

Débora Cabral de Carvalho Corrêa

**INVESTIGAÇÃO DAS ALTERAÇÕES GENÉTICAS DOS
EPENDIMOMAS E GLIOMAS DA INFÂNCIA E ADOLESCÊNCIA
UTILIZANDO A ESTRATÉGIA DE SEQUENCIAMENTO DE NOVA
GERAÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de
São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para
obtenção do título de Mestre em Ciências

São Paulo

2021

Débora Cabral de Carvalho Corrêa

**INVESTIGAÇÃO DAS ALTERAÇÕES GENÉTICAS DOS
EPENDIMOMAS E GLIOMAS DA INFÂNCIA E ADOLESCÊNCIA
UTILIZANDO A ESTRATÉGIA DE SEQUENCIAMENTO DE NOVA
GERAÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de
São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Orientadora

Dr^a. Silvia Regina Caminada de Toledo

São Paulo

2021

CORRÊA, DÉBORA CABRAL DE CARVALHO

Investigação das alterações genéticas dos ependimomas e gliomas da infância e adolescência utilizando a estratégia de sequenciamento de nova geração/ Débora Cabral de Carvalho Corrêa - São Paulo, 2021.

xvi, 141f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Estrutural e Funcional.

Título em inglês: Investigation of genetic alterations of childhood and adolescence ependymomas and gliomas using the next-generation sequencing strategy.

1. Tumores de sistema nervoso central. 2. Ependimoma. 3. Gliomas. 4. Tumores da infância e adolescência. 5. Sequenciamento de nova geração

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
ESTRUTURAL E FUNCIONAL

Chefe do Departamento: Prof.^a Dr.^a Sandra Maria Miraglia Valdeolivas
Coordenadora do Curso de Pós-Graduação: Prof.^a Dr.^a Isabel Cristina Céspedes

Este estudo foi desenvolvido no
Laboratório de Investigação Genética das Neoplasias da Infância e Adolescência – Instituto
de Oncologia Pediátrica/Grupo de Apoio ao Adolescente e à Criança com Câncer –
Universidade Federal de São Paulo (IOP-GRAACC/UNIFESP)
Disciplina de Genética do Departamento de Morfologia e Genética da Universidade Federal
de São Paulo – Escola Paulista de Medicina (UNIFESP/EPM)

Apoio e Suporte Financeiro

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

Processo nº 2019/12074-5 - Bolsa de Mestrado

Vigência: 01/08/2019 – 31/05/2021

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
(CAPES)

Instituto de Oncologia Pediátrica-GRAACC/UNIFESP (IOP-
GRAACC/UNIFESP)

As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade do(s) autor(es) e não necessariamente refletem a visão da FAPESP e da CAPES.

Débora Cabral de Carvalho Corrêa

**INVESTIGAÇÃO DAS ALTERAÇÕES GENÉTICAS DOS
EPENDIMOMAS E GLIOMAS DA INFÂNCIA E ADOLESCÊNCIA
UTILIZANDO A ESTRATÉGIA DE SEQUENCIAMENTO DE NOVA
GERAÇÃO**

Banca Examinadora

Dr^a. Elizabeth Suchi Chen

Dr^a. Lorena Favaro Pavon Porfirio

Dr. Elvis Terci Valera

Membro Suplente

Dr^a. Suzana Maria Fleury Malheiros

“A gente precisa se dispor a abrir mão da vida que planejamos a fim de encontrar a vida que espera por nós.”

Joseph J. Campbell

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, às minhas amigas queridas, à minha orientadora e colegas de laboratório, e à Fapesp pela concessão da bolsa e suporte financeiro.

Agradecimentos	vii
Lista de Figuras	xi
Lista de Tabelas	xii
Lista de Abreviaturas e Siglas	xiii
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
APRESENTAÇÃO	1
1. INTRODUÇÃO	3
1.1. Aspectos gerais dos tumores de sistema nervoso central	3
1.2. Ependimoma	4
1.2.1. Classificação histopatológica e subgrupos moleculares	4
1.2.1. Principais alterações citogenéticas, genéticas e moleculares	7
1.3. Gliomas	8
1.3.1. Classificação histopatológica dos tumores gliais e neurogliais	8
1.3.2. Gliomas de baixo grau	9
1.3.3. Gliomas de alto grau	11
1.3.3.1. Alterações genéticas associadas aos diferentes subgrupos moleculares	11
1.3.3.1. Glioblastoma congênito	14
1.4. Painel genético para as neoplasias da infância e adolescência	15
2. OBJETIVOS	17
2.1. Objetivo geral	17
2.2. Objetivos específicos	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1. Amostras e parâmetros clínicos	18
3.2. Características dos pacientes	18
3.2.1. Ependimoma	18
3.2.2. Gliomas	21
3.2.2.1. Gliomas de baixo grau e alto grau	21
3.2.2.2. Glioblastoma congênito	23
3.3. Extração e quantificação dos ácidos nucleicos (DNA e RNA)	24

3.4. Síntese de DNA complementar	25
3.5. Sequenciamento de nova geração	25
3.6. Análise de sequenciamento	25
3.7. Painei <i>Oncomine Childhood Cancer Research Assay</i> [®]	26
3.8. Análise dos dados	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1. Ependimoma	28
4.1.1. Análise das variantes genéticas detectadas nas amostras tumorais	28
4.1.2. Curvas de sobrevivência global	30
4.1.3. Perfil molecular e clínico dos pacientes investigados	34
4.1.3.1. Investigação das alterações moleculares mais frequentes	34
4.1.3.2. Ependimoma supratentorial e tumores <i>non-RELA-non-YAP1</i>	37
4.2. Gliomas	39
4.2.1. Análise das variantes genéticas detectadas nas amostras tumorais	39
4.2.2. Curvas de sobrevivência global	41
4.2.3. Perfil molecular e clínico dos pacientes investigados	44
4.2.3.1. Gliomas de baixo grau	47
4.2.3.2. Gliomas de alto grau	50
4.2.4. Glioblastoma congênito	56
4.2.4.1. Paciente 1	56
4.2.4.2. Paciente 2	58
5. CONCLUSÃO	60
5.1. Ependimoma	60
5.2. Gliomas	60
6. REFERÊNCIAS	62
7. ARTIGOS CIENTÍFICOS	73
7.1. Artigo científico submetido para a revista <i>Journal of Neuro-Oncology</i>	73
7.2. Artigo científico em elaboração	87
8. ANEXOS	104
8.1. Anexo 1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	104
8.2. Anexo 2. Aprovação da Comissão de Ética e Pesquisa da UNIFESP	111
8.3. Anexo 3. Aprovação do Comitê Científico do IOP-GRAACC/UNIFESP	119

9. APÊNDICES	121
9.1. Apêndice 1. Projetos de Iniciação Científica	121
9.2 Apêndice 2. Atividades Acadêmicas (2019 – 2021)	121
9.3. Apêndice 3. Participação em Congressos, Simpósios e Eventos (2019 – 2021)	122
9.4. Apêndice 4. Artigos publicados	124
9.5. Apêndice 5. Artigos submetidos para publicação	124

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Resumo gráfico dos nove subgrupos moleculares de EPN de acordo com o compartimento anatômico	6
Figura 2. Esquema do diagnóstico histológico dos gliomas, de acordo o grau de malignidade tumoral estabelecido pela nova classificação da OMS	9
Figura 3. Distribuição das principais alterações genéticas dos LGGs da infância e adolescência de acordo com a localização tumoral e tipo histológico	11
Figura 4. Ilustração esquemática dos diversos subgrupos moleculares de HGGs da infância e adolescência que diferem com base na localização tumoral, idade ao diagnóstico e prognóstico	14
Figura 5. Ilustração de todos os genes compreendidos pelo painel OCCRA®	27
Figura 6. Distribuição dos genes alterados nas amostras de EPN	29
Figura 7. Características das variantes genéticas identificadas nas amostras de EPN	30
Figura 8. Curvas de sobrevida global dos EPNs	31
Figura 9. Perfil genômico das 61 amostras de EPN	32
Figura 10. Distribuição dos genes alterados nas amostras de gliomas	39
Figura 11. Características das variantes genéticas identificadas nas amostras de gliomas	41
Figura 12. Curvas de sobrevida global dos gliomas	43
Figura 13. Perfil genômico das 39 amostras de LGGs	47
Figura 14. Perfil genômico das 56 amostras de HGGs	50
Figura 15. Subgrupos moleculares de HGGs H3.3 K27M e H3.3 G34R	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados clínicos e histopatológicos dos pacientes diagnosticados com EPN	20
Tabela 2. Dados clínicos dos pacientes diagnosticados com gliomas	22
Tabela 3. Características histopatológicas dos gliomas	23
Tabela 4. Dados clínicos dos pacientes diagnosticados com cGBM	24
Tabela 5. Tempo de acompanhamento e sobrevida dos pacientes com EPN	31
Tabela 6. Comparações das curvas de sobrevida entre os subgrupos de EPN pelo teste de Log-rank	31
Tabela 7. Perfil das variantes genéticas detectadas nas amostras de EPN	33
Tabela 8. Tempo de acompanhamento e sobrevida dos pacientes com gliomas	42
Tabela 9. Comparações das curvas de sobrevida dos gliomas de acordo com o grau tumoral pelo teste de Log-rank	42
Tabela 10. Perfil das variantes genéticas detectadas nas amostras de gliomas	44
Tabela 11. Variantes <i>KIAA1549–BRAF</i> identificadas nas amostras de LGGs	48
Tabela 12. Distribuição das CNVs detectadas nas amostras de HGGs	56
Tabela 13. Variantes genéticas detectadas na amostra de cGBM do Paciente 1	57
Tabela 14. Variantes genéticas detectadas na amostra de cGBM do Paciente 2	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABL2	<i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 2</i>
ALK	<i>Anaplastic lymphoma kinase</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASXL1	<i>Additional sex combs like 1</i>
ATF1	<i>Activating transcription factor 1</i>
ATRX	<i>Alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked</i>
BEND	<i>BEN domain-containing protein 2</i>
BRAF	<i>v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B</i>
CBTRUS	Registro Central de Tumores Cerebrais dos Estados Unidos
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i>
cGBM	Glioblastoma congênito
CIC	<i>Capicua transcriptional repressor</i>
CNV	<i>Copy number variation</i>
CREB	<i>cAMP-responsive element-binding protein 1</i>
DIPG	Glioma pontino intrínseco difuso
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EPN	Ependimoma
EWSR1	<i>Ewing sarcoma breakpoint region 1</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGFR1	<i>Fibroblast growth factor receptor 1</i>
GBM	Glioblastoma
H3F3A	<i>H3 histone family member 3A</i>
HGGs	Gliomas de alto grau
HGNET-MN1	Tumores neuroepiteliais de alto grau com alterações no gene <i>MN1</i>
HIST1H3B	<i>Histone cluster 1 H3 family member b</i>
IDH	<i>Isocitrate dehydrogenase</i>
IGF1R	<i>Insulin like growth factor 1 receptor</i>
InDel	<i>Insertion or deletion</i>
JAK2	<i>Janus kinase 2</i>
JAK2/STAT3	<i>Janus kinase 2/signal transducers and activators of transcription 3</i>
KMT2D	<i>Lysine methyltransferase 2D</i>
LGGs	Gliomas de baixo grau
MAMLD1	<i>Mastermind like domain containing 1</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MDM4	<i>Double minute 4</i>
MET	<i>Hepatocyte growth factor receptor</i>
MN1	<i>Meningioma 1</i>
MNV	<i>Multi-nucleotide variant</i>
MYC	<i>BHLH transcription factor</i>
NBS-HGGs	Gliomas de alto grau de outra localização que não o tronco encefálico
NF1	<i>Neurofibromin 1</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor-Kappa β</i>
NGS	Sequenciamento de nova geração

NRNY	<i>non-RELA-non-YAPI</i>
NTRK	<i>Neurotrophic receptor tyrosine kinase 1</i>
OCCRA	<i>Oncomine Childhood Cancer Research Assay</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA	Astrocitoma pilocítico
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PF-EPN	Ependimoma de fossa posterior
PF-EPN-A	Ependimoma de fossa posterior A
PF-EPN-B	Ependimoma de fossa posterior B
PPP1CB	<i>Protein phosphatase 1 catalytic subunit β</i>
PXA	Xantoastrocitoma pleomórfico
RAF1	<i>v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
RELA	<i>v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A</i>
ROS1	<i>v-ros avian UR2 sarcoma virus oncogene homolog 1</i>
RTKs	Receptores de tirosina quinase
SNC	Sistema nervoso central
SNP	<i>Single-nucleotide polymorphism</i>
SNV	<i>Single-nucleotide variant</i>
SP-EPN	Ependimoma medular
SP-MPE	Ependimoma mixopapilar medular
SP-SE	Subependimoma medular
ST-EPN	Ependimoma supratentorial
ST-EPN-RELA	Ependimoma supratentorial com fusões <i>RELA</i>
ST-EPN-YAPI	Ependimoma supratentorial com fusões <i>YAPI</i>
ST-SE	Subependimoma supratentorial
SUZ12	<i>Polycomb repressive complex 2 subunit</i>
TKIs	Inibidores de tirosina quinase
TP53	<i>Tumor protein p53</i>
TPM3	<i>Tropomyosin 3</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
wild-type	Tipo "selvagem", alelo normal
YAPI	<i>Yes-associated protein 1</i>
ZCCH8	<i>Zinc finger CCHC-type containing 8</i>
ZFTA	<i>Zinc finger translocation associated</i>

Introdução: Os tumores de sistema nervoso central (SNC) representam as neoplasias sólidas mais comuns da infância e adolescência. Dentre eles, os tumores neuroepiteliais são os mais frequentes e incluem sobretudo o ependimoma (EPN) e os gliomas. A utilização de um painel de sequenciamento de nova geração (NGS), desenvolvido exclusivamente para a investigação genética das principais neoplasias que acometem crianças e adolescentes, é essencial para a classificação molecular desses tumores em subgrupos clinicamente relevantes. **Objetivo:** Investigar alterações moleculares, com potencial marcador prognóstico e alvo terapêutico nos EPNs e gliomas da infância e adolescência, utilizando a estratégia de NGS. **Metodologia:** Para a identificação das variantes genéticas de origem somática foram selecionadas 156 amostras de tumores de SNC de pacientes diagnosticados e tratados no IOP-GRAACC/UNIFESP. As 156 amostras de SNC incluem 61 amostras de EPN: 42 de fossa posterior (PF-EPN), 14 supratentorial (ST-EPN) e cinco de medula espinal (SP-EPN), e 95 amostras de gliomas: 56 de gliomas de alto grau (HGGs), sendo quatro de glioblastoma congênito (cGBM), e 39 de gliomas de baixo grau (LGGs). Todas as amostras tumorais foram submetidas ao NGS utilizando o painel *Oncomine Childhood Cancer Research Assay*[®] (OCCRA[®]), projetado especificamente para as principais neoplasias da infância e adolescência. **Resultados:** Variantes genéticas foram identificadas em 24 das 61 (39,3%) amostras de EPN e em 76 das 95 (80,0%) amostras de gliomas. Nas amostras de EPN, as variantes mais comumente detectadas envolvem os genes *CIC*, *ASXL1* e *JAK2*, e ainda não haviam sido descritas neste tumor. Ainda, as alterações mais recorrentes nos LGGs foram as fusões *KIAA1549-BRAF* e variantes do gene *BRAF*, enquanto nos HGGs as variantes dos genes *H3F3A*, *TP53* e *ATRX* foram os eventos genéticos mais comuns. Nas amostras de cGBMs foram identificadas variantes dos genes *ALK* e *NTRK*, alterações distintas daquelas frequentemente observadas no glioblastoma que acomete crianças e adolescentes. **Conclusão:** A caracterização do perfil molecular dos EPNs e gliomas da infância e adolescência, através do painel OCCRA[®], revelou a presença de alterações moleculares ainda não descritas nestes tipos tumorais. Assim, nossos achados destacam a importância clínica na identificação de variantes genéticas para a determinação prognóstica e terapêutica desses pacientes.

Palavras-chave: Tumores de sistema nervoso central • Ependimoma • Gliomas • Sequenciamento de nova geração • Neoplasias da infância e adolescência

ABSTRACT

Background: Central nervous system (CNS) tumors represent the most common solid malignancy of childhood and adolescence. Among them, neuroepithelial tumors are the most frequent, comprised mostly by ependymoma (EPN) and gliomas. A specific genetic panel, based on next-generation sequencing (NGS) and developed exclusively for the main pediatric and adolescent neoplasms, is essential for tumor molecular classification into clinically relevant subgroups. **Objectives:** We aimed to investigate molecular alterations with a potential prognostic marker and therapeutic target in EPNs and gliomas of childhood and adolescence using the NGS strategy. **Methods:** In order to investigate the presence of somatic genetic variants, we selected 156 CNS tumor samples from patients diagnosed and treated at IOP-GRAACC/UNIFESP, which included 61 EPN samples: 42 posterior fossa (PF-EPN), 14 supratentorial (ST-EPN) and five spinal (SP-EP), and 95 gliomas samples: 56 high-grade gliomas (HGGs) and 39 low-grade gliomas (LGGs). Among the 56 HGGs samples, four were classified as congenital glioblastoma (cGBM). All tumor samples were subjected to targeted sequencing using the Oncomine Childhood Cancer Research Assay[®] (OCCRA[®]) panel, specific for the investigation of the most frequent genetic events observed in childhood and adolescence neoplasms. **Results:** Genetic variants were identified in 24 of 61 (39.3%) EPN samples and in 76 of 95 (80.0%) of gliomas samples. In EPN, the most commonly detected variants were in *CIC*, *ASXL1*, and *JAK2* genes. In LGGs, the most recurrent alterations were *KIAA1549-BRAF* fusions and variants in *BRAF* gene, whereas in HGGs, variants in *H3F3A*, *TP53* and *ATRX* genes were the most common genetic events. Variants in *ALK* and *NTRK* genes were identified in cGBM samples and included alterations distinct from those frequently observed in glioblastoma affecting children and adolescents. **Conclusion:** Molecular profiling of EPNs and gliomas of childhood and adolescence, using the OCCRA[®] panel, showed mutational characteristics not yet described in these tumors analyzed by NGS previously. Thus, our findings highlight the clinical importance in identifying new genetic variants for patients' prognosis and therapeutic orientation.

Keywords: Central nervous system tumors • Ependymoma • Gliomas • Next-generation sequencing • Pediatric tumor

Os tumores de sistema nervoso central (SNC) representam os tumores sólidos mais comuns da infância e adolescência e são uma das principais causas de morte relacionadas ao câncer em pacientes de 0 a 19 anos de idade [1]. Dentre os tumores de SNC, as neoplasias neuroepiteliais são responsáveis por 80% dos casos e incluem sobretudo os gliomas (30-50%) e o ependimoma (11%) [2, 3]. Em sua maioria, esses tumores apresentam prognósticos desfavoráveis, taxas de sobrevida relativamente estagnadas e poucas opções atuais de tratamento eficaz [4].

Nos últimos anos, a capacidade de analisar o tecido tumoral em uma escala genômica modificou a compreensão acerca dos tumores de SNC, que até então eram vistos somente como identidades únicas. Esses tumores passaram a incluir diversos subgrupos, sendo que cada um deles possui padrões diferentes de genética e epigenética, comportamento clínico e origem celular [5]. Tal avanço na compreensão da heterogeneidade molecular dos tumores cerebrais da infância foi possibilitado por tecnologias, como o sequenciamento de nova geração (*next-generation sequencing* – NGS), capazes de identificar genes e vias de sinalização que atuam no processo de tumorigênese e na proliferação celular [6]. A implementação do NGS permitiu a análise do perfil molecular tumoral no momento do diagnóstico, o refinamento da classificação tumoral em subgrupos clinicamente relevantes e até mesmo a reclassificação daqueles tumores de difícil diagnóstico na prática médica, possibilitando o direcionamento de terapias-alvo [7].

No entanto, as estratégias terapêuticas baseadas no perfil molecular tumoral para as neoplasias da infância ainda são limitadas em comparação às opções de tratamento para os tumores de adulto. Além disso, tumores que acometem crianças apresentam alterações genéticas e moleculares distintas, com baixas taxas mutacionais, e poucas variantes de

nucleotídeo único (SNVs) e inserções ou deleções (InDels). Por outro lado, esses tumores possuem uma alta prevalência de variantes estruturais, como fusões gênicas, rearranjos cromossômicos e alterações no número de cópias do DNA (CNAs) [8]. A maioria dos painéis de NGS atuais são projetados para neoplasias de adulto e, portanto, não compreendem as principais alterações genéticas presentes nos tumores da infância [9, 10]. O *Oncomine Childhood Cancer Research Assay*[®] (OCCRA[®]) é o primeiro painel, baseado em NGS, desenvolvido exclusivamente para a investigação genética das principais neoplasias que acometem crianças e adolescentes e inclui marcadores diagnósticos, prognósticos e terapêuticos que abordam um amplo espectro de tumores em um ensaio de sequenciamento de DNA e RNA. Desse modo, tendo em vista as disparidades entre os tumores de adulto e de criança no que diz respeito aos marcadores genéticos, a investigação do perfil molecular dos tumores de SNC da infância e adolescência, por meio de um painel de NGS específico, é essencial para a orientação prognóstica e terapêutica desses pacientes [10].

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais dos tumores de sistema nervoso central

Os tumores de sistema nervoso central (SNC) são responsáveis por 25% dos tumores que acometem crianças menores de 15 anos de idade e 10% dos tumores que ocorrem em crianças entre 15 a 19 anos [6, 11, 12]. Segundo o Registro Central de Tumores Cerebrais dos Estados Unidos (CBTRUS), a taxa de incidência de tumores cerebrais primários e tumores de SNC em crianças e adolescentes, registrada entre os anos de 2012 e 2016, é de aproximadamente 6,06 por 100 000 pessoas nos Estados Unidos [13]. Embora os tumores cerebrais sejam menos frequentes em crianças em comparação aos adultos, eles representam os tumores sólidos mais comuns da infância e constituem a principal causa de morbidade e mortalidade relacionada a neoplasias em pacientes pediátricos [14].

Em 2016, a nova classificação dos tumores de SNC da Organização Mundial de Saúde (OMS) estabeleceu pela primeira vez a utilização de parâmetros moleculares, além da histologia, para definir diferentes entidades tumorais, formulando, dessa maneira, um conceito de diagnóstico integrado. Segundo essa classificação, dentre os tumores de SNC da infância e adolescência, as neoplasias neuroepiteliais são as mais frequentes, compreendendo 80% dos casos, e incluem sobretudo os gliomas (30-50%), os tumores embrionários (17%), como o meduloblastoma, e o ependimoma (11%) [2, 3].

A capacidade de analisar o tecido tumoral em uma escala genômica modificou a compreensão acerca dos tumores de SNC, que até então eram vistos somente como identidades únicas. Esses tumores passaram a incluir diversos subgrupos, sendo que cada um deles possui padrões diferentes de genética e epigenética, comportamento clínico e origem celular [5]. Tal avanço na compreensão da heterogeneidade molecular dos tumores cerebrais da infância foi possibilitado por tecnologias, como o sequenciamento de nova geração (*next-*

generation sequencing - NGS), capazes de identificar genes e vias de sinalização que atuam no processo de tumorigênese e na proliferação celular [6]. Assim, dada a era atual da medicina de precisão, a determinação do perfil genômico dos tumores de SNC da infância e adolescência vem impulsionando o desenvolvimento de potenciais marcadores prognósticos e de terapias-alvo [16].

1.2. Ependimoma

1.2.1. Classificação histopatológica e subgrupos moleculares

O ependimoma (EPN) é uma neoplasia derivada das células da glia e representa o terceiro grupo de tumor de SNC mais comum da infância, sendo responsável por 6 a 12% dos tumores cerebrais em crianças [17]. Aproximadamente 30% dos EPNs acomete crianças menores de 3 anos de idade e seu pico de incidência ocorre aos 6 anos [18].

Os EPNs são tumores que surgem do revestimento ependimal do sistema ventricular ou do canal central da medula espinal. Nas crianças, 90% dos EPNs são de localização intracranial, sendo 2/3 de fossa posterior e 1/3 supratentorial [19]. Em contrapartida, nesses pacientes, os EPNs que acometem a medula espinal são extremamente raros [20]. Segundo a classificação atual da OMS, o EPN é subdividido de acordo com sua histologia em subependimoma (grau I), EPN mixopapilar (grau I), EPN clássico com seus três subtipos histológicos – papilar, de células claras e tancítico (grau II) e EPN anaplásico (grau III) [21]. Os EPNs de grau I ocorrem predominantemente em adultos e estão associados à um prognóstico clínico favorável, enquanto os EPNs de grau III apresentam uma elevada atividade mitótica, proliferação microvascular e necrose tumoral. Atualmente, a determinação terapêutica para os EPNs é realizada pela combinação da classificação e graduação histopatológica e do perfil molecular tumoral [22].

Apesar dos subgrupos de EPN de diferentes compartimentos anatômicos possuírem semelhanças histopatológicas entre si, os mesmos apresentam um perfil genético e molecular

extremamente heterogêneo. Estudos recentes que buscaram investigar o perfil genômico dos EPNs demonstraram que este tumor compreende pelo menos nove subgrupos moleculares, três em cada compartimento anatômico do SNC – medula espinal (*spinal ependymoma* - SP-EPN), fossa posterior (*posterior fossa ependymoma* - PF-EPN) e supratentorial (*supratentorial ependymoma* - ST-EPN).

Os subgrupos moleculares de SP-EPN incluem o subependimoma (*spinal subependymoma* - SP-SE), EPN mixopapilar (*spinal mixopapillary ependymoma* - SP-MPE) e EPN clássico (SP-EPN), sendo a instabilidade cromossômica característica típica dos dois últimos grupos. Os PF-EPNs podem ser classificados em EPN Grupo A (PF-EPN-A) e EPN Grupo B (PF-EPN-B). O PF-EPN-A ocorre predominantemente em crianças pequenas, com média de idade de 2,5 anos, e está associado a um prognóstico adverso. Já o PF-EPN-B acomete principalmente adolescentes e jovens adultos, com média de idade de 20 anos, e apresenta um prognóstico mais favorável quando comparado ao subgrupo PF-EPN-A. Em crianças, o ST-EPN compreende dois subgrupos principais - EPN com fusões entre os genes *RELA* e *ZFTA*, comumente conhecido como *C11orf95* (ST-EPN-RELA), e EPN com fusões do gene *YAP1* (ST-EPN-YAP1). Os tumores ST-EPN-RELA representam mais de 70% dos ST-EPNs da infância, enquanto o subgrupo ST-EPN-YAP1 é um evento raro, com poucos casos descritos na literatura. Além disso, já foi demonstrado que pacientes do subgrupo ST-EPN-YAP1 possuem resultados clínicos extremamente favoráveis, com taxas de sobrevida global que podem chegar à 100% em 5 anos [21, 22].

O comportamento clínico dos EPNs é altamente variável e aproximadamente 40% dos pacientes são incuráveis devido à tendência de recidiva, disseminação tumoral e limitada disponibilidade de tratamentos eficazes [5, 23, 24]. Atualmente, a ressecção cirúrgica é o fator prognóstico mais importante no EPN da infância, sendo a ressecção máxima segura, seguida por radioterapia focal, o tratamento de escolha na maioria dos casos. No entanto,

com exceção de pacientes do subgrupo ST-EPN-YAP1, crianças com EPN costumam apresentar resultados extremamente baixos de sobrevida à longo prazo, sendo a taxa de sobrevida global de 39 a 64% em 10 anos [24, 25]. Os principais fatores que impactam a sobrevida incluem o grau tumoral, a ressecção cirúrgica e a localização do tumor. Em geral, quanto mais jovem o paciente, pior o prognóstico, visto que o EPN pode se comportar de forma mais agressiva na população pediátrica [26]. Desse modo, os tratamentos atuais não são suficientes para fornecer cura a longo prazo para crianças com EPN, o que ressalta a necessidade de novas abordagens terapêuticas [24].

