquímica, da forma mutante R132H da IDH1 (IDH1R132H) e das formas selvagens da IDH1 e IDH2 em gliomas difusos de baixo e alto grau histológico, bem como possíveis diferenças entre as amostras com e sem a enzima mutante.

2.2. Específicos

- 2.2.1. Caracterizar espécimes de astrocitomas difusos de baixo e alto grau histológico de indivíduos adultos que compõem biorrepositório de instituição terciária brasileira, utilizando técnicas histológicas, imuno-histoquímicas e hibridação *in situ*.
- 2.2.2. Investigar, por técnica imuno-histoquímica, e descrever as distribuições teciduais de IDH1R132H e das formas selvagens da IDH1 e IDH2 em espécimes de astrocitomas difusos de baixo e alto grau histológico de indivíduos adultos que compõem biorrepositório de instituição terciária brasileira.
- 2.2.3. Estabelecer método para semiquantificar a expressão de IDH1R132H e das formas selvagens da IDH1 e IDH2 em astrocitomas difusos de baixo e alto grau histológico, a partir da análise digital de cortes histológicos submetidos a imunomarcção por peroxidase.
- 2.2.4. Pesquisar associações entre dados morfológicos e imuno-histoquímicos (qualitativos e semiquantitativos), a respeito da expressão de IDH1R132H e das formas selvagens da IDH1 e IDH2 em astrocitomas difusos de baixo e alto grau histológico, e dados clínicos e evolutivos de adultos que integram casuística de biorrepositório de instituição terciária brasileira.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp; CAAE: 30652420.0.0000.5404), baseia-se em análise retrospectiva de espécimes cirúrgicos obtidos de pacientes submetidos a cirurgia para tratamento de glioma e que tiveram acompanhamento clínico e cirúrgico no Hospital de Clínicas (HC) da Unicamp, no período de 2010 a 2018.

O material analisado corresponde a cortes histológicos obtidos dos espécimes cirúrgicos incluídos em blocos de parafina, os quais estão arquivados no Departamento de Patologia (DP), Área de Anatomia Patológica, da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Unicamp. Para seleção dos espécimes cirúrgicos, foram revisadas as lâminas histológicas já existentes no arquivo. As lâminas com cortes histológicos mais representativos de cada lesão foram identificadas e selecionadas juntamente com os seus respectivos blocos para as análises imuno-histoquímica e molecular. O número total de espécimes estudados (n) foi estabelecido considerando os critérios de inclusão e exclusão (vide abaixo). Desta forma, foram selecionados 25 indivíduos (n=25), sendo 10 com o diagnóstico histológico de glioma difuso de baixo grau (n=10) e 15 com glioma difuso de alto grau (n=15), ambos com células neoplásicas exibindo características morfológicas astrocitárias (vide item 3.3). Além disso, a confirmação da linhagem astrocitária das neoplasias, bem como a definição da nomenclatura diagnóstica e do respectivo grau, foram realizadas considerando-se os critérios apresentados na 5ª edição da Classificação de Tumores do SNC da OMS para gliomas difusos de adultos (2-3, 58). (vide itens 3.3, 3.5 e 3.7).

Ainda, os seguintes dados clínicos foram obtidos por meio de pesquisa nos prontuários médicos dos indivíduos cujos espécimes foram avaliados: idade ao diagnóstico histológico, idade no momento da cirurgia, topografia da lesão e idade ao óbito.

3.1. Critérios de inclusão

Pacientes adultos (maiores de 18 anos), de ambos os sexos, com diagnóstico histológico de glioma difuso de baixo ou alto grau, com características morfológicas astrocitárias, sem história prévia de qualquer neoplasia e/ou tratamento oncológico, e

cujos espécimes cirúrgicos estivessem contidos em blocos de parafina em adequado estado de conservação.

3.2. Critérios de exclusão

Qualquer paciente com diagnóstico histológico de glioma difuso de alto ou baixo grau e cujas características clínicas, ou do espécime cirúrgico correspondente, não estivessem contempladas nos critérios de inclusão.

3.3. Análise microscópica dos espécimes cirúrgicos e diagnóstico histológico

Cortes histológicos seriados de 4,0 µm foram obtidos dos blocos selecionados, conforme os critérios de inclusão e exclusão, e corados pela hematoxilina e eosina (HE) ou submetidos a reações imuno-histoquímicas (vide item 3.5).

Para avaliação diagnóstica dos espécimes corados pela HE, foram consideradas as seguintes características citológicas como sendo sugestivas de diferenciação astrocitária (astrocitoma) (2): núcleos atípicos (arredondados ou alongados, hipercromáticos e com limites irregulares) e citoplasma com prolongamentos fibrilares. Ainda, foi valorizado o encontro de células neoplásicas frequentemente descoesas ou, por vezes, distribuindo-se de forma a organizar fundo de aspecto frouxo ou microcístico. Lesões classificadas como de alto grau histológico (ver adiante) exibiam atipias nucleares mais intensas (como contornos mais irregulares, cromatina grosseira e/ou multinucleação), alta relação núcleo/citoplasma e menor frequência de prolongamentos citoplasmáticos. Com relação ao grau histológico, os tumores foram classificados como “de baixo grau” (grau 2 da OMS (2)) quando exibiram atipias nucleares, mas não figuras de mitose, proliferação microvascular nem necrose. Por sua vez, foram diagnosticados como “de alto grau” (grau 4 da OMS (2)) os tumores que apresentaram proliferação microvascular e/ou necrose (Figuras. 3 e 4).

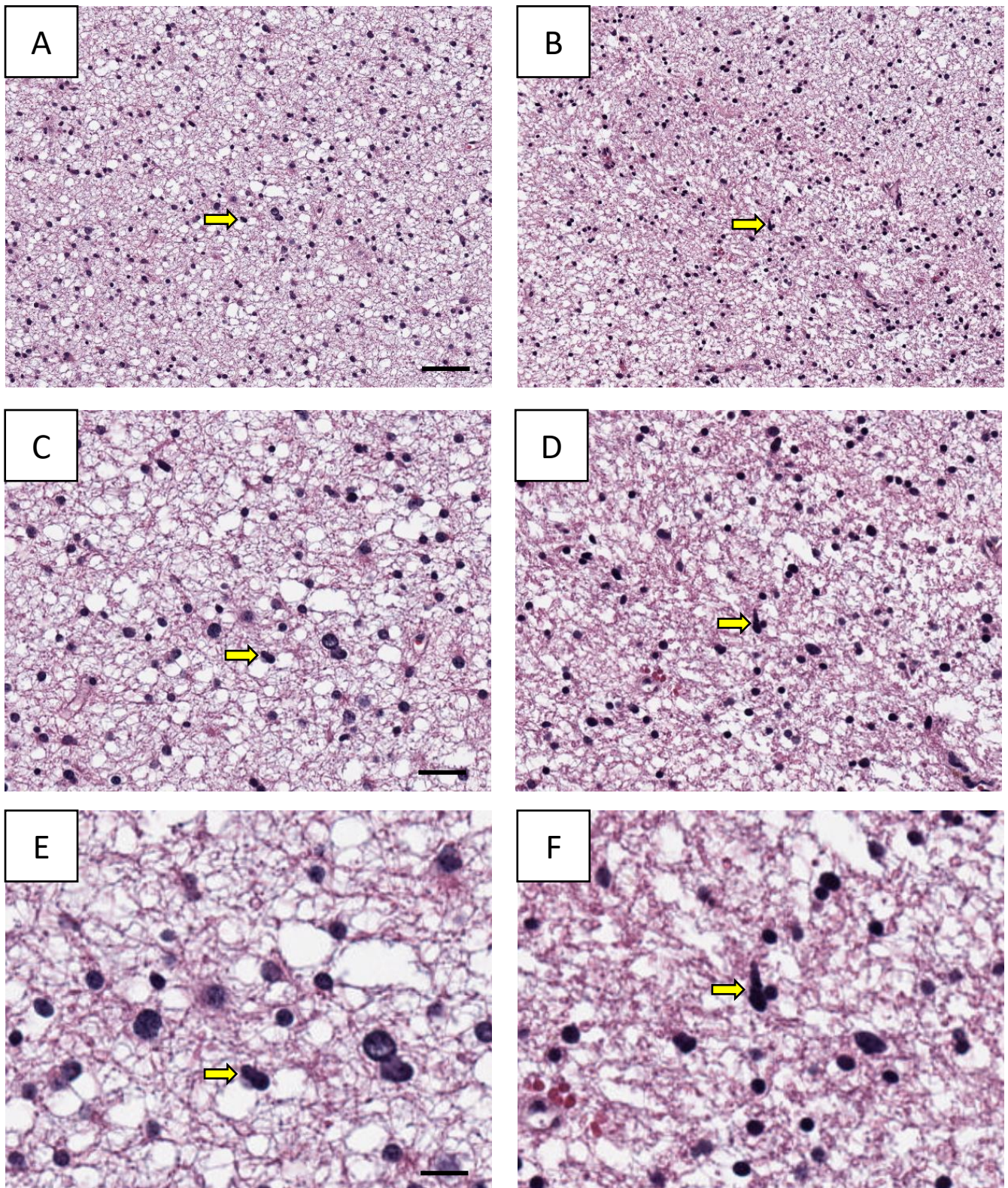


Figura 3. Achados histológicos representativos de astrocitoma, IDH mutante, grau 2 da OMS.

A – F) Neoplasia constituída por células exibindo atipias nucleares leves (irregularidade do contorno, cromatina heterogênea e hiperchromasia; setas amarelas), em fundo de aspecto fibrilar. Os campos histológicos apresentados em C e E correspondem a aumentos de maior magnitude do campo apresentado em A. O mesmo se aplica aos campos apresentados em D, F e B, respectivamente. Coloração com hematoxilina e eosina. Barras de escala: 100 μm (A – B); 50 μm (C – D); 20 μm (E – F).

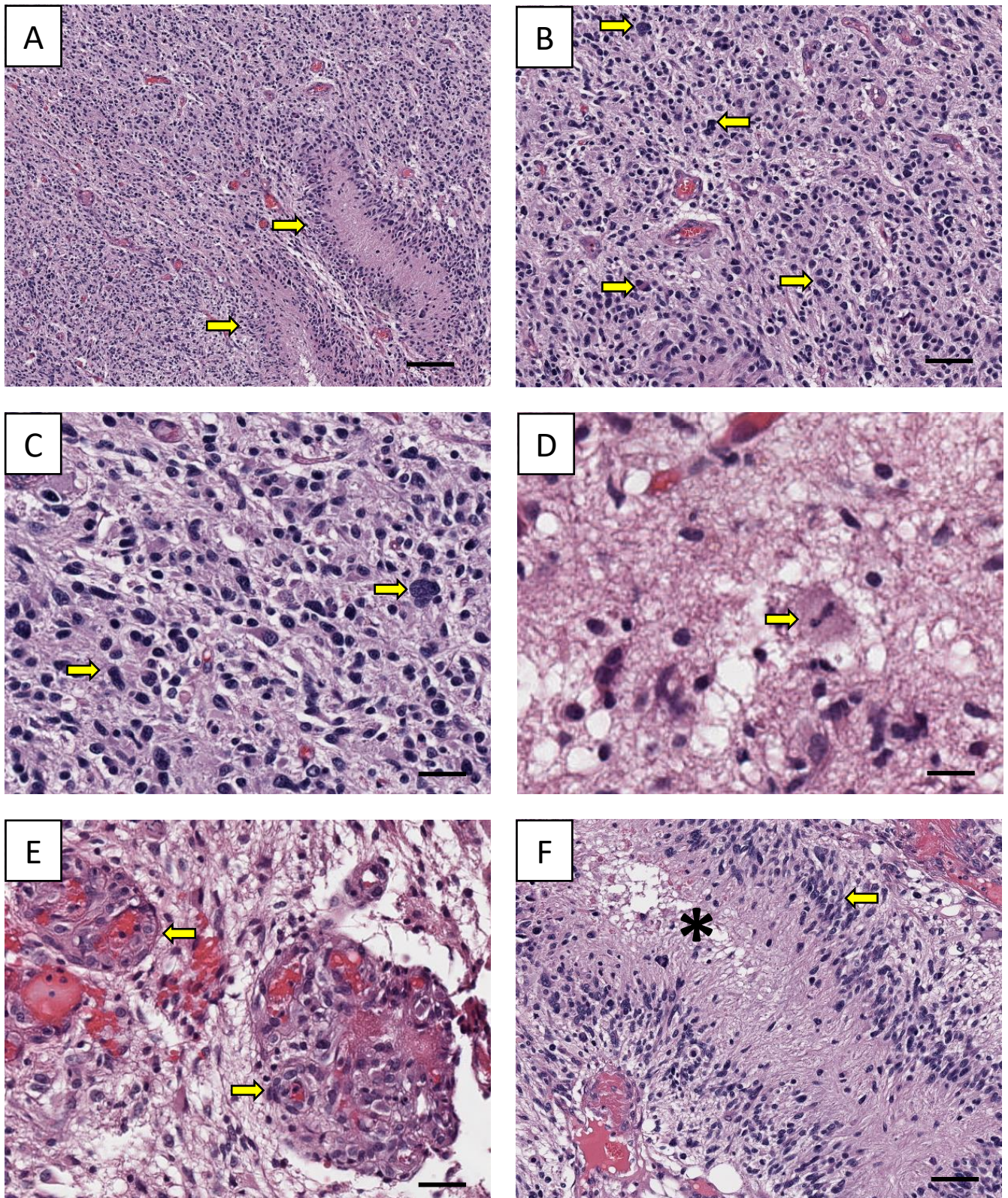


Figura 4. Achados histológicos representativos de astrocitoma, IDH mutante, grau 4 da OMS e de glioblastoma, IDH-selvagem, grau 4 da OMS. (continua na página seguinte)

Figura 4. Achados histológicos representativos de astrocitoma, IDH mutante, grau 4 da OMS e de glioblastoma, IDH-selvagem, grau 4 da OMS. (continuação da página anterior) Em A, neoplasia hipercelular, com áreas viáveis e focos de necrose (setas amarelas). Em B e C, maiores aumentos do componente neoplásico viável apresentado em A. Notam-se células anaplásicas com alta relação núcleo/citoplasma, irregularidade e hipercromasia nucleares (setas amarelas), por vezes com binucleação, em fundo de aspecto fibrilar denso. Em D, observa-se figura de mitose (seta amarela), um achado neoplásico frequente. Em E, identifica-se proliferação microvascular neoplásica (vasos com hiperplasia endotelial), com o aspecto comum em pseudoglomerulo (setas amarelas). Em F, observa-se área de necrose (indicada por asterisco), outro aspecto frequentemente observado, com destaque para a organização das células neoplásicas adjacentes em pseudopaliçada (seta amarela). Coloração com hematoxilina e eosina (A – F). Barras de escala: 200 µm (A); 100 µm (B e F); 50 µm (C e E); 20 µm (D).

3.4. Confeção de bloco de *tissue microarray* (TMA)

Após a realização de cortes histológicos (vide item 3.3), foram confeccionados blocos de *tissue microarray* (TMA). Para confecção destes blocos foram demarcadas áreas representativas de cada lesão no respectivo corte histológico. Em seguida, as áreas selecionadas foram identificadas nos materiais armazenados nos blocos doadores. Assim, a partir das áreas representativas de cada tecido emblocado, foram obtidos cilindros de 3mm de diâmetro, os quais foram transferidos para o bloco receptor (TMA). Para a confecção do bloco de TMA foi utilizado o equipamento 8010 Tissue-Tek® Quick-Ray™ Tissue Microarray System, cat#8010, Sakura Finetek USA, INC., 1750 West 214th street Torrance, CA 90501 USA.

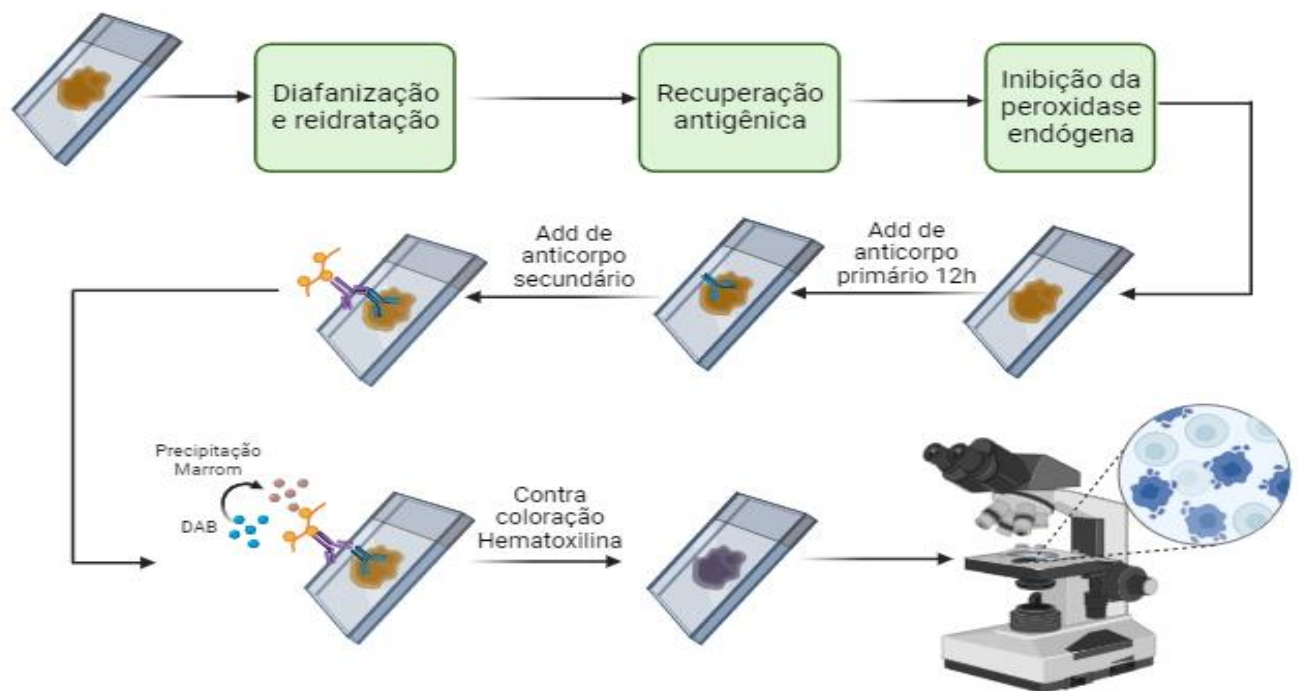
Especificamente, foi confeccionado um bloco receptor TMA para as lesões de baixo grau e outro para aquelas de alto grau. Para a orientação do posicionamento dos espécimes em cada bloco de TMA, foi utilizada como referência amostra de tecido hepático normal. De cada bloco de TMA, foram realizados cortes histológicos seriados de 3,0 µm de espessura e corados pela HE ou submetidos a protocolo de hibridação *in situ* por fluorescência (FISH; vide item 3.7).

3.5. Reações de imuno-histoquímica

De cada espécime incluído em bloco de parafina, cortes seriados de 4,0 µm foram coletados em lâminas histológicas previamente tratadas com 3-aminopropil-trietoxi-silano (Sigma Chemical Company, EUA).

Para o protocolo de imunomarcção, os cortes foram inicialmente fixados na lâmina em estufa a 60°C e desparafinizados com três sequências de xilol por 10 minutos cada, em temperatura ambiente, hidratados em solução de concentrações decrescentes de etanol (100%, 80% e 50%) e lavados em água destilada. A atividade da peroxidase endógena foi inibida utilizando peróxido de hidrogênio a 10% em três incubações de cinco minutos cada. Posteriormente, os cortes foram lavados em água destilada. Em seguida, foi realizada a recuperação antigênica em banho-maria a 90°C por 1 hora utilizando-se solução tampão Tris-EDTA pH 9,0 ou citrato de sódio pH 6,0, conforme o anticorpo primário (Quadro 4). Após, os cortes foram lavados em água destilada e colocados em solução salina tamponada com fosfato (PBS) a 10mM (pH 7,0).

Os cortes foram incubados com os anticorpos primários diluídos (Quadro 4) em albumina sérica bovina (BSA) a 1% e azida sódica (NaN_3) a 0,1% em PBS, em câmara úmida por 1 hora, em estufa de 37°C. Depois, foram incubados em geladeira por 18 horas a 4°C. Após a incubação com os anticorpos primários, os cortes foram lavados em PBS e expostos a anticorpos secundários conjugados com peroxidase em solução de revelação Envision™ Flex+® (Dako, cat#K8002, Glostrup, Denmark) por 1 hora a 37°C. A revelação foi realizada com substrato cromogênico 3,3 diaminobenzidina (DAB) incubando em câmara seca a 37°C durante 5 minutos e, posteriormente, contracoradas com hematoxilina de Mayer durante 3 minutos. Terminada esta etapa, as lâminas foram desidratadas em solução de etanol a 100%, diafanizadas em xilol e montadas em resina (Enthellan) (Figura 5).



Created in BioRender.com

Figura 5. Representação esquemática das reações de imuno-histoquímica. Ver detalhes no texto.

Para cada marcador, todos os cortes foram reagidos simultaneamente. Além disso, controles positivos e negativos foram utilizados para todas as reações.

Especificamente, a expressão da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) foi avaliada por ser um indicador de diferenciação astrocitária em células normais e neoplásicas. Em astrocitomas difusos do tipo adulto, a extensão da expressão de GFAP é tanto maior quanto mais diferenciada (de menor grau histológico) for a lesão. Por sua vez, como abordado anteriormente (vide item 1), as proteínas IDH1R132H, ATRX e p53 foram investigadas para auxiliar a caracterização dos gliomas difusos como astrocitomas ou glioblastomas (2-3, 58).

Quadro 4 – Informações sobre os anticorpos primários e respectivos métodos de recuperação antigênica (tampão e pH) utilizados nas reações imuno-histoquímicas.

Anticorpo	Clone / Cat #	Tampão	pH	Diluição	Fabricante
GFAP	#GA524	Citrato	6,0	1:500	Dako
IDH1R132H	H09	Citrato	6,0	1:250	Dianova
ATRX	HPA001906	Citrato	6,0	1:800	Sigma
p53	DO-7	Tris-EDTA	9,0	1:500	Dako
IDH1	HPA035248	Citrato	6,0	1:1500	Sigma
IDH2	HPA007831	Citrato	6,0	1:200	Sigma

3.6. Análises das imunomarcações

Após as reações de imuno-histoquímica, as lâminas foram escaneadas (Aperio Scanscope CS2; #23CS100) e procedeu-se às análises das imagens digitalizadas dos cortes histológicos.