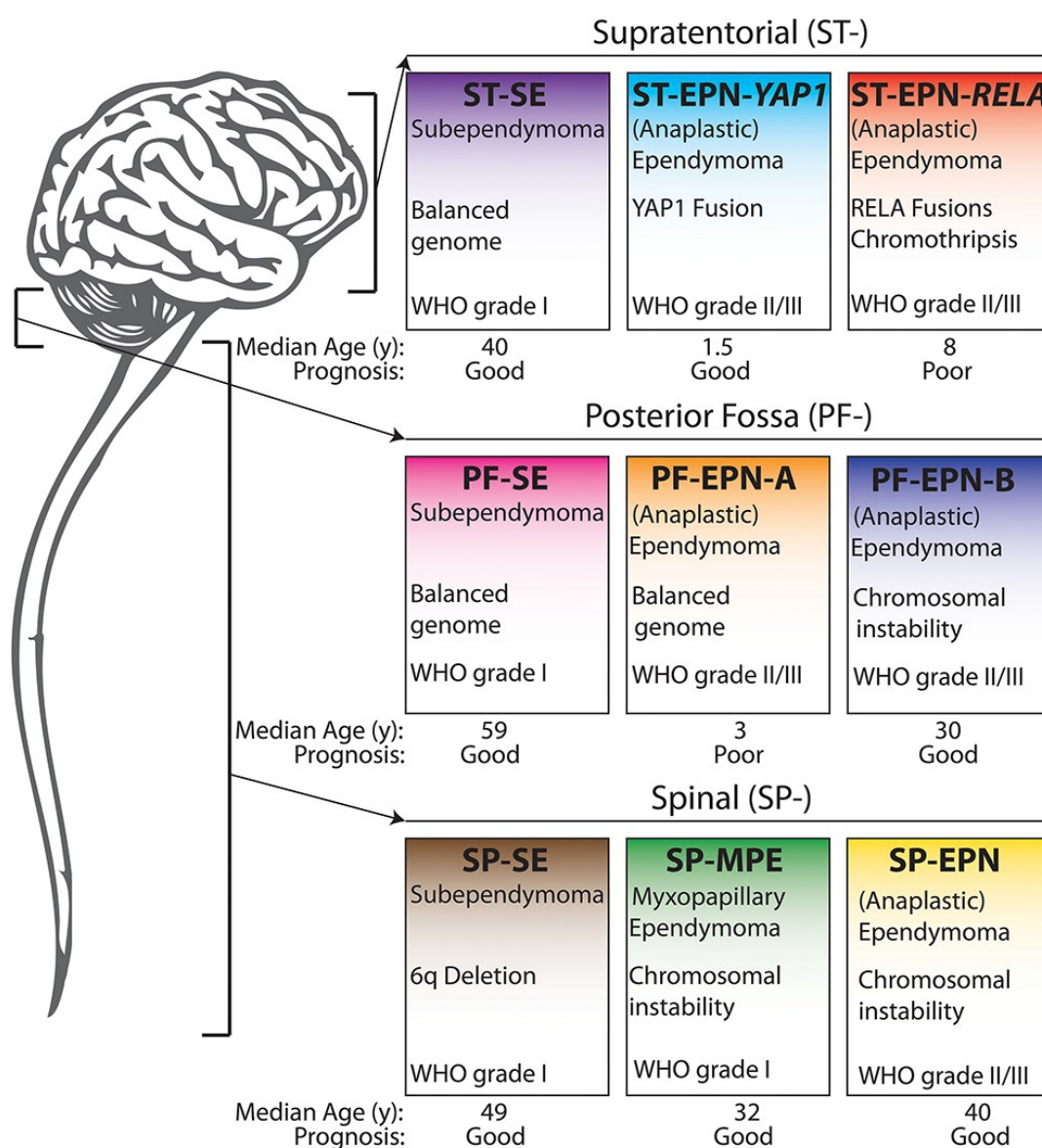


Figura 1. Esquema dos nove subgrupos moleculares de EPN de acordo com o compartimento anatômico. Representação de dados clínicos, como idade ao diagnóstico e prognóstico, características genéticas e moleculares e grau histológico do tumor. Pollack IF, *et al.* 2019 [27].

1.2.2. Principais alterações citogenéticas, genéticas e moleculares

Nas últimas décadas, análises de cariótipo e hibridização genômica comparativa revelaram uma ampla heterogeneidade do perfil citogenético do EPN da infância, sendo as perdas dos cromossomos 1q, 2, 3, 6q, 9q, 17 e 22, e ganhos dos cromossomos 1q, 5, 7, 8, 9, 11, 18 e 20 as alterações cromossômicas mais observadas [28, 29]. Estudos já demonstraram que os subgrupos moleculares de EPN apresentam diferenças significativas quanto aos padrões genético e epigenético, perfil de expressão gênica e alteração no número de cópias do DNA [30].

Os PF-EPNs-A possuem um perfil genômico equilibrado, sendo o ganho do cromossomo 1q a alteração cromossômica mais recorrente, observada em aproximadamente 15% dos casos. Os tumores de PF-A são caracterizados por diversas vias de sinalização envolvidas no processo neoplásico, incluindo vias de angiogênese, como as vias *VEGF*, *PDGF*, *MAPK*, *EGFR*, de integrina e matriz extracelular. Em contraste, os tumores de PF-B possuem alta instabilidade genômica, com diversas anormalidades citogenéticas, e apresentam alterações em genes responsáveis pela formação do citoesqueleto, como a estruturação de microtúbulos, e metabolismo oxidativo mitocondrial [31]. Análises do perfil de metilação dos subgrupos de PF-EPN revelaram diferenças expressivas entre estes tumores, sendo que os PF-EPNs-A possuem altos níveis de metilação nas ilhas CpG associados ao silenciamento epigenético de genes de diferenciação celular por meio da trimetilação da lisina 27 da histona H3 (*H3K27*). Além disso, as taxas de mutação em ambos os Grupos A e B são relativamente baixas, e até o presente momento nenhum evento genético recorrente foi identificado nestes tumores [3].

Tumores caracterizados por rearranjos do gene *RELA* foram recentemente reconhecidos como uma nova entidade de EPN pela classificação da OMS [15]. Atualmente, sete variantes para as fusões *RELA* já foram identificadas, sendo o gene *C11orf95* o gene parceiro mais comum [32, 33]. Fusões *C11orf95-RELA* levam à ativação da via de sinalização *NF-κβ*, que

está associada ao controle da proliferação celular e apoptose, contribuindo para a progressão do tumor por meio da vascularização endotelial [34, 35]. Além do subgrupo ST-EPN-RELA, tumores com fusões *YAPI-MAMLD1* já foram descritos como uma segunda entidade emergente no compartimento supratentorial de pacientes pediátricos. O gene *YAPI* promove a proliferação celular em gliomas por meio da ativação de β -catenina, e o gene *MAMLD1* atua na regulação de eventos transcricionais em diversos tipos tumorais [36]. Ainda, estudos recentes identificaram ST-EPNs sem fusões *RELA* ou *YAPI* (*non-RELA-non-YAPI* - NRNY) que não compreendem o subependimoma supratentorial (ST-SE), sugerindo que estes tumores podem representar uma nova entidade biológica e um possível novo subgrupo [37]. Apesar dos avanços na caracterização molecular dos EPNs, poucos genes *driver* envolvidos no processo neoplásico já foram identificados como potenciais alvos terapêuticos para este tumor [29].

1.3. Gliomas

1.3.1. Classificação histopatológica dos tumores gliais e neurogliais

Os gliomas representam uma das neoplasias mais comuns de SNC tanto em crianças como em adultos e são responsáveis por 30% de todos os tumores cerebrais primários. Os gliomas formam um grupo heterogêneo de tumores gliais e neurogliais, tradicionalmente classificados com base no tipo histológico e grau de malignidade. A maioria dos gliomas, os gliomas difusos, possuem extensa infiltração no parênquima do SNC e podem ser categorizados em astrocíticos, mistos ou oligodendrogliais. Os gliomas astrocíticos incluem o astrocitoma difuso (grau II), astrocitoma anaplásico (grau III) e glioblastoma (grau IV), e os gliomas oligodendrogliais são compostos pelo oligodendroglioma (grau II) e oligodendroglioma anaplásico (grau III). Outros gliomas geralmente apresentam um padrão de crescimento mais circunscrito, sendo o astrocitoma pilocítico (grau I) o mais frequente [38, 39]. Ainda, esses tumores podem ser classificados em gliomas de baixo grau (grau I e

II) e gliomas de alto grau (grau III e IV). Nos últimos anos, a classificação histológica dos gliomas passou a incluir diversos subgrupos moleculares, o que permitiu o refinamento dos critérios de diagnóstico, marcadores prognósticos e direcionamento de terapias personalizadas [40].

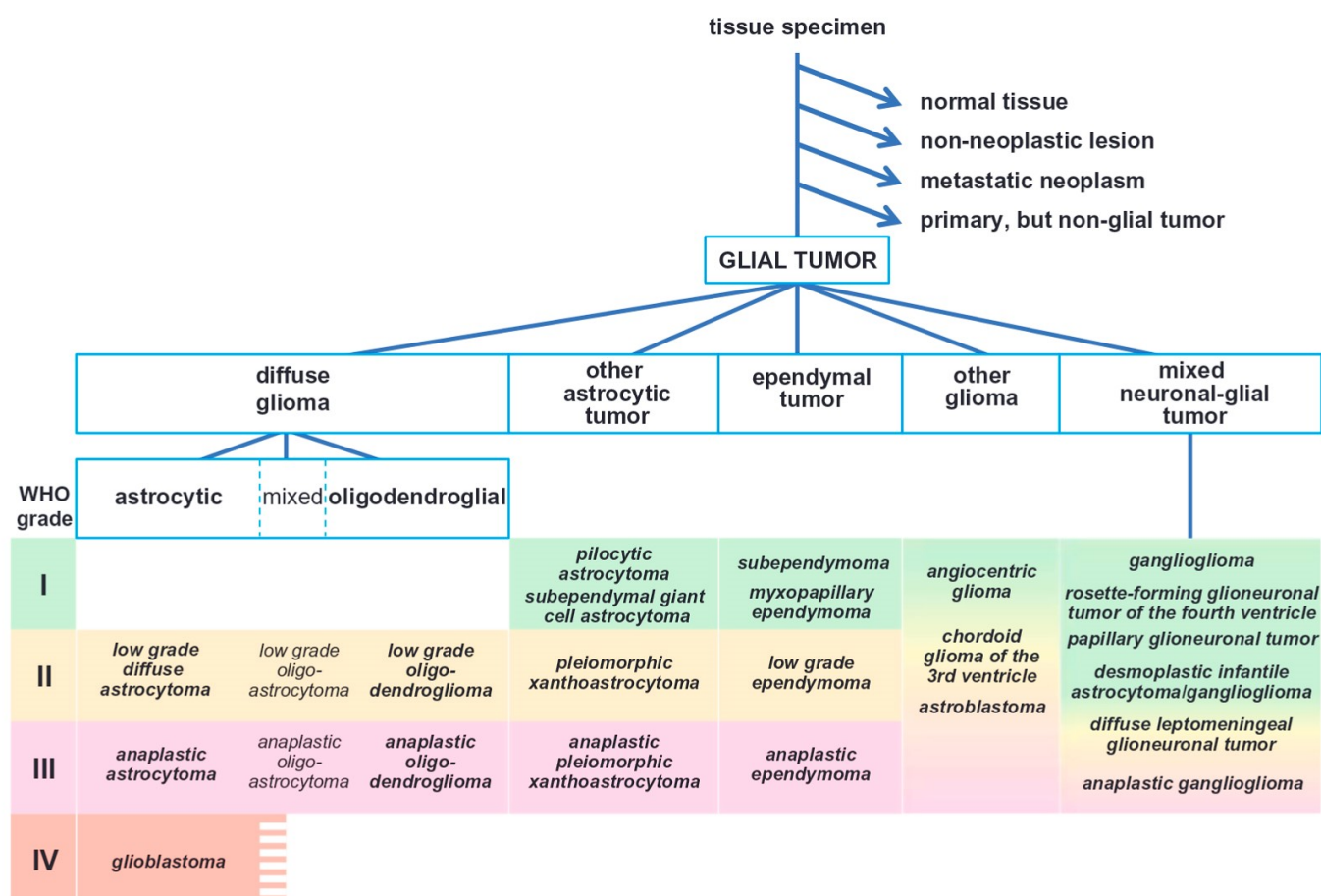


Figura 2. Esquema do diagnóstico histológico dos gliomas, de acordo o grau de malignidade tumoral, estabelecido pela nova classificação da OMS. Perry A e Wesseling P, 2016 [38].

1.3.2. Gliomas de baixo grau

Os gliomas de baixo grau (*low-grade gliomas* - LGGs) compreendem um espectro diverso de tumores de grau I e II e são o grupo de tumores de SNC mais comum da infância, representando aproximadamente 30 a 40% dos casos [41]. O astrocitoma pilocítico (*pilocytic astrocytoma* - PA) é o subtipo histológico mais frequente em crianças e ocorre predominantemente no cerebelo, tronco cerebral ou via óptica. Esse tumor é responsável por

20% dos tumores cerebrais primários em crianças com menos de 15 anos de idade e 30% de todos os tumores de fossa posterior da infância [42].

Os LGGs são tumores de crescimento lento, bem circunscritos, que não costumam progredir para graus mais elevados de malignidade. As taxas de sobrevida global de pacientes pediátricos com LGGs podem atingir mais de 90% em 10 anos, no entanto, a recidiva local ocorre em 10 a 20% casos e nos pacientes em que a lesão primária não foi passível de ressecção cirúrgica total, a taxa de progressão tumoral é de 50 a 80%. Embora as técnicas neurocirúrgicas e de radioterapia e quimioterapia tenham evoluído nas últimas décadas, o tratamento desses tumores ainda é um grande desafio devido à morbidade, progressão e recidiva tumoral [43].

Ao contrário dos LGGs de adultos, alterações no gene *IDH* são extremamente raras em crianças, sendo o ganho da região cromossômica 7q34 do oncogene *BRAF* a alteração genética mais comum nos LGGs da infância. A duplicação em tandem da região 7q34 leva à fusão do gene *KIAA1549* com o gene *BRAF* e ativa a via de sinalização *MAPK*. Aproximadamente 70 a 80% dos PAs apresentam fusões *KIAA1549-BRAF*, principalmente aqueles tumores que acometem o cerebelo. Essas fusões estão estreitamente correlacionadas à morfologia do PA e raramente são observadas em gliomas da infância com alto grau de malignidade. Além disso, diversas alterações na via *MAPK* já foram descritas em outros LGGs de crianças, incluindo a mutação *hotspot* V600E de *BRAF*, fusões *RAF1*, alterações e fusões de *FGFR1* e fusões dos genes da família *NTRK* [44-46]. Atualmente, terapias-alvo com inibidores da via *MAPK* veem se mostrando uma estratégia promissora principalmente no tratamento do PA de pacientes pediátricos [47].

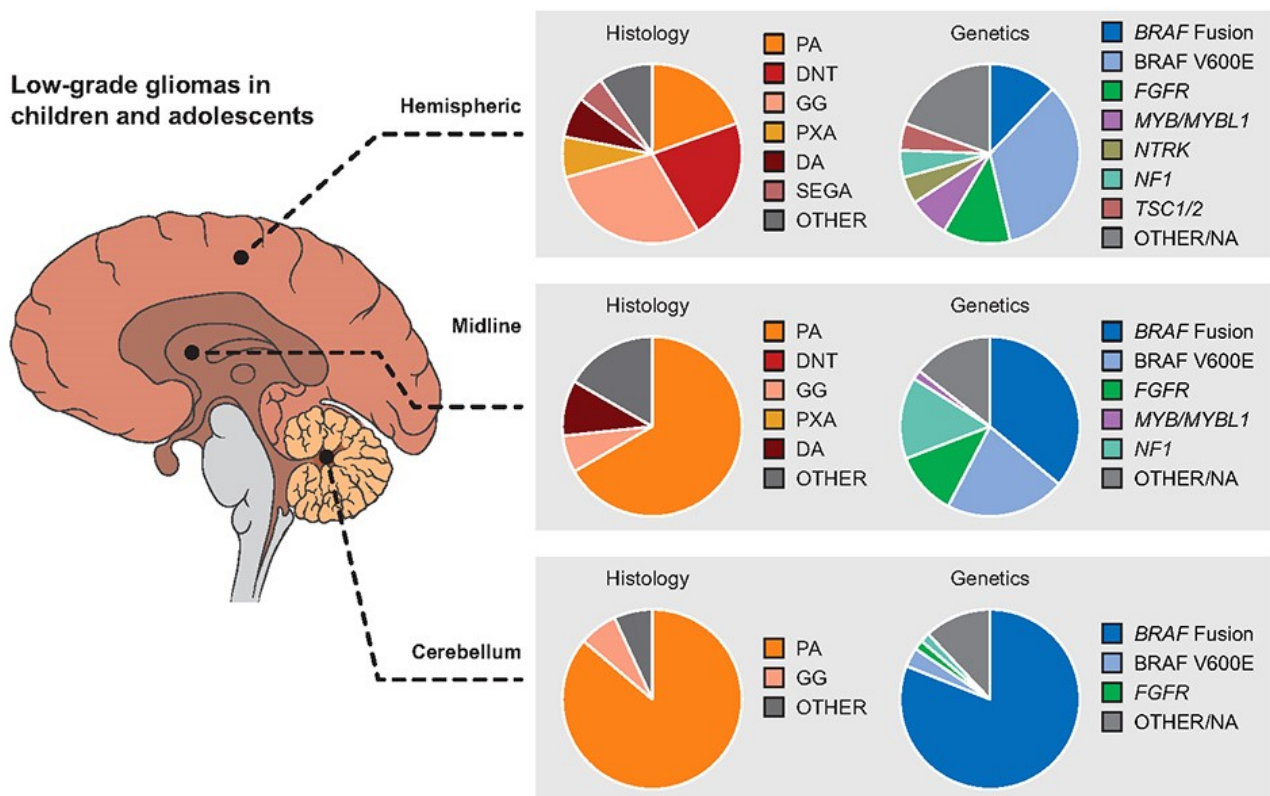


Figura 3. Distribuição das principais alterações genéticas dos LGGs em crianças e adolescentes de acordo com a localização tumoral e tipo histológico. PA astrocitoma pilocítico, DNT tumor neuroepitelial disemбриoplásico, GG ganglioglioma, PXA xantoastrocitoma pleomórfico, DA astrocitoma difuso, SEGA astrocitoma subependimário de células gigantes. Filbin M e Sturm D, 2018 [45].

1.3.3. Gliomas de alto grau

1.3.3.1. Alterações genéticas associadas aos diferentes subgrupos moleculares

Os gliomas de alto grau (*high-grade gliomas* - HGGs) e o glioma pontino intrínseco difuso (*diffuse intrinsic pontine glioma* - DIPG) são neoplasias gliais malignas, difusas e infiltrantes que compreendem um amplo espectro histológico, sendo a sua maioria composta pelo astrocitoma anaplásico e glioblastoma (GBM). Ao contrário da população adulta, os HGGs são relativamente raros em crianças e representam aproximadamente 8 a 12% dos tumores de SNC da infância. No entanto, pacientes pediátricos com HGGs possuem taxas de sobrevida a longo prazo inferiores à 10%, sendo estes tumores incuráveis na maioria dos casos. O GBM, que constitui 3 a 7% dos tumores cerebrais primários em crianças, é o tipo de glioma mais agressivo e menos de 5% dos pacientes pediátricos sobrevivem além dos 5

anos após o diagnóstico [48, 49]. Os protocolos de tratamento atuais incluem ressecção cirúrgica completa, radioterapia e uma variedade de opções de quimioterapia. A radioterapia possui um efeito temporário nos HGGs e até o presente momento poucos agentes quimioterápicos mostraram-se eficazes contra estes tumores [5].

Apesar das semelhanças histológicas, o perfil molecular dos HGGs da infância difere significativamente dos HGGs de adulto, tanto no que diz respeito aos padrões de mutações, como seus efeitos prognósticos [48]. Os HGGs e DIPGs da infância podem ser classificados em subgrupos com base nas alterações genéticas e epigenéticas mais recorrentes e nas propriedades biológicas e clínicas do tumor. Estudos demonstraram que alterações somáticas de histona, como as mutações K27M e G34R/V, são marcadores moleculares específicos dos HGGs, sobretudo do GBM e DIPG que acometem crianças e jovens adultos. Essas mutações *hotspot* afetam dois resíduos de aminoácidos distintos, K27 e G34, do gene *H3F3A* que codifica a variante de histona H3.3, e o resíduo K27 do gene *HIST1H3B* que codifica a variante de histona H3.1. A alteração K27M de *H3F3A*, na qual há a substituição de uma lisina por metionina, é frequentemente observada em crianças de 7 a 10 anos de idade e pode ocorrer simultaneamente com alterações nos genes *ATRX* e *TP53*. Os HGGs com a mutação K27M de *H3F3A* (H3.3 K27M) são tumores de linha média, região cerebral que compreende principalmente o cerebelo, ponte, medula espinal e tálamo, e costumam apresentar um prognóstico desfavorável. Já a mutação G34R/V de *H3F3A* (H3.3 G34R/V), resultado da troca de uma glicina por arginina ou valina, ocorre em tumores hemisféricos, é frequentemente observada em adolescentes e jovens adultos de 10 a 25 anos de idade, e está associada à uma sobrevida ligeiramente mais prolongada quando comparada a outros HGGs [49, 50].

Alterações nos genes de histona estão presentes em aproximadamente metade dos casos de HGGs da infância, sendo a outra metade dos casos composta por subgrupos tumorais

menores, como o subgrupo com alterações no gene *IDH1* e tumores com a mutação V600E do gene *BRAF*. O subgrupo *IDH1* representa menos de 5% dos HGGs da infância e possui um prognóstico favorável. Os tumores com a alteração *BRAF* V600E apresentam características histológicas semelhantes às do xantoastrocitoma pleomórfico (*pleomorphic xanthoastrocytoma* - PXA) e deleções do gene da família *CDK* são comumente observadas. O subgrupo de tumores semelhantes ao PXA acomete principalmente a região cortical e é responsável por 5 a 10% dos HGGs da infância [27].

Outras alterações genéticas recorrentes nos HGGs de crianças e adolescentes incluem mutações em genes que regulam o ciclo celular, como o gene *TP53*, que pode ser observado em aproximadamente 42 a 70% dos casos, e componentes da via de sinalização *MAPK*, como amplificações dos genes *IGF1R* e *MET* [49, 50]. Recentemente, análises de perfil de metilação revelaram seis subgrupos epigeneticamente distintos de HGGs da infância, que compreendem principalmente tumores com alterações nos genes *H3F3A*, *HIST1H3B*, *IDH1/2* ou *BRAF*. Esses achados destacam a heterogeneidade genômica e prognóstica dos HGGs, fornecendo informações para a estratificação dos pacientes em grupos de risco e de possíveis alvos terapêuticos [27].

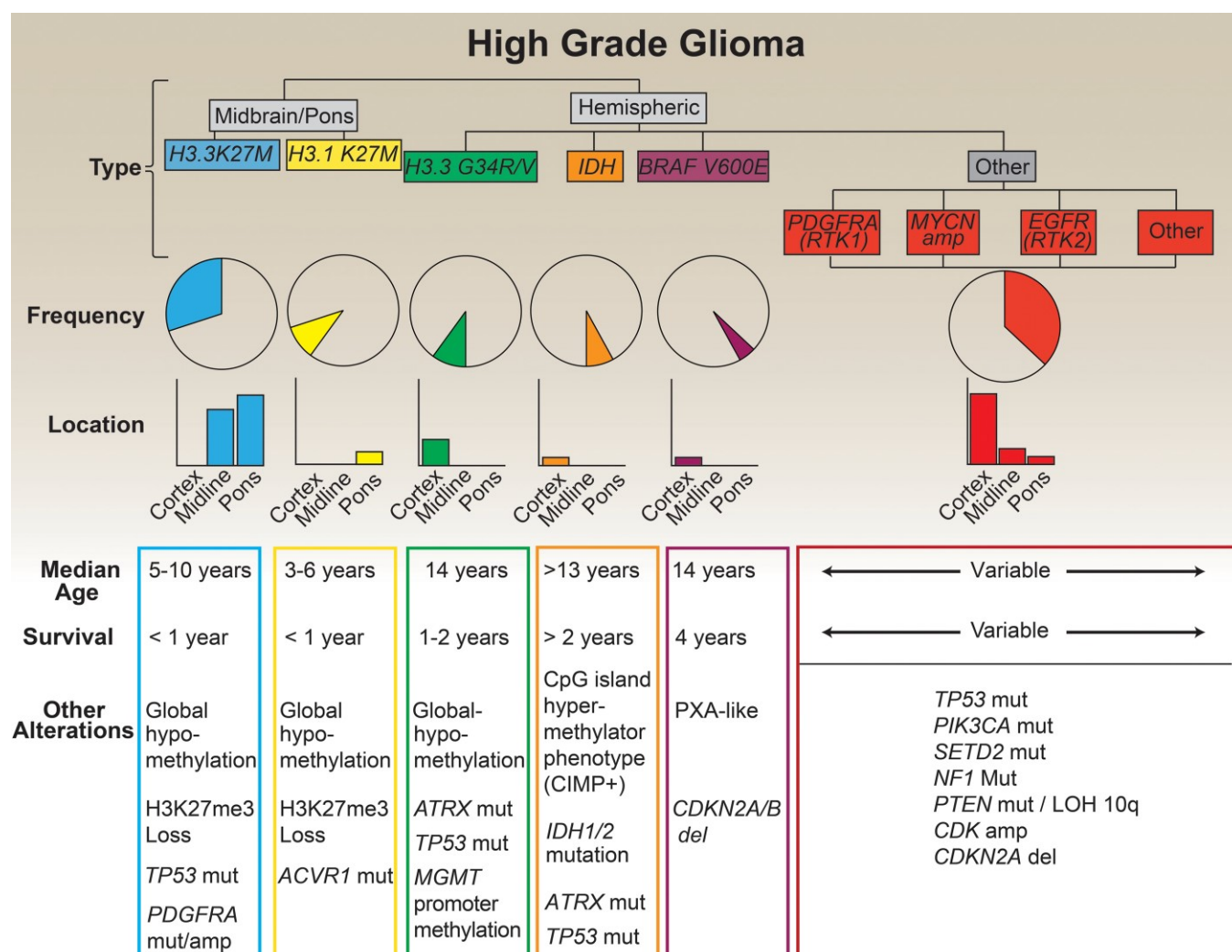


Figura 4. Ilustração esquemática dos diversos subgrupos de HGGs da infância que diferem com base na localização tumoral, idade ao diagnóstico e prognóstico. Além das alterações genéticas que definem os subgrupos, os tumores apresentam mutações (mut), amplificações (amp), deleções (del) e perda de heterozigosidade (LOH) em outros genes. Pollack IF, *et al.* 2019 [27].

1.3.3.2. Glioblastoma congênito

Os tumores cerebrais congênitos, definidos pela apresentação pré-natal ou nos primeiros meses de vida, representam menos de 2% de todos os tumores de SNC da infância [51]. O GBM congênito (*congenital glioblastoma* - cGBM) está entre os tipos mais raros de tumor cerebral congênito, com aproximadamente 120 casos descritos na literatura [52-62]. Ao contrário da maioria dos tumores cerebrais da infância, que frequentemente ocorrem na fossa posterior, o cGBM acomete principalmente o compartimento supratentorial, sobretudo os hemisférios cerebrais [52]. As estratégias terapêuticas para esse tumor incluem uma

combinação de ressecção cirúrgica, quimioterapia e radioterapia, e os pacientes costumam apresentar um prognóstico mais favorável em comparação ao GBM de criança e de adulto. No entanto, pacientes com cGBM que alcançaram uma sobrevida a longo prazo foram frequentemente submetidos a terapias intensivas com quimioterápicos agressivos [51].

Atualmente, as alterações genéticas mais comumente identificadas no cGBM envolvem os genes *ALK*, *ROS1*, *NTRK* e *MET*, sendo as fusões gênicas o achado molecular mais recorrente [52, 54]. Estudos recentes demonstraram que nos cGBMs as fusões *ZCCHC8-ROS1* e *PPP1CB-ALK* possuem um papel crítico na tumorigênese e o tratamento com inibidores de tirosina quinase (TKIs), que têm como alvo os genes *ROS1* e *ALK*, mostrou ser uma terapia alternativa eficaz para estes pacientes [54, 63]. Além disso, o cGBM possui um perfil molecular próprio, com características clínicas, biológicas e moleculares que diferem do GBM de criança e adulto, sugerindo que este tumor compreende uma nova entidade de tumor cerebral. No entanto, devido à sua raridade, ainda pouco se sabe acerca do papel dos eventos genéticos e moleculares na progressão do cGBM [51, 52].

1.4. Painel genético para as neoplasias da infância e adolescência

Os tumores cerebrais são uma das principais causas de morte relacionadas ao câncer em pacientes de 0 a 19 anos de idade. Em sua maioria, esses tumores apresentam prognósticos desfavoráveis, taxas de sobrevida relativamente estagnadas e poucas opções atuais de tratamento eficaz [1, 2]. Nos últimos anos, a aplicação de tecnologias de alto rendimento, como o NGS, permitiu a análise do perfil molecular tumoral no momento do diagnóstico, o refinamento da classificação tumoral em subgrupos clinicamente relevantes e até mesmo a reclassificação daqueles tumores de difícil diagnóstico na prática médica, possibilitando o direcionamento de terapias-alvo [7].

No entanto, as estratégias terapêuticas baseadas no perfil molecular tumoral para as neoplasias da infância ainda são limitadas em comparação às opções de tratamento para os

tumores de adulto. Além disso, tumores que acometem crianças apresentam alterações genéticas e moleculares distintas, com baixas taxas mutacionais e poucas variantes de nucleotídeo único (SNVs) e inserções ou deleções (InDels). Por outro lado, esses tumores possuem uma alta prevalência de variantes estruturais, como fusões gênicas, rearranjos cromossômicos e alterações no número de cópias do DNA (CNAs) [8].

A maioria dos painéis de NGS atuais são projetados para neoplasias de adultos e, portanto, não compreendem as principais alterações genéticas presentes nos tumores da infância e adolescência [9, 10]. O *Oncomine Childhood Cancer Research Assay*[®] (OCCRA[®]) é o primeiro painel, baseado em NGS, desenvolvido exclusivamente para a investigação genética das principais neoplasias que acometem crianças e adolescentes e inclui marcadores diagnósticos, prognósticos e terapêuticos que abordam um amplo espectro de tumores em um ensaio de sequenciamento de DNA e RNA. O OCCRA[®] é um painel desenvolvido pela Thermo Fisher Scientific[®] em parceria com o Children's Hospital Los Angeles e contém informações quanto à presença de SNVs (*single-nucleotide variants*), MNVs (*multi-nucleotide variants*), InDels (*insertions or deletions*), CNVs (*copy number variations*) e fusões gênicas. O painel OCCRA[®] utiliza baixas quantidade de DNA e RNA, o que é de particular relevância, uma vez que a biópsia de tumores da infância e adolescência consiste, frequentemente, em pequenos fragmentos. Além disso, seu conteúdo abrange 255 genes, 3069 amplicons e 1421 pares de primers de fusões gênicas e é compatível com diversos tipos amostrais, como tecidos tumorais fixados em formalina e embebidos em parafina, tecidos tumorais congelados e amostras de medula óssea e sangue periférico.

Desse modo, tendo em vista as disparidades entre os tumores de adulto e de criança no que diz respeito aos marcadores genéticos, a investigação do perfil molecular dos tumores de SNC da infância e adolescência, por meio de um painel de NGS específico, é essencial para a orientação prognóstica e terapêutica desses pacientes [10].

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar alterações moleculares, com potencial marcador prognóstico e alvo terapêutico nos EPNs e gliomas da infância e adolescência, utilizando a estratégia de NGS.

2.2. Objetivos Específicos

- 1) Investigar a presença de variantes genéticas de origem somática nas amostras de EPN e gliomas, utilizando a estratégia de NGS através de painel OCCRA[®], específico para as principais neoplasias da infância e adolescência.
- 2) Determinar o papel prognóstico e potencial alvo terapêutico das variantes genéticas identificadas, a partir da correlação dos resultados dos achados moleculares com os aspectos clínico-histopatológicos dos pacientes.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Amostras e parâmetros clínicos

Foram selecionados 156 pacientes diagnosticados e tratados no Instituto de Oncologia Pediátrica-GRAACC/UNIFESP (IOP-GRAACC/UNIFESP). A autorização dos pacientes participantes foi realizada através de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1). Para a investigação de variantes genéticas de origem somática foram selecionadas 156 amostras tumorais de SNC: 61 amostras de EPN e 95 amostras de gliomas. As 61 amostras de EPN foram categorizadas de acordo com o compartimento anatômico: 42 amostras de fossa posterior (68,8%) e 19 amostras de outras localizações tumorais, sendo 14 amostras supratentorial (22,9%) e cinco amostras de medula espinal (8,3%). As 95 amostras de gliomas foram classificadas de acordo com o grau tumoral: 39 amostras de LGGs (41,1%) e 56 amostras de HGGs (58,9%). Das 56 amostras de HGGs, quatro são de cGBM (7,1%). As amostras tumorais utilizadas no projeto fazem parte do Biobanco do IOP-GRAACC/UNIFESP (CONEP B-053) e o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (Anexo 2) e pelo Comitê Científico do IOP-GRAACC/UNIFESP (Anexo 3).

3.2. Características dos pacientes

3.2.1. Ependimoma

Foram selecionados 61 pacientes diagnosticados com EPN, acompanhados e tratados pelo IOP-GRAACC/UNIFESP entre os períodos de 2003 a 2020. A mediana de idade ao diagnóstico foi de 3,41 anos (intervalo: 0,72 – 17,08 anos) para os pacientes com PF-EPN, 4,75 anos (intervalo: 0,39 – 18,08 anos) para os pacientes com ST-EPN e de 6,5 anos (intervalo: 3,17 – 22,0 anos) para os pacientes do subgrupo SP-EPN. As amostras tumorais foram categorizadas de acordo com o tipo histológico e grau tumoral, baseado na

classificação atual dos tumores de SNC da OMS [15], sendo os subtipos EPN mixopapilar (grau I), EPN papilar (grau II), EPN (grau II) e EPN anaplásico (grau III). Os subgrupos PF-EPN e SP-EPN são compostos principalmente por tumores de grau II (61,7%), enquanto no ST-EPN a maioria dos tumores são de grau III (57,1%). Todos os pacientes foram submetidos à ressecção tumoral total, parcial ou biópsia e foram tratados com quimioterapia, radioterapia ou quimioterapia concomitante com radioterapia, seguindo técnicas e protocolos padrões. As características clínicas e histopatológicas dos pacientes diagnosticados com EPN, com base na localização tumoral, podem ser observadas na Tabela 1.

Tabela 1. Dados clínicos e histopatológicos dos pacientes diagnosticados com EPN

Parâmetros	Total (N=61)					
	Fossa Posterior		Supratentorial		Medula espinal	
	N=42		N=14		N=5	
	No.	%	No.	%	No.	%
Idade ao diagnóstico, anos						
Mediana	3,41		4,75		6,50	
Intervalo	0,72 – 17,08		0,39 - 18,08		3,17 - 22,00	
Média	5,14		5,88		14,45	
Desvio Padrão	4,06		5,51		6,90	
Gênero						
Masculino	26	62	7	50	5	100
Feminino	16	38	7	50	0	0
Tipo histológico						
EPN mixopapilar	0	0	0	0	2	40
EPN papilar	0	0	1	7	0	0
EPN	26	62	5	36	3	60
EPN anaplásico	16	38	8	57	0	0
Recidiva						
Sim	25	60	5	36	1	20
Não	17	40	9	64	4	80
Status atual						
Remissão completa	11	26	8	58	2	40
Em tratamento	3	7	3	21	1	20
Óbito	28	67	3	21	2	40
Tratamento						
Quimioterapia	5	12	1	8	0	0
Radioterapia	17	40	4	28	3	60
Quimioterapia + Radioterapia	18	43	4	28	1	20
Nenhum	2	5	5	36	1	20

EPN ependimoma

3.2.2. Gliomas

3.2.2.1. Gliomas de baixo grau e alto grau

Foram selecionados 95 pacientes diagnosticados com gliomas, acompanhados e tratados pelo IOP-GRAACC/UNIFESP entre os períodos de 2000 a 2020. A mediana de idade ao diagnóstico foi de 5,82 anos (intervalo: 0,38 – 16,67 anos) para os pacientes com LGGs e de 7,59 anos (intervalo: 0,0 – 18,75 anos) para os pacientes com HGGs.

As amostras tumorais foram categorizadas de acordo com o tipo histológico e grau tumoral, baseado na classificação atual dos tumores de SNC da OMS [15], sendo os subtipos: PA (grau I), ganglioglioma (grau I), astrocitoma (grau II), astrocitoma pilomixóide (grau II), astrocitoma difuso (grau II), astrocitoma anaplásico (grau III), PXA anaplásico (grau III), ganglioglioma anaplásico (grau III), GBM (grau IV) e DIPG (grau IV). Os LGGs são compostos majoritariamente pelo PA (71,8%) e os HGGs incluem sobretudo o GBM (71,2%). Todos os pacientes foram submetidos à ressecção tumoral total, parcial ou biópsia e foram tratados com quimioterapia, radioterapia ou quimioterapia concomitante com radioterapia, seguindo técnicas e protocolos padrões. Os dados clínicos dos pacientes diagnosticados com gliomas, de acordo com o grau tumoral, podem ser observados na Tabela 2 e as características histopatológicas dos tumores podem ser encontradas na Tabela 3.

Tabela 2. Dados clínicos dos pacientes diagnosticadas com gliomas

Parâmetros	Total (N=95)			
	Gliomas de baixo grau		Gliomas de alto grau	
	N=39		N=56	
	No.	%	No.	%
Idade ao diagnóstico, anos				
Mediana	5,82		7,59	
Intervalo	0,38 - 16,67		0,0 - 18,75	
Média	6,88		8,51	
Desvio Padrão	4,47		5,79	
Gênero				
Masculino	23	59	24	43
Feminino	16	41	32	57
Localização tumoral				
Hemisférica	4	10	24	43
Diencefálica/Talâmica	1	3	14	26
Óptica/Suprasselar	3	8	1	2
Ventricular/Intraventricular	2	5	3	5
Fossa Posterior	29	74	7	12
Medula espinal	0	0	7	12
Recidiva				
Sim	6	15	11	20
Não	33	85	45	80
Status atual				
Remissão completa	22	56	11	19
Em tratamento	12	31	6	11
Óbito	5	13	39	70
Tratamento				
Quimioterapia	6	15	11	20
Radioterapia	2	5	9	16
Quimioterapia + Radioterapia	5	13	27	48
Nenhum	26	67	9	16

Tabela 3. Características histopatológicas dos gliomas

Grau tumoral	Histologia	Total (N=95)	
		No.	%
I	Astrocitoma pilocítico	28	30
	Ganglioglioma	1	1
II	Astrocitoma	2	2
	Astrocitoma pilomixóide	3	3
	Astrocitoma difuso	5	5
III	Astrocitoma anaplásico	9	10
	Xantoastrocitoma pleomórfico anaplásico	2	2
	Ganglioglioma anaplásico	1	1
IV	Glioblastoma	42	44
	Glioma pontino intrínseco difuso	2	2
		95	100

3.2.2.2. Glioblastoma congênito

Dos 56 pacientes com HGGs selecionados, quatro são portadores de cGBM, sendo todos do sexo feminino. O critério de classificação para os casos congênitos consistiu na observação de sintomas clínicos durante o exame pré-natal, ao nascimento, na primeira semana de vida ou nos três primeiros meses de vida [54]. Dentre os quatro pacientes com cGBM analisados, dois tiveram diagnóstico pós-natal, com média de idade ao diagnóstico de 1,3 meses, e dois pacientes foram diagnosticados durante o pré-natal. Todos os tumores são de localização hemisférica e acometem o compartimento supratentorial do SNC. A sobrevida global dos pacientes foi altamente variável, sendo a sobrevida global mínima de 2,1 dias e a máxima de 7,1 anos de idade. Análises de sobrevida dos quatro pacientes com cGBM revelaram uma média de sobrevida global de 5,3 anos (95% IC: 2,3 – 8,3) e taxa de sobrevida global em 5 anos de 75,0%. As características clínicas de cada paciente diagnosticado com cGBM selecionados para o estudo estão resumidas na Tabela 4.

Tabela 4. Dados clínicos dos pacientes diagnosticados com cGBM

Paciente	Gênero	Idade ao diagnóstico	Localização tumoral	Região do SNC	Tratamento	Status atual	Recidiva	Sobrevida global
1	Feminino	3 dias	Hemisférica	Parietal	Nenhum	Óbito	Não	2,1 dias
2	Feminino	2,5 meses	Hemisférica	Occipital	Quimioterapia + Radioterapia	Vivo	Não	7,1 anos
3	Feminino	Pré-natal	Hemisférica	Supratentorial	Quimioterapia	Vivo	Não	4,8 anos
4	Feminino	Pré-natal	Hemisférico	Temporal	Quimioterapia	Vivo	Não	2,6 anos

SNC sistema nervoso central

3.3. Extração e quantificação dos ácidos nucleicos (DNA e RNA)

Para a extração de moléculas das amostras tumorais foi utilizado o FastPrep®-24 Tissue Ruptor (MP Biomedicals®), um homogeneizador de alta velocidade para a lise de amostras biológicas. A extração de moléculas de DNA e RNA foi realizada utilizando o Kit AllPrep DNA/RNA mini kit (QIAGEN®). Após a extração, as amostras foram diluídas em água livre de nucleases e quantificadas em Nanodrop 2000® (Thermo Fisher Scientific®). A razão entre as absorbâncias 260nm e 280nm foi utilizada como controle de qualidade das extrações, uma vez que acusa contaminações por proteínas e compostos fenólicos. Foi adotada uma razão A260/280 esperada entre 1,6 e 1,8 para as moléculas de DNA, e entre 1,8 e 2,0 para as moléculas de RNA. Após a quantificação pelo Nanodrop 2000®, todas as amostras foram quantificadas pelo fluorômetro Qubit 3® (Thermo Fisher Scientific®), o qual utiliza fluorescentes específicos para cada ácido nucleico (Qubit RNA HS Assay Kit® e Qubit dsDNA HS Assay Kit®), fornecendo uma quantificação mais precisa. As concentrações finais obtidas foram de 1,4ng/μl para as amostras de DNA e 1,7ng/μl para as amostras de RNA. Somente as amostras com os padrões esperados foram utilizadas no estudo.

3.4. Síntese de DNA complementar

A síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada a partir de 20ng de RNA (13μl) utilizando o SuperScript IV VILO Master Mix® (Thermo Fisher Scientific®) e de acordo com o protocolo do fabricante. Após a extração, as amostras foram diluídas em água livre de

nucleases e armazenadas em freezer -80°C.

3.5. Sequenciamento de nova geração

Para o preparo das bibliotecas foram utilizadas 20ng de DNA (15µl) e 20ng de cDNA (13µl) de cada amostra tumoral, seguindo o protocolo do fabricante para o *Oncomine Childhood Cancer Research Assay*[®] (Thermo Fisher Scientific[®]). As bibliotecas de amplicons, com *barcodes* específicos para cada amostra, foram geradas a partir de DNA e cDNA e a amplificação clonal automatizada foi realizada no Ion Chef[™] System (Thermo Fisher Scientific[®]). Após a finalização do preparo, as bibliotecas foram carregadas no chip Ion 540[™] (Thermo Fisher Scientific[®]) e este inserido no sequenciador Ion S5[™] System (Thermo Fisher Scientific[®]).

3.6. Análise de sequenciamento

Para o sequenciamento foram utilizadas leituras (*reads*) de 200 pares de bases e a plataforma de sequenciamento Ion Torrent S5[™] System. Ao final da corrida de sequenciamento, a análise dos dados gerados foi realizada pelo sequenciamento em larga escala. A qualidade dos dados brutos de cada leitura foi avaliada através do software Torrent Suite[™] versão 5.2.1 (Thermo Fisher Scientific[®]) e foram selecionadas leituras de amplicons que apresentaram a razão entre as fitas *forward* e *reverse* $\geq 0,6$ e $\leq 1,4$. As leituras obtidas foram alinhadas com o genoma humano de referência hg19/GHCh37 dentro do Torrent Suite[™], e foram adotadas somente leituras com uma cobertura mínima de 2000x. Os arquivos BAM gerados foram analisados utilizando o software IGV (*Integrative Genomics Viewer*) e as variantes identificadas foram comparadas com bancos de dados como o COSMIC (*Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*), dbSNP (*Single Nucleotide Polymorphism Database*), ExAC (*The Exome Aggregation Consortium*).

3.7. Painei *Oncomine Childhood Cancer Research Assay*[®]

Todas as amostras tumorais foram submetidas ao NGS utilizando o painei OCCRA[®], projetado especificamente para a investigação genética das principais neoplasias que acometem crianças e adolescentes. Todos os genes compreendidos pelo painei OCCRA[®] podem ser observados na Figura 5. A análise de sequenciamento contém informações acerca de SNVs, InDels, CNVs e fusões gênicas. As variantes genéticas foram classificadas de acordo com sua classe (SNV ou InDel), efeito funcional (*missense*, *nonsense*, sinônimo, *frameshift insertion*, *frameshift deletion* e *nonframeshift*) e significado clínico (patogênica, provavelmente patogênica, significado incerto, neutra, provavelmente benigna, benigna e não reportada) de acordo com os valores de predição FATHMM (*Functional Analysis through Hidden Markov Model*), que variam de 0 – 1, sendo considerada patogênica a variante com valor de predição $\geq 0,7$. Para as CNVs, foram consideradas amostras com valores de MAPD (*Median of the Absolute values of all Pairwise Differences*) $\leq 0,35$. As características das variantes foram avaliadas usando os bancos de dados COSMIC, ClinVar (*Clinically Relevant Variation*) e VARSOME (*The Human Genomic Variant Search Engine*).

Comprehensive mutation coverage (86)					CNV (28)		Full exon coverage (44)			Fusion and expression (97)					Gene expression
ABL1	CSF1R	GATA2	MAP2K2	RAF1	ALK	IGF1R	APC	GATA3	RUNX1	ABL1	FGFR2	MEF2B	NUP214	SSBP2	BCL2
ABL2	CSF3R	GNAQ	MET	RET	BRAF	JAK1	ARID1A	GNA13	SMARCA4	ABL2	FGFR2	MET	NUP98	STAG2	BCL6
ALK	CTNNB1	H3F3A	MPL	RHOA	CCND1	JAK2	ARID1B	ID3	SMARCB1	AFF3	FGFR3	MKL1	NUTM1	STAT6	FGFR1
ACVR1	DAXX	HDAC9	MSH6	SETBP1	CDK4	JAK3	ATRX	IKZF1	SOCS2	ALK	FLT3	MLLT10	NUTM2B	TAL1	FGFR4
AKT1	DNMT3A	HIST1H3B	MTOR	SETD2	CDK6	KIT	CDKN2A	KDM6A	SUFU	BCL11B	FOSB	MIN1	PAX3	TCF3	IGF1R
ASXL1	EGFR	HRAS	NCOR2	SH2B3	EGFR	KRAS	CDKN2B	KMT2D	SUZ12	BCOR	FUS	MYB	PAX5	TFE3	MET
ASXL2	EP300	IDH1	NOTCH1	SH2D1A	ERBB2	MDM2	CEBPA	MYOD1	TCF3	BCR	GLI1	MYBL1	PAX7	TP63	MYCN
BRAF	ERBB2	IDH2	NPM1	SMO	ERBB3	MDM4	CHD7	NF1	TET2	BRAF	GLIS2	MYH11	PDGFB	TSLP	MYC
CALR	ERBB3	IL7R	NRAS	STAT3	FGFR1	MET	CRLF1	NF2	TP53	CAMTA1	HMG2A	MYH9	PDGFRA	TSPAN4	TOP2A
CBL	ERBB4	JAK1	NT5C2	STAT5B	FGFR2	MYC	DDX3X	PHF6	TSC1	CCND1	JAK2	NGO2	PDGFRB	UBTF	
CCND1	ESR1	JAK2	PAX5	TERT	FGFR3	MYCN	DICER1	PRPS1	TSC2	CIC	KAT6A	NCOR1	PLAG1	USP6	
CCND3	EZH2	JAK3	PDGFRA	TPMT	FGFR4	PDGFRA	EBF1	PSMB5	WHSC1	CREBBP	KMT2A	NOTCH1	RAF1	WHSC1	
CCR5	FASLG	KDM4C	PDGFRB	USP7	GLI1	PIK3CA	EED	PTCH1	WT1	CRLF2	KMT2B	NOTCH2	RANBP17	YAP1	
CDK4	FBXW7	KDR	PIK3CA	ZMYM3	GLI2		FAS	PTEN	XIAP	CSF1R	KMT2C	NOTCH4	RECK	ZMYND11	
CIC	FGFR2	KIT	PIK3R1				GATA1	RB1		DUSP22	KMT2D	NPM1	RELA	ZNF384	
CREBBP	FGFR3	KRAS	PPM1D							EGFR	LMO2	NR4A3	RET		
CRLF2	FLT3	MAP2K1	PTPN11							ETV6	MAML2	NTRK1	ROS1		
										EWSR1	MAN2B1	NTRK2	RUNX1		
										FGFR1	MECOM	NTRK3	SS18		

Figura 5. Ilustração de todos os genes compreendidos pelo painel OCCRA®. Thermo Fisher Scientific®, 2018 [64].

3.8. Análise dos dados

A análise estatística dos dados descritivos foi realizada utilizando o software IBM SPSS Statistics versão 21.0 (Armonk, NY: IBM Corp), *jamovi* versão 1.2 (The Jamovi Project, Sidney, AU) e GraphPad Prism versão 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) para Windows. As curvas de sobrevida global dos pacientes em 5 anos e em 10 anos foram geradas pelo método de Kaplan-Meier, admitindo um intervalo de confiança de 95% (95% IC). Comparações entre as curvas de sobrevida foram realizadas pelo teste de Log-rank (Mantel-Cox) e foi admitido um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Ependimoma

4.1.1. Análise das variantes genéticas detectadas nas amostras tumorais

Variantes genéticas de origem somática foram identificadas em 24 das 61 (39,3%) amostras de EPN sequenciadas na nossa instituição, sendo 15 amostras de PF-EPN (15/42=35,7%), oito amostras de ST-EPN (8/14=57,1%) e uma amostra de SP-EPN (1/5=20,0%). Foram observados 18 genes alterados com 23 variantes genéticas, as quais incluem 10 SNVs (43,5%), seis InDels (26,1%), cinco CNVs (21,7%) e duas fusões gênicas (8,7%).

Os genes *ASXL1* e *CIC* foram os genes mais comumente detectados, cada um observado em seis amostras de EPN. Os genes *ABL2*, *JAK2*, *KMT2D* também foram frequentes, cada um identificado em três amostras tumorais. A distribuição de todos os 18 genes alterados nas amostras de EPN, de acordo com a localização tumoral, pode ser observada na Figura 6. Foram identificados 10 e 12 genes alterados nas amostras de PF-EPN (Figura 6a) e ST-EPN (Figura 6b), respectivamente. Nas amostras do subgrupo SP-EPN, o gene *ASXL1* foi o único gene alterado (Figura 6b).

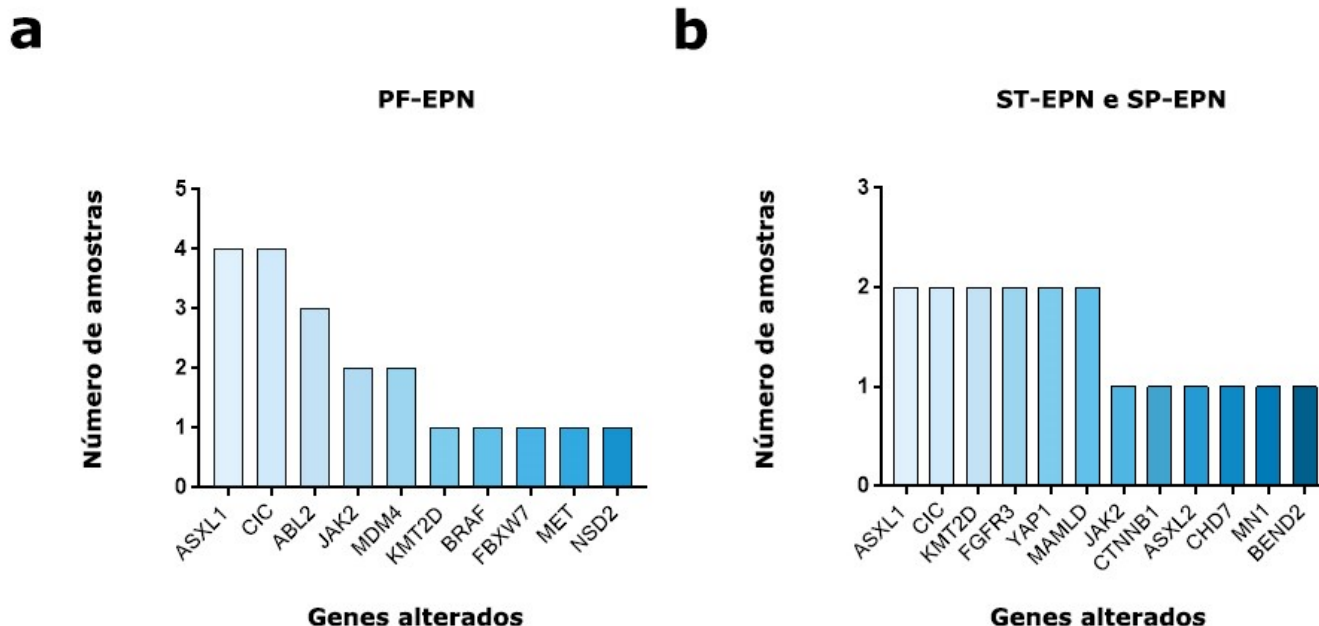


Figura 6. Distribuição dos genes alterados nas amostras de EPN. Genes presentes em (a) amostras de PF-EPN e (b) amostras de ST-EPN e SP-EPN.