Com relação à análise qualitativa, foi avaliada a ausência ou presença de imunomarcacão. Neste último caso, descreveu-se o padrão observado (citoplasmático e/ou nuclear). Particularmente, as marcações para GFAP, IDH1R132H, ATRX e p53 foram realizadas para caracterização da linhagem celular das neoplasias como astrocitária, levando-se em consideração também o status da codeleção 1p19q (vide item 3.7).

Ainda, para os marcadores IDH1R132H, IDH1 e IDH2, procedeu-se à avaliação semiquantitativa da distribuição tecidual nos tumores de baixo e alto grau. No presente estudo, a área de cada campo histológico avaliado foi de 0.252 mm², sendo que o campo foi obtido a partir do aumento digital de 20x verificado no programa Aperio

ImageScope® (versão 12.4.6, disponível gratuitamente em <https://www.leicabiosystems.com/pt-br/imagem-de-patologia/manage/aperio-imagescope/>). Por espécime, foram avaliados de 5 a 10 campos histológicos, conforme a quantidade e o tamanho de fragmentos teciduais disponíveis. Para a semiquantificação da marcação, foi utilizado o programa ImageJ® (versão 1.50i, disponível gratuitamente em <https://www.nih.gov>). Por meio deste programa, foi inicialmente empregada a técnica de deconvolução, ou seja, separação dos canais da hematoxilina e da diaminobenzidina (DAB), por meio do plugin IHC Profiler (74). Após, o canal referente à DAB foi submetido a processamento para aumento de contraste binário (*thresholding*, na versão original do programa em inglês). Através desta técnica, a imagem a ser analisada é convertida em informação binária, isto é, preto e branco. Para tal conversão, o operador do programa define visualmente um ponto de corte na escala de cinza que mantenha, da forma mais fidedigna possível, as características da imunomarcação (intensidade, distribuição no campo histológico avaliado e contraste com o fundo) observadas nas imagens coloridas (Figura 6). Particularmente, a esta escala de cinza correspondem valores numéricos que variam de 0 (preto) a 255 (branco). Desta forma, os *pixels* na escala de cinza abaixo do ponto de corte se tornam brancos e, aqueles acima, pretos. Por fim, o programa calcula o quociente de *pixels* positivos em relação ao total de *pixels* na imagem, fornecendo um valor definido como a porcentagem de positividade na área correspondente a cada campo histológico avaliado (75).

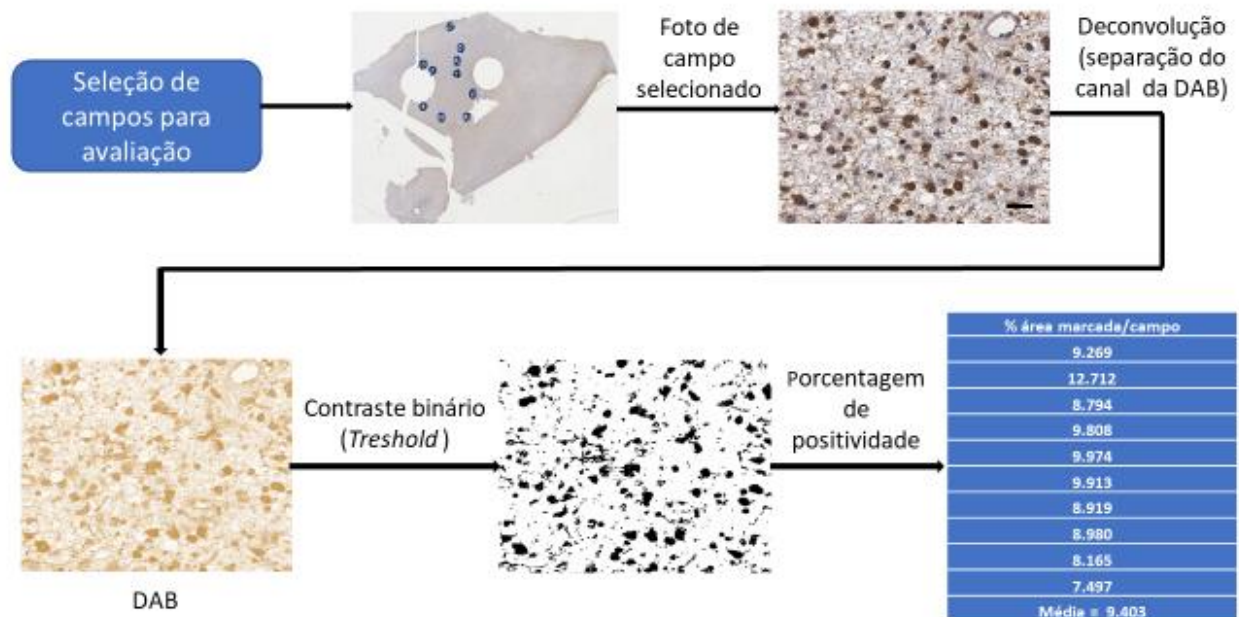


Figura 6. Representação esquemática da análise semiquantitativa das imunomarcações. Ver detalhes no texto.

3.7. Hibridação *in situ* por fluorescência (FISH)

A técnica de FISH foi realizada para a identificação da presença ou ausência da codeleção 1p/19q, com a finalidade de se caracterizar a linhagem dos gliomas difusos de baixo grau como oligodendroglioma ou astrocitoma, respectivamente (2). Foi utilizado o kit ZytoLight® Glioma 1p/19q Probe Set (ZytoVision, cat#Z-2272-20, Bremerhaven, Germany), conforme as especificações do fabricante.

Inicialmente, cortes de 3 µm foram obtidos dos blocos de TMA com fragmentos representativos dos gliomas difusos de baixo grau e coletados em quatro lâminas silanizadas. Após, os cortes foram desparafinizados em xilol por meio de três banhos de 10 minutos, seguidos de três banhos de 5 minutos em álcool absoluto e três banhos de 2 minutos em água destilada. A seguir, realizou-se pré-tratamento dos cortes com tampão citrato de sódio pH 6.0 10mM em banho-maria por 30 minutos, com posterior digestão enzimática com pepsina por 2 minutos a 37°C, em hibridizador (3800 Dako, Carpinteria, CA, USA). Nova lavagem foi realizada em solução salina por 5 minutos à

temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram lavados em água destilada, submetidos a desidratação em álcool absoluto e secagem a temperatura ambiente. Então, aplicou-se solução do kit para reduzir a autofluorescência por 20 minutos em temperatura ambiente. Após, foram feitas duas lavagens de 5 minutos em tampão de lavagem do kit. Em seguida, as lâminas foram secas ao ar e foram aplicados 10µL de solução do kit com as sondas 1p36, 1q25, 19q13, 19p13 sobre os cortes, os quais foram cobertos com lamínulas. Então, as lâminas foram colocadas em hibridizador (3800 hibridizador Dako, Carpinteria, CA, USA) para o processo de desnaturação por 10 min a 75°C e, posteriormente, incubadas para hibridação por 24h a 37°C.

Após as etapas de desnaturação e hibridação, as lâminas foram mergulhadas em tampão de lavagem previamente aquecido a 37°C até desprendimento das lamínulas. Então, foram realizados dois banhos em tampão de lavagem do kit por 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram desidratadas em álcool absoluto e secas a temperatura ambiente. Por fim, aplicaram-se 15µL por corte de solução de 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI; corante fluorescente com afinidade por ácidos nucléicos) para visualização nuclear e os cortes foram cobertos com lamínulas. As lâminas foram mantidas no escuro a 4°C até a análise das reações (Figura 7).

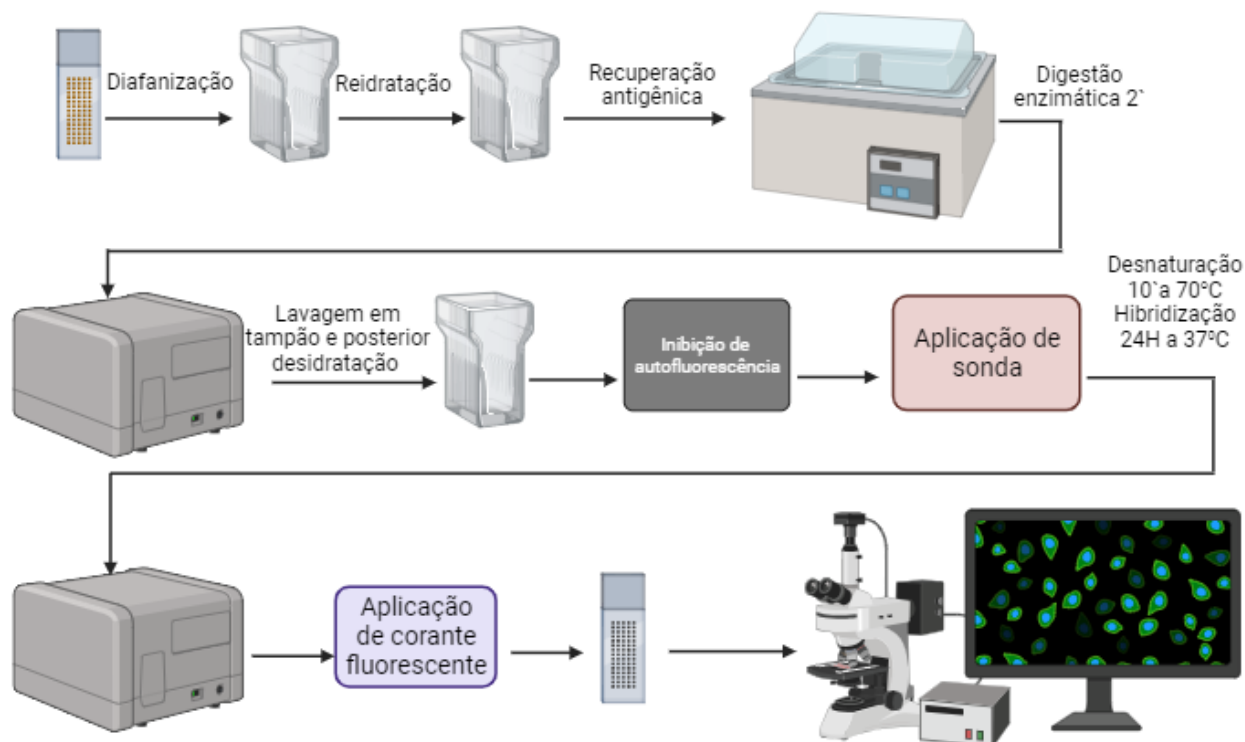


Figura 7. Representação esquemática da técnica de Hibridação *in situ* por fluorescência (FISH). Ver detalhes no texto.

A análise dos sinais de cada sonda foi realizada em um microscópio de fluorescência equipados com filtros verde e laranja (BM2100 NOVEL) com as seguintes características (verde – excitação: 503nm / emissão: 528nm; laranja – excitação: 547nm / emissão: 572nm). Para cada espécime, foram contados 60 núcleos de células neoplásicas. Especificamente, foram obtidos os números médios de sinais das regiões 1p36 (região de interesse), 1q25 (controle), 19q13 (região de interesse) e 19p13 (controle) por célula neoplásica. Foi considerada presença de codeleção em uma amostra tumoral, quando as razões 1p36/1q25 e 19q13/19p13 foram iguais ou inferiores a 0,8 (76-77) (Figura 7)

Na presente casuística, não se identificou codeleção 1p19q nos gliomas difusos de baixo grau, sendo, portanto, afastado o diagnóstico molecular de oligodendroglioma para estas lesões, conforme recomendado na edição mais recente da Classificação de Tumores do SNC da OMS (2).

Desta forma, o presente estudo foi desenvolvido apenas com tumores astrocitários de baixo ou alto grau, em adultos, sendo a caracterização das lesões realizada por meio da utilização, em paralelo, de técnicas de imuno-histoquímica (vide itens 3.5 e 3.6) e de FISH. A Figura 8 apresenta fluxograma de avaliação das lesões por meio dos dados histológicos e moleculares obtidos. Desta forma, as lesões estudadas foram classificadas como: **astrocitoma, IDH mutante, grau 2 da OMS; astrocitoma, sem outras especificações (SOE), grau 2 da OMS; glioblastoma, IDH selvagem, grau 4 da OMS ou astrocitoma, SOE, grau 4 da OMS**. Os detalhes referentes aos achados imuno-histoquímicos e moleculares que justificaram a classificação de cada tumor são apresentados na próxima seção (Resultados), juntamente com resultados de outras análises realizadas no mesmo espécime.

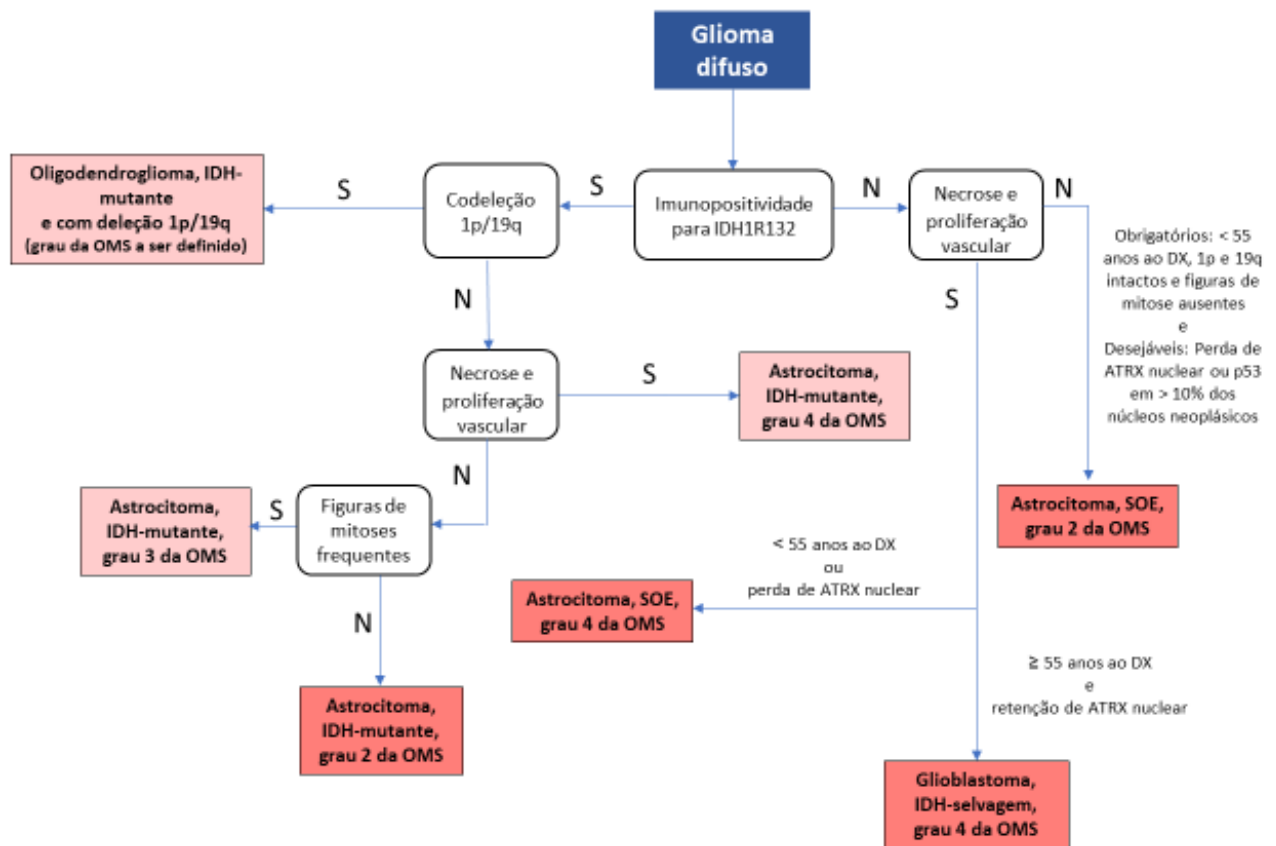


Figura 8. Etapas da avaliação histológica e molecular dos gliomas difusos de adultos da presente casuística. Todos os tumores estudados foram caracterizados como astrocitários, sendo que os diagnósticos correspondentes a estas lesões estão destacados em caixa com fundo escuro. Detalhes de cada espécime são apresentados na seção Resultados. ATRX: do inglês, *alpha-thalassemia/mental retardation, X-linked* (avaliação imuno-histoquímica). Codeleção 1p/19q: deleção completa dos cromossomos 1p e 19q (avaliação através de hibridação *in situ* por fluorescência – FISH). DX: diagnóstico. IDH: isocitrato desidrogenase. IDH1R132H: forma mutante R132H da IDH1 (avaliação imuno-histoquímica). N: não. OMS: Organização Mundial da Saúde. p53: proteína p53 (avaliação imuno-histoquímica). S: sim. SOE: sem outras especificações (modificado a partir de Horbinski et al., 2022 (58)).

3.8. Análise estatística

Para descrição do perfil desta casuística, foram calculados os valores de frequência absoluta (n) e relativa (%) das variáveis categóricas (sexo, diagnóstico histológico e status (positivo/negativo) das imunomarcações para IDH1 R132H e da

pesquisa da codeleção 1p/19q), bem como estatísticas descritivas das variáveis numéricas (idade, sobrevida global e porcentagem de imunopositividade), com valores de média, desvio padrão, valores mínimo e máximo, mediana e quartis.

Para comparação das porcentagens de imunopositividade entre dois grupos (baixo grau histológico e alto grau histológico; baixo grau histológico imunopositivo para IDH1R132H e baixo grau histológico imunonegativo para IDH1R132H) foi utilizado o teste de Mann-Whitney, devido à ausência de distribuição normal das variáveis e o tamanho reduzido dos grupos. Para analisar a relação da porcentagem de imunopositividade com os dados clínicos dos pacientes foram utilizados o teste de Mann-Whitney (comparação entre dois grupos) e o coeficiente de correlação de Spearman (relação entre variáveis numéricas). O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5% ($P < 0.05$).

Para análise estatística foram utilizados os seguintes programas computacionais: The SAS System for Windows (Statistical Analysis System, versão 9.4. SAS Institute Inc, 2002-2008, Cary, NC, USA) e R (versão 4.2.2. Copyright (C) 2022 The R Foundation for Statistical Computing).

4. RESULTADOS

4.1. Características clínicas dos grupos

Para este trabalho, foram selecionados 10 casos de tumores astrocitários de baixo grau e 15 de alto grau. As características clínicas dos indivíduos portadores das lesões estão apresentadas no Quadro 5.

Considerando as lesões de baixo grau, a casuística foi composta em 70,0% por mulheres e 30,0% por homens. No grupo de lesões de alto grau, 66,7% dos indivíduos eram homens e 33,3%, mulheres.

Com relação à idade ao diagnóstico, os indivíduos do grupo baixo grau apresentaram menor idade do que aqueles do grupo alto grau ($35,1 \pm 8,9$ (média $\pm$ desvio-padrão) e $52,2 \pm 15,6$, respectivamente; $p=0,007$).

Levando em conta a topografia das lesões, a maior parte se encontrava à esquerda no grupo baixo grau (60,0%) e à direita, no grupo alto grau (60,0%). Especificamente, no grupo baixo grau, as localizações foram: lobo temporal (30,0%), frontal (20,0%), fronto-parietal (20,0%), fronto-parieto-temporal (20,0%) e parietal (10,0%). Para as lesões de alto grau, as frequências das localizações foram: lobo frontal (53,3%); temporal (13,3%), parietal (13,3%), temporo-parietal (13,3%) e temporo-occipital (6,7%).

Sobre a idade dos indivíduos na ocasião do tratamento cirúrgico, o grupo baixo grau apresentou média de idade menor, em comparação com o grupo alto grau ($35,1 \pm 8,9$ e $52,3 \pm 15,5$, respectivamente; $p=0,007$).

Por sua vez, a média do tempo de seguimento foi maior para os pacientes do grupo baixo grau ($1.542,7 \pm 1.237,2$ dias), ao se comparar com a média do grupo alto grau ($420,8 \pm 585,6$ dias; $p=0,0061$).

Ao longo do período de acompanhamento dos indivíduos, a mortalidade detectada para o grupo baixo grau foi de 30,0%, ao passo que para o grupo alto grau foi de 60,0%. No entanto, não foi observada diferença estatística entre tais frequências de mortalidade ($p=0,2262$). Por outro lado, ao se levar em conta as curvas de sobrevida dos dois grupos, houve diferença significativa favorecendo o grupo baixo grau ($1007,44 \pm 139,41$ dias), quando comparado com o grupo alto grau ($345,30 \pm 54,54$ dias; $p=0,0118$).

Quadro 5 – Dados clínicos dos pacientes cujas amostras cirúrgicas foram avaliadas.

Grupo	#	Sexo	DX (anos)	Topografia e Lado	CX (anos)	Seguimento (dias)	Evolução
Baixo grau (n=10)	1	F	27	Fronto-parieto-temporal / D	27	577	Perda de seguimento
	2	M	48	Frontal / E	48	2.357	Perda de seguimento
	3	M	28	Fronto-parieto-temporal / E	28	3	Óbito
	4	F	27	Temporal / D	27	3.664	Vivo
	5	F	40	Fronto-temporal / D	40	726	Perda de seguimento
	6	M	21	Temporal / E	21	1.492	Perda de seguimento
	7	F	45	Parietal / E	45	171	Óbito
	8	F	39	Temporal / E	39	1.112	Óbito
	9	F	40	Fronto-temporal / D	40	1.045	Vivo
	10	F	36	Frontal / E	36	3.096	Vivo
Alto grau (n=15)	11	M	62	Frontal / D	62	429	Óbito
	12	M	56	Parietal / D	56	11	Óbito
	13	F	27	Frontal / E	27	190	Perda de seguimento
	14	M	48	Frontal / D	48	323	Óbito
	15	M	77	Frontal / D	77	152	Perda de seguimento
	16	F	25	Frontal / D	25	552	Óbito
	17	F	31	Frontal / E	32	870	Vivo
	18	M	58	Temporal / E	58	281	Óbito
	19	M	69	Temporo-occipital / E	69	68	Óbito
	20	M	48	Temporo-parietal / D	48	74	Óbito
	21	M	41	Frontal / E	41	436	Óbito
	22	M	55	Frontal / D	55	226	Óbito
	23	F	56	Parietal / E	56	2.380	Vivo
	24	F	60	Temporo-parietal / D	60	192	Perda de seguimento
	25	M	70	Temporal / D	70	128	Perda de seguimento

Legendas: #: identificação do indivíduo na casuística; CX: idade à cirurgia (em anos); D: lado direito DX: idade ao diagnóstico (em anos); E: lado esquerdo; Evolução: condição do indivíduo (vivo, perda de seguimento ou óbito) referente ao registro mais atualizado verificado no seguimento pós-cirurgia; F: sexo feminino; M: sexo masculino; Seguimento: tempo de seguimento pós-cirurgia (em anos).

4.2. Características histopatológicas dos grupos

Os achados histopatológicos dos tumores da presente casuística estão esquematizados nos Quadros 6 e 7. Todas as lesões avaliadas apresentaram: padrão de crescimento difuso (infiltração aleatória de células neoplásicas no parênquima cerebral normal adjacente), características citológicas sugestivas de diferenciação astrocitária (atipias nucleares e prolongamentos citoplasmáticos fibrilares) e critérios para baixo ou alto grau (vide itens 3.3 e 4.2.2; Figuras 3, 4, 12, 13 e 14).

Quadro 6 – Achados histopatológicos dos tumores de baixo grau avaliados.

Grupo	#	IDH1 R132H	Codel 1p/19q	ATRX	p53	GFAP	WHO CNS5	IDH1 R132H (%)	IDH1 (%)	IDH2 (%)
Baixo grau (n=10)	1	+	- (0,98/0,96)	-	- (<1%)	+	Astrocitoma, IDH-mutante, grau 2 da OMS	7,56	10,31	14,18
	2	+	- (0,81/1,00)	-	+ (80%)	+	Astrocitoma, IDH-mutante, grau 2 da OMS	11,54	15,47	16,70
	3	+	- (1,07/1,08)	-	- (<1%)	+	Astrocitoma, IDH-mutante, grau 2 da OMS	10,15	15,49	16,13
	4	-	Inc. (Inc./Inc.)	-	- (<1%)	+	Astrocitoma, SOE, grau 2 da OMS	-	14,32	14,98
	5	-	- (0,99/0,93)	+	- (<1%)	+	Astrocitoma, SOE, grau 2 da OMS	-	15,48	16,50
	6	-	- (0,9/Inc.)	-	- (<1%)	+	Astrocitoma, SOE, grau 2 da OMS	-	13,95	13,15
	7	-	- (0,92/0,94)	+	- (<1%)	+	Astrocitoma, SOE, grau 2 da OMS	-	13,56	11,51
	8	+	- (1,01/0,91)	-	+ (15%)	+	Astrocitoma, IDH-mutante, grau 2 da OMS	11,33	14,41	14,95
	9	-	- (0,96/0,90)	+	- (<1%)	+	Astrocitoma, SOE, grau 2 da OMS	-	13,23	17,34
	10	+	- (1,00/1,01)	-	+ (80%)	+	Astrocitoma, IDH-mutante, grau 2 da OMS	11,19	16,13	15,83

Legendas: #: identificação do indivíduo na casuística (corresponde à mesma identificação apresentada no Quadro 5); ATRX: imunopositividade (+) ou negatividade (-); Codel 1p/19q: presença (+) ou ausência (-) da codeleção 1p/19q, valores das razões 1p36/1q25 e 19q13/19p13; GFAP: imunopositividade (+) ou negatividade (-); IDH1 (%): porcentagem média de imunopositividade na área avaliada do espécime, calculada por meio do software ImageJ®; IDH1R132H: imunopositividade (+) ou negatividade (-); IDH1R132H (%): porcentagem média de imunopositividade na área avaliada do espécime, calculada por meio do software ImageJ®; Inc.: inconclusivo (cortes descolaram durante o processamento); OMS: Organização Mundial da Saúde; p53: imunopositividade (+) ou negatividade (-) e estimativa visual da % avaliada no espécime, sendo considerados positivos os espécimes com estimativa maior que 10% de núcleos com positividade forte; SOE: sem outras especificações; WHO CNS5: diagnóstico conforme a 5ª edição da Classificação de Tumores do Sistema Nervoso Central da OMS.

Quadro 7 – Achados histopatológicos dos tumores de alto grau avaliados.

Grupo	#	IDH1 R132H	Code1 1p/19q	ATRX	p53	GFAP	WHO CNS5	IDH1 R132H (%)	IDH1 (%)	IDH2 (%)
Alto grau (n=15)	11	-	NA	+	- (<1%)	+	Glioblastoma, IDH-selvagem, grau 4 da OMS	-	14,84	16,00
	12	-	NA	+	- (<1%)	+	Glioblastoma, IDH-selvagem, grau 4 da OMS	-	16,47	17,73
	13	+	NA	-	+	+	Astrocitoma, SOE, grau 4 da OMS	13,40	17,73	13,62
	14	-	NA	+	- (<1%)	+	Astrocitoma, SOE, grau 4 da OMS	-	19,55	15,19
	15	-	NA	+	- (<1%)	+	Glioblastoma, IDH-selvagem, grau 4 da OMS	-	17,53	15,69
	16	-	NA	+	- (<1%)	+	Astrocitoma, SOE, grau 4 da OMS	-	18,11	14,64
	17	+	NA	-	+	+	Astrocitoma, SOE, grau 4 da OMS	14,02	14,03	15,37
	18	-	NA	+	+	+	Glioblastoma, IDH-selvagem, grau 4 da OMS	-	16,79	15,63
	19	-	NA	+	- (<1%)	+	Glioblastoma, IDH-selvagem, grau 4 da OMS	-	16,21	15,48
	20	-	NA	+	+	+	Astrocitoma, SOE, grau 4 da OMS	-	15,3	15,63
	21	-	NA	+	- (<1%)	+	Astrocitoma, SOE, grau 4 da OMS	-	15,41	13,14
	22	-	NA	+	- (<1%)	+	Glioblastoma, IDH-selvagem, grau 4 da OMS	-	16,47	15,27
	23	-	NA	+	+	+	Glioblastoma, IDH-selvagem, grau 4 da OMS	-	16,24	8,98
	24	-	NA	+	- (<1%)	+	Glioblastoma, IDH-selvagem, grau 4 da OMS	-	17,72	14,61
	25	-	NA	+	- (<1%)	+	Glioblastoma, IDH-selvagem, grau 4 da OMS	-	13,96	16,22

Legendas: #: identificação do indivíduo na casuística (corresponde à mesma identificação apresentada no Quadro 5); ATRX: imunopositividade (+) ou negatividade (-); Code1 1p/19q: presença (+) ou ausência (-) da codeleção 1p/19q; GFAP: imunopositividade (+) ou negatividade (-); IDH1 (%): percentagem média de imunopositividade na área avaliada do espécime, calculada por meio do software ImageJ®; IDH1R132H: imunopositividade (+) ou negatividade (-) ou negatividade (-); IDH1R132H (%): percentagem média de imunopositividade na área avaliada do espécime, calculada por meio do software ImageJ®; IDH2 (%): percentagem média de imunopositividade na área avaliada do espécime, calculada por meio do software ImageJ®; NA: não se aplica; OMS: Organização Mundial da Saúde; p53: imunopositividade (+) ou negatividade (-) e estimativa visual da % avaliada no espécime, sendo considerados positivos os espécimes com estimativa maior que 10% de núcleos com positividade forte; SOE: sem outras especificações; WHO CNS5: diagnóstico conforme a 5ª edição da Classificação de Tumores do Sistema Nervoso Central da OMS.

4.2.1. Caracterização das neoplasias em função da imunoexpressão da forma mutante R132H da IDH1

Uma vez confirmado o padrão de crescimento difuso dos gliomas, procedeu-se à avaliação imuno-histoquímica da forma mutante R132H da IDH1 com a finalidade de caracterização qualitativa (positividade ou negatividade) das lesões. Independentemente do grau da neoplasia, 28,0% das 25 lesões avaliadas foram positivas para esta forma mutante da IDH1 (Quadros 6 e 7). Nestes casos, observou-se padrão de marcação citoplasmático difuso, por vezes com distribuição predominando em região perinuclear (Figuras 9 e 10). Assim, 72,0% de todas as lesões avaliadas foram negativas (Figura 11).

Especificamente, em se considerando o grau (vide itens 3.3 e 4.2.2), 50,0% e 13,3% dos tumores de baixo e de alto grau, respectivamente, foram imunopositivos para IDH1R132H (Quadros 6 e 7; Figuras 9 a 10).

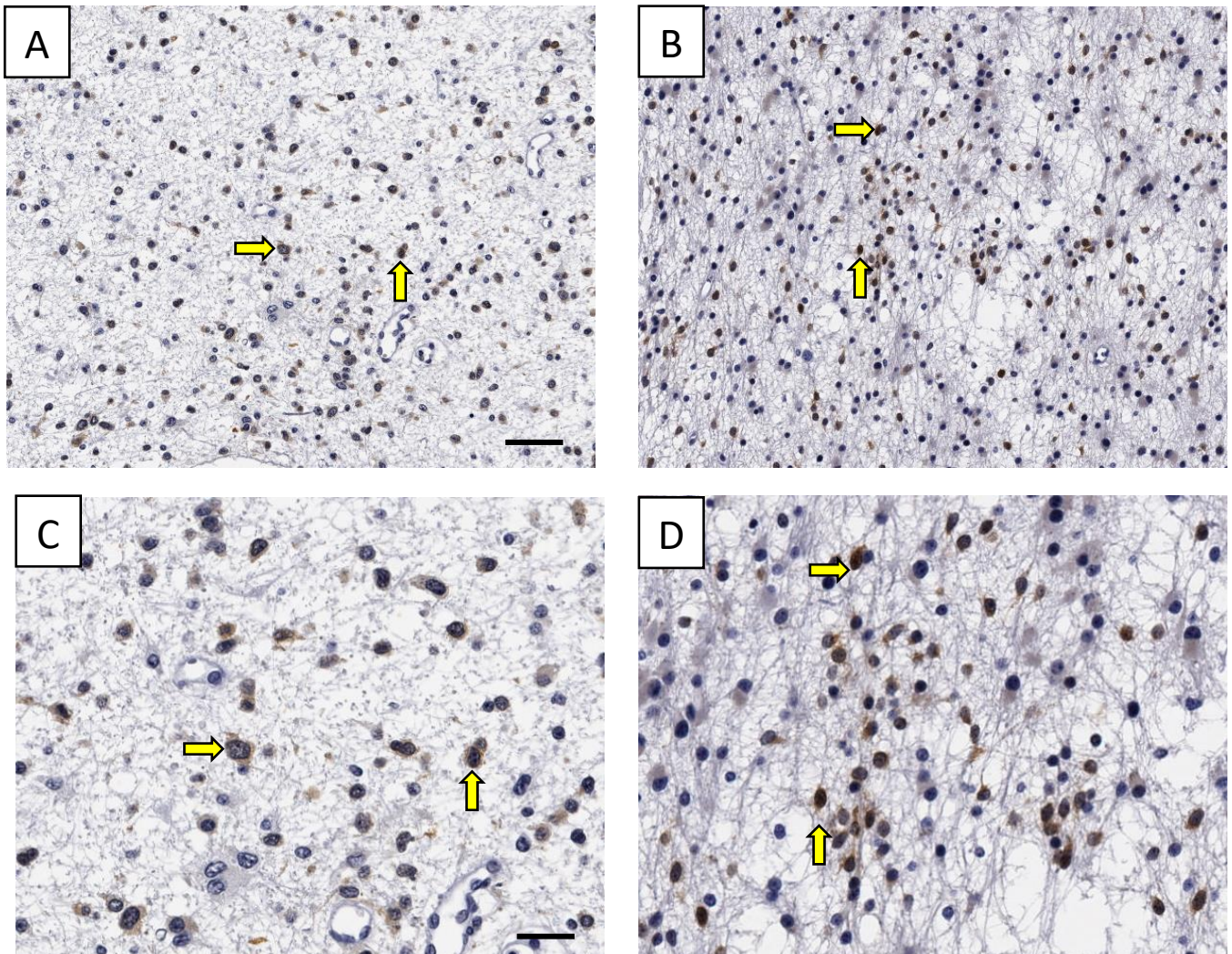


Figura 9. Imunomarcacão para a forma mutante R132H da isocitrato desidrogenase 1 (IDH1 R132H) em astrocitoma, IDH mutante, grau 2 da OMS. Em A e B, campos histológicos de espécimes diferentes imunopositivos para IDH1 R132H, cujos maiores aumentos são apresentados em C e D, respectivamente. As setas amarelas indicam as mesmas células observadas nos campos histológicos correspondentes de maior e menor magnitude. Positividade para IDH1 R132H foi observada em padrão citoplasmático, por vezes com predomínio perinuclear. A – D) Imunoperoxidase e contracoloração com hematoxilina. Barras de escala: 100 μ m (A e B); 50 μ m (C e D).

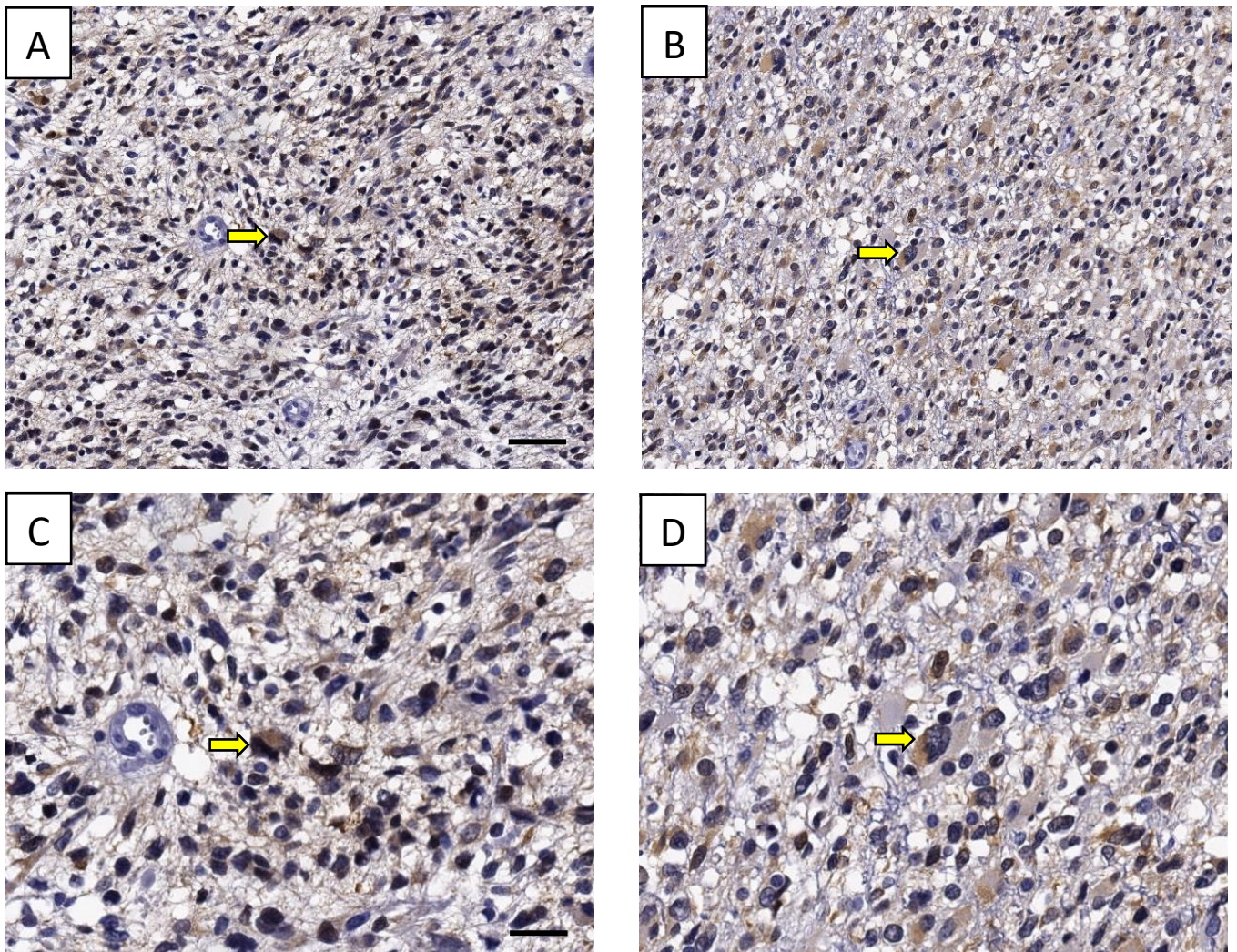


Figura 10. Imunomarcção para a forma mutante R132H da isocitrato desidrogenase 1 (IDH1 R132H) em astrocitoma, IDH mutante, grau 4 da OMS. Em A e B, campos histológicos de tumores imunopositivos para IDH1 R132H, cujos maiores aumentos são apresentados em C e D, respectivamente. As setas amarelas indicam as mesmas células observadas nos campos histológicos correspondentes de maior e menor magnitude. O padrão de marcação verificado foi citoplasmático difuso, com ocasional predomínio perinuclear. A – D) Imunoperoxidase e contracoloração com hematoxilina. Barras de escala: 100 µm (A e B); 50 µm (C e D).

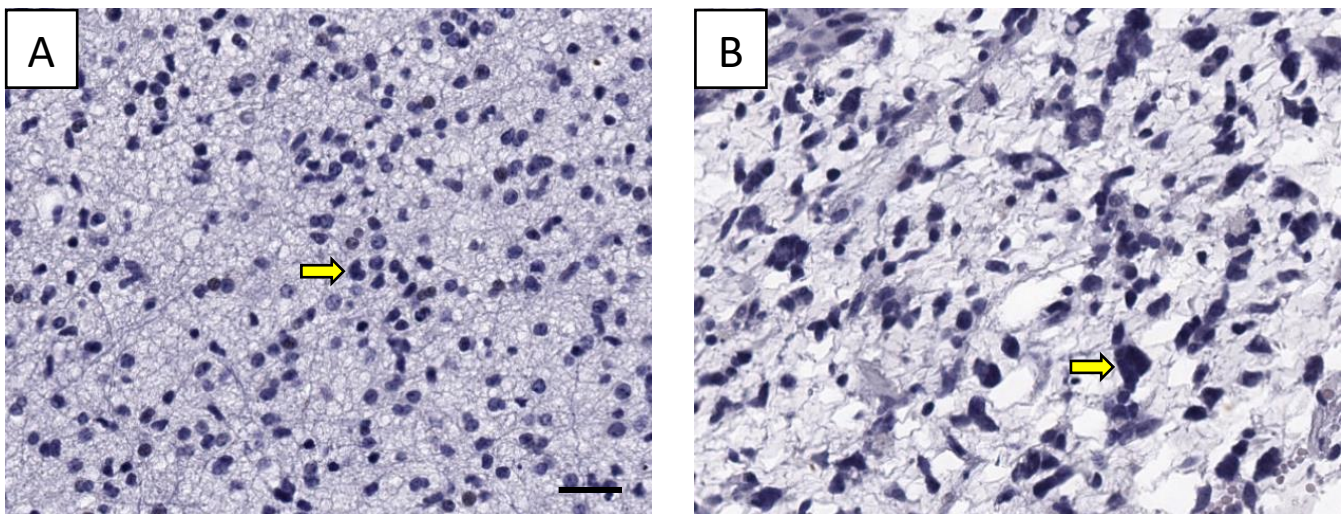


Figura 11. Imunomarcção para a forma mutante R132H da isocitrato desidrogenase 1 (IDH1 R132H) em gliomas difusos. Em A e B, campos histológicos representativos de diferentes espécimes imunonegativos para IDH1 R132H. Análises morfológicas, moleculares e/ou de imuno-histoquímica favoreceram a caracterização das neoplasias como astrocitoma, sem outras especificações, grau 2 da OMS (A) ou glioblastoma, IDH selvagem, grau 4 da OMS (B). Especificamente, a neoplasia indicada em A corresponde a um glioma difuso de baixo grau, GFAP-positivo, com perda da expressão nuclear de ATRX e sem codel 1p/19q. As setas amarelas indicam células com núcleos atípicos (irregulares e hipercromáticos), em fundo fibrilar. A e B) Imunoperoxidase com contra-coloração pela hematoxilina. Barras de escala: 50 μ m (A e B).

4.2.2. Caracterizações molecular e imunofenotípica da linhagem glial e do grau das neoplasias

Em paralelo, procedeu-se à confirmação molecular da linhagem (astrocitária ou oligodendrogliol) das lesões de baixo grau por meio da técnica de FISH. Assim, foi verificada ausência da codeleção dos cromossomos 1p e 19q em 90% dos espécimes (Quadro 6; Figuras 7 e 12). Tal achado exclui a possibilidade de linhagem oligodendrogliol e confirma a natureza astrocitária das neoplasias estudadas.

Particularmente, na lesão do indivíduo #6, foi observada razão 1p36/1q25 no valor de 0,90, sendo que houve descolamento do corte durante o processamento do material para análise dos resultados das sondas 19q13/19p13. Desta forma, foi possível apenas obter resultado referente ao status do cromossomo 1p. Visto que não se observou deleção 1p, independentemente do status do cromossomo 19q, a lesão já não se caracterizaria para codeleção, o que é obrigatório para considerar linhagem oligodendrogliol. Já os cortes utilizados para a análise do tumor do paciente #4 descolaram durante o processamento do material. Assim, a caracterização molecular não foi possível, sendo necessária a utilização de dados de imunomarcção para apoiar a natureza astrocitária da lesão (Quadro 6).

Por sua vez, reações imuno-histoquímicas para GFAP, ATRX e p53 também foram realizadas para avaliar a natureza astrocitária dos gliomas. Especificamente, todas as lesões de baixo grau apresentaram positividade citoplasmática para GFAP, marcador de diferenciação astrocitária. Além disso, 70% evidenciaram perda da expressão nuclear de ATRX, também favorecendo diferenciação astrocitária. Por sua vez, 30% dos tumores foram considerados positivos para p53 mutante, ou seja, estimou-se que mais de 10% das células neoplásicas em cada amostra possuíam marcação nuclear forte. Nas lesões consideradas negativas, foi estimado um percentual de positividade para p53 em menos de 1% dos núcleos (Quadro 6; Figura 13). Neste contexto, seguindo os critérios da WHO CNS5, as lesões com perda da expressão de ATRX também tiveram sua histogênese astrocitária confirmada pelos dados de imunofenotipagem. Além disso, a imunopositividade para GFAP e positividade para p53 em mais de 10% das células apoiaram tal histogênese. Particularmente, a lesão correspondente ao paciente #4, foi identificada como astrocitária devido ao fato de mostrar perda da expressão de ATRX e positividade para GFAP, visto que a confirmação da codeleção 1p/19q não foi possível devido às questões técnicas apresentadas acima (Quadro 6; Figuras 5 e 13).