As SNVs foram responsáveis pela maioria das variantes genéticas presentes nas amostras de EPN e foram identificadas em 12 amostras de PF-EPN, cinco amostras de ST-EPN e uma amostra de SP-EPN. Variantes da classe InDel foram detectadas em seis amostras tumorais, sendo três de PF-EPN e três de ST-EPN. As CNVs foram observadas exclusivamente em três amostras de PF-EPN e envolvem os genes *ABL2* e *MDM4*. Em contraste, fusões gênicas foram identificadas somente nas amostras de ST-EPN. A fusão entre o exon 5 do gene *YAP1* e o exon 3 do gene *MAML2* (*YAP1-MAML2*) foi observada em duas amostras, e a fusão entre o exon 1 do gene *MN1* e o exon 7 do gene *BEND2* (*MN1-BEND2*) foi detectada em uma amostra tumoral.

As características das variantes genéticas identificadas nas amostras de EPN podem ser observadas na Figura 7. O cromossomo 20 apresentou o maior número de variantes (19,0%), visto que o gene *ASXL1* está localizado na região 20q11.21 e foi o gene mais frequentemente alterado nas amostras tumorais (Figura 7a). As variantes genéticas de efeito funcional *missense* e *frameshift insertion* foram as mais recorrentes, responsáveis por 43,8% e 31,3% dos casos, respectivamente. Variantes *nonsense* foram observadas em 12,5% dos casos e

variantes de efeito *nonsense* e *frameshift deletion* foram responsáveis por 6,2% dos casos cada uma (Figura 7b). De todas as variantes analisadas, 62,5% são classificadas como patogênicas, 31,2% são provavelmente patogênicas e 6,3% são provavelmente benignas (Figura 7c).

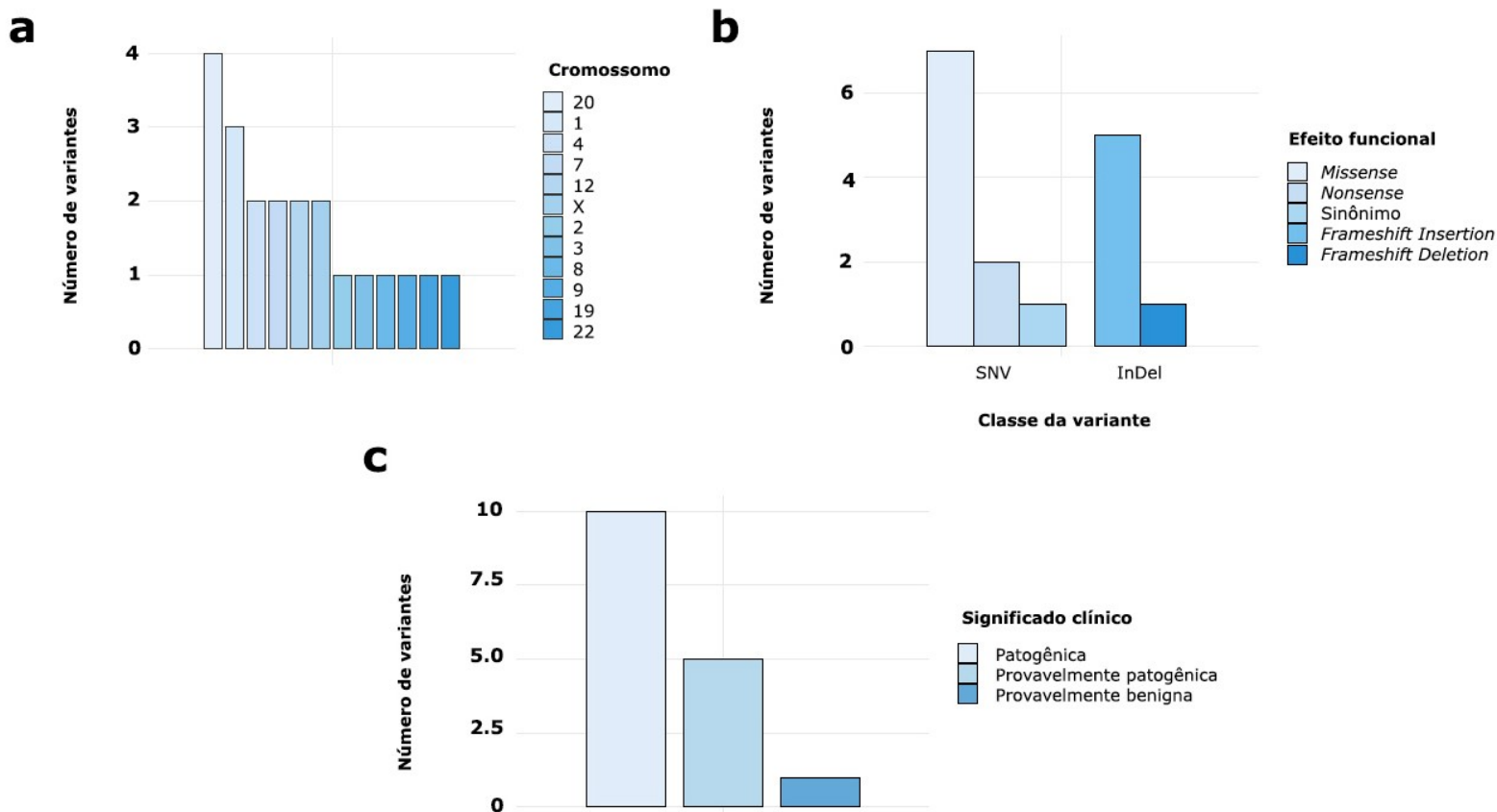


Figura 7. Características das variantes genéticas identificadas nas amostras de EPN. Distribuição das variantes de acordo com (a) localização cromossômica, (b) efeito funcional e (c) significado clínico.

4.1.2. Curvas de sobrevida global

Os pacientes diagnosticados com EPN foram observados desde a data de diagnóstico até o último contato ou óbito. A mediana de tempo de acompanhamento dos pacientes foi de 37,85 meses para o subgrupo PF-EPN, 63,91 meses para o ST-EPN e 123,70 meses para o SP-EPN (Tabela 5). Análises de sobrevida dos 61 pacientes com EPN revelaram uma mediada de sobrevida global de 73,83 meses (95% IC: 28,85 – 118,81) e taxa de sobrevida global em 10 anos de 45,9%. Além disso, as curvas de Kaplan-Meier mostraram uma diferença estatística significativa de tempo de sobrevida entre os subgrupos de EPN ($\chi^2=9,51$,

$p<0,0086$) (Figura 8), visto que os pacientes diagnosticados com PF-EPN tiveram uma taxa de sobrevida global em 10 anos (22,8%) inferior à taxa de sobrevida dos pacientes com ST-EPN (71,6%) ($p<0,007$) (Tabela 5). As comparações das curvas de sobrevida global dos subgrupos de EPN pelo teste de Log-rank podem ser encontradas na Tabela 6.

Tabela 5. Tempo de acompanhamento e sobrevida dos pacientes com EPN

Localização tumoral	Tempo de acompanhamento, meses				Sobrevida global em 10 anos
	Mediana	Intervalo	Média	DP	Taxa
Fossa Posterior (PF)	37,85	0,88 – 176,68	53,06	44,42	22,8%
Supratentorial (ST)	63,91	4,91 – 208,81	77,72	56,69	71,6%
Medula espinal (SP)	123,7	20,85 – 161,11	107,77	52,94	50,0%

DP desvio padrão

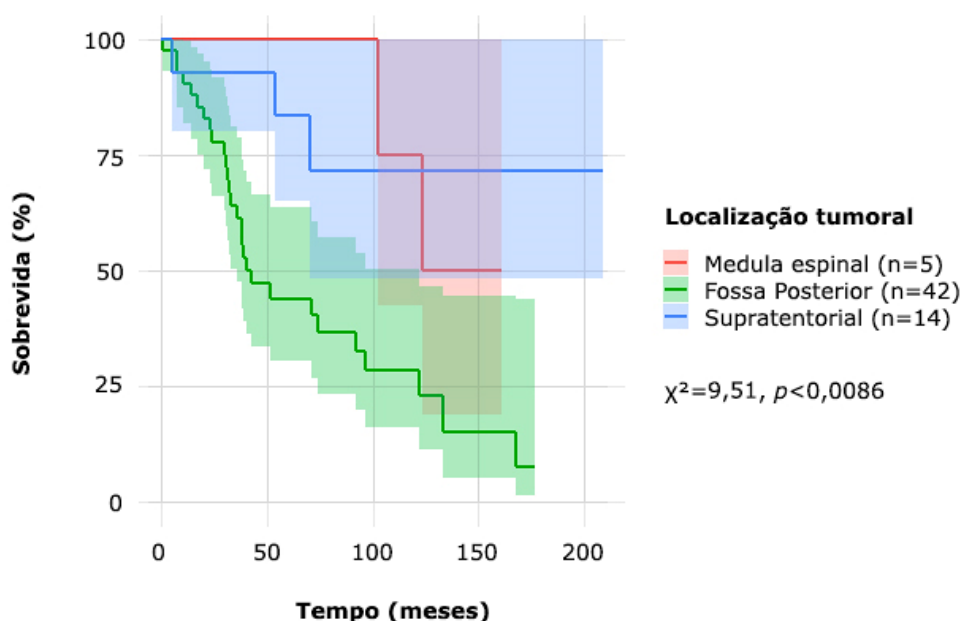


Figura 8. Curvas de sobrevida global dos EPNs. As curvas de sobrevida mostraram uma diferença estatística significativa entre os subgrupos de EPN ($\chi^2=9,51, p<0,0086$).

Tabela 6. Comparação das curvas de sobrevida global dos subgrupos de EPN pelo teste de Log-rank

Teste de Log-rank			v	EP	z	p
Medula espinal (SP)	Fossa Posterior (PF)	Log-rank	3,4817	2,0	1,698	0,090
Medula espinal (SP)	Supratentorial (ST)	Log-rank	-0,0875	1,0	-0,082	0,934
Fossa Posterior (PF)	Supratentorial (ST)	Log-rank	-6,9207	2,5	-2,691	0,007

EP erro padrão

4.1.3. Perfil molecular e clínico dos pacientes investigados

A análise do perfil genômico dos EPNs foi realizada para avaliar uma possível associação entre as variantes genéticas detectadas pelo painel OCCRA® e as seguintes características clínicas dos pacientes: idade ao diagnóstico, gênero, status atual, grau tumoral e localização do tumor (Figura 9). O perfil das variantes genéticas pode ser observado na Tabela 7.

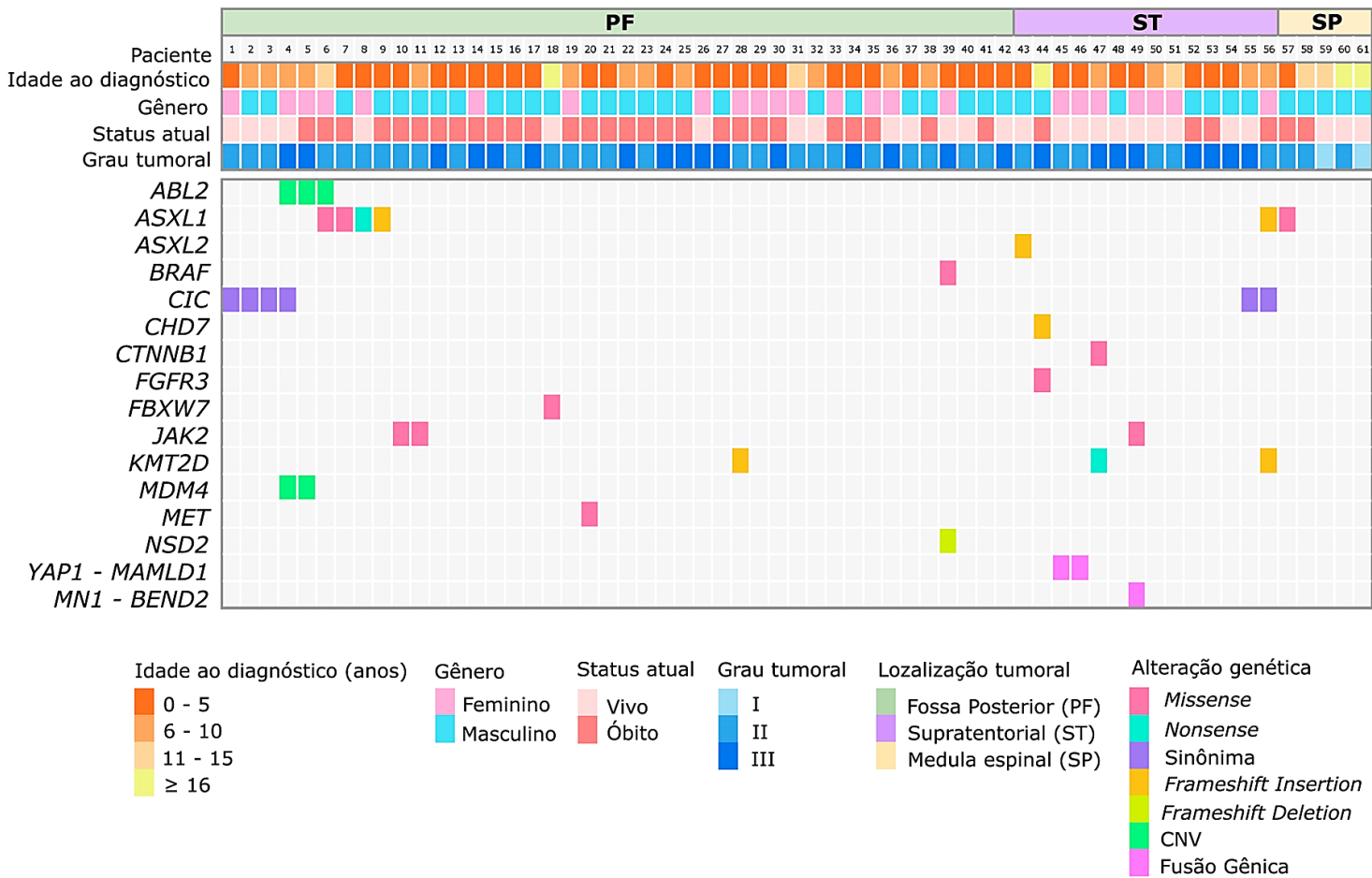


Figura 9. Perfil genômico das 61 amostras de EPN. Cada barra vertical ilustra um caso individual.

Tabela 7. Perfil das variantes genéticas detectadas nas amostras de EPN

Gene	Códon	Mudança de aminoácido	Classe da variante	Efeito da variante	Significado clínico	No. amostras
<i>ABL2</i>	N/A	N/A	CNV	N/A	N/A	3
<i>ASXL1</i>	c.3306G>T	p.Glu1102Asp	SNV	<i>Missense</i>	Patogênica	3
	c.2077C>T	p.Arg693Ter	SNV	<i>Nonsense</i>	Patogênica	1
	c.2322_2323delAT	p.Arg774fs	InDel	<i>Frameshift insertion</i>	Provavelmente patogênica	1
	c.1953_1954insA	p.Gly652fs	InDel	<i>Frameshift insertion</i>	Provavelmente patogênica	1
<i>ASXL2</i>	c.2978_2979insG	p.Ile994fs	InDel	<i>Frameshift insertion</i>	Patogênica	1
<i>BEND2</i>	N/A	N/A	Fusão	N/A	N/A	1
<i>BRAF</i>	c.1387A>G	p.Ile463Val	SNV	<i>Missense</i>	Provavelmente patogênica	1
<i>CHD7</i>	c.1939_1940insA	p.Ser647fs	InDel	<i>Frameshift insertion</i>	Patogênica	1
<i>CIC</i>	c.4533C>T	p.Arg1512Cys	SNV	Sinônima	Patogênica	6
<i>CTNNB1</i>	c.104T>G	p.Ile35Ser	SNV	<i>Missense</i>	Patogênica	1
<i>FBXW7</i>	c.1394G>A	p.Arg465His	SNV	<i>Missense</i>	Patogênica	1
<i>FGFR3</i>	c.1150T>C	p.Phe384Leu	SNV	<i>Missense</i>	Provavelmente benigna	1
<i>JAK2</i>	c.1711G>A	p.Gly571Ser	SNV	<i>Missense</i>	Patogênica	3
<i>KMT2D</i>	c.6184C>T	p.Gln2062Ter	SNV	<i>Nonsense</i>	Patogênica	1
	c.6554_6555insC	p.Glu2186fs	InDel	<i>Frameshift insertion</i>	Provavelmente patogênica	2
<i>MAMLD1</i>	N/A	N/A	Fusão	N/A	N/A	2
<i>MDM4</i>	N/A	N/A	CNV	N/A	N/A	2
<i>MET</i>	c.3029C>T	p.Thr1010Ile	SNV	<i>Missense</i>	Patogênica	1
<i>MNI</i>	N/A	N/A	Fusão	N/A	N/A	1
<i>NSD2</i>	c.4028delC	p.Pro1343fs	InDel	<i>Frameshift deletion</i>	Provavelmente patogênica	1
<i>YAPI</i>	N/A	N/A	Fusão	N/A	N/A	2

N/A não se aplica, SNV *single-nucleotide variant*, InDel *insertion-deletion*, CNV *copy number variation*

4.1.3.1. Investigação das alterações moleculares mais frequentes

A variante genética c.4533C>T do gene *CIC* foi a variante mais comum, identificada em seis amostras tumorais de pacientes com características clínicas distintas, sendo quatro PF-EPN e dois ST-EPN. A variante c.4533C>T de *CIC* é patogênica de efeito sinônimo e já foi descrita como polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) sobretudo em meningioma e hemangioblastoma [65, 66]. O gene *CIC* atua como um supressor tumoral de genes que fazem parte da via de sinalização de receptores de tirosina quinase (RTKs)/*Ras*/*MAPK* [67]. Os componentes da via de sinalização de RTKs regulam inúmeros processos biológicos, como proliferação, diferenciação e migração celular e a desregulação desta via pode acarretar em diversas doenças, principalmente no surgimento de neoplasias [68]. Ainda, estudos já demonstraram que o gene *CIC* está envolvido na progressão tumoral, particularmente no oligodendroglioma e GBM [69-72]. Alterações no gene *CIC*, localizado em 19q13.2, ocorrem em aproximadamente 70% dos oligodendrogliomas que apresentam deleção combinada das regiões cromossômicas 1p e 19q. Nesses tumores, a maioria das alterações de *CIC* observadas, como o aparecimento prematuro de códons de parada, inserções *frameshift* e deleções, são mutações com perda função que neutralizam a atividade repressora de *CIC* [73, 74] e estão associadas a um pior prognóstico [67]. No entanto, a variante c.4533C>T de *CIC* comumente identificada nas nossas amostras tumorais é resultado de uma mutação *hotspot* com ganho de função e ainda não havia sido descrita em amostras de EPN.

No presente estudo, o gene *ASXL1* apresentou o maior número de variantes e foi observado em seis amostras tumorais. As variantes de *ASXL1* incluem duas SNVs, uma de efeito *missense* e uma substituição *nonsense*, e duas InDels de efeito *frameshift insertion*. A variante do gene *ASXL1* mais comumente detectada nas amostras de EPN foi a variante c.3306G>T, patogênica e de efeito *missense*, identificada em três amostras de EPN grau II de pacientes que morreram devido à progressão da doença, sendo duas amostras de PF-EPN

e uma amostra de SP-EPN. Alterações no gene *ASXL1*, responsável por regular funções epigenéticas, já foram descritas principalmente em neoplasias mieloides e estudos prévios demonstraram que nestes tumores a maioria das variantes, que são de efeito *nonsense* e *frameshift*, estão associadas à um pior prognóstico, enquanto a relevância funcional das variantes *missense* ainda não é clara [75, 76]. Até o presente momento, nos tumores de SNC, variantes do gene *ASXL1* foram relatadas somente em amostras de DIPG [77]. A variante c.3306G>T de *ASXL1*, recorrente nas nossas amostras tumorais, já foi identificada em síndromes mielodisplásicas, mielofibrose, leucemia mielóide crônica e aguda, hemangioblastoma e adenocarcinoma de pulmão, porém, a mesma ainda não havia sido descrita em amostras de EPN [78-85].

Adicionalmente, a variante c.3306G>T de *ASXL1* foi a única alteração genética identificada nos EPNs de localização medular. Os EPNs primários de medula espinal são tumores extremamente raros em crianças e adolescentes, representando menos de 13% de todos os EPNs da infância, e surgem frequentemente entre os 10 a 14 anos de idade. Dentre os EPNs de medula espinal que acometem crianças, os tumores de grau II representam o subtipo mais recorrente, seguido pelo EPN mixopapilar e EPN anaplásico, sendo este último o subtipo histológico mais incomum [86]. Os EPNs medulares de grau II da infância são, em sua maior parte, tumores intramedulares de crescimento lento que apresentam altas taxas de sobrevida global que podem atingir 90 a 100% em 5 anos [87]. No entanto, ao contrário dos achados clínicos comumente relatados na literatura para esse tumor, o nosso paciente com SP-EPN de grau II, positivo para a variante c.3306G>T de *ASXL1*, teve idade ao diagnóstico inferior a 5 anos, foi submetido à diversas ressecções neurocirúrgicas e morreu devido à progressão da doença.

Além dos genes *CIC* e *ASXL1*, a variante patogênica e de efeito *missense* c.1711G>A do gene *JAK2*, foi um evento genético recorrente nas nossas amostras tumorais. Essa variante

de *JAK2* foi observada em três amostras de localizações distintas, sendo duas de PF-EPN e uma de ST-EPN. O gene *JAK2* codifica uma tirosina quinase não receptora responsável pela sinalização de citocinas e fatores de crescimento e a via *JAK2/STAT3* é essencial na regulação da resposta imune assim como na proliferação, sobrevivência e diferenciação celular, desempenhando, conseqüentemente, um papel crítico no processo de oncogênese. Em alguns tumores, já foi demonstrado que altas expressões de *JAK2/STAT3* estão associadas a um pior prognóstico clínico e resistência à quimioterapia [88]. Ainda, estudos revelaram que em GBM a inibição de *JAK2/STAT3* retarda a progressão tumoral e em EPN, inibidores desta via são agentes terapêuticos promissores para o tratamento de tumores intrinsecamente resistentes à quimioterapia, como o EPN intracranial da infância. A variante c.1711G>A do gene *JAK2*, observada nas nossas amostras tumorais e previamente descrita em hemangioblastoma, carcinoma de nasofaringe e neoplasias mieloproliferativas crônicas [89-92], representa um evento chave nas malignidades hematológicas [92, 93]. Ainda assim, atualmente pouco se sabe a respeito do papel de *JAK2* na tumorigênese dos EPNs da infância e adolescência [94, 95].

Na amostra de ST-EPN, classificada como tumor anaplásico (grau III), além da variante c.1711G>A de *JAK2*, foi detectada a fusão *MNI-BEND2*. Recentemente, Sturm *et al.* (2016) descreveram uma nova entidade de tumores de SNC, os tumores neuroepiteliais de alto grau com alterações no gene *MNI* (HGNET-MN1), que são caracterizados por padrões globais de metilação e fusões gênicas que têm o *MNI* como alvo, sendo o *BEND2* o gene parceiro mais comum [96]. Aproximadamente 1/3 dos HGNET-MN1 são histologicamente diagnosticados como astroblastoma, um tumor glial raro de crianças e jovens adultos, com uma predominância feminina, e que tipicamente acomete a região supratentorial, sobretudo os hemisférios cerebrais [97, 98]. Assim como descrito na literatura, nossos achados incluem uma paciente do sexo feminino com tumor supratentorial e positivo para a fusão *MNI-*

BEND2. Nesse contexto, como os tumores cerebrais compreendem diversos subgrupos moleculares, a investigação de seu perfil genômico, por meio da estratégia de NGS, permite o diagnóstico integrado e até mesmo a reclassificação tumoral, o que é de suma importância na rotina da prática clínica [99].

Embora os PF, ST e SP EPNs frequentemente difiram quanto os marcadores genéticos e moleculares [21], no nosso estudo, variantes dos genes *CIC* (c.4533C>T), *ASXL1* (c.3306G>T) e *JAK2* (c.1711G>A) foram observadas em amostras de EPN de diferentes localizações tumorais. Ainda, nossos resultados moleculares sugerem que as variantes dos genes *CIC*, *ASXL1* e *JAK2*, as quais já foram extensivamente relatadas em gliomas e neoplasias hematológicas, ainda não haviam sido descritas em amostras de EPN.

4.1.3.2. Ependimoma supratentorial e tumores *non-RELA-non-YAP1*

Estudos prévios que avaliaram o perfil molecular dos EPNs da infância já demonstraram que o ST-EPN difere dos EPNs de fossa posterior e de medula espinal [33]. Nos ST-EPNs da infância, fusões *C11orf95-RELA* representam a alteração genética mais frequente, enquanto as fusões *YAP1-MAMLD1* são eventos menos comuns. Das 14 amostras de ST-EPN investigadas no presente estudo, duas apresentaram fusões *YAP1-MAMLD1* e curiosamente, fusões *C11orf95-RELA* não foram identificadas. As amostras de ST-EPN de grau II, positivas para a fusão *YAP1-MAMLD1*, são provenientes de duas pacientes do sexo feminino que estavam vivas no momento da análise, ambas diagnosticadas com menos de 5 anos, sendo as idades ao diagnóstico de 1,3 anos e 4,7 meses (média de 0,84 anos). Além disso, as curvas de sobrevida global dos pacientes revelaram uma diferença estatística significativa entre os subgrupos de ST-EPN e PF-EPN, na qual os pacientes com ST-EPN obtiveram um melhor prognóstico clínico, com taxas de sobrevida global em 10 anos de 71,6%, quando comparados aos pacientes com PF-EPN. Nossos achados corroboram com os poucos casos de ST-EPN-YAP1 relatados até o presente momento, os quais sugerem que

fusões *YAPI-MAMLD1* são observadas especialmente em pacientes do sexo feminino, menores de 3 anos idade, e estão associadas a um bom prognóstico [36].

A partir da análise do perfil de metilação dos EPNs, Pajtler *et al.* (2015) propuseram que além dos tumores com fusões *RELA* e *YAPI*, somente os subependimomas são encontrados no compartimento supratentorial [19]. A ausência de fusões gênicas ou de outras alterações genéticas recorrentes são características predominantes do subgrupo de ST-SE, que incluem majoritariamente tumores de grau I de pacientes adultos [19, 35]. No entanto, análises mais recentes identificaram ST-EPNs, sem fusões *RELA* ou *YAPI*, que não se enquadram no subgrupo ST-SE [34, 35]. Em um estudo publicado em 2021, Zschoernack *et al.* investigaram uma coorte de ST-EPNs da infância, ausente para essas fusões convencionais, denominada *non-RELA-non-YAPI* (NRNY) [37]. Os tumores NRNY foram categorizados em subgrupos distintos com base nos seus atributos histológicos predominantes, sugerindo que estes ST-EPNs representam uma entidade biológica distinta. Essas evidências atuais indicam que, além dos subgrupos moleculares de EPN já estabelecidos, existem pelo menos mais dois novos subgrupos de ST-EPNs – EPN semelhante ao subtipo *RELA* (*RELA-like*) e EPN tanicítico. O subgrupo *RELA-like* são tumores de grau III que, embora não apresentem expressão nuclear de p65/RelA, um marcador para a ativação da via de sinalização *NF- κ B*, são histologicamente semelhantes ao subgrupo ST-EPN-RELA. Por outro lado, os ST-EPNs do subgrupo tanicítico são, em sua maioria, tumores de grau II com 50% dos casos exibindo genoma balanceado [37].