Sobre os tumores de alto grau, a avaliação de imunomarcação mostrou que todos apresentaram células com positividade citoplasmática para o marcador astrocitário GFAP, com distribuição irregular e em diferentes proporções. Ainda, as marcações nucleares para ATRX e para p53 foram variáveis. De fato, a maioria das lesões (87,0%) exibiram retenção da expressão de ATRX, ao passo que 33,0% delas exibiram positividade para p53, esta última estimada em mais de 10% dos núcleos. Assim, considerando-se em conjunto, as características morfológicas, imunopositividade para GFAP e os achados de alto grau nestas lesões – conforme detalhado a seguir e no item 3.3 – também se confirmou a natureza astrocitária destas lesões (Quadro 7; Figuras 4 e 14).

Desta forma, as avaliações morfológicas, moleculares e imuno-histoquímicas permitiram a caracterização da linhagem glial astrocitária dos presentes gliomas difusos. Por fim, às lesões que apresentaram apenas atipias nucleares (ou seja, ausência de figuras de mitose frequentes, proliferação microvascular e necrose) foi atribuído o grau 2 (baixo grau) da OMS. Àquelas com proliferação microvascular e necrose foi atribuído o grau 4 (alto grau) da OMS (Figuras 3, 4, 12, 13 e 14).

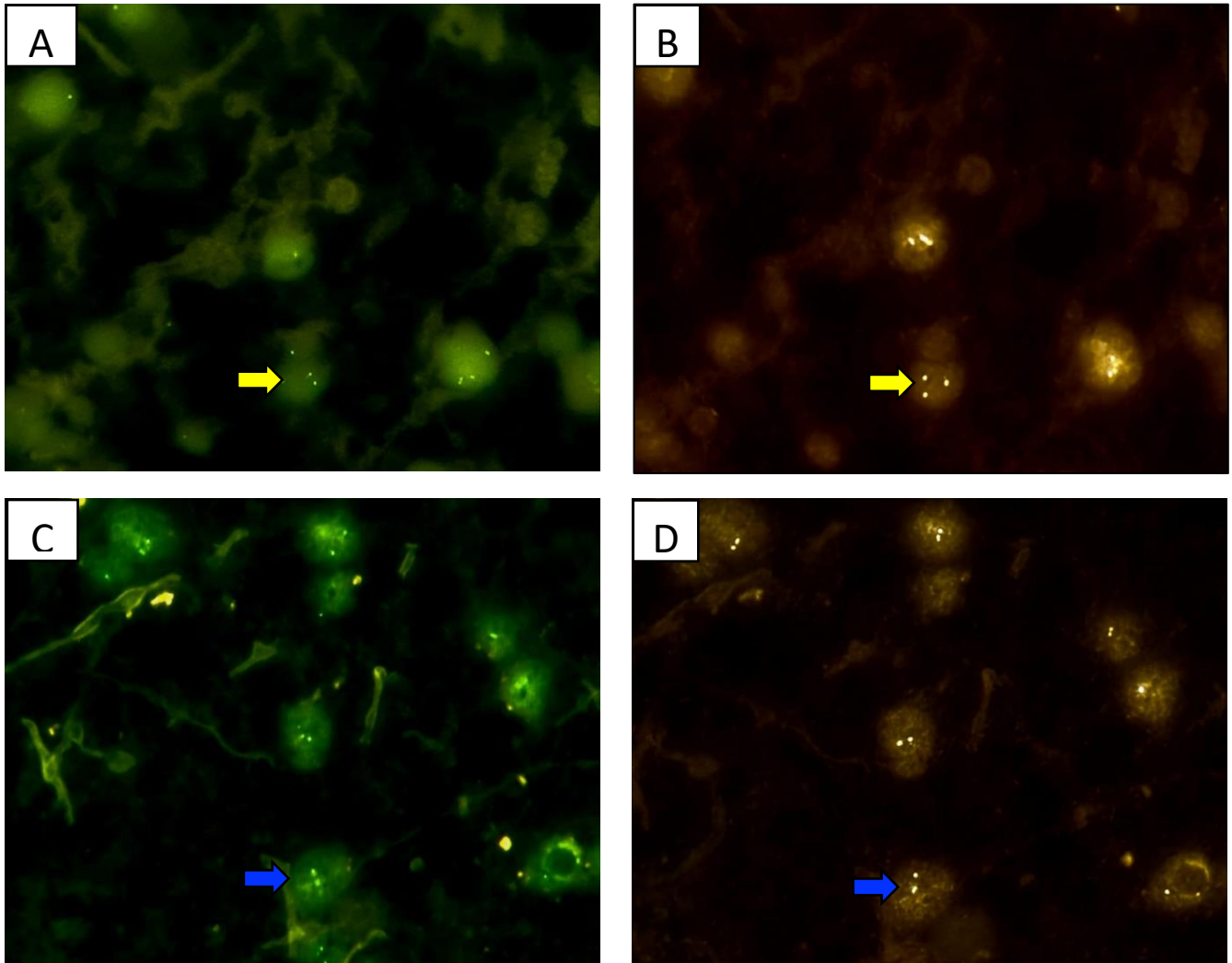


Figura 12. Pesquisa do status da codeleção 1p/19q em glioma difuso de baixo grau histológico por meio da técnica de FISH. A – D) Fotomicrografias representativas de neoplasia, cuja investigação histopatológica complementar corroborou um astrocitoma, IDH mutante, grau 2 da OMS (ver Figuras 3 e 13). Em A e B, sinais emitidos pelas sondas correspondentes às regiões 1q25 (controle; filtro verde) e 1p36 (região de interesse; filtro laranja), respectivamente. O mesmo núcleo está indicado por setas amarelas, sendo que não se observa perda/deleção da região de interesse. Em C e D, sinais emitidos pelas sondas correspondentes às regiões 19p13 (controle; filtro verde) e 19q13 (região de interesse; filtro laranja), respectivamente. O mesmo núcleo está indicado por setas azuis, sendo que não se observa perda/deleção da região de interesse. Neste espécime, as razões 1p36/1q25 e 19q13/19p13 foram, respectivamente, 0,98 e 0,96, indicando ausência de codeleção 1p/19q. Tal achado confirmou a linhagem astrocitária do glioma difuso.

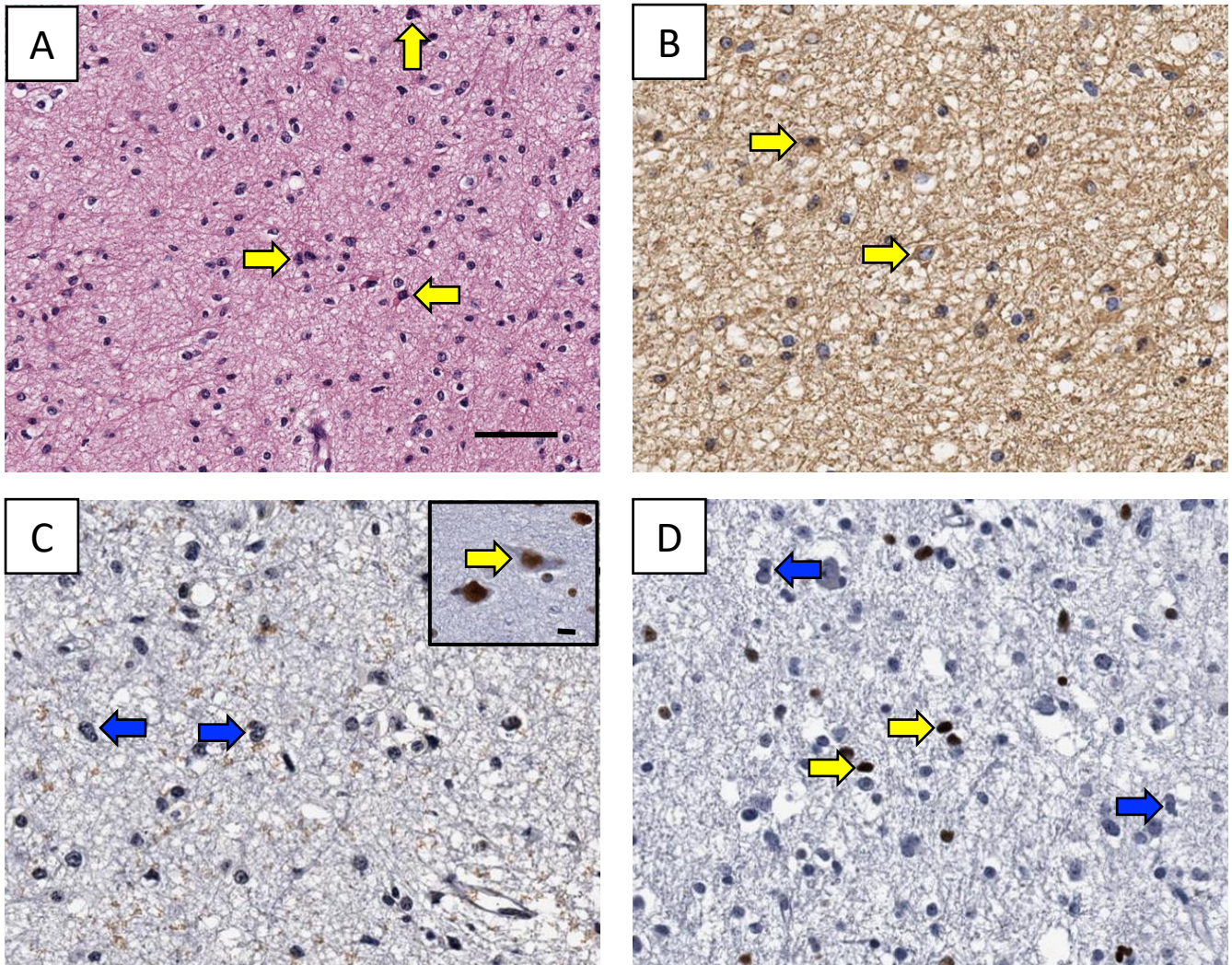


Figura 13. Achados histológicos e de imunomarcção representativos de astrocitoma, IDH mutante, grau 2 da OMS. Em A, neoplasia constituída por células exibindo atipias nucleares leves (irregularidade do contorno, cromatina heterogênea e hipercromasia; setas amarelas), em fundo de aspecto fibrilar. Em B, imunopositividade para GFAP nos prolongamentos citoplasmáticos das células neoplásicas (setas amarelas). Em C, nota-se negatividade para ATRX nos núcleos tumorais (setas azuis). No detalhe, observa-se marcação em controle interno positivo correspondendo a núcleo de neurônio em córtex cerebral (seta amarela). Em D, verificam-se núcleos de células neoplásicas positivos (setas amarelas) ou negativos (setas azuis) para proteína p53. A imunomarcção para p53 foi estimada em cerca de 10% das células tumorais. Investigação imuno-histoquímica complementar evidenciou expressão de IDH1 R132H (não apresentada nesta figura). A) Coloração com hematoxilina e eosina. B – D) Imunoperoxidase e contracoloração com hematoxilina. Barras de escala: 50 μ m (A – D); 10 μ m (detalhe em C).

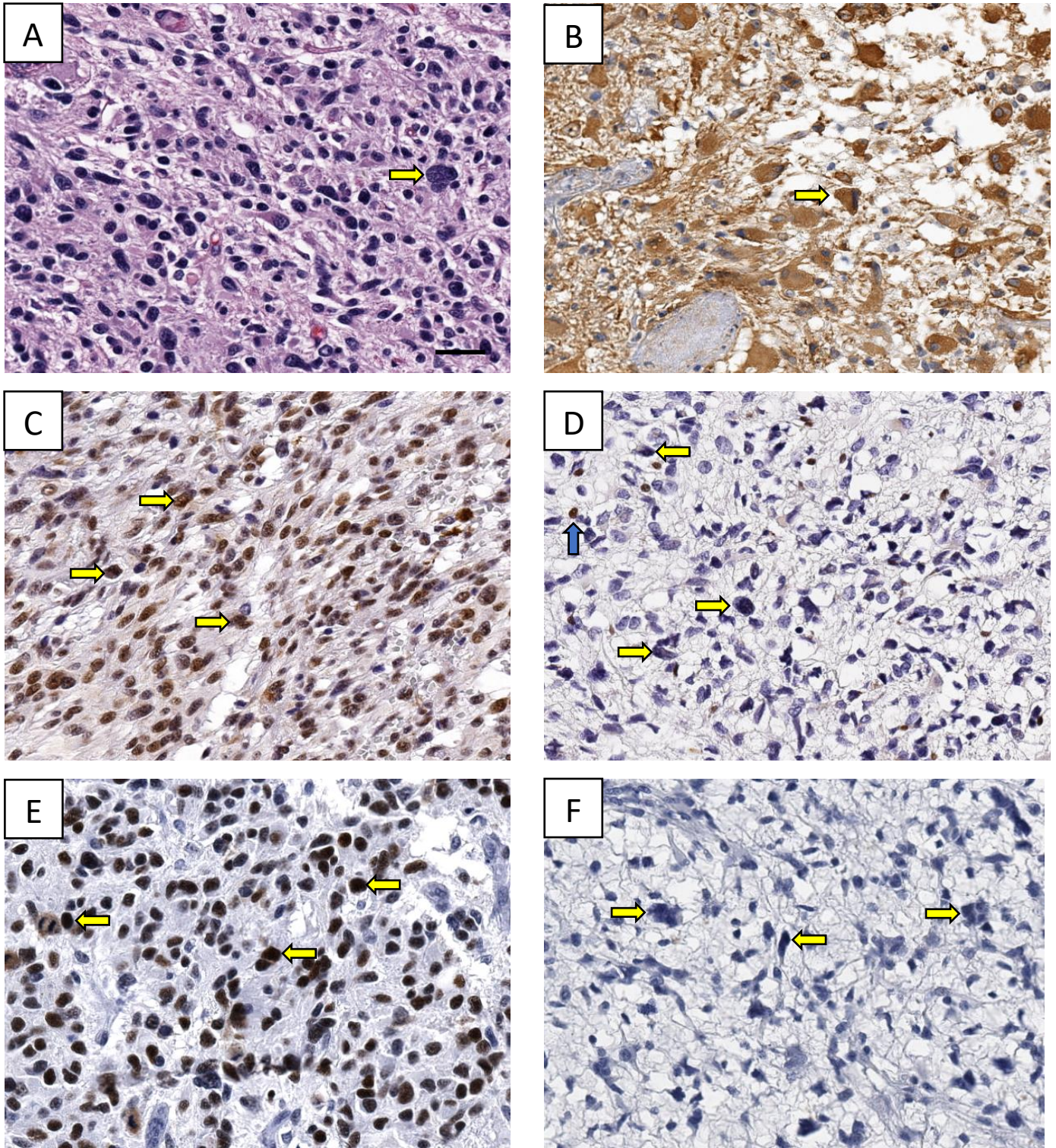


Figura 14. Achados histológicos e de imunomarcção representativos de astrocitoma, IDH mutante, grau 4 da OMS e glioblastoma, IDH-selvagem, grau 4 da OMS. *(continua na página seguinte)*

Figura 14. Achados histológicos e de imunomarcação representativos de astrocitoma, IDH mutante, grau 4 da OMS e glioblastoma, IDH-selvagem, grau 4 da OMS. (continuação da página anterior) Em A, neoplasia hipercelular constituída por células atípicas com irregularidade de contorno nuclear, hipercromasia e cromatina heterogênea (seta amarela), em fundo fibrilar denso. Foram observadas, ainda, mitoses, proliferação microvascular e áreas de necrose (não apresentadas nesta figura). Em B, imunopositividade para GFAP no citoplasma e nos prolongamentos citoplasmáticos das células neoplásicas (seta amarela). Em C e D, fotomicrografias de espécimes diferentes submetidos a imunomarcação para ATRX. Em C, verifica-se positividade para ATRX nos núcleos neoplásicos (setas amarelas). Em D, nota-se imunonegatividade para ATRX nos núcleos do glioma (setas amarelas) e marcação em controle interno positivo (núcleo de neurônio; seta azul). Em E e F, fotomicrografias de espécimes diferentes submetidos a imunomarcação para proteína p53. Em E, verifica-se que a maioria dos núcleos neoplásicos exibem positividade forte (setas amarelas). Em F, nota-se imunonegatividade nos núcleos do tumor (setas amarelas). A) Coloração com hematoxilina e eosina. B – F) Imunoperoxidase e contracoloração com hematoxilina. Barras de escala: 50 µm (A – F).

4.2.3. Diagnóstico neuropatológico das neoplasias no presente estudo

Tendo por base as características morfológicas (glioma difuso, com feições astrocitárias e de alto ou baixo grau histológico), moleculares (codeleção 1p/19q para lesões de baixo grau) e imunofenotípicas apresentadas no item anterior, bem como os critérios e orientações da WHO CNS5, foram estabelecidos diferentes diagnósticos para as lesões na presente casuística (Figura 8; Quadros 5 a 7):

- a) Astrocitoma, IDH mutante, grau 2 da OMS: gliomas difusos astrocitários, com imunopositividade para a forma mutante R132H da IDH1 e ausência de figuras de mitose frequentes, proliferação microvascular e necrose;
- b) Astrocitoma, sem outras especificações (SOE), grau 2 da OMS: gliomas difusos astrocitários em indivíduos com idade inferior a 55 anos ao diagnóstico, com imunonegatividade para a forma mutante R132H da IDH1 e ausência de figuras de mitose frequentes, proliferação microvascular e necrose.
- c) Glioblastoma, IDH selvagem, grau 4 da OMS: gliomas difusos astrocitários em indivíduos com idade de 55 anos ou mais ao diagnóstico, com imunonegatividade para a forma mutante R132H da IDH1 e presença de proliferação microvascular e necrose;
- d) Astrocitoma, SOE, grau 4 da OMS: gliomas difusos astrocitários com perda da expressão nuclear de ATRX e presença de proliferação microvascular e necrose.

Feita a caracterização astrocitária das neoplasias e atribuídos os respectivos graus (considerando parâmetros morfológicos), passamos a investigar, por análise imuno-histoquímica, eventual repercussão da expressão da forma mutante mais comum da IDH1 (IDH1R132H) sobre a expressão e distribuição tecidual das isoformas 1 e 2 da IDH.

4.2.4. Expressão da forma mutante IDH1R132H e das isoformas 1 e 2 da IDH nos tumores de baixo e alto grau

Além da finalidade de caracterização das lesões, a imunomarcagem da forma mutante R132H da IDH1 foi avaliada para investigar associação com a expressão e distribuição tecidual das isoformas 1 e 2 da IDH. Para este objetivo, as marcações imuno-histoquímicas foram analisadas de forma digital, por meio do programa ImageJ®.

Como mencionado anteriormente, a mutação da IDH1R132H foi encontrada em 50% das amostras de baixo grau e em 13,3% daquelas do grupo alto grau. Independente do grau da lesão, o padrão de marcação observado foi citoplasmático difuso, com ocasional predomínio perinuclear (Quadros 6 e 7; Figuras 9 e 10). Não foi observada diferença entre as frequências de amostras positivas ao se comparar os dois grupos ($p=0,0752$).

A análise digital das marcações evidenciou que a média dos percentuais de expressão (distribuição tecidual) no grupo baixo grau (tumores que receberam grau 2 da OMS) foi de $5,20 \pm 5,60\%$ e de $1,80 \pm 4,80\%$ no grupo alto grau (tumores que receberam grau 4 da OMS), não sendo verificada diferença significativa ($p=0,1234$) (Quadros 6 e 7; Figuras 9, 10, 19).

Com relação à imunopositividade para a isoforma 1 da IDH (selvagem), foi observado padrão citoplasmático, forte e difuso. Os achados microscópicos que caracterizaram tal padrão foram essencialmente similares em espécimes com ou sem imunoexpressão da IDH1R132H, independentemente do grau da neoplasia (Figuras 15 e 16). Sobre a avaliação semiquantitativa da marcação, a média dos percentuais de expressão (distribuição tecidual) no grupo baixo grau foi significativamente menor que no grupo alto grau ($14,20 \pm 1,70\%$ e $16,40 \pm 1,60\%$, respectivamente; $p=0.0051$) (Quadros 6 e 7; Figuras 15, 16 e 19).

Por fim, a marcação para a isoforma 2 da IDH (selvagem), exibiu padrão citoplasmático, forte, granular, por vezes de forma difusa ou predominando na periferia. De forma semelhante ao verificado para a IDH1 selvagem, o padrão morfológico da positividade para IDH2 selvagem não variou entre tumores com ou sem imunoexpressão da IDH1R132H. Também não foi verificada diferença qualitativa entre lesões de alto ou baixo grau (Figuras 17 e 18). A avaliação semiquantitativa não mostrou diferença significativa entre as médias dos percentuais de expressão dos

grupos baixo e alto grau ($15,10 \pm 1,80\%$ e $14,90 \pm 2,0\%$, respectivamente; $p=0.6773$) (Quadros 6 e 7; Figura 19).

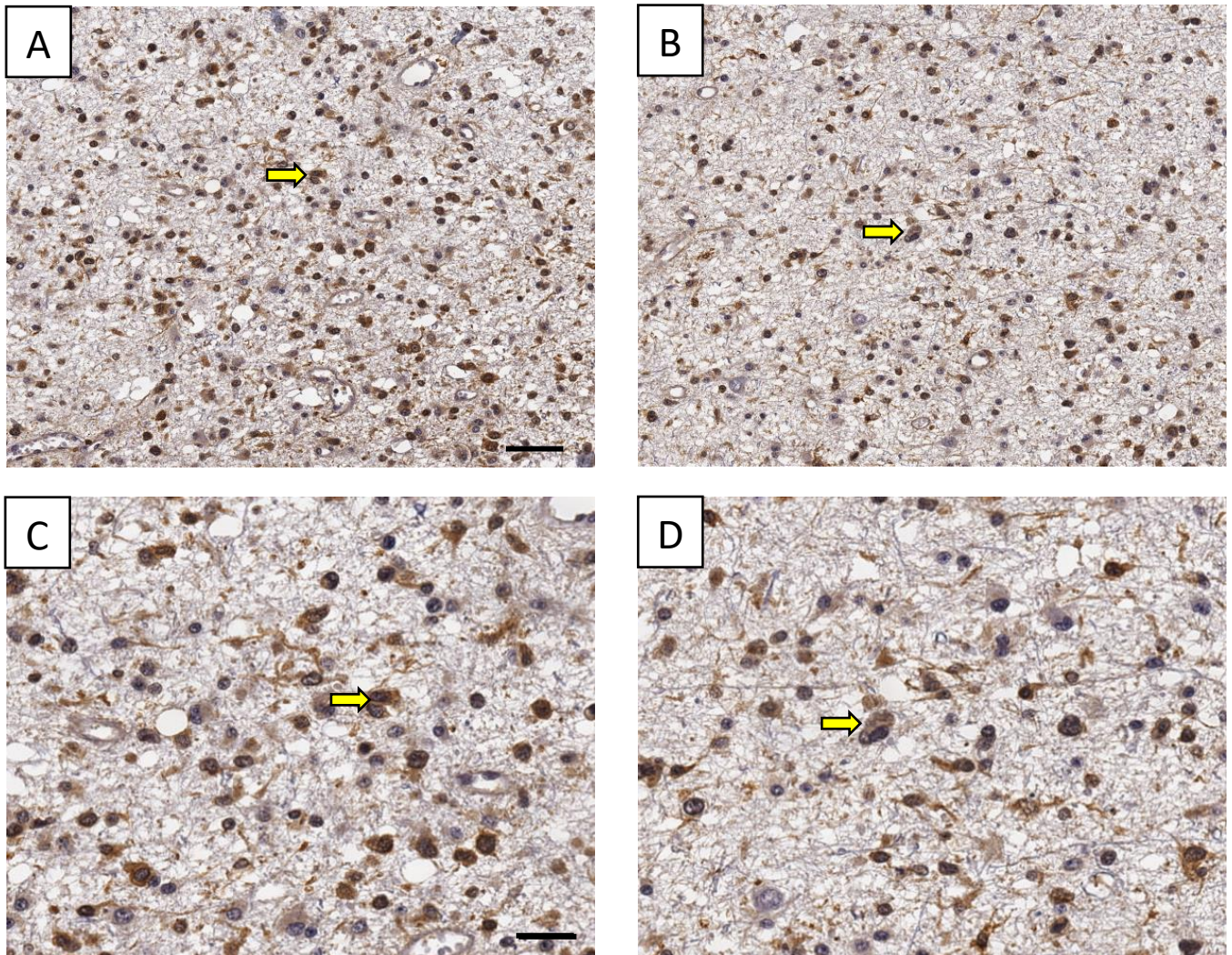


Figura 15. Imunomarcacão para a forma selvagem da isocitrato desidrogenase 1 em astrocitoma, IDH mutante, grau 2 da OMS. Em A e B, campos histológicos de espécimes diferentes imunopositivos para IDH1 R132H, cujos maiores aumentos são apresentados em C e D, respectivamente. As setas amarelas indicam as mesmas células observadas nos campos histológicos correspondentes de maior e menor magnitude. Observa-se positividade em padrão citoplasmático, forte e difuso, o qual também foi verificado em espécimes imunonegativos para IDH1 R132H. A – D) Imunoperoxidase e contracoloração com hematoxilina. Barras de escala: 100 μ m (A e B); 50 μ m (C e D).

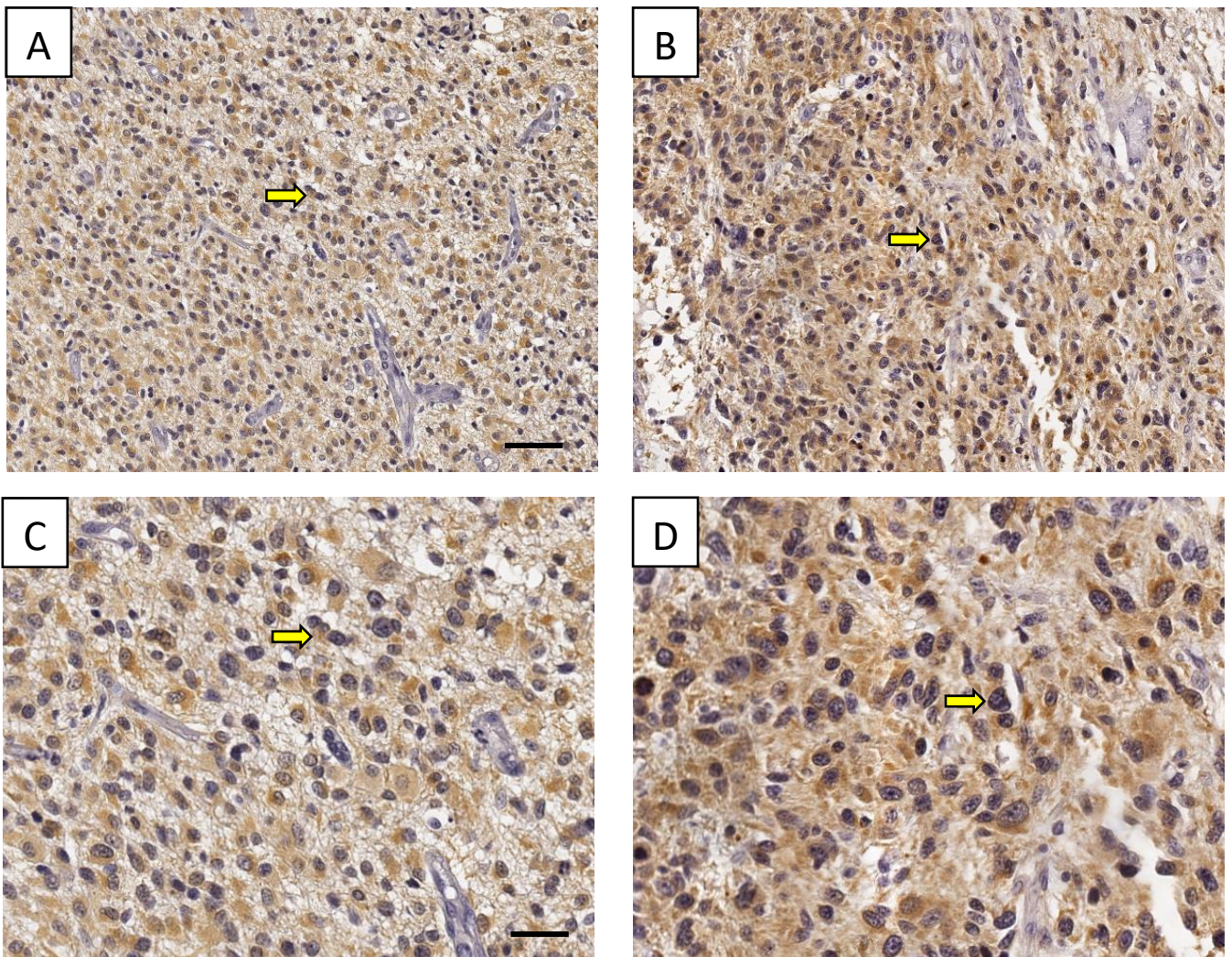


Figura 16. Imunomarcacão para a forma selvagem da isocitrato desidrogenase 1 em glioblastoma, IDH-selvagem, grau 4 da OMS. Em A e B, campos histológicos de espécimes diferentes, cujos maiores aumentos são apresentados em C e D, respectivamente. As setas amarelas indicam as mesmas células observadas nos campos histológicos correspondentes de maior e menor magnitude. Observa-se positividade em padrão citoplasmático, forte e difuso, o qual também foi verificado em espécimes imunopositivos para IDH1 R132H. A – D) Imunoperoxidase e contracolorao com hematoxilina. Barras de escala: 100 µm (A e B); 50 µm (C e D).

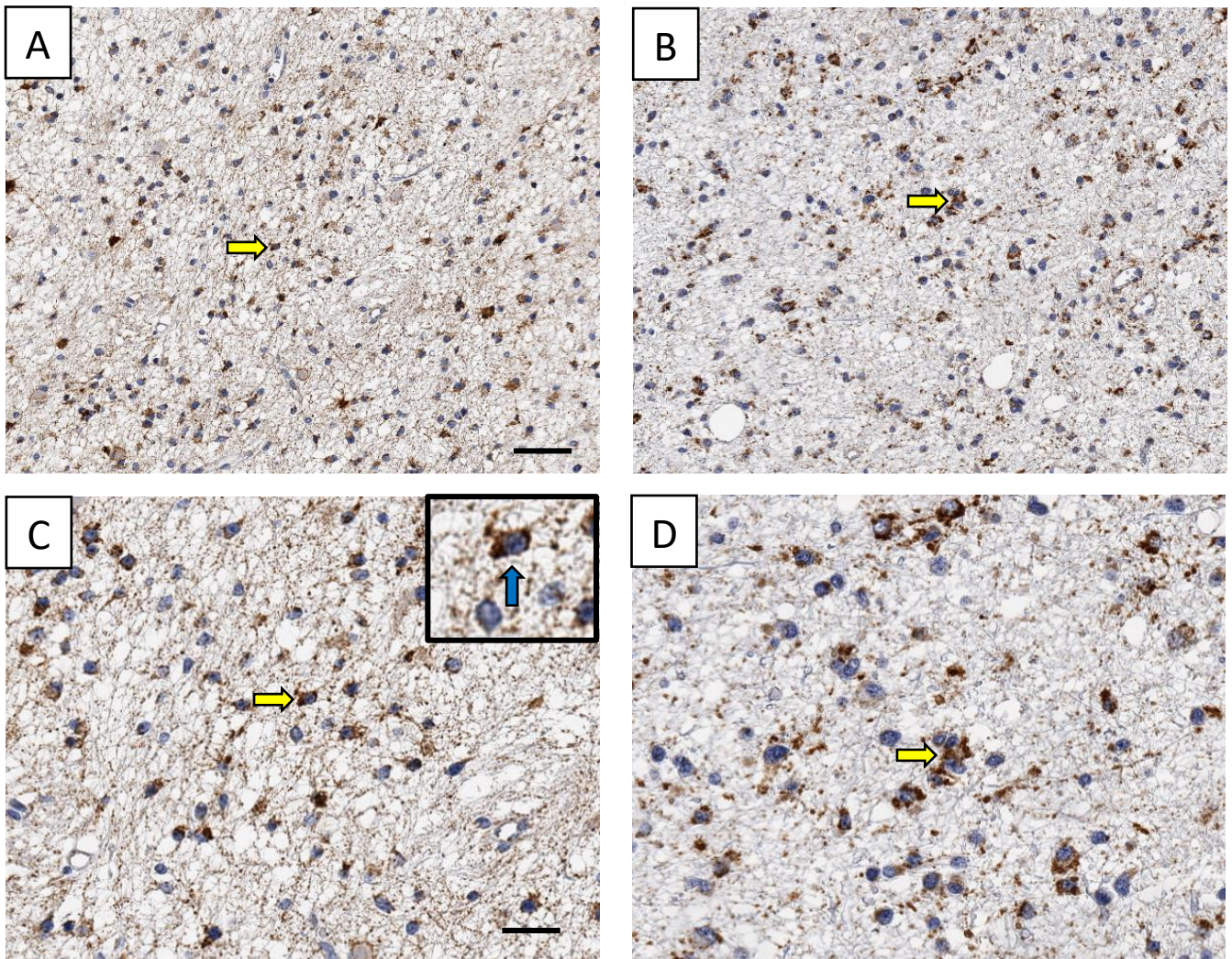


Figura 17. Imunomarcacão para a forma selvagem da isocitrato desidrogenase 2 em astrocitoma, IDH mutante, grau 2 da OMS. Em A e B, campos histológicos de espécimes diferentes imunopositivos para IDH1 R132H, cujos maiores aumentos são apresentados em C e D, respectivamente. As setas amarelas indicam as mesmas células observadas nos campos histológicos correspondentes de maior e menor magnitude. Verifica-se positividade em padrão citoplasmático, forte, granular e difuso (setas amarelas em C e D) ou com distribuico preferencial na periferia do citoplasma. Tal padrão foi verificado de forma similar em espécimes imunonegativos para IDH1 R132H. A – D) Imunoperoxidase e contracoloraco com hematoxilina. Barras de escala: 100 µm (A e B); 50 µm (C e D).

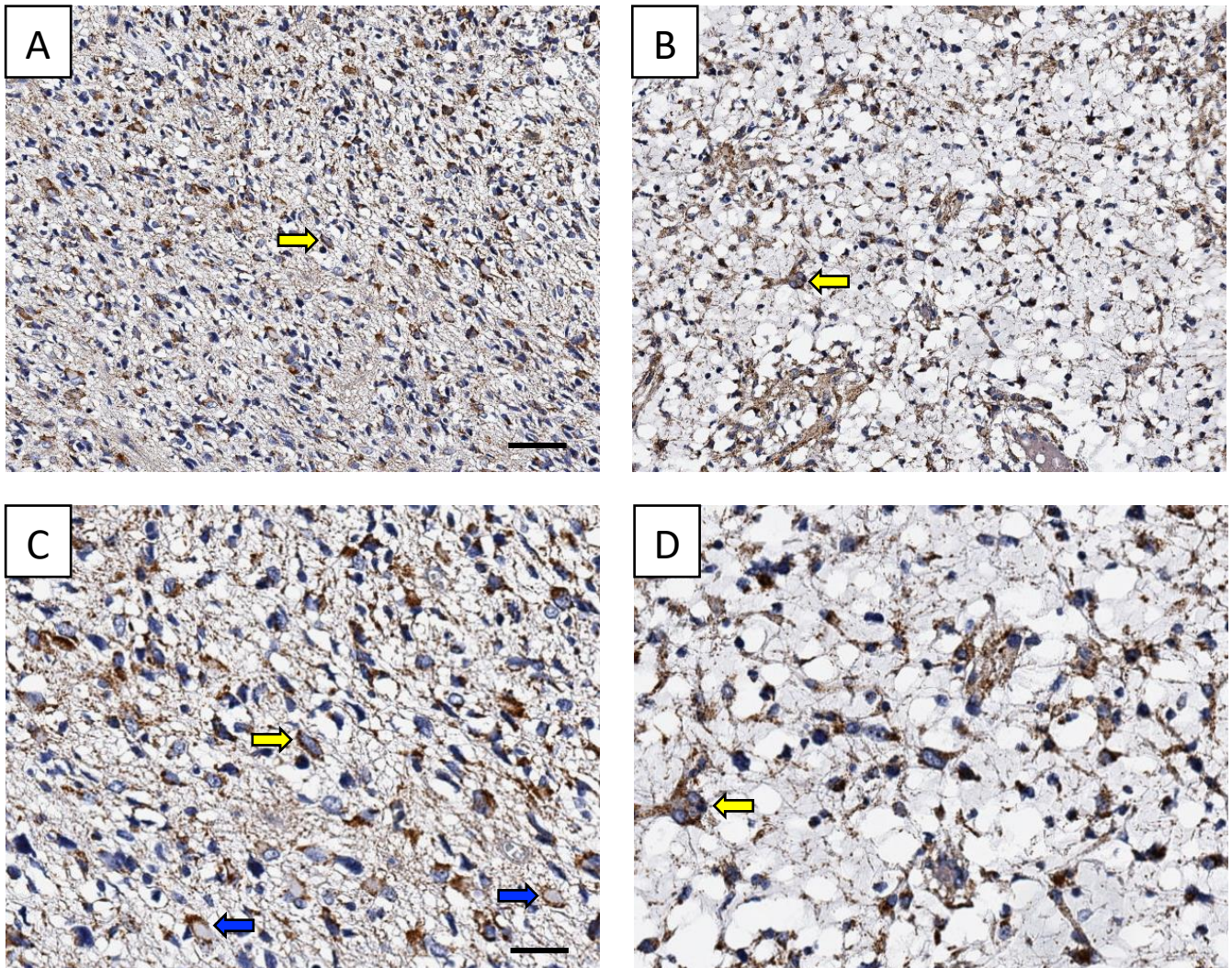


Figura 18. Imunomarcacão para a forma selvagem da isocitrato desidrogenase 2 em astrocitoma grau 4 da OMS. Em A e B, campos histológicos de espécimes diferentes, cujos maiores aumentos são apresentados em C e D, respectivamente. As setas amarelas indicam as mesmas células observadas nos campos histológicos correspondentes de maior e menor magnitude. O padrão de marcao foi citoplasmático, forte, granular e difuso, por vezes com distribuio preferencial na periferia do citoplasma (setas azuis em C), sendo que não foi observada diferença entre espécimes com imunopositividade ou imunonegatividade para IDH1 R132H. Nesta figura, A e C correspondem a um astrocitoma, IDH mutante, grau 4 da OMS. B e D correspondem a um astrocitoma, sem outras especificaes, grau 4 da OMS (lesão imunonegativa para IDH1 R132H em indivíduo com 25 anos de idade, não sendo possível excluir mutao não-cannica da IDH1). A – D) Imunoperoxidase e contracolorao com hematoxilina. Barras de escala: 100 µm (A e B); 50 µm (C e D).

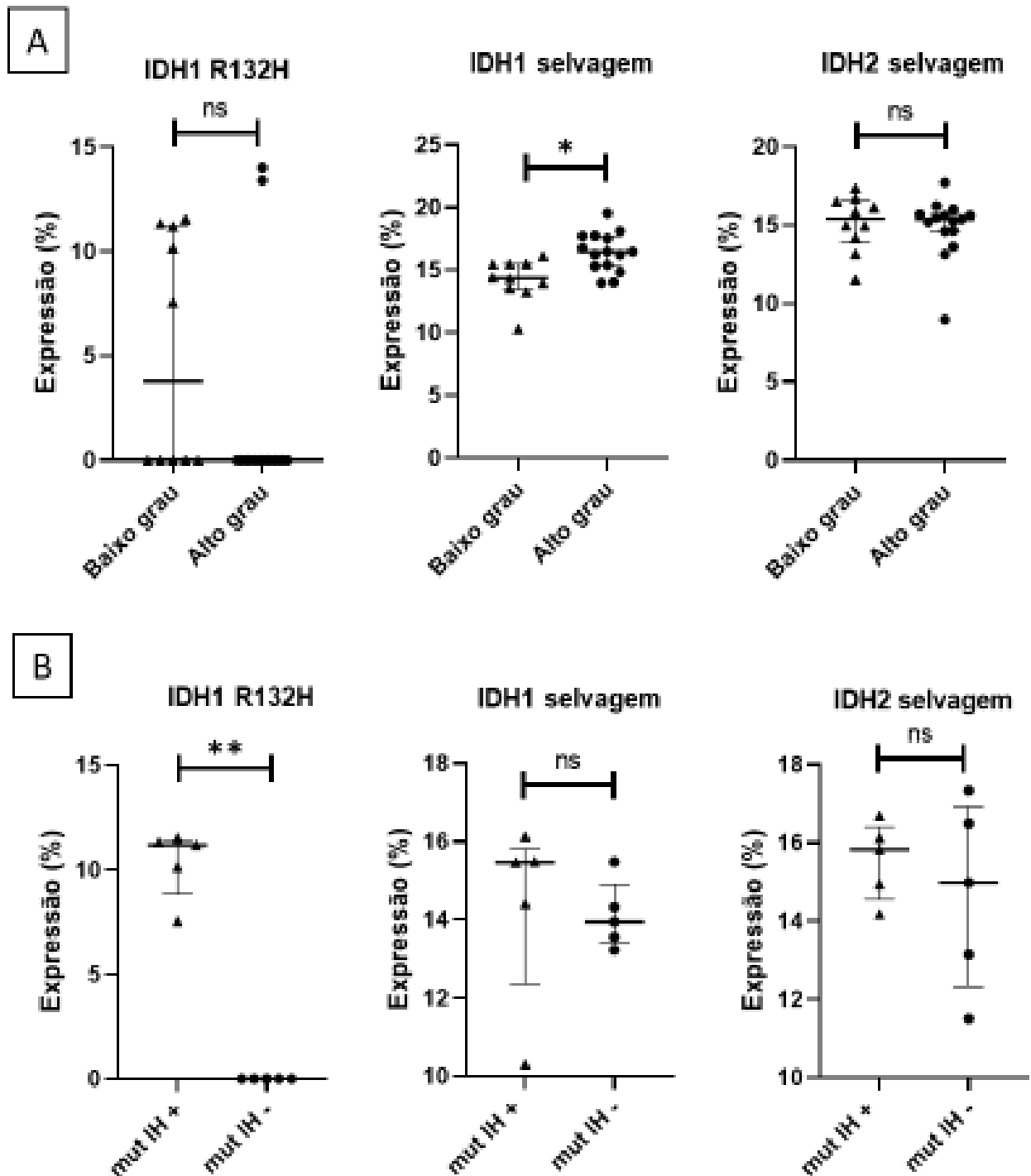


Figura 19. Representações gráficas das avaliações semiquantitativas das imunomarcações para a forma mutante R132H da IDH1 e formas selvagens da IDH1 e IDH2 em preparados histológicos de astrocitomas grau 2 ou grau 4 da OMS. Em A, apresentam-se os tumores separados em grupos de baixo ou alto grau histológico, ou seja, grau 2 ou 4 da OMS, respectivamente. Em B, apresentam-se apenas os tumores de baixo grau histológico agrupados conforme a imunopositividade (mut IH +) ou negatividade (mut IH -) para IDH1 R132H. Para cada grupo, estão apresentadas as médias dos percentuais expressão (percentual de pixels positivos considerando-se o número total de pixels em cada campo histológico avaliado) por indivíduo. Os gráficos de dispersão estão apresentados por mediana no eixo horizontal e intervalo interquartil no eixo vertical. Detalhes sobre as diferenças entre os grupos são apresentados no texto (teste de Mann-Whitney; *p < 0.05; **p < 0.001).

4.2.5. Expressão das isoformas 1 e 2 da IDH com base no status da mutação IDH1R132H nos tumores de baixo grau

Especificamente, no grupo baixo grau, 50% das amostras mostraram imunopositividade para a forma mutante R132H da IDH1. A título de validação da técnica empregada aqui para análise semiquantitativa, a média dos percentuais de expressão (distribuição tecidual) mostrou diferença significativa entre as amostras com e sem a mutação ($10,35 \pm 0,74$ e $0,00 \pm 0,0$, respectivamente; $p < 0,0001$).

Em seguida, procedeu-se à análise comparativa da média dos percentuais de expressão (distribuição tecidual) das isoformas selvagens da IDH1 e IDH2 nos tumores de baixo grau, considerando as lesões com e sem a mutação. Não foi verificada alteração na expressão da IDH1 (com mutação: $14,40 \pm 2,30\%$; sem mutação: $14,10 \pm 0,90\%$; $p = 0,2963$) nem da IDH2 (com mutação: $15,60 \pm 1,0\%$; sem mutação: $14,70 \pm 2,40\%$; $p = 0,8345$) (Quadro 6; Figura 19).