No nosso estudo, nenhuma variante genética foi detectada em seis das 14 (42,8%) amostras de ST-EPN, as quais incluem principalmente tumores de grau II e III. Ainda, as seis amostras de ST-EPN ausentes para as fusões *RELA* e *YAPI* não exibiram as características clínico-histopatológicas típicas do subgrupo ST-SE. Portanto, a identificação de uma nova entidade de ST-EPN sem alterações genéticas recorrentes ou fusões *RELA/YAPI*, os NRNY,

permite uma classificação refinada e adicional dos EPNs da infância por meio da integração do diagnóstico histológico e genético destes tumores [37].

4.2. Gliomas

4.2.1. Análise das variantes genéticas detectadas nas amostras tumorais

Variantes genéticas de origem somática foram identificadas em 76 das 95 (80,0%) amostras de gliomas sequenciadas na nossa instituição, sendo 33 amostras de LGGs (33/39=84,6%) e 43 amostras de HGGs (43/56=76,8%). Foram observados 51 genes alterados com 123 variantes genéticas, as quais incluem 60 SNVs (48,8%), 22 InDels (17,9%), 29 CNVs (23,6%) e 12 fusões gênicas (9,7%). Os eventos genéticos mais recorrentes nos LGGs foram as fusões *KIAA1549-BRAF* e variantes do gene *BRAF*, enquanto as variantes genéticas mais comumente detectadas nas amostras de HGGs envolvem os genes *H3F3A*, *TP53* e *ATRX*. A distribuição de todos os 51 genes alterados nas amostras de gliomas pode ser observada na Figura 10.

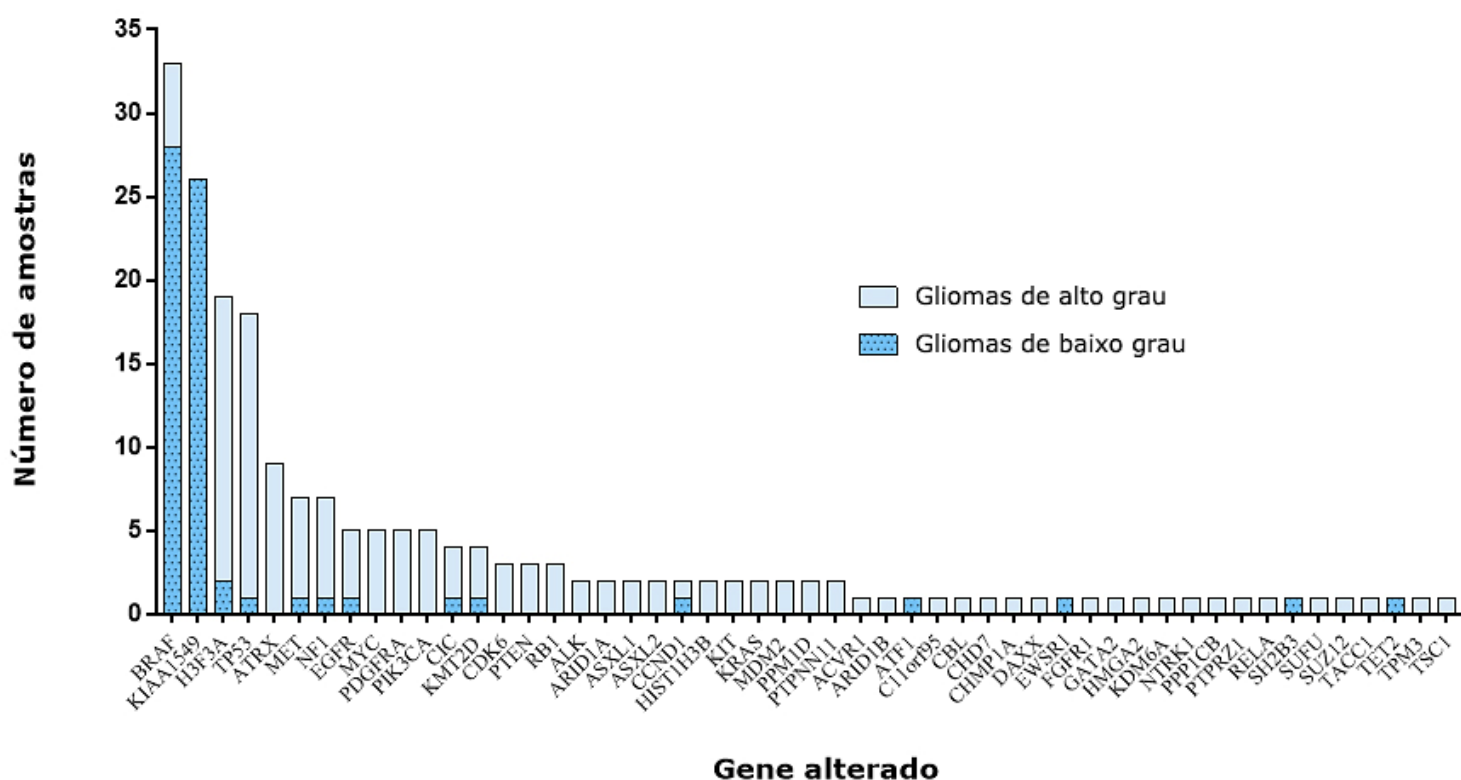


Figura 10. Distribuição dos genes alterados nas amostras de gliomas. Os genes mais frequentemente alterados nas amostras tumorais incluem os genes *BRAF*, *KIAA1549*, *H3F3A*, *TP53* e *ATRX*.

Nas amostras de HGGs, variantes das classes SNV, InDel e CNV foram identificadas em 32 (43,1%), 16 (24,6%) e 15 (23,1%) amostras, respectivamente, e as fusões gênicas foram eventos menos comuns, observadas em seis (9,2%) amostras tumorais. Em contraste, nos LGGs as fusões gênicas foram responsáveis pela maioria das alterações genéticas e foram identificadas em 27 (75,0%) amostras tumorais, das quais 26 (96,3%) apresentaram fusões *KIAA1549–BRAF*. Nos LGGs, variantes das classes SNV, InDel e CNV foram menos frequentes, observadas em seis (16,7%), duas (5,6%) e uma (2,7%) amostra tumoral, respectivamente.

As características das variantes genéticas identificadas nas amostras de gliomas podem ser observadas na Figura 11. O cromossomo 17 apresentou o maior número de variantes (25,0%), seguido pelo cromossomo 7 (21,2%), visto que *TP53*, *KIAA1549* e *BRAF* foram os genes mais comumente alterados nas amostras tumorais e estão localizados em 17p13.1 e 7q34, respectivamente. (Figura 11a). Variantes de efeito funcional *missense* e *nonsense* foram as mais frequentes, responsáveis por 46,4% e 25,6% dos casos, respectivamente. Variantes *frameshift deletion* e *frameshift insertion* foram observadas em 19,5% e 6,1% dos casos, respectivamente, enquanto variantes de efeito sinônimo e *nonframeshift insertion* foram eventos menos recorrentes, cada uma observada em 1,2% dos casos (Figura 11b). De todas as variantes analisadas, 91,5% são classificadas como patogênicas, 6,1% são provavelmente patogênicas, 1,2% são neutras e 1,2% ainda não haviam sido relatadas (Figura 11c).

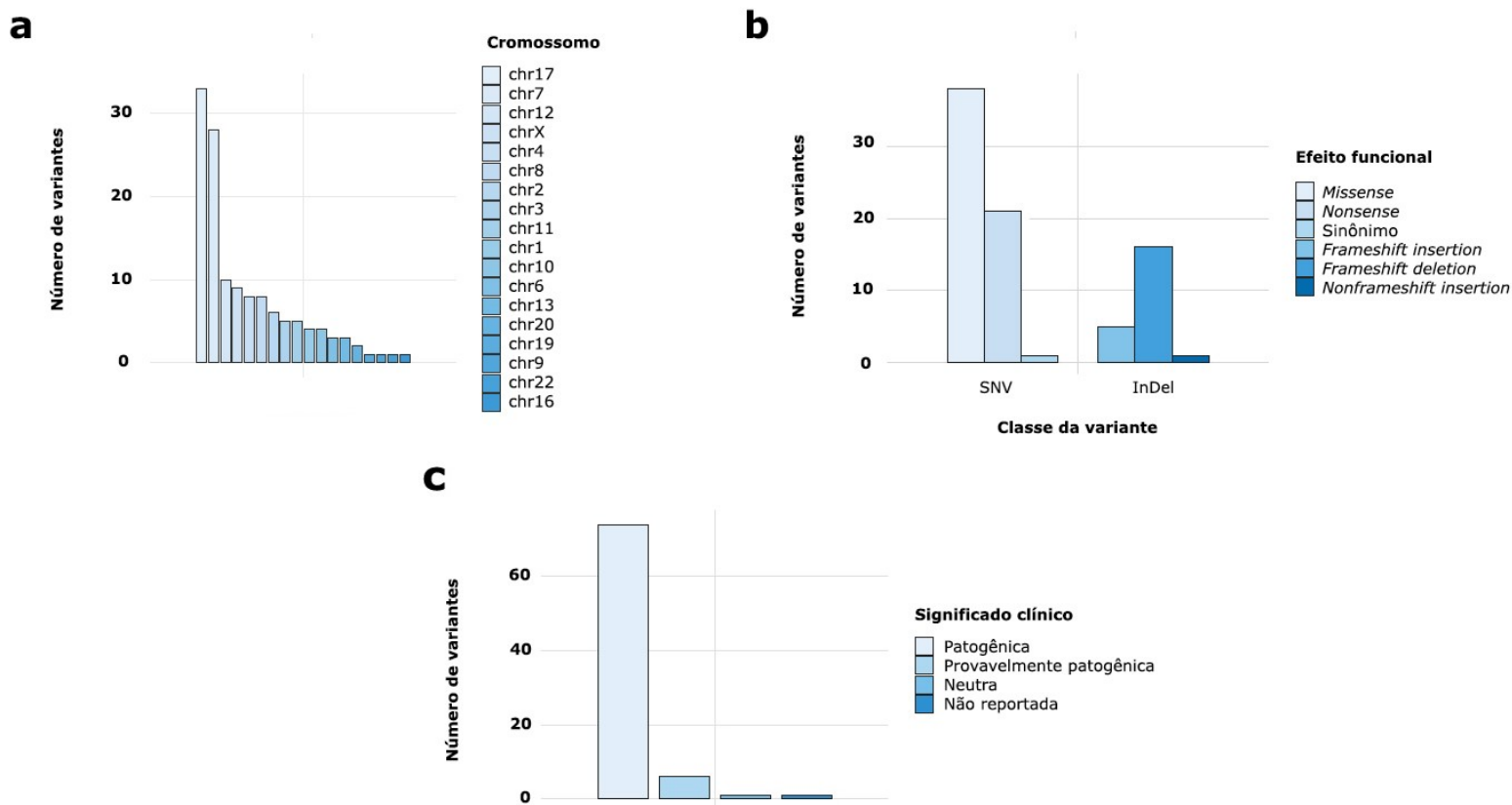


Figura 11. Características das variantes genéticas identificadas nas amostras de gliomas. Distribuição das variantes de acordo com (a) localização cromossômica, (b) efeito funcional e (c) significado clínico.

4.2.2. Curvas de sobrevida global

Os pacientes diagnosticados com gliomas foram observados desde a data de diagnóstico até o último contato ou óbito. A mediana de tempo de acompanhamento dos pacientes foi de 51,21 meses para os LGGs e 19,02 meses para os HGGs (Tabela 8). Análises de sobrevida revelaram que os pacientes com LGGs tiveram uma mediana de sobrevida global de 187,21 meses (95% IC: 182,58 – 191,84) e taxa de sobrevida em 5 anos e em 10 anos de 90,7% e 87,2%, respectivamente. Pacientes com HGGs apresentaram uma mediana de sobrevida global de 23,60 meses (95% IC: 10,39 – 36,82) e taxa de sobrevida em 5 anos e em 10 anos de 24,6% e 12,3%, respectivamente. Além disso, as curvas Kaplan-Meier mostraram uma diferença estatística significativa entre o tempo de sobrevida dos pacientes com LGGs e HGGs ($\chi^2=34,59$, $p<0,0001$) (Figura 12a) e entre o tempo de sobrevida dos pacientes com base no grau tumoral ($\chi^2=35,39$, $p<0,0001$) (Figura 12b).

Pacientes com tumores grau I e grau III foram responsáveis pela maior (100,0%) e menor (20,8%) taxa de sobrevida global em 5 anos, respectivamente ($p<0,001$) (Tabela 8). Além disso, apesar dos pacientes com tumores grau IV, como o GBM, terem apresentado uma taxa de sobrevida global em 5 anos (26,0%) superior à dos pacientes com tumores grau III (20,8%), esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,678$). Comparações pelo teste de Log-rank da sobrevida global dos gliomas, com base no grau tumoral, podem ser encontradas na Tabela 9.

Tabela 8. Tempo de acompanhamento e sobrevida dos pacientes com gliomas

Glioma	Grau tumoral	Tempo de acompanhamento, meses				Sobrevida global em 5 anos
		Mediana	Intervalo	Média	DP	Taxa
Gliomas de baixo grau	I	64,62	12,13 - 213,96	78,71	57,72	100,0%
	II	45,59	10,09 - 76,22	40,96	19,09	74,1%
Gliomas de alto grau	III	19,72	3,44 - 99,67	27,06	25,84	20,8%
	IV	19,01	0,06 - 169,44	34,85	39,02	26,0%

DP desvio padrão

Tabela 9. Comparação das curvas de sobrevida global dos gliomas de acordo com o grau tumoral pelo teste de Log-rank

Teste de Log-rank						
Grau tumoral			v	EP	z	p
I	II	Log-rank	1,26	0,75	1,69	0,090
I	III	Log-rank	6,76	1,309	5,169	< 0,001
I	IV	Log-rank	14,71	2,750	5,350	< 0,001
II	III	Log-rank	4,26	1,598	2,665	0,008
II	IV	Log-rank	5,42	2,354	2,304	0,021
III	IV	Log-rank	-1,04	2,499	-0,42	0,678

EP erro padrão

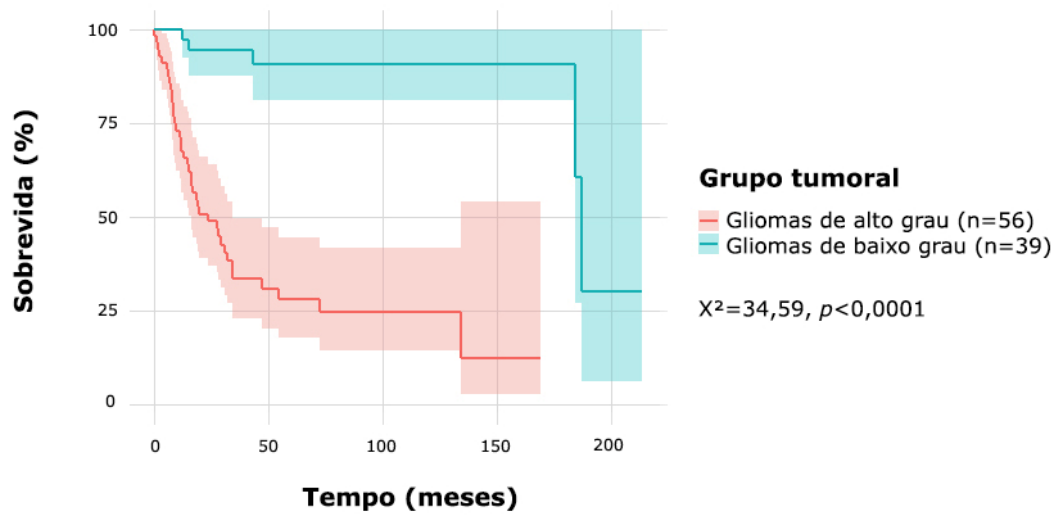
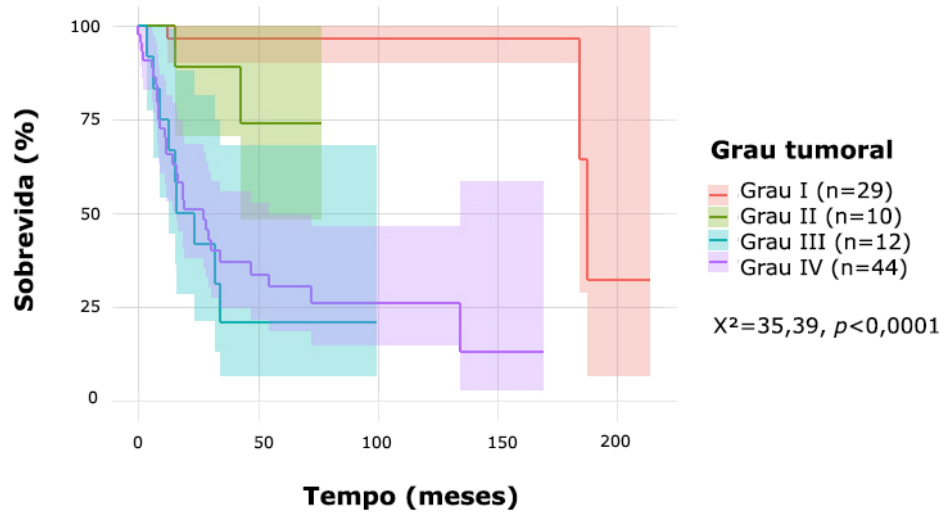
a**b**

Figura 12. Curvas de sobrevida global dos gliomas. As curvas de sobrevida mostraram uma diferença estatística significativa entre **(a)** os grupos de pacientes com HGGs e LGGs ($\chi^2=34,59, p<0,0001$) e **(b)** com base no grau tumoral ($\chi^2=35,39, p<0,0001$).

4.2.3. Perfil molecular e clínico dos pacientes investigados

A análise do perfil genômico dos gliomas foi realizada para avaliar uma possível associação entre as variantes genéticas detectadas pelo painel OCCRA[®] e as seguintes características clínicas dos pacientes: idade ao diagnóstico, gênero, status atual, histologia e localização tumoral (Figuras 13 e 14). O perfil das variantes genéticas pode ser observado na Tabela 10.

Tabela 10. Perfil das variantes genéticas detectadas nas amostras de gliomas

Gene	Códon	Mudança de aminoácido	Classe da variante	Efeito da variante	Significado clínico	No. amostras
<i>ACVR1</i>	c.983G>A	p.Gly328Glu	SNV	<i>Missense</i>	Patogênica	1
<i>ALK</i>	N/A	N/A	CNV	N/A	N/A	1
	N/A	N/A	Fusão	N/A	N/A	1
<i>ARID1A</i>	c.6259G>T	p.Gly2087Ter	SNV	<i>Nonsense</i>	Patogênica	1
	c.6317_6318insC	p.Asn2109fs	InDel	<i>Frameshift insertion</i>	Patogênica	1
<i>ARID1B</i>	c.5830C>T	p.Arg1944Ter	SNV	<i>Nonsense</i>	Patogênica	1
<i>ASXL1</i>	c.3306G>T	p.Glu1102Asp	SNV	<i>Missense</i>	Patogênica	1
	c.2580_2581delAG	p.Arg860fs	InDel	<i>Frameshift deletion</i>	Patogênica	1
<i>ASXL2</i>	c.2134G>T	p.Gly712Ter	SNV	<i>Nonsense</i>	Patogênica	1
	c.2332_2333insG	p.Pro778fs	InDel	<i>Frameshift deletion</i>	Patogênica	1
<i>ATF1</i>	N/A	N/A	Fusão	N/A	N/A	1
<i>ATRX</i>	c.3898A>T	p.Lys1300Ter	SNV	<i>Nonsense</i>	Patogênica	1
	c.4276C>T	p.Arg1426Ter	SNV	<i>Nonsense</i>	Patogênica	1
	c.3726C>A	p.Cys1242Ter	SNV	<i>Nonsense</i>	Patogênica	1
	c.2341C>T	p.Arg781Ter	SNV	<i>Nonsense</i>	Patogênica	1
	c.5527C>T	p.Gln1843Ter	SNV	<i>Nonsense</i>	Patogênica	2
	c.627delT	p.Ser210fs	InDel	<i>Frameshift deletion</i>	Patogênica	1
	c.6623_6626delATAC	p.Tyr2308fs	InDel	<i>Frameshift deletion</i>	Patogênica	1
	c.3334_3368delACTGA GAAATATTCCATGAA AGAAGATGGTTGAA	p.Thr1112fs	InDel	<i>Frameshift deletion</i>	Patogênica	1
<i>BRAF</i>	c.1799T>A	p.Val600Glu	SNV	<i>Missense</i>	Patogênica	6
	N/A	N/A	CNV	N/A	N/A	1
	N/A	N/A	Fusão	N/A	N/A	26
<i>C11orf95</i>	N/A	N/A	Fusão	N/A	N/A	1
<i>CBL</i>	c.1224G>T	p.Trp408Cys	SNV	<i>Missense</i>	Patogênica	1
<i>CCND1</i>	N/A	N/A	CNV	N/A	N/A	1
<i>CDK6</i>	N/A	N/A	CNV	N/A	N/A	3
<i>CHD7</i>	c.1939_1940insA	p.Ser647fs	InDel	<i>Frameshift insertion</i>	Patogênica	1
<i>CHMP1A</i>	N/A	N/A	Fusão	N/A	N/A	1
<i>CIC</i>	c.4533C>T	p.Arg1512Cys	SNV	<i>Sinônima</i>	Patogênica	4
<i>DAXX</i>	c.748C>T	p.Arg250Ter	SNV	<i>Nonsense</i>	Patogênica	1

<i>EGFR</i>	c.1793G>T	p.Gly598Val	SNV	<i>Missense</i>	Patogênica	1
	c.2573T>C	p.Leu858Pro	SNV	<i>Missense</i>	Patogênica	1
	c.2308_2309insCCAGCG TGG	p.Met766_Ala767 insAlaSerVal	InDel	<i>Nonframeshift insertion</i>	Provavelmente patogênica	1
	N/A	N/A	CNV	N/A	N/A	1
	N/A	N/A	Fusão	N/A	N/A	1
<i>EWSR1</i>	N/A	N/A	Fusão	N/A	N/A	1
<i>FGFR1</i>	N/A	N/A	Fusão	N/A	N/A	1
<i>GATA2</i>	c.959G>A	p.Gly320Asp	SNV	<i>Missense</i>	Patogênica	1
<i>H3F3A</i>	c.103G>A	p.Gly35Arg	SNV	<i>Missense</i>	Provavelmente patogênica	1
	c.83A>T	p.Lys28Met	SNV	<i>Missense</i>	Patogênica	18
<i>HIST1H3 B</i>	c.83A>T	p.Lys28Met	SNV	<i>Missense</i>	Patogênica	2
<i>HMG A2</i>	N/A	N/A	Fusão	N/A	N/A	1
<i>KDM6A</i>	c.47_48insGC	p.Ala17fs	InDel	<i>Frameshift insertion</i>	Patogênica	1
<i>KIAA1549</i>	N/A	N/A	Fusão	N/A	N/A	26
<i>KIT</i>	N/A	N/A	CNV	N/A	N/A	2
<i>KMT2D</i>	c.8454G>A	p.Trp2818Ter	SNV	<i>Nonsense</i>	Patogênica	1
	c.6554_6555insC	p.Glu2186fs	InDel	<i>Frameshift insertion</i>	Provavelmente patogênica	3
<i>KRAS</i>	N/A	N/A	CNV	N/A	N/A	2
<i>MDM2</i>	N/A	N/A	CNV	N/A	N/A	2
<i>MET</i>	c.2962C>T	p.Arg988Cys	SNV	<i>Missense</i>	Patogênica	1
	c.3029C>T	p.Thr1010Ile	SNV	<i>Missense</i>	Patogênica	1
	N/A	N/A	CNV	N/A	N/A	5
	N/A	N/A	Fusão	N/A	N/A	1
<i>MYC</i>	N/A	N/A	CNV	N/A	N/A	5
<i>NF1</i>	c.3916C>T	p.Arg1036Ter	SNV	<i>Nonsense</i>	Patogênica	1
	c.5305C>T	p.Arg1769Ter	SNV	<i>Nonsense</i>	Patogênica	1
	c.705C>G	p.Tyr235Ter	SNV	<i>Nonsense</i>	Patogênica	1
	c.2872_2878delACTCAA T	p.Thr958fs	InDel	<i>Frameshift deletion</i>	Patogênica	2
	c.3739_3742delTTTG	p.Phe1247fs	InDel	<i>Frameshift deletion</i>	Patogênica	2
	c.4332delG	p.Lys1444fs	InDel	<i>Frameshift deletion</i>	Patogênica	1
	c.5031_5035delCTATA	p.Tyr1678fs	InDel	<i>Frameshift deletion</i>	Patogênica	1
	c.1019_1020delCT	p.Ser340fs	InDel	<i>Frameshift deletion</i>	Patogênica	1
<i>NTRK1</i>	N/A	N/A	Fusão	N/A	N/A	1
<i>PDGFRA</i>	c.2524G>T	p.Asp842Try	SNV	<i>Missense</i>	Provavelmente patogênica	1
	N/A	N/A	CNV	N/A	N/A	4
<i>PIK3CA</i>	c.1624G>A	p.Glu542Lys	SNV	<i>Missense</i>	Patogênica	1
	c.3140A>G	p.His1047Arg	SNV	<i>Missense</i>	Patogênica	2
	c.3143A>G	p.His1048Arg	SNV	<i>Missense</i>	Provavelmente patogênica	1
	c.263G>A	p.Arg88Gln	SNV	<i>Missense</i>	Patogênica	1
	N/A	N/A	CNV	N/A	N/A	1
<i>PPM1D</i>	c.1403C>A	p.Ser468Ter	SNV	<i>Nonsense</i>	Patogênica	1
	c.1531_1544delAAAAA TTTGAAGAT	p.Lys511fs	InDel	<i>Frameshift deletion</i>	Patogênica	1
<i>PPP1CB</i>	N/A	N/A	Fusão	N/A	N/A	1
<i>PTPRZ1</i>	N/A	N/A	Fusão	N/A	N/A	1