O estudo da expressão (distribuição tecidual) das isoformas selvagens 1 e 2 em função da expressão ou não da IDH1R132H não foi realizado para as lesões de alto grau. De fato, apenas duas amostras deste grupo apresentaram imunopositividade para esta forma mutante da IDH1, inviabilizando análise estatística.

4.2.6. Correlação entre a expressão da forma mutante IDH1R132H e a expressão das isoformas selvagens 1 e 2 da IDH

Para avaliação da correlação entre a expressão da forma mutante IDH1R132H e das isoformas selvagens 1 e 2 da IDH foram consideradas, inicialmente, todas as lesões de baixo e alto grau ($n = 7$) positivas para a mutação. Não foi encontrada correlação entre as expressões da forma mutante e da selvagem da IDH1 (coeficiente de correlação de Spearman (r) = $0,17857$; $p = 0,7017$), assim como entre a forma mutante da IDH1 e a selvagem da IDH2 ($r = -0,07143$; $p = 0,8790$).

Ao se considerar apenas os tumores de baixo grau imunopositivos para IDH1R132 ($n = 5$), também não foi verificada correlação entre a expressão das formas mutante e selvagem da IDH1 ($r = 0,20000$; $p = 0,7471$) ou entre a IDH1R132H e a forma selvagem da IDH2 ($r = 0,60000$; $p = 0,2848$).

5. DISCUSSÃO

Na presente casuística, verificamos uma razão de homens para mulheres de 0,43:1 nas lesões de baixo grau e de 2:1 nas lesões de alto grau. Em relatos prévios, baseados principalmente em critérios diagnósticos prévios à WHO CNS5, a razão de homens para mulheres acometidos por glioblastoma (incluindo lesões com IDH comprovadamente selvagem) varia de 1,28 a 1,6:1 (78-79). Esta razão foi semelhante àquela observada em nossa casuística para lesões de alto grau. Todavia, para os astrocitomas com mutação da IDH e de grau 2 ou 3, observa-se leve predomínio masculino em relatos prévios (80). Tal observação não foi constatada em nosso grupo de baixo grau, o que pode ser consequente à amostragem pequena.

Quanto à idade de apresentação, relatos prévios indicam que a mediana para os astrocitomas, IDH-mutantes, graus 2 ou 3 é de 38 anos. Tal idade é semelhante àquela verificada em nossa casuística para as lesões de baixo grau $35,1 \pm 8,9$ anos (média $\pm$ desvio-padrão) (80-81). Além disso, sabe-se que gliomas difusos de maior grau se apresentam em indivíduos mais velhos (81). De fato, o pico de incidência de glioblastoma, IDH-mutante é entre 55 e 85 anos de idade, uma faixa etária que inclui a média das idades dos pacientes do nosso grupo de alto grau, ou seja, $52,2 \pm 15,6$ anos (82). É possível que as lesões de alto grau ocorram em indivíduos mais idosos pois (1) esses pacientes têm mais tempo de acumular mutações necessários para as lesões de maior grau ou (2) há maior tempo para progressão de lesões de baixo grau para alto grau (83).

Levando-se em conta o tempo de sobrevida após o diagnóstico histológico, foi verificado na presente casuística maior sobrevida no grupo com astrocitomas de baixo grau (grau 2 da OMS; $1007,44 \pm 139,41$ dias), quando comparado com o grupo dos astrocitomas de alto grau (grau 4 da OMS; $345,30 \pm 54,54$ dias; $p=0,0118$). Este achado é esperado uma vez que o grau da lesão tem relação inversa com o tempo de sobrevida (84-86). Ainda, é notável que tanto para astrocitomas IDH-mutantes quanto para glioblastomas IDH selvagem, pacientes mais jovens tendem a apresentar maior sobrevida (85,87-89). Dessa forma, é possível propor que a menor idade ao diagnóstico no grupo baixo grau tenha contribuído com maior tempo de sobrevida, em comparação com o grupo alto grau.

Antes da progressão da discussão é importante observar um ponto importante relativo à nomenclatura das lesões. Os diagnósticos e especificações histológicas e

moleculares da presente casuística foram feitos levando em conta os critérios da WHO CNS5 de 2021. Todavia, as referências citadas cuja data antecede a publicação desses critérios se basearam em recomendações mais antigas da OMS para o diagnóstico anátomo patológico. Dessa forma, é possível que haja pequenas diferenças entre as classificações adotadas no presente trabalho e nas referências pré 2021 aqui citadas.

Como abordado previamente no presente trabalho, o estudo da mutação da IDH se tornou imprescindível para a adequada classificação dos gliomas difusos do tipo adulto a partir da WHO CNS 5 (2). Dessa forma, o presente trabalho buscou caracterizar a expressão da forma mutante mais comum da IDH1 assim como das formas selvagens da IDH1 e IDH2 em amostra de gliomas humanos difusos do tipo adulto em instituição terciária brasileira.

Especificamente, realizamos a avaliação qualitativa da imunopositividade para a mutação R132H da IDH1. Neste sentido, considerando-se a identificação da forma mutante mais comum da proteína IDH1, notou-se frequência maior no grupo de baixo grau (50,0%) do que no grupo de alto grau (13,3%). Tais dados são compatíveis com aqueles apresentados por outros autores e indicam relação inversamente proporcional entre a ocorrência de mutação da IDH1 e o grau dos gliomas difusos em adultos. Especificamente, Mellinghoff *et al.* (2021) relataram que astrocitomas difusos IDH-mutante, oligodendrogliomas IDH-mutante, 1p/19q-codeletados, astrocitomas difusos IDH-selvagem e glioblastomas apresentam mutação da IDH em cerca de 80% e 17% dos casos de baixo e alto grau, respectivamente (à época de avaliação indicados como grau II, III e IV da OMS) (90-95).

Uma possível hipótese para o encontro de tais frequências de imunopositividade para IDH1R132H em lesões de baixo e alto grau decorreria do fato de que a mutação da IDH parece ser um evento precoce na fisiopatogênese de gliomas difusos humanos de baixo grau (96). Nesse sentido, astrócitos imortalizados expressando IDH1R132H apresentam níveis elevados de 2-hidroxiglutarato, concentrações reduzidas de NADPH, assim como aumento da proliferação celular, sugerindo um fenótipo oncogênico (97). Entretanto, a formação de gliomas *in vivo* em modelos de camundongos só foi possível com a indução de alterações genéticas concomitantes a mutação IDH1R132H, incluindo inativação do *ATRX* (97). Dessa forma, é possível notar que, à despeito do fato de a mutação da IDH1 ser associado

a oncogênese em gliomas de baixo grau, ela parece não ser suficiente por si só e deve ser associada a outras alterações genéticas (98-99). Nesse sentido, aproximadamente 90% dos gliomas de baixo grau com mutação da IDH1R132H e sem codeleção 1p/19q também apresentam mutações da *p53* e inativação do *ATRX* (99). Ainda, é notável que os gliomas com perda de *ATRX* apresentam alongamento alternativo dos telômeros (ALT), permitindo alongamento anômalo dos telômeros e inibindo a senescência celular (97-100). Dessa forma, lesões de baixo grau apresentariam mais comumente imunopositividade para IDH1R132H do que lesões de alto grau, pois na gênese das primeiras tal mutação ocorreria como um dos eventos iniciais mais frequentes. Por sua vez, a gliomagenese das lesões de alto grau envolveria a participação de alterações moleculares adicionais e posteriores caracterizando lesões molecularmente distintas daquelas de baixo grau (101).

Progredindo a avaliação da mutação da IDH1R132H, foi realizada avaliação semiquantitativa de sua expressão por meio do software ImageJ. Nesse sentido, a média do percentual de área marcada para as lesões de baixo grau foi de $5,20 \pm 5,60\%$, enquanto que para as lesões de alto grau foi de $1,80 \pm 4,80\%$. Não houve diferença estatística entre esses dois valores ($p=0,1234$). Apesar da ausência de significância estatística, a tendência para uma maior expressão da IDH1R132H em lesões de baixo grau pode ser explicada com base em vias diferentes de oncogênese ao se comparar com as lesões de alto grau. Especificamente, lesões de baixo grau seriam mais dependentes da mutação da IDH1 para sua patogênese, enquanto que as de alto grau constituíram um grupo com gênese molecular mais complexa (101).

Um ponto relativo à mutação da IDH1 é que essa cursa com aumento do consumo celular de NADPH levando à diminuição de seus níveis celulares (97). Especificamente, a forma selvagem da IDH gera a forma reduzida NADPH a partir de NAP^+ , enquanto que a forma mutante consome tal NADPH interferindo no equilíbrio oxidativo da célula (97-101,18). Nesse sentido, nota-se uma relação funcional entre as formas selvagem e mutante da IDH intermediada pelo sistema NADPH/NADP⁺. Assim, no presente trabalho optamos por estudar a imunomarcagem das formas selvagens da IDH1 e 2 e avaliar se a presença da mutação IDH1R132H interferiria em suas distribuições teciduais.

Quanto à IDH1 selvagem, os resultados da presente investigação evidenciaram que sua distribuição tecidual varia conforme o grau da lesão. Especificamente, a

expressão semiquantitativa da IDH1 foi significativamente menor no grupo baixo grau ($14,20 \pm 1,70\%$) do que no grupo alto grau ($16,40 \pm 1,60\%$; $p=0.0051$). Isso provavelmente se explica pelo fato de que lesões de baixo grau são as que apresentam maior frequência de mutações da IDH1, seja a variedade estudada no presente trabalho, ou formas mais raras (90–92, 94). Logo, com o gene mutado, é possível propor que ocorreria uma produção significativamente menor da proteína selvagem. Particularmente, em nossa casuística, apesar de uma tendência a maior expressão da IDH1R132H nas lesões de baixo grau, tal achado não alcançou significância estatística pelo n limitado. Por sua vez, a IDH2 não teve alteração em seus valores de expressão tecidual ao se levar em conta o grau das lesões (baixo grau: $15,10 \pm 1,80\%$, alto grau: $14,90 \pm 2,0\%$; $p=0.6773$). Tal achado provavelmente se deve ao fato de que a mutação IDH1 é muito mais prevalente do que a mutação da IDH2, independente do grau da lesão (102). Dessa forma, com a baixa incidência de mutação da IDH2 em gliomas de forma geral, tanto em gliomas de alto quanto baixo grau, ambas as lesões de baixo e alto grau apresentariam o gene da proteína íntegro, permitindo sua expressão sem diferenças semiquantitativas.

Também foi realizada a comparação da expressão da IDH1 e 2 selvagens ao se levar em conta exclusivamente os gliomas de baixo grau e a presença ou ausência de imunopositividade para a mutação IDH1R132H. Especificamente, não houve alteração da expressão da IDH2 ao se comparar os grupos com mutação ($15,60 \pm 1,0\%$) e sem mutação ($14,70 \pm 2,40\%$; $p=0,834$). Tal achado poderia ser explicado a partir da hipótese considerada anteriormente, ou seja, a mutação no gene *IDH1* não interferiria na expressão do *IDH2* e da proteína por ele codificada. Todavia, também não houve diferença na expressão da IDH1 selvagem, ao se considerar a presença ou ausência da forma mutante IDH1R132H (com mutação: $14,40 \pm 2,30\%$; sem mutação: $14,10 \pm 0,90\%$; $p=0,2963$). Tal achado sugere que a mutação IDH1R132H não leve à diminuição da expressão da forma selvagem da IDH1 nos astrocitomas de baixo grau. Neste contexto, é possível propor que (i) mecanismos celulares levariam a um aumento da expressão do gene *IDH1* selvagem e/ou (ii) o alelo não mutado ainda seria o suficiente para garantir a produção da enzima em níveis fisiológicos

Ainda, foi avaliado nesse presente trabalho a presença de possível correlação entre a expressão de IDH1R132H e as isoformas selvagens IDH1 e 2. Especificamente, não foi encontrada nenhuma forma de correlação, nem no total de

lesões IDH1R132H imunopositivas, nem somente naquelas de baixo grau. Isso suporta a noção de que, à despeito da relação funcional entre essas enzimas, não parece haver repercussão tecidual na expressão de cada uma devido a mutação da IDH1R132H. Isso pode se dever ao fato discutido anteriormente, de que mesmo com a mutação teríamos um gene funcionante para expressar a IDH1 e ambos os genes funcionantes para expressar a IDH2, assim a expressão tecidual dessas enzimas não seria afetada pela mutação da IDH1R132H.

É importante notar, todavia, que o presente trabalho, em sua forma atual, apresenta limitações. Especificamente, a nomenclatura está parcialmente incompleta para alguns casos devido à possibilidade de haver (i) mutação mais rara do *IDH1* em indivíduos com menos de 55 anos ao diagnóstico e/ou com lesões de alto grau e perda da expressão nuclear de *ATRX*, (ii) alteração do *CDKN2A/B* nas lesões com características morfológicas de baixo grau. Particularmente, no caso das lesões grau 2 da presente casuística, o termo SOE foi atribuído pois a pesquisa de formas mutantes mais raras da IDH é recomendada para quem tiver idade inferior a 55 anos ao diagnóstico. Somente após a investigação complementar e conclusiva da presença ou ausência de mutação da IDH é que o diagnóstico final pode ser confirmado. Com relação às lesões de grau 4 da presente casuística, o termo SOE foi atribuído pois a pesquisa de formas mutantes mais raras da IDH é indicada para os indivíduos com menos de 55 anos ao diagnóstico, imunonegatividade para a forma mutante R132H da IDH1 e/ou perda da expressão nuclear de *ATRX*. Somente após a investigação complementar e conclusiva é que o diagnóstico final (astrocitoma, IDH-mutante ou glioblastoma, IDH-selvagem) pode ser estabelecido. Por fim, no presente trabalho, estudamos a repercussão da forma mutante mais comum da IDH1 (R132H). No entanto, por ora, não podemos excluir se os presentes resultados independem das mutações mais raras, tanto da IDH1 quanto da IDH2.

Tendo estas presentes limitações em mente, análises futuras mais completas serão realizadas por nosso grupo de pesquisa, na presente casuística, para a exclusão destas dúvidas, bem como associar esta reavaliação mais precisa e detalhada da nomenclatura/classificação das lesões com outras enzimas funcionalmente relacionadas com as formas selvagens da IDH 1 e 2.

6. CONCLUSÕES

1) Na casuística do presente serviço terciário brasileiro, considerando os achados histológicos, imuno-histoquímicos e de hibridação *in situ*, em gliomas difusos de adulto, as lesões de baixo grau foram classificadas como: astrocitoma, IDH-mutante, grau 2 da OMS (50%) ou astrocitoma, SOE, grau 2 da OMS (50%). Por sua vez, os tumores de alto grau foram classificados como: glioblastoma IDH-selvagem, grau 4 (60%) ou astrocitoma, SOE, grau 4 da OMS (40%).

2) O padrão de imunomarcção para IDH1R132H, IDH1 selvagem e IDH2 selvagem foi citoplasmático e com distribuição difusa. Não sendo observadas diferenças morfológicas qualitativas entre as lesões de alto e baixo grau. Além disso, não observamos diferenças com relação aos tumores com e sem a forma mutante IDH1R132H.

3) O uso do software *ImageJ* permitiu semiquantificar a expressão da IDH1 e IDH2 selvagens, bem como da forma mutante mais comum (IDH1R132H). Comparando os grupos de baixo e alto grau, houve diferença significativa entre as médias percentuais de expressão (distribuição tecidual) da IDH1 selvagem, sendo menor nas lesões de baixo grau. Não houve diferença com relação à distribuição da IDH1R132H e da IDH2 selvagem. Especificamente, considerando as lesões de baixo grau, não houve diferença na expressão da IDH1 ou da IDH2 em função da imunopositividade para IDH1R132.

4) Além da ausência de diferenças com relação ao padrão de imunopositividade para IDH1R132H, IDH1 selvagem e IDH2 selvagem entre os dois grupos, não houve correlação entre a expressão (distribuição tecidual) da IDH1R132H e da IDH1, assim como da IDH1R132H e da IDH2. Tais achados foram verificados ao serem consideradas conjuntamente as lesões de alto e baixo grau ou apenas aquelas de baixo grau. Desta forma, é possível que a forma mutante mais comum da IDH não interfira com as expressões das duas isoformas selvagens e/ou que o alelo não mutado do *IDH1* garanta a síntese proteica em níveis fisiológicos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Galbraith K, Snuderl M. Molecular Pathology of Gliomas. [cited 2023 Mar 1]; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.path.2021.05.003>
2. Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, et al. The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: A summary. *Neuro Oncol*. 2021 Aug 1;23(8):1231–51.
3. Whitfield BT, Huse JT. Classification of adult-type diffuse gliomas: Impact of the World Health Organization 2021 update. *Brain Pathology* [Internet]. 2022 Jul 1 [cited 2023 Feb 14];32(4). Available from: </pmc/articles/PMC9245936/>
4. Brandner S, McAleenan A, Jones HE, Kernohan A, Robinson T, Schmidt L, et al. Diagnostic accuracy of 1p/19q codeletion tests in oligodendroglioma: A comprehensive meta-analysis based on a Cochrane systematic review. *Neuropathol Appl Neurobiol* [Internet]. 2022 Jun 1 [cited 2023 Apr 23];48(4). Available from: </pmc/articles/PMC9208578/>
5. Griffin CA, Burger P, Morsberger L, Yonescu R, Swierczynski S, Weingart JD, et al. Identification of der(1;19)(q10;p10) in five oligodendrogliomas suggests mechanism of concurrent 1p and 19q loss. *J Neuropathol Exp Neurol* [Internet]. 2006 Oct [cited 2023 Apr 23];65(10):988–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17021403/>
6. Jenkins RB, Blair H, Ballman K V., Giannini C, Arusell RM, Law M, et al. A t(1;19)(q10;p10) mediates the combined deletions of 1p and 19q and predicts a better prognosis of patients with oligodendroglioma. *Cancer Res* [Internet]. 2006 Oct 15 [cited 2023 Apr 23];66(20):9852–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17047046/>
7. Gladitz J, Klink B, Seifert M. Network-based analysis of oligodendrogliomas predicts novel cancer gene candidates within the region of the 1p/19q co-deletion. *Acta Neuropathol Commun* [Internet]. 2018 Jun 11 [cited 2023 Apr 23];6(1):49. Available from: </pmc/articles/PMC5996550/>
8. Ziegler J, Pody R, De Souza PC, Evans B, Saunders D, Smith N, et al. ELTD1, an effective anti-angiogenic target for gliomas: preclinical assessment in mouse GL261

- and human G55 xenograft glioma models. *Neuro Oncol* [Internet]. 2017 [cited 2023 Apr 23];19(2):175–85. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27416955/>
9. Towner RA, Jensen RL, Colman H, Vaillant B, Smith N, Casteel R, et al. ELTD1, a potential new biomarker for gliomas. *Neurosurgery* [Internet]. 2013 Jan [cited 2023 Apr 23];72(1):77–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23096411/>
 10. Liu S, Cadoux-Hudson T, Schofield CJ. Isocitrate dehydrogenase variants in cancer — Cellular consequences and therapeutic opportunities. *Curr Opin Chem Biol* [Internet]. 2020 Aug 1 [cited 2023 Mar 1];57:122. Available from: [/pmc/articles/PMC7487778/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3277778/)
 11. Al-Khallaf H. Isocitrate dehydrogenases in physiology and cancer: biochemical and molecular insight. *Cell Biosci* [Internet]. 2017 Aug 3 [cited 2023 Mar 1];7(1):37. Available from: [/pmc/articles/PMC5543436/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29443436/)
 12. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, et al. IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas . *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2009 Feb 19 [cited 2023 Mar 1];360(8):765–73. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa0808710>
 13. Reitman ZJ, Yan H. Isocitrate Dehydrogenase 1 and 2 Mutations in Cancer: Alterations at a Crossroads of Cellular Metabolism. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* [Internet]. 2010 Jul 7 [cited 2023 Mar 1];102(13):932. Available from: [/pmc/articles/PMC2897878/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2097878/)
 14. Nikiforova, Marina N., and Ronald L. Hamilton. "Molecular diagnostics of gliomas." *Archives of pathology & laboratory medicine* 135.5 (2011): 558-568.
 15. Balss, Jörg, et al. "Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors." *Acta neuropathologica* 116 (2008): 597-602.
 16. Prensner, J., Chinnaiyan, A. Metabolism unhinged: *IDH* mutations in cancer. *Nat Med* 17, 291–293 (2011). <https://doi.org/10.1038/nm0311-291>
 17. Hartmann C, Hentschel B, Wick W, Capper D, Felsberg J, Simon M, et al. Patients with IDH1 wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis than IDH1-mutated glioblastomas, and IDH1 mutation status accounts for the unfavorable prognostic effect of higher age: Implications for classification of gliomas. *Acta Neuropathol*

- [Internet]. 2010 Dec 19 [cited 2023 Mar 1];120(6):707–18. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00401-010-0781-z>
18. Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM, et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* [Internet]. 2009 Dec 10 [cited 2023 Feb 14];462(7274):739–44. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19935646/>
 19. Xu W, Yang H, Liu Y, Yang Y, Wang P, Kim SH, et al. Oncometabolite 2-Hydroxyglutarate Is a Competitive Inhibitor of α -Ketoglutarate-Dependent Dioxygenases. *Cancer Cell* [Internet]. 2011 Jan 1 [cited 2023 Feb 14];19(1):17. Available from: [/pmc/articles/PMC3229304/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20475371/)
 20. Turcan, S., Rohle, D., Goenka, A., Walsh, L. A., Fang, F., Yilmaz, E., ... & Chan, T. A. (2012). IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylation phenotype. *Nature*, 483(7390), 479-483.
 21. Nouchmeh, H., Weisenberger, D. J., Diefes, K., Phillips, H. S., Pujara, K., Berman, B. P., ... & Aldape, K. (2010). Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer cell*, 17(5), 510-522.
 22. Islam MS, Leissing TM, Chowdhury R, Hopkinson RJ, Schofield CJ. 2-Oxoglutarate-Dependent Oxygenases. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-044724> [Internet]. 2018 Jun 20 [cited 2023 Mar 13];87:585–620. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-biochem-061516-044724>
 23. Das S, Marsden PA. Angiogenesis in Glioblastoma. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2013 Oct 17 [cited 2023 Mar 13];369(16):1561–3. Available from: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMcibr1309402>
 24. Sasaki M, Knobbe CB, Itsumi M, Elia AJ, Harris IS, In I, et al. D-2-hydroxyglutarate produced by mutant IDH1 perturbs collagen maturation and basement membrane function. 2038 GENES & DEVELOPMENT [Internet]. [cited 2023 Mar 13];26:2038–49. Available from: <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.198200.112>; www.genesdev.org
 25. Zhao S, Lin Y, Xu W, Jiang W, Zhai Z, Wang P, et al. Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1 α . *Science* (1979)

[Internet]. 2009 Apr 10 [cited 2023 Mar 13];324(5924):261–5. Available from: www.jbc.org/cgi/

26. Hollinshead KER, Munford H, Eales KL, Bardella C, Li C, Escribano-Gonzalez C, et al. Oncogenic IDH1 Mutations Promote Enhanced Proline Synthesis through PYCR1 to Support the Maintenance of Mitochondrial Redox Homeostasis. *Cell Rep* [Internet]. 2018 Mar 20 [cited 2023 Mar 13];22(12):3107–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29562167/>
27. Gelman SJ, Naser F, Mahieu NG, McKenzie LD, Dunn GP, Chheda MG, et al. Consumption of NADPH for 2-HG Synthesis Increases Pentose Phosphate Pathway Flux and Sensitizes Cells to Oxidative Stress. *Cell Rep*. 2018;22(2):512–22.
28. Śledzińska P, Bebyn MG, Furtak J, Kowalewski J, Lewandowska MA. Prognostic and Predictive Biomarkers in Gliomas. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 Oct 1 [cited 2023 Mar 13];22(19):10373. Available from: [/pmc/articles/PMC8508830/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3588830/)
29. Amankulor NM, Kim Y, Arora S, Kargl J, Szulzewsky F, Hanke M, et al. Mutant IDH1 regulates the tumor-associated immune system in gliomas. *Genes Dev* [Internet]. 2017 May 2 [cited 2023 Mar 1];31(8):774–86. Available from: <http://genesdev.cshlp.org/content/early/2017/05/02/gad.294991.116>
30. Bleeker FE, Atai NA, Lamba S, Jonker A, Rijkeboer D, Bosch KS, et al. The prognostic IDH1(R132) mutation is associated with reduced NADP+-dependent IDH activity in glioblastoma. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2010 Apr [cited 2023 Mar 13];119(4):487–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20127344/>
31. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JCH, Leary RJ, Angenendt P, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* [Internet]. 2008 Sep 26 [cited 2023 Mar 13];321(5897):1807–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18772396/>
32. Metellus P, Coulibaly B, Colin C, De Paula AM, Vasiljevic A, Taieb D, et al. Absence of IDH mutation identifies a novel radiologic and molecular subtype of WHO grade II gliomas with dismal prognosis. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2010 [cited 2023 Mar 13];120(6):719–29. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21080178/>

33. Ju HQ, Lin JF, Tian T, Xie D, Xu RH. NADPH homeostasis in cancer: functions, mechanisms and therapeutic implications. [cited 2023 Mar 13]; Available from: <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00326-0>
34. Pramono AA, Rather GM, Herman H, Lestari K, Bertino JR. NAD- and NADPH-Contributing Enzymes as Therapeutic Targets in Cancer: An Overview. *Biomolecules* [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2023 Mar 13];10(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32111066/>
35. Xiao W, Wang RS, Handy DE, Loscalzo J. NAD(H) and NADP(H) Redox Couples and Cellular Energy Metabolism. *Antioxid Redox Signal* [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2023 Mar 13];28(3):251. Available from: </pmc/articles/PMC5737637/>
36. Heiden MGV, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* [Internet]. 2009 May 5 [cited 2023 Mar 13];324(5930):1029. Available from: </pmc/articles/PMC2849637/>
37. Jiao Y, Killela PJ, Reitman ZJ, Rasheed BA, Heaphy CM, de Wilde RF, et al. Frequent ATRX, CIC, FUBP1 and IDH1 mutations refine the classification of malignant gliomas. *Oncotarget* [Internet]. 2012 [cited 2023 Feb 14];3(7):709. Available from: </pmc/articles/PMC3443254/>
38. Kannan K, Inagaki A, Silber J, Gorovets D, Zhang J, Kastenhuber ER, et al. Whole-exome sequencing identifies ATRX mutation as a key molecular determinant in lower-grade glioma. *Oncotarget* [Internet]. 2012 [cited 2023 Feb 14];3(10):1194–204. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23104868/>
39. Modrek AS, Golub D, Khan T, Bready D, Prado J, Bowman C, et al. Low-Grade Astrocytoma Mutations in IDH1, P53, and ATRX Cooperate to Block Differentiation of Human Neural Stem Cells via Repression of SOX2. *Cell Rep* [Internet]. 2017 Oct 31 [cited 2023 Mar 1];21(5):1267–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29091765/>
40. Böglér O, Su Huang H -J, Kleihues P, Cavenee WK. The p53 gene and its role in human brain tumors. *Glia* [Internet]. 1995 Nov 1 [cited 2023 Mar 1];15(3):308–27. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/glia.440150311>
41. Kandoth C, McLellan MD, Vandin F, Ye K, Niu B, Lu C, et al. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* 2013 502:7471 [Internet]. 2013

- Oct 16 [cited 2023 Mar 1];502(7471):333–9. Available from:
<https://www.nature.com/articles/nature12634>
42. Aubrey BJ, Strasser A, Kelly GL. Tumor-Suppressor Functions of the TP53 Pathway. [cited 2023 Mar 21]; Available from: <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/>
 43. Levine AJ, Oren M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2009 Oct [cited 2023 Apr 23];9(10):749. Available from: </pmc/articles/PMC2771725/>
 44. Vousden KH, Prives C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell*. 2009 May 1;137(3):413–31.
 45. Menendez D, Inga A, Resnick MA. The expanding universe of p53 targets. *Nature Reviews Cancer* 2009 9:10 [Internet]. 2009 Oct [cited 2023 Apr 23];9(10):724–37. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrc2730>
 46. Vaughan DE, Rai R, Khan SS, Eren M, Ghosh AK. PAI-1 is a Marker and a Mediator of Senescence. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2017 Aug 1 [cited 2023 Apr 23];37(8):1446. Available from: </pmc/articles/PMC5846199/>
 47. Louis DN. The p53 gene and protein in human brain tumors. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1994;53(1):11–21.
 48. Bykov VJN, Eriksson SE, Bianchi J, Wiman KG. Targeting mutant p53 for efficient cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2018;18(2):89–102.
 49. Haase S, Garcia-Fabiani MB, Carney S, Altshuler D, Núñez FJ, Méndez FM, et al. Mutant ATRX: uncovering a new therapeutic target for glioma. <https://doi.org/10.1080/14728222.2018.1487953> [Internet]. 2018 [cited 2023 Mar 1]; Available from:
<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14728222.2018.1487953>
 50. Weller, M., Pfister, S. M., Wick, W., Hegi, M. E., Reifenberger, G., & Stupp, R. (2013). Molecular neuro-oncology in clinical practice: a new horizon. *The lancet oncology*, 14(9), e370-e379.
 51. Haberler, C., & Wöhrer, A. (2014). Clinical Neuropathology practice news 2-2014: ATRX, a new candidate biomarker in gliomas. *Clinical Neuropathology*, 33(2), 108.

52. Takano, S., Ishikawa, E., Sakamoto, N., Matsuda, M., Akutsu, H., Noguchi, M., ... & Matsumura, A. (2016). Immunohistochemistry on IDH 1/2, ATRX, p53 and Ki-67 substitute molecular genetic testing and predict patient prognosis in grade III adult diffuse gliomas. *Brain tumor pathology*, 33, 107-116.
53. Ebrahimi, A., Skardelly, M., Bonzheim, I., Ott, I., Mühleisen, H., Eckert, F., ... & Schittenhelm, J. (2016). ATRX immunostaining predicts IDH and H3F3A status in gliomas. *Acta neuropathologica communications*, 4, 1-10.
54. Simon M, Köster G, Menon AG, Schramm J. Functional evidence for a role of combined CDKN2A (p16-p14ARF)/CDKN2B (p15) gene inactivation in malignant gliomas. *Acta Neuropathologica* 1999 98:5 [Internet]. 1999 Nov [cited 2023 Apr 23];98(5):444–52. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s004010051107>
55. Cilluffo D, Barra V, Di Leonardo A. P14ARF: The Absence that Makes the Difference. *Genes (Basel)* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2023 Apr 23];11(7):1–8. Available from: [/pmc/articles/PMC7397060/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3397060/)
56. Schirripa A, Sexl V, Kollmann K. Cyclin-dependent kinase inhibitors in malignant hematopoiesis. *Front Oncol* [Internet]. 2022 Aug 11 [cited 2023 Apr 23];12. Available from: [/pmc/articles/PMC9403899/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39403899/)
57. Ding L, Cao J, Lin W, Chen H, Xiong X, Ao H, et al. The Roles of Cyclin-Dependent Kinases in Cell-Cycle Progression and Therapeutic Strategies in Human Breast Cancer. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2023 Apr 23];21(6). Available from: [/pmc/articles/PMC7139603/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37139603/)
58. Horbinski, C., Berger, T., Packer, R.J. et al. Clinical implications of the 2021 edition of the WHO classification of central nervous system tumours. *Nat Rev Neurol* 18, 515–529 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41582-022-00679-w>
59. Mancini A, Xavier-Magalhães A, Woods WS, Nguyen KT, Amen AM, Hayes JL, et al. Disruption of the β 1L Isoform of GABP Reverses Glioblastoma Replicative Immortality in a TERT Promoter Mutation-Dependent Manner. *Cancer Cell*. 2018 Sep 10;34(3):513-528.e8.
60. Giardini MA, Segatto M, Da Silva MS, Nunes VS, Cano MIN. Telomere and Telomerase Biology. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2014 Jan 1;125:1–40.

61. Saadeh FS, Mahfouz R, Assi HI. Egfr as a clinical marker in glioblastomas and other gliomas. *International Journal of Biological Markers* [Internet]. 2018 Feb 9 [cited 2023 Mar 26];33(1):22–32. Available from:
https://journals.sagepub.com/doi/10.5301/ijbm.5000301?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0pubmed
62. Li L, Dutra A, Pak E, III JEL, Gerstein RM, Pandolfi PP, et al. EGFRvIII expression and PTEN loss synergistically induce chromosomal instability and glial tumors. *Neuro Oncol* [Internet]. 2009 Feb 1 [cited 2023 Mar 27];11(1):9–21. Available from:
<https://academic.oup.com/neuro-oncology/article/11/1/9/1050434>
63. Mazzoleni S, Politi LS, Pala M, Cominelli M, Franzin A, Sergi LS, et al. Epidermal growth factor receptor expression identifies functionally and molecularly distinct tumor-initiating cells in human glioblastoma multiforme and is required for gliomagenesis. *Cancer Res* [Internet]. 2010 Oct 1 [cited 2023 Mar 27];70(19):7500–13. Available from:
<https://aacrjournals.org/cancerres/article/70/19/7500/559807/Epidermal-Growth-Factor-Receptor-Expression>
64. Aibaidula A, Chan AKY, Shi Z, Li Y, Zhang R, Yang R, et al. Adult IDH wild-type lower-grade gliomas should be further stratified. *Neuro Oncol* [Internet]. 2017 Oct 1 [cited 2023 Mar 17];19(10):1327–37. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28575485/>
65. Shinojima N, Tada K, Shiraishi S, Kamiryo T, Kochi M, Nakamura H, et al. Prognostic Value of Epidermal Growth Factor Receptor in Patients with Glioblastoma Multiforme 1. *Cancer Res* [Internet]. 2003 [cited 2023 Mar 17];63:6962–70. Available from:
<http://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/63/20/6962/2509276/ch2003006962.pdf>
66. Stichel D, Ebrahimi A, Reuss D, Schrimpf D, Ono T, Shirahata M, et al. Distribution of EGFR amplification, combined chromosome 7 gain and chromosome 10 loss, and TERT promoter mutation in brain tumors and their potential for the reclassification of IDHwt astrocytoma to glioblastoma. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2018 Nov 1 [cited 2023 Mar 27];136(5):793–803. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30187121/>

67. Balesaria S, Brock C, Bower M, Clark J, Nicholson SK, Lewis P, et al. Loss of chromosome 10 is an independent prognostic factor in high-grade gliomas. *Br J Cancer* [Internet]. 1999 [cited 2023 Mar 27];81(8):1371–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10604735/>
68. Roth JJ, Fierst TM, Waanders AJ, Yimei L, Biegel JA, Santi M. Whole Chromosome 7 Gain Predicts Higher Risk of Recurrence in Pediatric Pilocytic Astrocytomas Independently From KIAA1549-BRAF Fusion Status. *J Neuropathol Exp Neurol* [Internet]. 2016 Apr 1 [cited 2023 Mar 27];75(4):306–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26945035/>
69. Wessels PH, Twijnstra A, Kessels AGH, Krijne-Kubat B, Theunissen PH, Ummelen MIJ, et al. Gain of chromosome 7, as detected by in situ hybridization, strongly correlates with shorter survival in astrocytoma grade 2. *Genes Chromosomes Cancer* [Internet]. 2002 [cited 2023 Mar 27];33(3):279–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11807985/>
70. Pirozzi CJ, Yan H. The implications of IDH mutations for cancer development and therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2021 Oct;18(10):645-661. doi: 10.1038/s41571-021-00521-0. Epub 2021 Jun 15. PMID: 34131315.
71. Dharmaiah S, Huse JT. The epigenetic dysfunction underlying malignant glioma pathogenesis. *Lab Invest*. 2022 Jul;102(7):682-690. doi: 10.1038/s41374-022-00741-7. Epub 2022 Feb 12. PMID: 35152274.
72. Alzial G, Renoult O, Paris F, Gratas C, Clavreul A, Pecqueur C. Wild-type isocitrate dehydrogenase under the spotlight in glioblastoma. *Oncogene*. 2022 Jan;41(5):613-621. doi: 10.1038/s41388-021-02056-1. Epub 2021 Nov 11. PMID:34764443; PMCID: PMC8799461.
73. Eisenbarth D, Wang YA. Glioblastoma heterogeneity at single cell resolution. *Oncogene*. 2023 Jun;42(27):2155-2165. doi: 10.1038/s41388-023-02738-y. Epub 2023 Jun 5. PMID: 37277603.
74. Varghese F, Bukhari AB, Malhotra R, De A. IHC profiler: An open source plugin for the quantitative evaluation and automated scoring of immunohistochemistry images of human tissue samples. *PLoS ONE*. 2014 May 6;9(5).

75. Assis-Mendonça, G. R., Athié, M. C. P., Tamanini, J. V. G., Souza, A. D., Zanetti, G. G., Araújo, P. A. O. R. D. A., ... & Rogerio, F. (2023). Transcriptome analyses of the cortex and white matter of focal cortical dysplasia type II: Insights into pathophysiology and tissue characterization. *Frontiers in neurology*, 14, 1023950.
76. Senetta R, Verdun di Cantogno L, Chiusa L, Castellano I, Gugliotta P, Sapino A, Cassoni P. A "weighted" fluorescence in situ hybridization strengthens the favorable prognostic value of 1p/19q codeletion in pure and mixed oligodendroglial tumors. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2013 May;72(5):432-41. doi: 10.1097/NEN.0b013e3182901f41. PMID: 23584201; PMCID: PMC3678883.
77. Cevik, L., Landrove, M. V., Aslan, M. T., Khammad, V., Garagorry Guerra, F. J., Cabello-Izquierdo, Y., ... & Otero, J. J. (2022). Information theory approaches to improve glioma diagnostic workflows in surgical neuropathology. *Brain Pathology*, 32(5), e13050.
78. Ostrom QT, Cioffi G, Waite K, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2014–2018. *Neuro Oncol* [Internet]. 2021 Oct 1 [cited 2023 Feb 14];23(Suppl 3):iii1. Available from: /pmc/articles/PMC8491279/
79. Ohgaki H, Kleihues P. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2005 Jan [cited 2024 Jan 24];109(1):93–108. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15685439/>
80. DJ B, RG V, KD A, WK Y, SR S, LA C, et al. Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas. *N Engl J Med* [Internet]. 2015 Jun 25 [cited 2024 Jan 24];372(26):2481–98. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26061751/>
81. Reuss DE, Mamatjan Y, Schrimpf D, Capper D, Hovestadt V, Kratz A, et al. IDH mutant diffuse and anaplastic astrocytomas have similar age at presentation and little difference in survival: a grading problem for WHO. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2015 Jun 26 [cited 2024 Jan 24];129(6):867–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25962792/>
82. Ostrom QT, Cioffi G, Gittleman H, Patil N, Waite K, Kruchko C, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2012-2016. *Neuro Oncol* [Internet]. 2019 Oct 1

[cited 2024 Jan 24];21(Suppl 5):V1–100. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31675094/>

83. Jaeckle KA, Decker PA, Ballman K V., Flynn PJ, Giannini C, Scheithauer BW, et al. TRANSFORMATION OF LOW GRADE GLIOMA AND CORRELATION WITH OUTCOME: AN NCCTG DATABASE ANALYSIS. *J Neurooncol* [Internet]. 2011 Aug [cited 2024 Jan 24];104(1):253. Available from: [/pmc/articles/PMC5738240/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21675094/)
84. Appay R, Dehais C, Maura CA, Alentorn A, Carpentier C, Colin C, et al. CDKN2A homozygous deletion is a strong adverse prognosis factor in diffuse malignant IDH-mutant gliomas. *Neuro Oncol* [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2024 Jan 24];21(12):1519. Available from: [/pmc/articles/PMC7145561/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31675094/)
85. Shirahata M, Ono T, Stichel D, Schrimpf D, Reuss DE, Sahm F, et al. Novel, improved grading system(s) for IDH-mutant astrocytic gliomas. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2018 Apr 23 [cited 2024 Jan 24];136(1):153–66. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29687258/>
86. Von Deimling A, Ono T, Shirahata M, Louis DN. Grading of Diffuse Astrocytic Gliomas: A Review of Studies Before and After the Advent of IDH Testing. *Semin Neurol* [Internet]. 2018 Feb 1 [cited 2024 Jan 24];38(1):19–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29548048/>
87. Yang RR, Shi Z feng, Zhang Z yu, Chan AKY, Aibaidula A, Wang W wei, et al. IDH mutant lower grade (WHO Grades II/III) astrocytomas can be stratified for risk by CDKN2A, CDK4 and PDGFRA copy number alterations. *Brain Pathol* [Internet]. 2020 May 1 [cited 2024 Jan 24];30(3):541–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31733156/>
88. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol*. 2009 May 1;10(5):459–66.
89. Reifenberger G, Weber RG, Riehm V, Kaulich K, Willscher E, Wirth H, et al. Molecular characterization of long-term survivors of glioblastoma using genome- and transcriptome-wide profiling. *Int J Cancer* [Internet]. 2014 Oct 15 [cited 2024 Jan 24];135(8):1822–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24615357/>

90. Mellinghoff IK, Chang SM, Jaeckle KA, Van Den Bent M. Isocitrate Dehydrogenase Mutant Grade II and III Glial Neoplasms. [cited 2024 Jan 16]; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2021.08.008>
91. Andrews C, Prayson RA. IDH mutations in older patients with diffuse astrocytic gliomas. *Ann Diagn Pathol* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2024 Jan 16];49. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33137656/>
92. Choi J, Kim SH, Ahn SS, Choi HJ, Yoon HI, Cho JH, et al. Extent of resection and molecular pathologic subtype are potent prognostic factors of adult WHO grade II glioma. *Sci Rep* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2024 Jan 16];10(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32034238/>
93. Lu VM, O'Connor KP, Shah AH, Eichberg DG, Luther EM, Komotar RJ, et al. The prognostic significance of CDKN2A homozygous deletion in IDH-mutant lower-grade glioma and glioblastoma: a systematic review of the contemporary literature. *J Neurooncol* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2024 Jan 16];148(2):221–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32385699/>
94. Masood M, Anwar RF, Mehmood K, Javed M, Amjad T, Naseem N. Analysis of Isocitrate dehydrogenase (IDH) mutation in Gliomas: A call for neurosurgeons and pathologists in Pakistan. *J Pak Med Assoc*. 2022 Jan 1;72(1):134–40.
95. Zheng S, Rammohan N, Sita T, Teo PT, Wu Y, Lesniak M, et al. GlioPredictor: a deep learning model for identification of high-risk adult IDH-mutant glioma towards adjuvant treatment planning. *123AD* [cited 2024 Jan 24]; Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-51765-6>
96. Kayabolen A, Yilmaz E, Bagci-Onder T. IDH Mutations in Glioma: Double-Edged Sword in Clinical Applications? *Biomedicines* [Internet]. 2021 Jul 1 [cited 2024 Jan 16];9(7). Available from: <https://pmc/articles/PMC8301439/>
97. Philip B, Yu DX, Silvis MR, Shin CH, Robinson JP, Robinson GL, et al. Mutant IDH1 Promotes Glioma Formation In Vivo. *Cell Rep* [Internet]. 2018 May 1 [cited 2024 Jan 24];23(5):1553–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29719265/>
98. Bardella C, Al-Dalahmah O, Krell D, Brazauskas P, Al-Qahtani K, Tomkova M, et al. Expression of Idh1R132H in the Murine Subventricular Zone Stem Cell Niche Recapitulates Features of Early Gliomagenesis. *Cancer Cell* [Internet]. 2016 Oct 10

[cited 2024 Jan 24];30(4):578–94. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27693047/>

99. DJ B, RG V, KD A, WK Y, SR S, LA C, et al. Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas. *N Engl J Med* [Internet]. 2015 Jun 25 [cited 2024 Jan 24];372(26):2481–98. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26061751/>
100. Hu Y, Shi G, Zhang L, Li F, Jiang Y, Jiang S, et al. Switch telomerase to ALT mechanism by inducing telomeric DNA damages and dysfunction of ATRX and DAXX. *Sci Rep* [Internet]. 2016 Aug 31 [cited 2024 Jan 24];6. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27578458/>
101. Yan H, Williams D, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, et al. IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas A bs tr ac t. *N Engl J Med*. 2009;360:765–73.
102. Cohen AL, Holmen SL, Colman H. IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas. *Curr Neurol Neurosci Rep* [Internet]. 2013 [cited 2024 Feb 4];13(5):345. Available from:
[/pmc/articles/PMC4109985/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24109985/)

8. ANEXO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DA EXPRESSÃO TECIDUAL DE TRANSIDROGENASE DE NUCLEOTÍDEOS DE NICOTINAMIDA, GLICOSE 6-FOSFATO DESIDROGENASE E ENZIMAS MÁLICAS EM GLIOMAS DE ALTO E BAIXO GRAU COM OU SEM A MUTAÇÃO R132H DA ISOCITRATO DESIDROGENASE-1. **Pesquisador:** Fabio Rogerio **Área Temática:**

Versão: 1

CAAE: 30652420.0.0000.5404

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.018.680

Apresentação do Projeto:

As informações contidas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram obtidas dos documentos apresentados para apreciação ética e das informações inseridas pelo Pesquisador Responsável do estudo na Plataforma Brasil.