<i>PTEN</i>	c.361G>A	p.Ala121Thr	SNV	Missense	Patogênica	1
	c.633C>A	p.Cys211Ter		Nonsense	Patogênica	1
	c.389delG	p.Arg130fs	InDel	Frameshift deletion	Patogênica	1
<i>PTPN11</i>	c.215C>T	p.Ala72Val	SNV	Missense	Patogênica	2
<i>RBI</i>	c.1033C>T	p.Arg445Ter	SNV	Nonsense	Não reportada	1
	c.1741G>T	p.Gly581Ter	SNV	Nonsense	Patogênica	1
	c.1154_1161delTAATGATG	p.Lys385fs	InDel	Frameshift deletion	Patogênica	1
<i>RELA</i>	N/A	N/A	Fusão	N/A	N/A	1
<i>SH2B3</i>	c.622G>C	p.Glu208Gln	SNV	Missense	Patogênica	1
<i>SUFU</i>	c.436C>T	p.Arg146Ter	SNV	Nonsense	Patogênica	1
<i>SUZ12</i>	c.856C>T	p.Arg286Ter	SNV	Nonsense	Patogênica	1
<i>TACC1</i>	N/A	N/A	Fusão	N/A	N/A	1
<i>TET2</i>	c.5152G>T	p.Val1718Leu	SNV	Missense	Neutra	1
<i>TP53</i>	c.1024C>T	p.Arg342Ter	SNV	Nonsense	Patogênica	1
	c.405C>A	p.Cys135Ter	SNV	Nonsense	Patogênica	1
	c.469G>T	p.Val157Phe	SNV	Missense	Provavelmente patogênica	1
	c.472C>G	p.Arg158Gly	SNV	Missense	Patogênica	3
	c.473G>T	p.Arg158Leu	SNV	Missense	Patogênica	1
	c.488A>G	p.Tyr163Cys	SNV	Missense	Patogênica	1
	c.577C>T	p.His193Tyr	SNV	Missense	Patogênica	1
	c.613T>A	p.Tyr205Asn	SNV	Missense	Patogênica	1
	c.701A>C	p.Tyr234Ser	SNV	Missense	Patogênica	1
	c.706T>C	p.Tyr236His	SNV	Missense	Patogênica	1
	c.707A>C	p.Tyr236Ser	SNV	Missense	Patogênica	1
	c.710T>C	p.Met237Thr	SNV	Missense	Patogênica	1
	c.716A>C	p.Asn239Thr	SNV	Missense	Patogênica	1
	c.730G>T	p.Gly244Cys	SNV	Missense	Patogênica	1
	c.733G>A	p.Gly245Ser	SNV	Missense	Patogênica	1
	c.742C>T	p.Arg248Trp	SNV	Missense	Patogênica	1
	c.817C>T	p.Arg273Cys	SNV	Missense	Patogênica	3
	c.818G>A	p.Arg273His	SNV	Missense	Patogênica	3
	c.844C>T	p.Arg282Trp	SNV	Missense	Patogênica	2
	c.140del	p.Pro47fs	InDel	Frameshift deletion	Patogênica	1
	c.691_739delACCATCCACTACAACACTACATGTGTAACAGTTCCTGCA TGGGCGGCATGA	p.Ile232fs	InDel	Frameshift deletion	Patogênica	1
	c.247_248insG	p.Ala83fs	InDel	Frameshift insertion	Patogênica	1
<i>TPM3</i>	N/A	N/A	Fusão	N/A	N/A	1
<i>TSC1</i>	c.2519_2520insC	p.Val841fs	InDel	Frameshift deletion	Patogênica	1

N/A não se aplica, SNV *single-nucleotide variant*, InDel *insertion-deletion*, CNV *copy number variation*

4.2.3.1. Gliomas de baixo grau

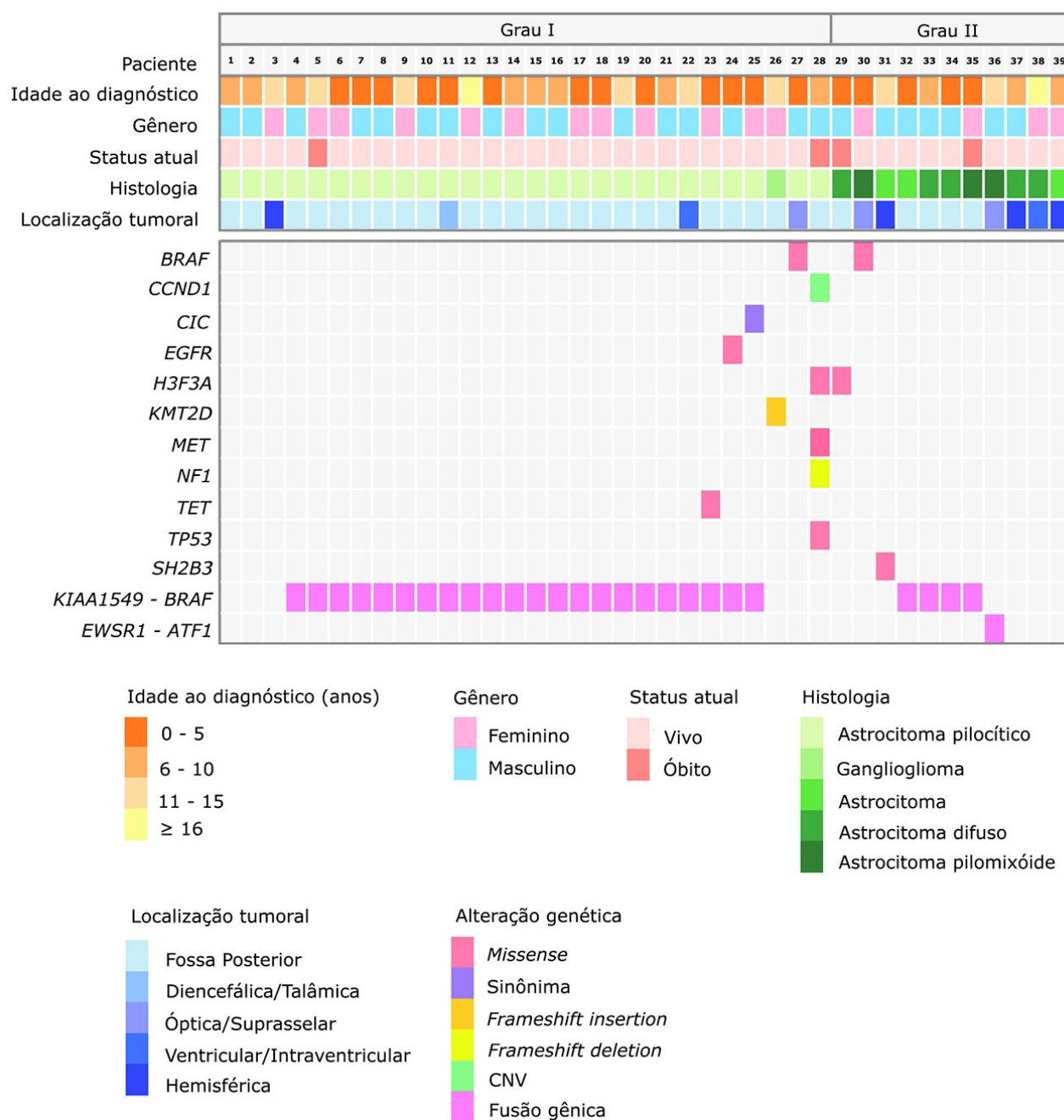


Figura 13. Perfil genômico das 39 amostras de LGGs. Cada barra vertical ilustra um caso individual.

Dos 39 pacientes com LGGs analisados, as fusões *KIAA1549-BRAF* foram as variantes genéticas mais frequentes, identificadas em 26 (66,7%) amostras tumorais. Das 26 amostras que apresentaram fusões *KIAA1549-BRAF*, 22 amostras são tumores de grau I classificados como PA (84,7%), e quatro amostras são tumores de grau II que compreendem o astrocitoma difuso (7,7%), astrocitoma (3,8%) e astrocitoma pilomixóide (3,8%). No presente estudo,

foram detectadas quatro variantes da fusão *KIAA1549–BRA*F, sendo a mais comum a variante entre o exon 15 do gene *KIAA1549* e o exon 9 do gene *BRA*F (15;9), observada em 11 dos 26 (42,3%) casos. As variantes *KIAA1549–BRA*F 14;9 e 15;9 também foram recorrentes, identificadas em oito (30,8%) e seis (23,1%) dos 26 casos, respectivamente. A variante 17;10 foi um evento menos frequente, responsável por um caso (3,8%) (Tabela 11).

Tabela 11. Variantes *KIAA1549–BRA*F identificadas nas amostras de LGGs

Fusão gênica	Gene 1			Gene 2			Total (N=26)	
	Nome	Localização cromossômica	Exon	Nome	Localização cromossômica	Exon	No. amostras	%
<i>KIAA1549 - BRA</i> F	<i>KIAA1549</i>	7:138552721	14	<i>BRA</i> F	7:140487384	9	8	30,8
	<i>KIAA1549</i>	7:138545885	15	<i>BRA</i> F	7:140487385	9	11	42,3
	<i>KIAA1549</i>	7:138545885	15	<i>BRA</i> F	7:140481493	11	6	23,1
	<i>KIAA1549</i>	7:138529062	17	<i>BRA</i> F	7:140482957	10	1	3,8

Mutações do gene *BRA*F são as alterações genéticas mais conhecidas e bem caracterizadas dos gliomas da infância, frequentemente observadas no PA. Esses tumores são definidos pela fusão oncogênica entre os genes *KIAA1549* e *BRA*F, resultado da duplicação em tandem da região cromossômica 7q34 [100, 101]. As fusões *KIAA1549–BRA*F estão presentes em aproximadamente 70 a 80% dos PAs e acarretam na desregulação da via de sinalização *MAPK*. Atualmente, existem nove variantes da fusão *KIAA1549–BRA*F descritas na literatura, sendo a variante mais comumente observada a fusão entre o exon 16 do gene *KIAA1549* e o exon 9 do gene *BRA*F (16;9) (68%). Variantes menos frequentes incluem as fusões 16;11 (10%) e 15;9 (9%) [102].

No nosso estudo, a fusão *KIAA1549–BRA*F 15;9 foi a variante mais recorrente nos LGGs, responsável por 42,3% dos casos, frequência superior à relatada na literatura para esta variante. Além disso, a segunda variante mais comumente identificada nas nossas amostras, a fusão *KIAA1549–BRA*F 14;9, ainda não havia sido descrita em PA, e a variante 15;11, observada em aproximadamente 3,0% dos casos [102], foi detectada em 23,1% das nossas

amostras tumorais. Curiosamente, a variante 16;9, descrita na literatura como a mais frequente em PA [102], não foi observada no nosso estudo.

A fusão *KIAA1549-BRAF* foi o fator prognóstico favorável mais significativo nos LGGs, visto que esses pacientes tiveram uma taxa de sobrevida global em 5 anos de 100,0% e 95,7% dos pacientes não apresentaram alterações genéticas adicionais. Ainda, dos 29 pacientes com LGGs analisados, três (10,3%) morreram devido à progressão da doença após 20 anos de acompanhamento e apenas um paciente tinha tumor positivo para a fusão *KIAA1549-BRAF*. Desse modo, levando em consideração que a fusão *KIAA1549-BRAF* ativa a via de sinalização *MAPK*, e que esta alteração representa um alvo para drogas como os inibidores de *MEK*, a identificação de variantes para fusões *KIAA1549-BRAF* é essencial no contexto de ensaios clínicos e na orientação terapêutica desses pacientes.

Nas amostras de LGGs, além das fusões *KIAA1549-BRAF*, foi identificada uma fusão entre o exon 7 do gene *EWSR1* e o exon 5 do gene *ATF1* (*EWSR1-ATF1*). Fusões gênicas envolvendo o gene *EWSR1* e membros da família CREB (proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc), como o gene *ATF1*, já foram relatadas em um grupo diverso de tumores [103]. Em um estudo publicado em 2017, Kao YC *et al.* investigaram uma coorte de crianças e jovens adultos de 12 a 23 anos de idade com tumores mesenquimais mixóides positivos para fusões entre o gene *EWSR1* e membros da família CREB, incluindo a fusão *EWSR1-ATF1*, e que apresentaram características histológicas distintas e predileção pela região cerebral e das meninges [103]. Esses achados recentes sugerem uma nova entidade de tumor cerebral denominada de tumores mesenquimais mixóides intracranianos com fusões *EWSR1* e genes da família CREB (*EWSR1-CREB*), e até o presente momento, poucos são os casos descritos na literatura [103-110]. No nosso estudo, a fusão gênica *EWSR1-ATF1* foi detectada em uma amostra de astrocitoma pilomixóide que acometeu a região óptica, indicando uma possível reclassificação tumoral.

4.2.3.2. Gliomas de alto grau



Figura 14. Perfil genômico das 56 amostras de HGGs. Cada barra vertical ilustra um caso individual. A presença de mais de uma variante no mesmo gene é representada por boxes com várias cores.

Análises de perfil de metilação dos HGGs da infância recentemente revelaram seis subgrupos tumorais distintos que apresentam alterações nos genes *H3F3A* (subgrupos H3.3 K27M e H3.3 G34R/V), *HIST1H3B* (subgrupo H3.1 K27M), *IDH1/2* (subgrupo *IDH*) e *BRAF* (subgrupo *BRAF* V600E). Outras alterações genéticas relatadas incluem amplificações dos genes *MYC*, *PDGFRA* (RTK1) ou *EGFR* (RTK2) [27]. No nosso estudo, foram identificadas duas variantes patogênicas de efeito *missense* do gene *H3F3A* em 17 amostras

de HGGs, as variantes c.83A>T e c.103G>A, que resultam nas mutações de histona K27M e G34R, respectivamente. Além disso, a variante c.83A>T do gene *HIST1H3B* foi detectada em duas amostras de GBM e a variante c.1799T>A do gene *BRAF*, que caracteriza a mutação V600E, foi observada em quatro amostras tumorais, sendo três amostras de GBM e uma amostra de PXA anaplásico. Nenhuma alteração nos genes *IDH1* ou *IDH2* foi detectada pelo painel nas amostras analisadas.

Estudos de perfil genômico dos HGGs da infância já demonstraram que a variante c.83A>T do gene *H3F3A* é altamente prevalente em GBM, astrocitoma anaplásico e DIPG, e aproximadamente 22% dos GBMs e 78% dos DIPGs que acometem crianças e adolescentes apresentam alterações em *H3F3A* [111, 112]. A mutação *H3F3A* K27M ocorre em 70 a 80% dos GBMs de linha média e DIPGs da infância, enquanto a variante *HIST1H3B* K27M é menos frequente e mais específica dos DIPGs [113]. Nas nossas amostras de HGGs, alterações no gene *H3F3A* foram os eventos mais comuns e as variantes c.83A>T e c.103G>A de *H3F3A* caracterizam dois subgrupos moleculares distintos de gliomas, o subgrupo H3.3 K27M e H3.3 G34R. A variante *H3F3A* c.83A>T foi identificada em 16 amostras de HGGs, 12 de GBM (75%) e quatro de astrocitoma anaplásico (25%), e a variante *H3F3A* c.103G>A foi observada somente em uma amostra de GBM (Figura 15a). Curiosamente, nenhuma amostra de DIPG analisada apresentou variantes do gene *H3F3A* ou *HIST1H3B*.

As mutações K27M e G34R são mutuamente exclusivas e estão intrinsicamente associadas à localização anatômica do tumor, sendo que o subgrupo H3.3 K27M possui predileção pela linha média cerebral, sobretudo pela região talâmica [114, 115], enquanto o subgrupo H3.3 G24R acomete preferencialmente o hemisfério cerebral [49, 50]. Das 16 amostras tumorais do subgrupo H3.3 K27M analisadas, 14 amostras são de localização de linha média, as quais incluem sete de tálamo (43,8%), cinco de medula espinal (31,2%) e

duas de cerebelo/tronco encefálico (12,5%), e duas amostras acometem os hemisférios cerebrais (12,5%). A amostra do subgrupo H3.3 G34R é de localização hemisférica (Figura 15b). Já foi demonstrado que a mutação G34R é altamente expressa no neocórtex durante os estágios iniciais de desenvolvimento embrionário e a mutação K27M está associada aos estágios intermediários e finais de desenvolvimento principalmente da região talâmica. Esses achados evidenciam que os gliomas H3.3 K27M e H3.3 G34R possuem padrões de expressão gênica durante os estágios de desenvolvimento embrionário que estão correlacionados à sua localização tumoral subsequente, indicando que estes dois subgrupos moleculares diferem no que diz respeito ao início do processo neoplásico e/ou à sua origem celular [111].

Além disso, análises recentes mostraram que os gliomas positivos para a mutação *H3F3A* K27M possuem um prognóstico clínico desfavorável, independentemente da localização anatômica do SNC acometida, do grau tumoral e da extensão da ressecção neurocirúrgica [116-118]. No nosso estudo, pacientes com HGGs positivos para a mutação *H3F3A* K27M apresentaram uma mediana de sobrevida global de 9,18 meses (95% IC: 4,03 – 14,32), valor inferior à mediana de sobrevida de 23,60 meses dos 56 HGGs analisados. Adicionalmente, pacientes com a mutação *H3F3A* K27M (subgrupo H3.3 K27M) obtiveram uma pior sobrevida global quando comparados aos pacientes que não apresentaram variantes genéticas detectadas pelo painel (subgrupo H3.3 K27 *wild-type*) ($\chi^2=11,99$, $p=0,0005$) (Figura 15c). Os pacientes do subgrupo H3.3 K27M revelaram uma taxa de sobrevida global em 5 anos (6,3%) significativamente inferior à taxa de sobrevida global em 5 anos dos pacientes do subgrupo H3.3 K27 *wild-type* (61,5%) ($p<0,001$), evidenciando que a mutação *H3F3A* K27M representa, possivelmente, um fator prognóstico adverso nos HGGs da infância [117-120].

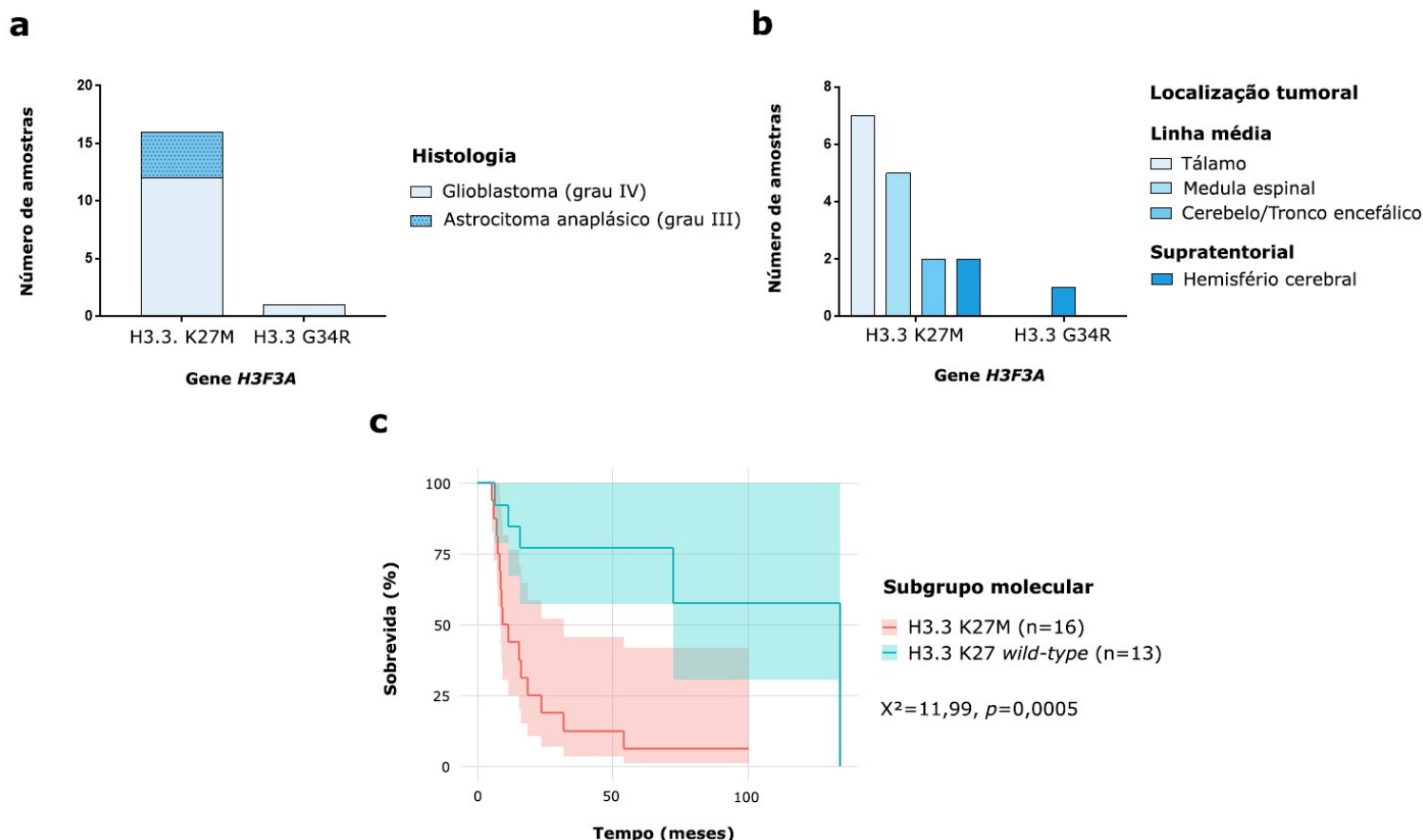


Figura 15. Subgrupos moleculares de HGGs H3.3 K27M e H3.3 G34R. Número de amostras de acordo com (a) o tipo histológico e (b) localização tumoral. c. Pacientes com a mutação *H3F3A* K27M apresentaram uma pior sobrevida global quando comparados ao grupo de pacientes *wild-type* ($\chi^2=11,99, p=0,0005$).

No presente estudo, alterações genéticas simultâneas foram identificadas nas amostras de HGGs que apresentaram variantes do gene *H3F3A*: 58,8% (10/17) exibiram mutações em *TP53*, 35,3% (6/17) tiveram variantes com perda de função de *ATRX*, 23,5% (4/17) apresentaram aumento no número de cópias de *PDGFRA* e 17,6% (3/17) tiveram aumento no número de cópias de *MET* ou *MYC*. Ainda, três amostras de GBM apresentaram alterações concomitantes nos genes *H3F3A*, *TP53* e *ATRX*, sendo duas amostras positivas para a variante *H3F3A* c.83A>T e uma amostra positiva para a variante *H3F3A* c.103G>A. Estudos prévios já demonstraram que no mesmo tumor, mutações em *H3F3A* podem se sobrepor simultaneamente a outras alterações genéticas específicas, sendo que aproximadamente 30% das mutações *H3F3A* K27M estão associadas a alterações no gene *ATRX* e 60% a alterações em *TP53* [115, 121]. Além disso, análises comparativas de perfil genômico revelaram que

mutações em *H3F3A* e *ATRX* são específicas do GBM da infância, característica que distingue molecularmente o GBM de pacientes pediátricos do GBM de adulto. O gene *ATRX* codifica um membro do complexo de remodelação da cromatina necessário para a incorporação da histona H3.3 na heterocromatina e nos telômeros, assim como em diversos sítios de ligação de fatores de transcrição. Nesse contexto, mutações com perda de função de *ATRX* reduzem a incorporação de H3.3 em um subconjunto de genes envolvidos no processo neoplásico, além de prejudicar o transporte desta histona para os telômeros, o que interrompe o seu estado heterocromático e facilita o alongamento alternativo dos mesmos. Esses achados indicam que defeitos na arquitetura da cromatina, como mutações em *H3F3A* e *ATRX*, são fundamentais na patogênese do GBM da infância [115].

O aumento no número de cópias do DNA também foi um evento genético recorrente no nosso estudo. De todas as 29 CNVs detectadas nas amostras de gliomas, 28 foram identificadas nos HGGs, sendo 23 amostras de GBM (82,1%), quatro amostras de astrocitoma anaplásico (14,3%) e uma amostra de DIPG (3,6%). Foi observado aumento no número de cópias de 12 genes, sendo os genes *MET*, *MYC* e *PDGFRA* responsáveis pela maioria dos casos: CNVs dos genes *MET* e *MYC* foram identificadas em cinco (17,8%) dos 28 casos cada uma, e CNVs do gene *PDGFRA* foram observadas em quatro (14,3%) dos 28 casos. A mediana do número de cópias de DNA foi de 6,96 cópias (intervalo: 1,24 – 270,0 cópias; desvio padrão: 50,15) e a distribuição de todas as CNVs detectadas nas amostras de HGGs, de acordo com gene, número de cópias e tipo histológico está sumarizada na Tabela 12.

Tabela 12. Distribuição das CNVs detectadas nas amostras de HGGs

Gene	Localização cromossômica	Número de cópias	Histologia
<i>ALK</i>	2:29416076	11,2	GBM
<i>BRAF</i>	7:140434390	5,36	Astrocitoma anaplásico
<i>CCND1</i>	11:69455944	7,96	Astrocitoma anaplásico
<i>CDK6</i>	7:92244380	5,85	GBM
		9,11	GBM
		4,96	Astrocitoma anaplásico
<i>EGFR</i>	7:55210037	52,6	GBM
<i>KIT</i>	4:55529115	6,44	GBM
		10,73	GBM
<i>KRAS</i>	12:25364746	26,65	GBM
		5,96	DIPG
<i>MDM2</i>	12:69207030	6,18	GBM
		7,48	GBM
<i>MET</i>	7:16313461	5,84	GBM
		1,24	GBM
		12,4	GBM
		7,95	GBM
		4,66	Astrocitoma anaplásico
<i>MYC</i>	8:128748885	5,81	GBM
		20,38	GBM
		270,0	GBM
		4,93	GBM
		5,25	GBM
<i>PDGFRA</i>	4:55097715	38,29	GBM
		5,2	GBM
		9,89	GBM
		21,6	GBM
<i>PIK3CA</i>	3:178916680	4,75	GBM

GBM glioblastoma, DIPG glioma pontino intrínseco difuso

Diversos estudos já propuseram que o gene *MET* desempenha um papel crítico na proliferação, sobrevivência e invasão celular e resistência ao tratamento em GBM [122, 123], e alterações em *MYC* são altamente prevalentes em um subconjunto de GBM da infância [124]. Nos gliomas, amplificações dos genes *MET* e *MYC* conferem um pior prognóstico aos pacientes [125, 126] e nos HGGs da infância o gene *PDGFRA* é o alvo de amplificação focal mais frequente, identificado em aproximadamente 8 a 26% dos GBMs [127]. Além disso,

evidências sugerem que tumores com a mutação *H3F3A* K27M possuem um maior número de alterações no número de cópias do DNA [115, 121], sendo as amplificações dos genes *MYC* e *PDGFRA* as mais comumente observadas [128]. No subgrupo de HGGs H3.3 K27M a presença de alterações no número de cópias indica que as amplificações de *MYC* e *PDGFRA* são eventos subsequentes à mutação *H3F3A* K27M [129]. Nesse contexto, nossos achados sugerem que a identificação da variante *H3F3A* c.83A>T, que caracteriza o subgrupo molecular H3.3 K27M, pode ser utilizada como um fator de diagnóstico nos HGGs da infância e adolescência e que esses pacientes podem se beneficiar de terapias que tenham como alvo agentes remodeladores de cromatina ou modificações pós-transcricionais de histona.

4.2.4. Glioblastoma congênito

Dos quatro pacientes com cGBM analisados no presente estudo, dois pacientes apresentaram tumores com variantes genéticas, as quais incluem uma CNV de *ALK* e duas fusões gênicas, *PPP1CB-ALK* e *TPM3-NTRK1*. Além disso, não foram identificadas variantes nos genes *H3F3A*, *TP53* e *ATRX*, alterações comumente observadas no GBM que acomete crianças e adolescentes.

4.2.4.1. Paciente 1

O tumor do Paciente 1 apresentou aumento no número de cópias do gene *ALK* e a fusão *PPP1CB-ALK*. A CNV detectada consiste em 11,2 cópias de *ALK* e a fusão gênica foi entre o exon 5 de *PPP1CB* e o exon 20 de *ALK* (Tabela 13).