Introdução:

Gliomas são os tumores cerebrais mais comuns e correspondem a cerca de 70% das neoplasias primárias do sistema nervoso central (SNC). Estes tumores surgem a partir de células gliais, sendo que aqueles que possuem características histológicas que remetem à linhagem astrocitária são considerados como astrocitomas. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), os astrocitomas podem ser classificados em quatro graus histológicos (I – IV), os quais guardam relação estreita com o comportamento biológico da lesão, tempo de sobrevida do paciente e resposta à abordagem terapêutica. O astrocitoma pilocítico, ao qual é atribuído grau I, é bem delimitado, de crescimento lento e acomete predominantemente crianças e adultos jovens. Seu padrão histológico bifásico é característico: áreas compactas, constituídas por células bipolares associadas a fibras de Rosenthal, que se misturam, em proporções variadas, com áreas frouxas contendo células multipolares e estruturas microcísticas ou arredondadas granulares eosinofílicas.

Via de regra, a conduta é cirúrgica e o prognóstico, favorável (Louis et al., 2016). Por sua vez, os astrocitomas graus II, III e IV ocorrem principalmente em adultos e são considerados gliomas difusos, pois se infiltram de forma irrestrita na substância branca, tornando impossível sua delimitação precisa. Do ponto de vista morfológico, a classificação destes tumores baseia-se nos seguintes achados histológicos: atipias nucleares, mitoses, proliferação microvascular e necrose. O astrocitoma grau II (astrocitoma difuso de baixo grau) apresenta apenas um dos achados, sendo o mais comum atipia nuclear. O tumor grau III (astrocitoma anaplásico) exibe dois dos achados microscópicos listados, sendo atipia nuclear e mitoses os mais frequentes. No astrocitoma grau IV (glioblastoma; GBM), são observados ao menos três dos achados histológicos. A partir desta graduação histológica, os astrocitomas difusos podem ser categorizados em baixo (II) ou alto (III e IV) grau. A excisão cirúrgica apenas, ainda que não permita a retirada completa da lesão, é a abordagem proposta para os tumores grau II. Os tumores graus III e IV recebem ainda radioterapia e/ou quimioterapia adjuvante. O tempo de sobrevida dos pacientes é inversamente proporcional ao grau histológico dos astrocitomas (Louis et al., 2016). GBM é o tumor cerebral primário mais frequente, correspondendo a aproximadamente 70 % dos astrocitomas e 15 % de todas as neoplasias intra-cranianas. Cerca de 90 % dos GBMs são classificados como primários. Tais lesões acometem principalmente idosos (média de 62 anos), têm rápida evolução (menos de três meses) e não apresentam evidências clínicas ou histopatológicas de lesão precursora. Por outro lado, GBMs secundários acometem indivíduos mais jovens (média de 45 anos) e progridem de forma lenta a partir de astrocitoma difuso de menor grau. Histologicamente indistinguíveis entre si, as duas formas de GBM apresentam prognóstico sombrio. Pacientes com GBM primário apresentam sobrevida mediana aproximada de cinco meses e aqueles com a forma secundária, de oito meses (Ohgaki et al., 2009). A análise histológica tem papel importante para a definição do tipo de uma neoplasia astrocitária. Porém, dificuldades diagnósticas podem surgir em função da heterogeneidade do tumor, sobreposição com aspectos morfológicos de outros gliomas ou amostragem parcial da lesão. Em função disso, nas últimas décadas, foram conduzidos diversos estudos empregando prioritariamente técnicas moleculares objetivando-se encontrar marcadores biológicos com relevância diagnóstica, prognóstica e/ou que permitam melhor compreensão do funcionamento das células neoplásicas. Especificamente, a investigação da codeleção 1p/19q tem permitido realizar diagnóstico diferencial em casos de gliomas difusos de baixo grau (grau II), uma vez que as células tumorais podem apresentar características morfológicas que sugerem diferenciação astrocitária (astrocitoma) ou oligodendroglioma (oligodendroglioma). Neste contexto, tais tipos de gliomas difusos que apresentam a codeleção são diagnosticados como

oligodendrogliomas, independentemente de suas feições microscópicas. Na ausência da codeleção, estabelece-se o diagnóstico de astrocitoma difuso de baixo grau. Por sua vez, a codeleção 1p/19q pode estar associada com mutação nos genes IDH1 e IDH2 nos tumores oligodendrogliais. Neste sentido, a mutação, além de contribuir com o diagnóstico da neoplasia, também é informação relevante para estabelecimento do prognóstico de pacientes. De fato, indivíduos com glioma difuso de baixo grau, astrocitoma anaplásico ou glioblastoma com a forma mutante dos genes IDH apresentam melhor prognóstico (Nikiforova et al., 2011; Louis et al., 2016). Estudos recentes estimam que de 70% a 90% dos gliomas difusos de baixo grau com mutação no gene IDH, apresentam regulação alterada do genoma, contribuindo com a gênese tumoral (Sanson et al., 2009; Yan et al., 2009; Watanabe et al., 2009; Hartmann et al., 2009; Duncan et al., 2012; Noushmehr et al., 2010; Heather et al., 2015). Ainda, observou-se recentemente que a perda de expressão da proteína ATRX detectada em astrocitomas difusos não ocorreria simultaneamente à codeleção 1p e 19q, sendo que esta última alteração gênica (codeleção 1p/19q) é considerada assinatura molecular de neoplasias oligodendrogliais. Desta forma, foi proposto que a investigação da expressão da ATRX, juntamente com aquela de IDH1 R132H, serviria como forma alternativa para a classificação da linhagem do glioma (Karsy et al., 2017). Especificamente, a partir da análise da expressão da proteína ATRX, em havendo manutenção da sua expressão, seria alta a probabilidade de ocorrência da codeleção 1p/19q, sugerindo o diagnóstico de oligodendroglioma. Por sua vez, se constatada a perda de expressão da proteína ATRX, o diagnóstico seria de astrocitoma ou glioblastoma secundário, ou seja, uma neoplasia não-oligodendroglioma. Com relação à IDH-1, sabe-se que esta é a isoforma citosólica da IDH e promove a conversão reversível de isocitrato a alfa-cetoglutarato (CG), em uma reação associada à redução de uma molécula de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP⁺). A alteração mais comum no gene da IDH-1 determina a substituição de um aminoácido arginina por histidina que se localiza no sítio de ligação do isocitrato (R132H). Tal mutação altera a atividade enzimática normal e reduz sua capacidade de sintetizar CG e reduzir NADP⁺, tornando a célula mais suscetível ao estresse oxidativo. Outra consequência dessa mutação se refere à nova capacidade funcional da enzima para converter NADPH e CG a NADP⁺ e D-2-hidroxioglutarato (2HG) que, produzido em excesso, é considerado um metabólito oncogênico por induzir a regulação aberrante da expressão gênica. Essa redução na quantidade de NADPH favoreceria estresse oxidativo, além de alterar a regulação de fatores de transcrição nuclear (Wallace et al., 2012; Ronchi et al., 2013). Além disso, o aumento da produção de 2HG elevaria os níveis de HIF-1 alfa (do inglês, hypoxia-inducible fator – 1 alfa), um fator de transcrição que aumenta a expressão do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e favorece a angiogênese (Cohen et al., 2013). Outra fonte importante de NADPH no citosol é a glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PD). Tal enzima é uma molécula chave para a geração de NADPH, o qual contribui para a manutenção da glutatona reduzida (GSH). Esta última participa da eliminação de espécies reativas de oxigênio, o que pode proteger as células neoplásicas de danos oxidativos (Ju et al., 2017). Além disso, a alta expressão de G6PD foi relatada em tumores humanos como câncer de ovário, próstata, bexiga, estômago, colorretal, mama e rim (Yi et al., 2015; Tsouko et al., 2014; Wang et al., 2015; Ju et al., 2017; Pu et al., 2015; Zhang et al., 2017). Especificamente, nos tumores gástrico, colorretal, mamário e renal, a alta

expressão de G6PD está relacionada com a progressão da neoplasia e mau prognóstico, sendo assim um potencial alvo terapêutico metabólico (Wang et al., 2012; Ju et al., 2017; Pu et al., 2015; Zhang et al., 2017). Especificamente em gliomas (Li et al., 2008), verificou-se que a intensidade da imunomarcagem para G6PD relaciona-se positivamente com o grau da neoplasia, sendo que não ocorre expressão do marcador em tecido cerebral sem neoplasia. Além disso, Yang et al. (2018) propuseram que a expressão gênica aumentada de G6PD seria um fator preditor de maior risco e de pior prognóstico em gliomas de baixo grau, mas não em glioblastoma. Nas mitocôndrias, uma das enzimas que participa de mecanismos de redução do estresse oxidativo é a transidrogenase de nucleotídeos de nicotinamida (NAD(P)⁺ transidrogenase; NNT), localizada na membrana interna desta organela. Especificamente, a NNT utiliza o gradiente de prótons através da membrana mitocondrial interna para prover a energia necessária para a produção de NADPH a partir de NADP⁺. Para a realização deste processo, a NNT promove a transferência de um hidreto para o NADP⁺, sendo que tal hidreto é proveniente da oxidação de NADH a NAD⁺, catalisada pela mesma enzima. Nas mitocôndrias, o NADPH pode ser utilizado pela forma selvagem da isocitrato desidrogenase-2 (IDH2), promovendo a carboxilação redutiva de CG a isocitrato e este pode ser convertido a cis-aconitato e, posteriormente, a citrato pela aconitase mitocondrial. O citrato pode ser exportado da mitocôndria para o citosol por um carreador de citrato, participando de vias de biossíntese ou sendo convertido a cis-aconitato e isocitrato pela aconitase citosólica. As enzimas málicas (EMs) também têm sido estudadas por sua relação com crescimento e proliferação celular em diferentes neoplasias. A enzima málica 1 (EM1), isoforma citosólica desta proteína, é encontrada no citosol e converte malato a piruvato concomitante à redução de NADP⁺ a NADPH. Estudos da expressão da EM1 em tumores como carcinoma de células escamosas oral e de nasofaringe, câncer de mama, pulmão e gástrico relacionam a expressão da EM1 com tamanho do tumor, grau histológico, prognóstico ruim e sobrevida baixa. (S Murai et al., 2017; Chie Nakashima et al., 2018; Zheng et al., 2012; Ruocen Liao et al., 2018; Chakrabarti et al., 2015; Yanyan Shi et al., 2019). Por sua vez, a inibição da expressão de ME1, por manipulação genética in vitro de células neoplásicas, resulta em redução do crescimento celular e aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (Zheng et al., 2012). Desta forma, infere-se que, a diminuição da expressão de EM1 contribuiria com maior suscetibilidade celular a estresse oxidativo. A enzima málica 2 (EM2), localizada na mitocôndria, é responsável pela descarboxilação oxidativa de malato, para produzir CO₂ e piruvato, simultaneamente à redução de NADP⁺ e de NAD⁺ a, respectivamente, NADPH e NADH. Ren et al. (2015) descreveram que EM2 é fortemente expressa em muitos tumores sólidos, inclusive carcinoma pulmonar do tipo não pequenas células. Neste tipo de neoplasia, a depleção de EM2 levou a inibição da proliferação celular e indução de morte. Tais achados seriam decorrentes da depleção da síntese do antioxidante NADPH e do consequente aumento dos níveis de ROS. Especificamente, Cheng et al. (2016) demonstraram envolvimento da EM2 com o crescimento e invasão de células de GBM, bem como identificaram relação entre o nível de expressão da EM2 e a graduação do tumor, isto é, maior expressão de enzima em astrocitomas de alto grau. Tais autores evidenciaram também que o aumento de espécies reativas de oxigênio na mitocôndria, induzido por inibição da expressão (knockdown) de EM2, poderia levar ao acúmulo e maior frequência de mutações nas células neoplásicas.

Ainda que o mecanismo fisiopatogênico de tal acúmulo não esteja claro, ele estaria associado a produção diminuída de ATP e contribuiria com o aumento da agressividade do comportamento biológico do tumor. Com relação à enzima málica 3 (EM3), também mitocondrial, sabe-se que esta proteína promove a redução do NADP⁺ a NADPH em reação similar àquela catalisada pela EM2. Desta forma, a EM3, assim como outras enzimas mencionadas previamente, poderia ter sua expressão influenciada pela mutação da IDH-1. Até onde sabemos, não há estudos voltados à expressão de EM3 em neoplasias e sua possível participação na fisiopatogênese destas lesões. Até onde sabemos, não há relatos prévios na literatura a respeito da avaliação da expressão/distribuição tecidual da IDH-1 mutante (R132H) e das enzimas NNT, G6PD, EM1, EM2 e EM3 em amostras histológicas de astrocitomas humanos de alto ou baixo grau. Pretendemos, portanto, a partir de cortes histológicos de espécimes cirúrgicos e técnica imunoistoquímica, obter informações originais sobre estas expressões, uma vez que as reações catalisadas por este conjunto de enzimas parecem estar relacionadas. Além disso, visamos contribuir com a melhor compreensão do funcionamento/metabolismo das células neoplásicas gliais, bem como relacionar os dados morfológicos com o grau histológico da lesão e a evolução clínica dos indivíduos.

Hipótese: A forma mutante da IDH1 R132H estaria associada com alteração da distribuição/expressão tecidual de enzimas funcionalmente relacionadas com a síntese de NADPH (NNT, G6PD, EM1, EM2 e EM3). Objetivo Primário: Avaliar a distribuição tecidual de proteínas relacionadas à síntese de NADPH em astrocitomas difusos de baixo grau e glioblastoma, bem como eventual associação com o status da mutação da IDH-1. Objetivo Secundário: Avaliar a distribuição tecidual, através de imunoistoquímica, da enzima NNT em astrocitomas difusos de baixo grau e glioblastoma e eventual repercussão da proteína mutante IDH1 R132H. Avaliar a distribuição tecidual, através de imunoistoquímica, da enzima G6PD em astrocitomas difusos de baixo grau e glioblastoma e eventual repercussão da proteína mutante IDH1 R132H. Avaliar a distribuição tecidual, através de imunoistoquímica, das enzimas EM1, EM2 e EM3 em astrocitomas difusos de baixo grau e glioblastoma e eventual repercussão da proteína mutante IDH1 R132H. Relacionar os achados morfológicos e imunoistoquímicos com dados moleculares diagnósticos de astrocitomas difusos de baixo grau e glioblastoma. Metodologia Proposta: O presente estudo se baseia em análise retrospectiva de espécimes cirúrgicos obtidos de pacientes submetidos a cirurgia para tratamento de glioma e que tiveram acompanhamento clínico e cirúrgico no Hospital de Clínicas (HC) da Unicamp, no período de 2010 a 2018. O material analisado corresponderá a cortes histológicos obtidos dos espécimes cirúrgicos incluídos em blocos de parafina, os quais estão arquivados no Departamento de Anatomia Patológica (DAP) da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Unicamp

(vide autorização em anexo). Para seleção dos espécimes cirúrgicos, as lâminas histológicas já existentes de cada caso serão revistas. Tais lâminas foram confeccionadas previamente e avaliadas para elaboração do diagnóstico de rotina. As lâminas mais representativas de cada caso serão identificadas e os respectivos blocos selecionados para o estudo histológico e molecular (vide itens 3.4 e 3.5). O número total de espécimes a serem estudados (n) dependerá da aplicação dos critérios de inclusão e exclusão (vide abaixo), especialmente do estado de conservação dos blocos de parafina. A princípio, estima-se um valor de 25 indivíduos (n=25) com glioma. Ainda, dos pacientes submetidos a cirurgia, serão obtidos dados clínicos através de pesquisa nos respectivos prontuários médicos (idade ao diagnóstico histológico, idade no momento da cirurgia e idade ao óbito, quando for o caso, e topografia da lesão). Critério de Inclusão: Pacientes adultos (maiores de 18 anos), de ambos os sexos, com diagnóstico de glioma difuso de alto ou baixo grau, sem história prévia de qualquer neoplasia e/ou tratamento oncológico, e cujos espécimes cirúrgicos estejam contidos em blocos de parafina em adequado estado de conservação. Critério de Exclusão: Qualquer paciente com diagnóstico de astrocitoma difuso de alto ou baixo grau e cujas características clínicas, ou do espécime cirúrgico correspondente, não sejam contempladas nos critérios de inclusão.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Avaliar a distribuição tecidual de proteínas relacionadas à síntese de NADPH em astrocitomas difusos de baixo grau e glioblastoma, bem como eventual associação com o status da mutação da IDH-1. Objetivo Secundário: Avaliar a distribuição tecidual, através de imunoistoquímica, da enzima NNT em astrocitomas difusos de baixo grau e glioblastoma e eventual repercussão da proteína mutante IDH1 R132H. Avaliar a distribuição tecidual, através de imunoistoquímica, da enzima G6PD em astrocitomas difusos de baixo grau e glioblastoma e eventual repercussão da proteína mutante IDH1 R132H. Avaliar a distribuição tecidual, através de imunoistoquímica, das enzimas EM1, EM2 e EM3 em astrocitomas difusos de baixo grau e glioblastoma e eventual repercussão da proteína mutante IDH1 R132H. Relacionar os achados morfológicos e imunoistoquímicos com dados moleculares diagnósticos de astrocitomas difusos de baixo grau e glioblastoma

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo informações do pesquisador:

Riscos: O presente estudo não implicará risco aos participantes uma vez que as amostras a serem analisadas serão obtidas a partir de material arquivado na coleção do Bloário de Anatomia Patológica do HC Unicamp. O material refere-se ao espécime

cirúrgico que foi removido previamente de cada indivíduo e incluído em bloco(s) de parafina para realização de diagnóstico. Desta forma, o presente estudo não implicará coleta de qualquer tipo de amostra biológica adicional do indivíduo cuja amostra será avaliada através de colorações especiais e estudo imunoistoquímico. Benefícios: Não há benefícios diretos. Os benefícios previstos referem-se à obtenção de conhecimento relacionado à fisiopatogênese de gliomas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Este projeto está baseado na análise retrospectiva de exames de anatomia patológica de pacientes que foram submetidos a cirurgia para remoção de glioma no Hospital das Clínicas da UNICAMP no período de 2010 a 2018. Os exames estão atualmente arquivados no departamento de patologia do HC. O pesquisador responsável é o Dr Fabio Rogério e o presente estudo embasará a tese de mestrado da Dra Arethusa de Souza. A instituição proponente é a FCM / UNICAMP. Há previsão orçamentária de R\$15.000,00 cujo financiamento é Fapesp. O cronograma apresentado tem previsão de início em 02/2021 e término em 08/2022. Está inserido na Grande Área 4/ ciências da saúde. O estudo será feito com a análise de 25 pacientes.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram analisados os seguintes documentos de apresentação obrigatória:

1-Folha de Rosto Para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos: arquivo :
"FabioRogerio_Glioma_FolhaRostoAssinada.pdf" - ADEQUADO

2 - Projeto de Pesquisa: Foram analisados os documentos :

"PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1536360.pdf" e
"FabioRogerio_Glioma_Projeto.pdf":

ADEQUADO

3-Orçamento financeiro e fontes de financiamento: Informações sobre orçamento financeiro incluídas no documento :
"PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1536360.pdf" - No projeto consta que o financiamento será da Fapesp

4-Cronograma: Informações sobre o cronograma incluídas no documento: "

PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1536360.pdf" : ADEQUADO

5-Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: Foi apresentado o documento :

"FabioRogerio_Glioma_TCLE.pdf: RECOMENDAÇÕES

6-Currículo do pesquisador principal e demais colaboradores: "Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Fábio Rogério).pdf": SOMENTE DO PESQUISADOR PRINCIPAL

7-Documentos necessários para armazenamento de material biológico humano em biorrepositório conforme a Resolução CNS 441/11, itens 2.II e 6, Portaria MS 2.201/11, Capítulo II, Artigos 5º e Capítulo III, Artigo 8 e Norma Operacional CNS Nº 001/2013 anexo II: N/A

8- Foram ainda analisados os seguintes arquivos:
 "FabioRogerio_Comprovante_Vinculo_Institucional.pdf" +
 "FabioRogerio_Glioma_AutorizacaoDAPFCM.pdf"

Recomendações:

1-Substituir no TCLE o item "Vantagens" por "Benefícios".

2-No item "Ressarcimento e Indenização" do TCLE acrescentar a frase: "Não haverá ressarcimento, pois você não terá gastos para participar da pesquisa".

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado com RECOMENDAÇÕES (Vide item acima "Recomendações")

Considerações Finais a critério do CEP:

- O participante da pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (quando aplicável).

- O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (quando aplicável).

- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido

em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas e aguardando a aprovação do CEP para continuidade da pesquisa. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.

- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data de parecer de aprovação e ao término do estudo.

- Lembramos que segundo a Resolução 466/2012, item XI.2 letra e, “cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento”.

- O pesquisador deve manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1536360.pdf	09/04/2020 17:35:40		Aceito
Outros	FabioRogerio_Comprovante_Vinculo_Institucional.pdf	09/04/2020 17:34:59	Fabio Rogerio	Aceito
Outros	FabioRogerio_Glioma_AutorizacaoDAP_FCM.pdf	07/04/2020 17:29:53	Fabio Rogerio	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	FabioRogerio_Glioma_TCLE.pdf	07/04/2020 17:27:44	Fabio Rogerio	Aceito

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	FabioRogerio_Glioma_Projeto.pdf	07/04/2020 17:27:28	Fabio Rogerio	Aceito
Folha de Rosto	FabioRogerio_Glioma_FolhaRostoAssinada.pdf	07/04/2020 17:26:40	Fabio Rogerio	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 11 de Maio de 2020

Assinado por:
Renata Maria dos Santos Celeghini
(Coordenador(a))