Tabela 13. Variantes genéticas detectadas na amostra de cGBM do Paciente 1

Paciente	Classe da variante	Gene	Localização cromossômica	Número de cópias	Intervalo de confiança
1	CNV	<i>ALK</i>	2:29416076	11,2	5% 9,08; 95% 13,8
	Classe da variante	Fusão	Gene	Localização cromossômica	Exon
	Fusão	<i>PPP1CB-ALK</i>	<i>PPP1CB</i> <i>ALK</i>	2:29006844 2:29446394	5 20

CNV copy number variation

Em um estudo recente, Zhong *et al.* (2021) relataram o caso de uma paciente do sexo feminino com cGBM que morreu devido à progressão da doença dois dias após o nascimento e apresentou alterações genéticas semelhantes às variantes identificadas no nosso Paciente 1 [63]. Nesse estudo, foram detectadas a fusão *PPP1CB-ALK*, que consiste nos exons 1-5 de *PPP1CB* e exons 20-29 de *ALK*, e uma amplificação de *ALK* [63]. Embora já tenha sido demonstrado que os transcritos das fusões do gene *ALK* são oncogênicos e que estes estão presentes em diversas neoplasias, poucos são os casos descritos na literatura de fusões *PPP1CB-ALK*. Apesar de raras, as fusões *PPP1CB-ALK* foram identificadas sobretudo em HGGs da infância e análises recentes revelaram que esta fusão é um evento genético característico neste tipo tumoral [58, 63, 130-134]. Além disso, a ocorrência simultânea de fusões *PPP1CB-ALK* e amplificações de *ALK* foi observada em um subgrupo de pacientes pediátricos com GBM [135, 136].

Alterações na expressão de *ALK* já foram detectadas em diferentes tumores assim como nos gliomas. Nesse sentido, mutações de *ALK* são eventos recorrentes nos tumores de SNC e a identificação destas alterações permitiu que o gene *ALK* fosse considerado um importante marcador molecular e alvo terapêutico nos tumores cerebrais [137, 138]. Atualmente, ensaios clínicos para o desenvolvimento de pequenas moléculas de TKIs capazes de penetrar a barreira hematoencefálica estão em andamento, uma vez que tratamentos que têm como alvo o gene *ALK* veem se mostrando capazes de melhorar o prognóstico clínico de pacientes cujos

tumores de SNC apresentam alterações neste gene [139, 140]. As fusões *PPP1CB-ALK* são uma das fusões de RTKs mais comuns dos gliomas da infância [63] e descobertas recentes revelaram que células tumorais positivas para a fusão *PPP1CB-ALK* são sensíveis aos inibidores de *ALK*, sugerindo que alterações neste gene, como rearranjos cromossômicos e amplificações gênicas, são potenciais alvos terapêuticos com TKIs no GBM [134, 135]. Apesar do nosso Paciente 1, assim como o paciente com cGBM relatado por Zhong *et al.* (2021), terem falecido devido à progressão da doença poucos dias após o nascimento e nenhum tratamento ter sido realizado, pequenas moléculas de TKIs já foram reconhecidas como candidatos eficazes para o tratamento do GBM [141, 142]. Desse modo, nossos achados moleculares e resultados prévios sugerem que a fusão *PPP1CB-ALK* e amplificações de *ALK* podem ser potenciais marcadores moleculares em cGBM.

4.2.4.2. Paciente 2

O tumor do Paciente 2 apresentou a fusão *TPM3-NTRK1*, que consiste no exon 7 do gene *TPM3* e exon 10 do gene *NTRK1* (Tabela 14).

Tabela 14. Variantes genéticas detectadas na amostra de cGBM do Paciente 2

Paciente	Classe da variante	Fusão	Gene	Localização cromossômica	Exon
2	Fusão	<i>TPM3-NTRK1</i>	<i>TPM3</i>	1:154142876	7
			<i>NTRK1</i>	1:156844363	10

Fusões envolvendo os genes da família *NTRK* já foram descritas em inúmeras neoplasias, tanto de pacientes adultos como em crianças, e incluem principalmente tumores como o carcinoma de pulmão de células não-pequenas, carcinoma papilar de tireoide, carcinoma secretor da mama e GBM [143, 144]. Tumores raros geralmente apresentam uma alta incidência de fusões *NTRK*, com taxas que podem chegar a 90% ou mais, enquanto nas neoplasias mais comuns, como melanoma, câncer de mama, de pulmão e colorretal, e tumores de SNC, as fusões *NTRK* são encontradas em frequências mais baixas [145, 146].

Alterações no gene *NTRK* já foram amplamente investigadas em gliomas da infância e nestes tumores as fusões *NTRK* são detectadas em 5 a 25% dos casos [147, 148]. Estudos recentes revelaram que fusões *NTRK*, como a fusão *TPM3-NTRK1*, são comumente observadas em HGGs da infância e estão presentes em aproximadamente 40% dos pacientes menores de 3 anos de idade com HGGs que não acometem a região do tronco encefálico (*non-brainstem high-grade gliomas* – NBS-HGGs), sendo estes em sua maioria de localização hemisférica [148-150]. No presente estudo, o Paciente 2, cujo tumor acomete o hemisfério cerebral e é positivo para a fusão *TPM3-NTRK1*, foi diagnosticado com 2,5 meses de idade e não apresentou outras alterações genéticas adicionais detectadas pelo painel. Esses achados corroboram com resultados prévios que identificaram a fusão *TPM3-NTRK1* em um subconjunto de pacientes pediátricos com NBS-HGGs [149, 150].

Atualmente, diversos TKIs com atividade contra a família de proteínas do gene *NTRK* estão sendo investigados. Os TKIs de primeira geração, o larotrectinibe (Vitrakvi®) e entrectinibe (Rozlytrek®), são os dois primeiros compostos aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*) e pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) para o tratamento de tumores sólidos da infância com fusões *NTRK*. Tanto o larotrectinibe como o entrectinibe mostraram uma atividade antitumoral notável no tratamento de pacientes oncológicos de diversas idades e tumores de diferentes histologias [151, 152]. Além disso, em um estudo recentemente publicado, Alharbi *et. al.* (2020) relataram o caso de uma paciente de 18 meses de idade e portadora de GBM com fusão *NTRK* que apresentou regressão tumoral significativa após ter disso submetida à tratamento de primeira linha com larotrectinibe [153]. Nossos resultados indicam que, assim como as fusões de *ALK*, as fusões *NTRK* podem ser potenciais marcadores moleculares e alvos terapêuticos no tratamento do cGBM com TKIs.

5. CONCLUSÃO

5.1. Ependimoma

- a. As variantes *CIC* c.4533C>T, *ASXL1* c.3306G>T e *JAK2* c.1711G>A foram as variantes genéticas mais comumente detectadas nas amostras de EPN de diferentes localizações tumorais e ainda não haviam sido relatadas em EPN.
- b. A identificação da fusão *MNI-BEND2* em uma amostra de ST-EPN sugere uma possível reclassificação tumoral, levando em consideração que esta alteração genética caracteriza uma entidade de tumores de SNC recém descrita, os HGNET-MN1.
- c. A identificação dos rearranjos cromossômicos *YAPI-MAMLD1* em duas amostras tumorais permitiu a classificação do subgrupo molecular ST-EPN-YAP1. As fusões *YAPI-MAMLD1* foram observadas em pacientes do sexo feminino, menores de 3 anos idade, e análises de sobrevida mostraram que esta alteração está associada a um bom prognóstico nos EPNs de localização supratentorial.
- d. Não foram observadas fusões *C11orf95-RELA*, evento característico do subgrupo molecular ST-EPN-RELA. Ainda, as amostras de ST-EPN ausentes para as fusões *RELA* e *YAPI* não apresentaram as características clínico-histopatológicas típicas do subgrupo ST-SE, indicando um possível novo subgrupo de ST-EPN denominado *non-RELA-non-YAPI*.

5.2. Gliomas

- a. As fusões *KIAA1549-BRAF* foram as alterações moleculares mais comumente detectadas nas amostras de LGGs, as quais incluem principalmente o PA. Foram identificadas quatro variantes distintas para essa fusão gênica, sendo a variante 15;9 a mais comum, com uma frequência superior à descrita na literatura. Além disso, a variante 14;9, observada nas amostras de LGGs, ainda não havia sido relatada em PA.

A fusão *KIAA1549–BRAF* foi o fator prognóstico favorável mais significativo nos LGGs, visto que estes pacientes tiveram uma taxa de sobrevida global em 5 anos de 100,0% e 95,7% dos pacientes não apresentaram alterações genéticas adicionais.

- b.** A identificação da fusão *EWSR1-ATF1* em uma amostra de astrocitoma pilomixóide sugere uma possível reclassificação tumoral, levando em consideração que esta alteração genética caracteriza uma nova entidade de tumores mesenquimais mixóides com fusões entre o gene *EWSR1* e membros da família CREB, os *EWSR1-CREB*.
- c.** A identificação das variantes *H3F3A* c.83A>T, *H3F3A* c.103G>A, *HIST1H3B* c.83A>T e *BRAF* c.1799T>A nos HGGs permitiu a classificação destas amostras em quatro subgrupos moleculares distintos - H3.3 K27M, H3.3 G34R, H3.1 K27M e *BRAF* V600E, respectivamente.
- d.** A variante *H3F3A* c.83A>T, que resulta na mutação *H3F3A* K27M e caracteriza o subgrupo H3.3 K27M, foi a alteração molecular mais comumente detectada nas amostras de HGGs, sobretudo no GBM. Os tumores positivos para a mutação *H3F3A* K27M apresentaram variantes genéticas simultâneas principalmente nos genes *TP53*, *ATRX*, *PDGFRA*, *MET* e *MYC*. Além disso, pacientes do subgrupo H3.3 K27M revelaram uma pior sobrevida global quando comparados ao grupo de pacientes *wild-type*, evidenciando que a variante *H3F3A* c.83A>T é um fator prognóstico adverso nos HGGs da infância.
- e.** Nos cGBMs as alterações de *ALK* e *NTRK* sugerem que estes genes são potenciais marcadores prognósticos e alvos para o tratamento do cGBM com medicamentos já aprovados pela ANVISA e FDA. Nessas amostras, foi possível identificar alterações genéticas distintas daquelas frequentemente observadas no GBM da infância e adolescência, as quais incluem principalmente variantes dos genes *H3F3A*, *TP53* e *ATRX*, indicando que o cGBM compreende uma entidade tumoral única.

6. REFERÊNCIAS

1. Firme MR, Marra MA. The molecular landscape of pediatric brain tumors in the next-generation sequencing era. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2014;14(9):474. doi:10.1007/s11910-014-0474-4
2. Koob M, Girard N. Cerebral tumors: specific features in children. *Diagn Interv Imaging.* 2014;95(10):965-983. doi:10.1016/j.diii.2014.06.017
3. Chiang JC, Ellison DW. Molecular pathology of paediatric central nervous system tumours. *J Pathol.* 2017;241(2):159-172. doi:10.1002/path.4813
4. Barsan V, Paul M, Gorski H, et al. Clinical Impact of Next-generation Sequencing in Pediatric Neuro-Oncology Patients: A Single-institutional Experience. *Cureus.* 2019;11(12):e6281. Published 2019 Dec 3. doi:10.7759/cureus.6281
5. Gajjar A, Pfister SM, Taylor MD, Gilbertson RJ. Molecular insights into pediatric brain tumors have the potential to transform therapy. *Clin Cancer Res.* 2014;20(22):5630-5640. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-0833
6. Cacciotti C, Fleming A, Ramaswamy V. Advances in the molecular classification of pediatric brain tumors: a guide to the galaxy. *J Pathol.* 2020;251(3):249-261. doi:10.1002/path.5457
7. Kline CN, Joseph NM, Grenert JP, et al. Targeted next-generation sequencing of pediatric neuro-oncology patients improves diagnosis, identifies pathogenic germline mutations, and directs targeted therapy [published correction appears in *Neuro Oncol.* 2017 Apr 1;19(4):601]. *Neuro Oncol.* 2017;19(5):699-709. doi:10.1093/neuonc/now254
8. Ahmed AA, Vundamati DS, Farooqi MS, Guest E. Precision Medicine in Pediatric Cancer: Current Applications and Future Prospects. *High Throughput.* 2018;7(4):39. Published 2018 Dec 13. doi:10.3390/ht7040039
9. Lorentzian A, Biegel JA, Ostrow DG, et al. Tumor Variant Identification That Accounts for the Unique Molecular Landscape of Pediatric Malignancies. *JNCI Cancer Spectr.* 2018;2(4):pky079. doi:10.1093/jncics/pky079
10. Hiemenz MC, Ostrow DG, Busse TM, et al. OncoKids: A Comprehensive Next-Generation Sequencing Panel for Pediatric Malignancies. *J Mol Diagn.* 2018;20(6):765-776. doi:10.1016/j.jmoldx.2018.06.009
11. Udaka YT, Packer RJ. Pediatric Brain Tumors. *Neurol Clin.* 2018;36(3):533-556. doi:10.1016/j.ncl.2018.04.009
12. Panigrahy A, Blüml S. Neuroimaging of pediatric brain tumors: from basic to advanced magnetic resonance imaging (MRI). *J Child Neurol.* 2009;24(11):1343-1365. doi:10.1177/0883073809342129
13. Ostrom QT, Cioffi G, Gittleman H, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2012-2016. *Neuro Oncol.* 2019;21(Suppl 5):v1-v100. doi:10.1093/neuonc/noz150
14. Wells EM, Packer RJ. Pediatric brain tumors. *Continuum (Minneap Minn).* 2015;21(2 Neuro-oncology):373-396. doi:10.1212/01.CON.0000464176.96311.d1
15. Banan R, Hartmann C. The new WHO 2016 classification of brain tumors-what

- neurosurgeons need to know. *Acta Neurochir (Wien)*. 2017;159(3):403-418. doi:10.1007/s00701-016-3062-3
16. AlRayahi J, Zapotocky M, Ramaswamy V, et al. Pediatric Brain Tumor Genetics: What Radiologists Need to Know. *Radiographics*. 2018;38(7):2102-2122. doi:10.1148/rg.2018180109
 17. Thorp N, Gandola L. Management of Ependymoma in Children, Adolescents and Young Adults. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2019;31(3):162-170. doi:10.1016/j.clon.2018.12.001
 18. Kilday JP, Rahman R, Dyer S, et al. Pediatric ependymoma: biological perspectives. *Mol Cancer Res*. 2009;7(6):765-786. doi:10.1158/1541-7786.MCR-08-0584
 19. Pajtler KW, Witt H, Sill M, et al. Molecular Classification of Ependymal Tumors across All CNS Compartments, Histopathological Grades, and Age Groups. *Cancer Cell*. 2015;27(5):728-743. doi:10.1016/j.ccell.2015.04.002
 20. Lundar T, Due-Tønnessen BJ, Scheie D, Brandal P. Pediatric spinal ependymomas: an unpredictable and puzzling disease. Long-term follow-up of a single consecutive institutional series of ten patients. *Childs Nerv Syst*. 2014;30(12):2083-2088. doi:10.1007/s00381-014-2491-7
 21. Ellison DW, Aldape KD, Capper D, et al. cIMPACT-NOW update 7: advancing the molecular classification of ependymal tumors. *Brain Pathol*. 2020;30(5):863-866. doi:10.1111/bpa.12866
 22. Pajtler KW, Mack SC, Ramaswamy V, et al. The current consensus on the clinical management of intracranial ependymoma and its distinct molecular variants. *Acta Neuropathol*. 2017;133(1):5-12. doi:10.1007/s00401-016-1643-0
 23. Korshunov A, Witt H, Hielscher T, et al. Molecular staging of intracranial ependymoma in children and adults. *J Clin Oncol*. 2010;28(19):3182-3190. doi:10.1200/JCO.2009.27.3359
 24. Delgado-López PD, Corrales-García EM, Alonso-García E, et al. Central nervous system ependymoma: clinical implications of the new molecular classification, treatment guidelines and controversial issues. *Clin Transl Oncol*. 2019;21(11):1450-1463. doi:10.1007/s12094-019-02082-2
 25. Toescu SM, Aquilina K. Current and Emerging Methods of Management of Ependymoma. *Curr Oncol Rep*. 2019;21(9):78. Published 2019 Jul 29. doi:10.1007/s11912-019-0826-y
 26. Reni M, Gatta G, Mazza E, Vecht C. Ependymoma. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2007;63(1):81-89. doi:10.1016/j.critrevonc.2007.03.004
 27. Pollack IF, Agnihotri S, Broniscer A. Childhood brain tumors: current management, biological insights, and future directions. *J Neurosurg Pediatr*. 2019;23(3):261-273. doi:10.3171/2018.10.PEDS18377
 28. Dubuc AM, Northcott PA, Mack S, Witt H, Pfister S, Taylor MD. The genetics of pediatric brain tumors. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2010;10(3):215-223. doi:10.1007/s11910-010-0103-9
 29. Mack SC, Taylor MD. The genetic and epigenetic basis of ependymoma. *Childs Nerv Syst*. 2009;25(10):1195-1201. doi:10.1007/s00381-009-0928-1
 30. Yao Y, Mack SC, Taylor MD. Molecular genetics of ependymoma. *Chin J Cancer*.

- 2011;30(10):669-681. doi:10.5732/cjc.011.10129
31. Thompson YY, Ramaswamy V, Diamandis P, Daniels C, Taylor MD. Posterior fossa ependymoma: current insights. *Childs Nerv Syst.* 2015;31(10):1699-1706. doi:10.1007/s00381-015-2823-2
 32. Parker M, Mohankumar KM, Punchihewa C, et al. C11orf95-RELA fusions drive oncogenic NF- κ B signalling in ependymoma [published correction appears in *Nature*. 2014 Apr 24;508(7497):554. Becksford, Jared [corrected to Becksfort, Jared]. *Nature*. 2014;506(7489):451-455. doi:10.1038/nature13109
 33. Pietsch T, Wohlers I, Goschzik T, et al. Supratentorial ependymomas of childhood carry C11orf95-RELA fusions leading to pathological activation of the NF- κ B signaling pathway. *Acta Neuropathol.* 2014;127(4):609-611. doi:10.1007/s00401-014-1264-4
 34. Fukuoka K, Kanemura Y, Shofuda T, et al. Significance of molecular classification of ependymomas: C11orf95-RELA fusion-negative supratentorial ependymomas are a heterogeneous group of tumors. *Acta Neuropathol Commun.* 2018;6(1):134. Published 2018 Dec 4. doi:10.1186/s40478-018-0630-1
 35. Pagès M, Pajtler KW, Puget S, et al. Diagnostics of pediatric supratentorial RELA ependymomas: integration of information from histopathology, genetics, DNA methylation and imaging. *Brain Pathol.* 2019;29(3):325-335. doi:10.1111/bpa.12664
 36. Andreiulo F, Varlet P, Tauziède-Espariat A, et al. Childhood supratentorial ependymomas with YAP1-MAMLD1 fusion: an entity with characteristic clinical, radiological, cytogenetic and histopathological features. *Brain Pathol.* 2019;29(2):205-216. doi:10.1111/bpa.12659
 37. Zschoernack V, Jünger ST, Mynarek M, et al. Supratentorial ependymoma in childhood: more than just RELA or YAP. *Acta Neuropathol.* 2021;141(3):455-466. doi:10.1007/s00401-020-02260-5
 38. Perry A, Wesseling P. Histologic classification of gliomas. *Handb Clin Neurol.* 2016;134:71-95. doi:10.1016/B978-0-12-802997-8.00005-0
 39. Jones C, Baker SJ. Unique genetic and epigenetic mechanisms driving paediatric diffuse high-grade glioma. *Nat Rev Cancer.* 2014;14(10):10.1038/nrc3811. doi:10.1038/nrc3811
 40. Gonçalves FG, Alves CAPF, Vossough A. Updates in Pediatric Malignant Gliomas. *Top Magn Reson Imaging.* 2020;29(2):83-94. doi:10.1097/RMR.0000000000000235
 41. Hargrave D. Paediatric high and low grade glioma: the impact of tumour biology on current and future therapy. *Br J Neurosurg.* 2009;23(4):351-363. doi:10.1080/02688690903158809
 42. Paixão Becker A, de Oliveira RS, Saggiaro FP, Neder L, Chimelli LM, Machado HR. In pursuit of prognostic factors in children with pilocytic astrocytomas. *Childs Nerv Syst.* 2010;26(1):19-28. doi:10.1007/s00381-009-0990-8
 43. Jones DT, Gronych J, Lichter P, Witt O, Pfister SM. MAPK pathway activation in pilocytic astrocytoma. *Cell Mol Life Sci.* 2012;69(11):1799-1811. doi:10.1007/s00018-011-0898-9
 44. Horbinski C. To BRAF or not to BRAF: is that even a question anymore?. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2013;72(1):2-7. doi:10.1097/NEN.0b013e318279f3db

45. Filbin M, Sturm D. Gliomas in Children. *Seminars in Neurology*. 2018;38(1), 121–130. doi:10.1055/s-0038-1635106
46. Sturm D, Pfister SM, Jones DTW. Pediatric Gliomas: Current Concepts on Diagnosis, Biology, and Clinical Management. *J Clin Oncol*. 2017;35(21):2370-2377. doi:10.1200/JCO.2017.73.0242
47. Drobysheva A, Klesse LJ, Bowers DC, et al. Targeted MAPK Pathway Inhibitors in Patients With Disseminated Pilocytic Astrocytomas. *J Natl Compr Canc Netw*. 2017;15(8):978-982. doi:10.6004/jnccn.2017.0139
48. Braunstein S, Raleigh D, Bindra R, Mueller S, Haas-Kogan D. Pediatric high-grade glioma: current molecular landscape and therapeutic approaches. *J Neurooncol*. 2017;134(3):541-549. doi:10.1007/s11060-017-2393-0
49. Fangusaro J. Pediatric high grade glioma: a review and update on tumor clinical characteristics and biology. *Front Oncol*. 2012;2:105. Published 2012 Aug 24. doi:10.3389/fonc.2012.00105
50. Ebrahimi A, Skardelly M, Schuhmann MU, et al. High frequency of H3 K27M mutations in adult midline gliomas. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2019;145(4):839-850. doi:10.1007/s00432-018-02836-5
51. Macy ME, Birks DK, Barton VN, et al. Clinical and molecular characteristics of congenital glioblastoma. *Neuro Oncol*. 2012;14(7):931-941. doi:10.1093/neuonc/nos125
52. Gilani A, Donson A, Davies KD, et al. Targetable molecular alterations in congenital glioblastoma. *J Neurooncol*. 2020;146(2):247-252. doi:10.1007/s11060-019-03377-8
53. Anestis DM, Tsitsopoulos PP, Ble CA, Tsitouras V, Tsonidis CA. Congenital Glioblastoma Multiforme: An Unusual and Challenging Tumor. *Neuropediatrics*. 2017;48(6):403-412. doi:10.1055/s-0037-1601858
54. Coccé MC, Mardin BR, Bens S, et al. Identification of ZCCHC8 as fusion partner of ROS1 in a case of congenital glioblastoma multiforme with a t(6;12)(q21;q24.3). *Genes Chromosomes Cancer*. 2016;55(9):677-687. doi:10.1002/gcc.22369
55. Isaacs H Jr. Perinatal (fetal and neonatal) astrocytoma: a review. *Childs Nerv Syst*. 2016;32(11):2085-2096. doi:10.1007/s00381-016-3215-y
56. Kameda M, Otani Y, Ichikawa T, Shimada A, Ichimura K, Date I. Congenital Glioblastoma with Distinct Clinical and Molecular Characteristics: Case Reports and a Literature Review. *World Neurosurg*. 2017;101:817.e5-817.e14. doi:10.1016/j.wneu.2017.02.026
57. Milano GM, Cerri C, Ferruzzi V, et al. Congenital glioblastoma. *Pediatr Blood Cancer*. 2009;53(1):124-126. doi:10.1002/pbc.22008
58. Ng A, Levy ML, Malicki DM, Crawford JR. Unusual high-grade and low-grade glioma in an infant with PPP1CB-ALK gene fusion. *BMJ Case Rep*. 2019;12(2):e228248. Published 2019 Feb 1. doi:10.1136/bcr-2018-228248
59. Nsir AB, Darmoul M, Hadhri R, Hattab N. Congenital Glioblastoma: Lessons Learned from a Rare Case with Unusual Presentation. *Turk Neurosurg*. 2017;27(3):464-467. doi:10.5137/1019-5149.JTN.13047-14.3
60. Olsen TK, Panagopoulos I, Meling TR, et al. Fusion genes with ALK as recurrent partner in ependymoma-like gliomas: a new brain tumor entity? *Neuro Oncol*.

- 2015;17(10):1365-1373. doi:10.1093/neuonc/nov039
61. Shimamura N, Asano K, Ogane K, Yagihashi A, Ohkuma H, Suzuki S. A case of definitely congenital glioblastoma manifested by intratumoral hemorrhage. *Childs Nerv Syst.* 2003;19(10-11):778-781. doi:10.1007/s00381-003-0807-0
 62. Thankamony A, Harlow FH, Ponnampalam J, Clarke P. Congenital brain tumour mimicking fetal intracranial haemorrhage. *J Obstet Gynaecol.* 2007;27(3):314-317. doi:10.1080/01443610701241217
 63. Zhong Y, Lin F, Xu F, et al. Genomic characterization of a PPP1CB-ALK fusion with fusion gene amplification in a congenital glioblastoma. *Cancer Genet.* 2021;252-253:37-42. doi:10.1016/j.cancergen.2020.12.005
 64. Thermo Fisher Scientific. Oncomine Childhood Cancer Research Assay. 2018. <https://www.thermofisher.com/br/en/home/clinical/preclinical-companion-diagnostic-development/oncomine-oncology/oncomine-childhood-research-assay.html>
 65. Jungwirth G, Warta R, Beynon C, et al. Intraventricular meningiomas frequently harbor NF2 mutations but lack common genetic alterations in TRAF7, AKT1, SMO, KLF4, PIK3CA, and TERT. *Acta Neuropathol Commun.* 2019;7(1):140. Published 2019 Aug 30. doi:10.1186/s40478-019-0793-4
 66. Shankar GM, Taylor-Weiner A, Lelic N, et al. Sporadic hemangioblastomas are characterized by cryptic VHL inactivation. *Acta Neuropathol Commun.* 2014;2:167. Published 2014 Dec 24. doi:10.1186/s40478-014-0167-x
 67. Bunda S, Heir P, Metcalf J, et al. CIC protein instability contributes to tumorigenesis in glioblastoma. *Nat Commun.* 2019;10(1):661. Published 2019 Feb 8. doi:10.1038/s41467-018-08087-9
 68. Jiménez G, Shvartsman SY, Paroush Z. The Capicua repressor--a general sensor of RTK signaling in development and disease. *J Cell Sci.* 2012;125(Pt 6):1383-1391. doi:10.1242/jcs.092965
 69. Liu Z, Liu H, Liu Z, Zhang J. Oligodendroglial tumours: subventricular zone involvement and seizure history are associated with CIC mutation status. *BMC Neurol.* 2019;19(1):134. Published 2019 Jun 18. doi:10.1186/s12883-019-1362-y
 70. Cahill DP, Louis DN, Cairncross JG. Molecular background of oligodendroglioma: 1p/19q, IDH, TERT, CIC and FUBP1. *CNS Oncol.* 2015;4(5):287-294. doi:10.2217/cns.15.32
 71. Yip S, Butterfield YS, Morozova O, et al. Concurrent CIC mutations, IDH mutations, and 1p/19q loss distinguish oligodendrogliomas from other cancers. *J Pathol.* 2012;226(1):7-16. doi:10.1002/path.2995
 72. Yang R, Chen LH, Hansen LJ, et al. Cic Loss Promotes Gliomagenesis via Aberrant Neural Stem Cell Proliferation and Differentiation. *Cancer Res.* 2017;77(22):6097-6108. doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-1018
 73. Weissmann S, Cloos PA, Sidoli S, Jensen ON, Pollard S, Helin K. The Tumor Suppressor CIC Directly Regulates MAPK Pathway Genes via Histone Deacetylation. *Cancer Res.* 2018;78(15):4114-4125. doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-0342
 74. Simón-Carrasco L, Jiménez G, Barbacid M, Drostén M. The Capicua tumor suppressor: a gatekeeper of Ras signaling in development and cancer. *Cell Cycle.*

- 2018;17(6):702-711. doi:10.1080/15384101.2018.1450029
75. Inoue D, Fujino T, Kitamura T. ASXL1 as a critical regulator of epigenetic marks and therapeutic potential of mutated cells. *Oncotarget*. 2018;9(81):35203-35204. Published 2018 Oct 16. doi:10.18632/oncotarget.26230
 76. Gelsi-Boyer V, Brecqueville M, Devillier R, Murati A, Mozziconacci MJ, Birnbaum D. Mutations in ASXL1 are associated with poor prognosis across the spectrum of malignant myeloid diseases. *J Hematol Oncol*. 2012;5:12. Published 2012 Mar 21. doi:10.1186/1756-8722-5-12
 77. Lulla RR, Saratsis AM, Hashizume R. Mutations in chromatin machinery and pediatric high-grade glioma. *Sci Adv*. 2016;2(3):e1501354. Published 2016 Mar 18. doi:10.1126/sciadv.1501354
 78. Carbuccia N, Trouplin V, Gelsi-Boyer V, et al. Mutual exclusion of ASXL1 and NPM1 mutations in a series of acute myeloid leukemias. *Leukemia*. 2010;24(2):469-473. doi:10.1038/leu.2009.218
 79. Szpurka H, Jankowska AM, Makishima H, et al. Spectrum of mutations in RARS-T patients includes TET2 and ASXL1 mutations. *Leuk Res*. 2010;34(8):969-973. doi:10.1016/j.leukres.2010.02.033
 80. Thol F, Friesen I, Damm F, et al. Prognostic significance of ASXL1 mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol*. 2011;29(18):2499-2506. doi:10.1200/JCO.2010.33.4938
 81. Makishima H, Jankowska AM, McDevitt MA, et al. CBL, CBLB, TET2, ASXL1, and IDH1/2 mutations and additional chromosomal aberrations constitute molecular events in chronic myelogenous leukemia. *Blood*. 2011;117(21):e198-e206. doi:10.1182/blood-2010-06-292433
 82. Guglielmelli P, Biamonte F, Score J, et al. EZH2 mutational status predicts poor survival in myelofibrosis. *Blood*. 2011;118(19):5227-5234. doi:10.1182/blood-2011-06-363424
 83. Patnaik MM, Padron E, LaBorde RR, et al. Mayo prognostic model for WHO-defined chronic myelomonocytic leukemia: ASXL1 and spliceosome component mutations and outcomes [published correction appears in *Leukemia*. 2013 Oct;27(10):2112. Komroji, R S [corrected to Komrokji, R S]. *Leukemia*. 2013;27(7):1504-1510. doi:10.1038/leu.2013.88
 84. Ohgami RS, Ma L, Merker JD, et al. Next-generation sequencing of acute myeloid leukemia identifies the significance of TP53, U2AF1, ASXL1, and TET2 mutations. *Mod Pathol*. 2015;28(5):706-714. doi:10.1038/modpathol.2014.160
 85. McMillan EA, Ryu MJ, Diep CH, et al. Chemistry-First Approach for Nomination of Personalized Treatment in Lung Cancer. *Cell*. 2018;173(4):864-878.e29. doi:10.1016/j.cell.2018.03.028
 86. Szathmari A, Zerah M, Vinchon M, et al. Ependymoma of the Spinal Cord in Children: A Retrospective French Study. *World Neurosurg*. 2019;126:e1035-e1041. doi:10.1016/j.wneu.2019.03.033
 87. Lin Y, Jea A, Melkonian SC, Lam S. Treatment of pediatric Grade II spinal ependymomas: a population-based study. *J Neurosurg Pediatr*. 2015;15(3):243-249. doi:10.3171/2014.9.PEDS1473

88. Vainchenker W, Constantinescu SN. JAK/STAT signaling in hematological malignancies. *Oncogene*. 2013;32(21):2601-2613. doi:10.1038/onc.2012.347
89. Ma W, Kantarjian H, Zhang X, et al. Mutation profile of JAK2 transcripts in patients with chronic myeloproliferative neoplasias. *J Mol Diagn*. 2009;11(1):49-53. doi:10.2353/jmoldx.2009.080114
90. Odejide O, Weigert O, Lane AA, et al. A targeted mutational landscape of angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Blood*. 2014;123(9):1293-1296. doi:10.1182/blood-2013-10-531509
91. Ali SM, Yao M, Yao J, et al. Comprehensive genomic profiling of different subtypes of nasopharyngeal carcinoma reveals similarities and differences to guide targeted therapy. *Cancer*. 2017;123(18):3628-3637. doi:10.1002/cncr.30781
92. Lin M, Nebral K, Gertzen CGW, et al. JAK2 p.G571S in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: a synergizing germline susceptibility. *Leukemia*. 2019;33(9):2331-2335. doi:10.1038/s41375-019-0459-z
93. Bahar B, Barton K, Kini AR. The role of the Exon 13 G571S JAK2 mutation in myeloproliferative neoplasms. *Leuk Res Rep*. 2016;6:27-28. Published 2016 Jul 25. doi:10.1016/j.lrr.2016.07.003
94. Mukthavaram R, Ouyang X, Saklecha R, et al. Effect of the JAK2/STAT3 inhibitor SAR317461 on human glioblastoma tumorspheres. *J Transl Med*. 2015;13:269. Published 2015 Aug 18. doi:10.1186/s12967-015-0627-5
95. Phi JH, Choi SA, Kim SK, Wang KC, Lee JY, Kim DG. Overcoming Chemoresistance of Pediatric Ependymoma by Inhibition of STAT3 Signaling. *Transl Oncol*. 2015;8(5):376-386. doi:10.1016/j.tranon.2015.08.001
96. Sturm D, Orr BA, Toprak UH, et al. New Brain Tumor Entities Emerge from Molecular Classification of CNS-PNETs. *Cell*. 2016;164(5):1060-1072. doi:10.1016/j.cell.2016.01.015
97. Burford A, Mackay A, Popov S, et al. The ten-year evolutionary trajectory of a highly recurrent paediatric high grade neuroepithelial tumour with MN1:BEND2 fusion. *Sci Rep*. 2018;8(1):1032. Published 2018 Jan 18. doi:10.1038/s41598-018-19389-9
98. Yamasaki K, Nakano Y, Nobusawa S, et al. Spinal cord astroblastoma with an EWSR1-BEND2 fusion classified as a high-grade neuroepithelial tumour with MN1 alteration. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2020;46(2):190-193. doi:10.1111/nan.12593
99. Lorenz J, Rothhammer-Hampl T, Zoubaa S, et al. A comprehensive DNA panel next generation sequencing approach supporting diagnostics and therapy prediction in neurooncology. *Acta Neuropathol Commun*. 2020;8(1):124. Published 2020 Aug 5. doi:10.1186/s40478-020-01000-w
100. Tian Y, Rich BE, Vena N, et al. Detection of KIAA1549-BRAF fusion transcripts in formalin-fixed paraffin-embedded pediatric low-grade gliomas. *J Mol Diagn*. 2011;13(6):669-677. doi:10.1016/j.jmoldx.2011.07.002
101. Jones DT, Kocialkowski S, Liu L, et al. Tandem duplication producing a novel oncogenic BRAF fusion gene defines the majority of pilocytic astrocytomas. *Cancer Res*. 2008;68(21):8673-8677. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2097
102. Srinivasa K, Cross KA, Dahiya S. BRAF Alteration in Central and Peripheral Nervous System Tumors. *Front Oncol*. 2020;10:574974. Published 2020 Sep 15.

doi:10.3389/fonc.2020.574974

103. Kao YC, Sung YS, Zhang L, et al. EWSR1 Fusions With CREB Family Transcription Factors Define a Novel Myxoid Mesenchymal Tumor With Predilection for Intracranial Location. *Am J Surg Pathol.* 2017;41(4):482-490. doi:10.1097/PAS.0000000000000788
104. Ballester LY, Meis JM, Lazar AJ, et al. Intracranial Myxoid Mesenchymal Tumor With EWSR1-ATF1 Fusion. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2020;79(3):347-351. doi:10.1093/jnen/nlz140
105. Bale TA, Oviedo A, Kozakewich H, et al. Intracranial myxoid mesenchymal tumors with EWSR1-CREB family gene fusions: myxoid variant of angiomatoid fibrous histiocytoma or novel entity?. *Brain Pathol.* 2018;28(2):183-191. doi:10.1111/bpa.12504
106. Gareton A, Pierron G, Mokhtari K, et al. ESWR1-CREM Fusion in an Intracranial Myxoid Angiomatoid Fibrous Histiocytoma-Like Tumor: A Case Report and Literature Review. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2018;77(7):537-541. doi:10.1093/jnen/nly039
107. Konstantinidis A, Cheesman E, O'Sullivan J, et al. Intracranial Angiomatoid Fibrous Histiocytoma with EWSR1-CREB Family Fusions: A Report of 2 Pediatric Cases. *World Neurosurg.* 2019;126:113-119. doi:10.1016/j.wneu.2019.02.107
108. White MD, McDowell MM, Pearce TM, Bukowski AJ, Greene S. Intracranial Myxoid Mesenchymal Tumor with Rare EWSR1-CREM Translocation. *Pediatr Neurosurg.* 2019;54(5):347-353. doi:10.1159/000501695
109. Sciot R, Jacobs S, Calenbergh FV, Demaerel P, Wozniak A, Debiec-Rychter M. Primary myxoid mesenchymal tumour with intracranial location: report of a case with a EWSR1-ATF1 fusion. *Histopathology.* 2018;72(5):880-883. doi:10.1111/his.13437
110. Liu C, Liu Y, Zhao Y, et al. Primary Intracranial Mesenchymal Tumor with EWSR1-CREM Gene Fusion: A Case Report and Literature Review. *World Neurosurg.* 2020;142:318-324. doi:10.1016/j.wneu.2020.07.015
111. Sturm D, Witt H, Hovestadt V, et al. Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma. *Cancer Cell.* 2012;22(4):425-437. doi:10.1016/j.ccr.2012.08.024
112. Venneti S, Garimella MT, Sullivan LM, et al. Evaluation of histone 3 lysine 27 trimethylation (H3K27me3) and enhancer of Zest 2 (EZH2) in pediatric glial and glioneuronal tumors shows decreased H3K27me3 in H3F3A K27M mutant glioblastomas. *Brain Pathol.* 2013;23(5):558-564. doi:10.1111/bpa.12042
113. Sturm D, Bender S, Jones DT, et al. Paediatric and adult glioblastoma: multiform (epi)genomic culprits emerge. *Nat Rev Cancer.* 2014;14(2):92-107. doi:10.1038/nrc3655
114. Oliveira VF, De Sousa GR, Dos Santos AC, et al. Evaluating H3F3A K27M and G34R/V somatic mutations in a cohort of pediatric brain tumors of different and rare histologies. *Childs Nerv Syst.* 2021;37(2):375-382. doi:10.1007/s00381-020-04852-8
115. Schwartzenruber J, Korshunov A, Liu XY, et al. Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma [published correction appears in *Nature.* 2012 Apr 5;484(7392):130]. *Nature.* 2012;482(7384):226-231. Published

- 2012 Jan 29. doi:10.1038/nature10833
116. Testa U, Castelli G, Pelosi E. Genetic Abnormalities, Clonal Evolution, and Cancer Stem Cells of Brain Tumors. *Med Sci (Basel)*. 2018;6(4):85. Published 2018 Oct 2. doi:10.3390/medsci6040085
 117. Deng H, Zeng J, Zhang T, et al. Histone H3.3K27M Mobilizes Multiple Cancer/Testis (CT) Antigens in Pediatric Glioma. *Mol Cancer Res*. 2018;16(4):623-633. doi:10.1158/1541-7786.MCR-17-0460
 118. Huang TY, Piunti A, Lulla RR, et al. Detection of Histone H3 mutations in cerebrospinal fluid-derived tumor DNA from children with diffuse midline glioma. *Acta Neuropathol Commun*. 2017;5(1):28. Published 2017 Apr 17. doi:10.1186/s40478-017-0436-6
 119. Karremann M, Gielen GH, Hoffmann M, et al. Diffuse high-grade gliomas with H3 K27M mutations carry a dismal prognosis independent of tumor location. *Neuro Oncol*. 2018;20(1):123-131. doi:10.1093/neuonc/nox149
 120. Lu VM, Alvi MA, McDonald KL, Daniels DJ. Impact of the H3K27M mutation on survival in pediatric high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis. *J Neurosurg Pediatr*. 2018;23(3):308-316. doi:10.3171/2018.9.PEDS18419
 121. Yuen BT, Knoepfler PS. Histone H3.3 mutations: a variant path to cancer. *Cancer Cell*. 2013;24(5):567-574. doi:10.1016/j.ccr.2013.09.015
 122. Cheng F, Guo D. MET in glioma: signaling pathways and targeted therapies. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019;38(1):270. Published 2019 Jun 20. doi:10.1186/s13046-019-1269-x
 123. Awad AJ, Burns TC, Zhang Y, Abounader R. Targeting MET for glioma therapy. *Neurosurg Focus*. 2014;37(6):E10. doi:10.3171/2014.9.FOCUS14520
 124. Hutter S, Bolin S, Weishaupt H, Swartling FJ. Modeling and Targeting MYC Genes in Childhood Brain Tumors. *Genes (Basel)*. 2017;8(4):107. Published 2017 Mar 23. doi:10.3390/genes8040107
 125. Pierscianek D, Kim YH, Motomura K, et al. MET gain in diffuse astrocytomas is associated with poorer outcome. *Brain Pathol*. 2013;23(1):13-18. doi:10.1111/j.1750-3639.2012.00609.x
 126. Kong DS, Song SY, Kim DH, et al. Prognostic significance of c-Met expression in glioblastomas. *Cancer*. 2009;115(1):140-148. doi:10.1002/cncr.23972
 127. Koschmann C, Zamler D, MacKay A, et al. Characterizing and targeting PDGFRA alterations in pediatric high-grade glioma. *Oncotarget*. 2016;7(40):65696-65706. doi:10.18632/oncotarget.11602
 128. Korshunov A, Ryzhova M, Hovestadt V, et al. Integrated analysis of pediatric glioblastoma reveals a subset of biologically favorable tumors with associated molecular prognostic markers. *Acta Neuropathol*. 2015;129(5):669-678. doi:10.1007/s00401-015-1405-4
 129. Khuong-Quang DA, Buczkowicz P, Rakopoulos P, et al. K27M mutation in histone H3.3 defines clinically and biologically distinct subgroups of pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas. *Acta Neuropathol*. 2012;124(3):439-447. doi:10.1007/s00401-012-0998-0
 130. Chmielecki J, Bailey M, He J, et al. Genomic Profiling of a Large Set of Diverse

- Pediatric Cancers Identifies Known and Novel Mutations across Tumor Spectra. *Cancer Res.* 2017;77(2):509-519. doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-1106
131. Lake JA, Donson AM, Prince E, et al. Targeted fusion analysis can aid in the classification and treatment of pediatric glioma, ependymoma, and glioneuronal tumors. *Pediatr Blood Cancer.* 2020;67(1):e28028. doi:10.1002/pbc.28028
 132. Štiková Z, Ptáková N, Horáková M, Kost'un J, Ondič O. Inflammatory myofibroblastic tumor of the uterus - case report. *Inflamatorní myofibroblastický tumor dělohy - kazuistika. Cesk Patol.* 2019;55(4):239-243.
 133. Aghajan Y, Levy ML, Malicki DM, Crawford JR. Novel PPP1CB-ALK fusion protein in a high-grade glioma of infancy. *BMJ Case Rep.* 2016;2016:bcr2016217189. Published 2016 Aug 16. doi:10.1136/bcr-2016-217189
 134. Guerreiro Stucklin AS, Ryall S, Fukuoka K, et al. Alterations in ALK/ROS1/NTRK/MET drive a group of infantile hemispheric gliomas. *Nat Commun.* 2019;10(1):4343. Published 2019 Sep 25. doi:10.1038/s41467-019-12187-5
 135. Kameda M, Otani Y, Ichikawa T, Shimada A, Ichimura K, Date I. Congenital Glioblastoma with Distinct Clinical and Molecular Characteristics: Case Reports and a Literature Review. *World Neurosurg.* 2017;101:817.e5-817.e14. doi:10.1016/j.wneu.2017.02.026
 136. Blandin AF, et al. ALK amplification and rearrangements are recurrent targetable events in glioblastoma. *Neuro-Oncology.* 2018;Volume 20, issue suppl6;vi204–vi205.
 137. Takita J. The role of anaplastic lymphoma kinase in pediatric cancers. *Cancer Sci.* 2017;108(10):1913-1920. doi:10.1111/cas.13333
 138. Brastianos PK, Ippen FM, Hafeez U, Gan HK. Emerging Gene Fusion Drivers in Primary and Metastatic Central Nervous System Malignancies: A Review of Available Evidence for Systemic Targeted Therapies. *Oncologist.* 2018;23(9):1063-1075. doi:10.1634/theoncologist.2017-0614
 139. Holla VR, Elamin YY, Bailey AM, et al. ALK: a tyrosine kinase target for cancer therapy. *Cold Spring Harb Mol Case Stud.* 2017;3(1):a001115. doi:10.1101/mcs.a001115
 140. Wong A. The Emerging Role of Targeted Therapy and Immunotherapy in the Management of Brain Metastases in Non-Small Cell Lung Cancer. *Front Oncol.* 2017;7:33. Published 2017 Apr 5. doi:10.3389/fonc.2017.00033
 141. Kim G, Ko YT. Small molecule tyrosine kinase inhibitors in glioblastoma. *Arch Pharm Res.* 2020;43(4):385-394. doi:10.1007/s12272-020-01232-3
 142. Le Rhun E, Preusser M, Roth P, et al. Molecular targeted therapy of glioblastoma. *Cancer Treat Rev.* 2019;80:101896. doi:10.1016/j.ctrv.2019.101896
 143. Dunn DB. Larotrectinib and Entrectinib: TRK Inhibitors for the Treatment of Pediatric and Adult Patients With NTRK Gene Fusion. *J Adv Pract Oncol.* 2020;11(4):418-423. doi:10.6004/jadpro.2020.11.4.9
 144. Gatalica Z, Xiu J, Swensen J, Vranic S. Molecular characterization of cancers with NTRK gene fusions. *Mod Pathol.* 2019;32(1):147-153. doi:10.1038/s41379-018-0118-3
 145. Okamura R, Boichard A, Kato S, Sicklick JK, Bazhenova L, Kurzrock R. Analysis of NTRK Alterations in Pan-Cancer Adult and Pediatric Malignancies: Implications for

- NTRK-Targeted Therapeutics. *JCO Precis Oncol.* 2018;2018:PO.18.00183. doi:10.1200/PO.18.00183
146. Cocco E, Scaltriti M, Drilon A. NTRK fusion-positive cancers and TRK inhibitor therapy. *Nat Rev Clin Oncol.* 2018;15(12):731-747. doi:10.1038/s41571-018-0113-0
 147. Amatu A, Sartore-Bianchi A, Siena S. NTRK gene fusions as novel targets of cancer therapy across multiple tumour types. *ESMO Open.* 2016;1(2):e000023. Published 2016 Mar 18. doi:10.1136/esmoopen-2015-000023
 148. Gambella A, Senetta R, Collemi G, et al. NTRK Fusions in Central Nervous System Tumors: A Rare, but Worthy Target. *Int J Mol Sci.* 2020;21(3):753. Published 2020 Jan 23. doi:10.3390/ijms21030753
 149. Clarke M, Mackay A, Ismer B, et al. Infant High-Grade Gliomas Comprise Multiple Subgroups Characterized by Novel Targetable Gene Fusions and Favorable Outcomes. *Cancer Discov.* 2020;10(7):942-963. doi:10.1158/2159-8290.CD-19-1030
 150. Wu G, Diaz AK, Paugh BS, et al. The genomic landscape of diffuse intrinsic pontine glioma and pediatric non-brainstem high-grade glioma. *Nat Genet.* 2014;46(5):444-450. doi:10.1038/ng.2938
 151. Bongarzone I, Pierotti MA, Monzini N, et al. High frequency of activation of tyrosine kinase oncogenes in human papillary thyroid carcinoma. *Oncogene.* 1989;4(12):1457-1462.
 152. Rolfo C. NTRK gene fusions: a rough diamond ready to sparkle. *Lancet Oncol.* 2020;21(4):472-474. doi:10.1016/S1470-2045(20)30026-7
 153. Alharbi M, Mobark NA, Balbaid AAO, et al. Regression of ETV6-NTRK3 Infantile Glioblastoma After First-Line Treatment With Larotrectinib. *JCO Precis Oncol.* 2020;4:PO.20.00017. Published 2020 Jun 30. doi:10.1200/PO.20.00017

7. ARTIGOS CIENTÍFICOS

7.1. Artigo científico submetido para a revista *Journal of Neuro-Oncology*

Journal of Neuro-Oncology

Molecular profiling of pediatric and adolescent ependymomas: identification of genetic variants using a next-generation sequencing panel --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	NEON-D-21-00447
Full Title:	Molecular profiling of pediatric and adolescent ependymomas: identification of genetic variants using a next-generation sequencing panel
Article Type:	Laboratory Investigation
Keywords:	Ependymoma; Pediatric brain tumor; Central nervous system tumor; Next-generation sequencing; Molecular profiling; Genomic landscape
Corresponding Author:	Silvia Caminada Toledo, Ph.D Pediatric Oncology Institute São Paulo, São Paulo BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Pediatric Oncology Institute
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Débora Cabral de Carvalho Corrêa, BSc
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Débora Cabral de Carvalho Corrêa, BSc Francice Tesser-Gamba, Ph.D Indhira Dias Oliveira, Ph.D Nasjla Saba da Silva, M.D, MSc Andrea Maria Capellano, M.D, Ph.D Maria Teresa de Seixas Alves, M.D, Ph.D Patrícia Alessandra Dastoli, M.D, Ph.D Sergio Cavalheiro, M.D, Ph.D Silvia Regina Caminada de Toledo, Ph.D

Authors

Débora Cabral de Carvalho Corrêa^{1,2}, Francine Tesser-Gamba¹, Indhira Dias Oliveira¹, Nasjla Saba da Silva¹, Andrea Maria Capellano¹, Maria Teresa de Seixas Alves³, Patrícia Alessandra Dastoli¹, Sergio Cavalheiro^{1,4}, Silvia Regina Caminada de Toledo^{1,2}

¹ Pediatric Oncology Institute-GRAACC, Department of Pediatrics, Federal University of Sao Paulo, Sao Paulo, SP, Brazil

² Department of Morphology and Genetics, Division of Genetics, Federal University of Sao Paulo, Sao Paulo, SP, Brazil

³ Department of Pathology, Federal University of Sao Paulo, Sao Paulo, SP, Brazil

⁴ Department of Neurology and Neurosurgery, Federal University of Sao Paulo, Sao Paulo, SP, Brazil

ABSTRACT

Purpose Ependymoma (EPN) is the third most common brain tumor in children and adolescents and is incurable in up to 40% of cases, as chemotherapy is ineffective in most individuals and treatment remains challenging. This study aimed to investigate molecular alterations, with a potential prognostic marker and therapeutic target in EPN of childhood and adolescence, using a next-generation sequencing (NGS)-based panel specific for pediatric neoplasms. **Methods** We selected 61 EPN samples from patients treated at Pediatric Oncology Institute-GRAACC/UNIFESP that were divided according to the anatomical compartment of the central nervous system (CNS): 42 posterior fossa (PF), 14 supratentorial (ST), and five spinal (SP). NGS was performed to identify somatic genetic variants in tumor samples using the OncoPrint Childhood Cancer Research Assay[®] (OCCRA[®]) panel, from Thermo Fisher Scientific[®]. **Results** Genetic variants were identified in 24 of 61 (39.3%) tumors and over 90.0% of all variants were pathogenic or likely pathogenic. The most commonly variants detected were in *CIC*, *ASXL1*, and *JAK2* genes and have not been reported in EPN yet. *MNI-BEND2* fusion, alteration recently described in a new CNS tumor entity, was identified in one ST sample. Additionally, *YAP1-MAMLD1* fusion, a rare event associated with good outcome in ST-EPN, was observed in two samples from alive female patients with age at diagnosis under five years. **Conclusions** EPN molecular profiling by the OCCRA[®] panel showed mutational signatures not yet described in EPN analyzed by NGS previously, which highlights the clinical importance in identifying new genetic variants for patients' prognosis and therapeutic orientation.

INTRODUCTION

Central nervous system (CNS) tumors represent the most common solid malignancy of childhood and adolescence and ependymoma (EPN) is the third most frequent, accounting for 10% of all brain tumors in children and 30% affecting patients under the age of 3 years^{1, 2}. EPN is an ependymal neoplasm derived from glial cells and can arise from the ependymal lining of the ventricular system or the central canal of the spinal cord (SP). In children, about 90% of EPNs are intracranial, with one-third being located supratentorial (ST) and two-thirds occurring in the posterior fossa (PF)³. In contrast to adults, EPN affecting the SP is exceedingly rare in infants⁴.

Although advances have been made in implementing a precision medicine for pediatric and adolescent CNS tumors over the last few decades, the survival curves of these patients remain stagnated. The current 5-year survival rates of pediatric EPN range from 39% to 64%

and this tumor is incurable in up to 40% of cases, as chemotherapy is ineffective in most individuals and treatment reveals to be challenging⁵. The ability to analyze tumor tissues on a genomic scale provided a wider understanding about the biology and the mechanisms involved in the neoplastic process, as CNS tumors have shown to include several subgroups with different patterns of genetics, epigenetics, clinical behavior, and even cellular origin¹.

Recent studies of EPN genomic profiling revealed that this tumor comprises at least nine molecular subgroups according to its anatomical compartment of the CNS – PF, ST and SP region, each of them characterized by recurrent genetic and epigenetic alterations⁶⁻⁸. In intracranial tumors, *C11orf95* and *YAP1* fusion genes are the most frequent mutational signatures observed in ST-EPN, while PF-EPN is characterized by two methylation groups, PF-EPN-A and PF-EPN-B. Accordingly, EPN molecular subgroups are defined by unique demographic and clinical characteristics and disparate prognosis^{7, 8}.

With the advent of next-generation sequencing (NGS) technology, it became possible to investigate molecular signatures of different tumors at the time of diagnosis and personalize targeted therapies⁹. The genomic landscape of pediatric tumors differs significantly from that observed in adults, mostly in terms of mutation frequency and genetic variant class. However, the majority of NGS panels are designed for adult tumors and do not comprise the genetic alterations commonly found in pediatric neoplasms^{10, 11}. The OncoPrint Childhood Cancer Research Assay[®] (OCCRA[®]) is the first genetic NGS-based panel, developed specifically for the main neoplasms of childhood and adolescence, and contains information from more than 250 genes about the presence of hotspot mutations, copy number alterations, rearrangements, and gene expression. Hence, molecular profiling of pediatric and adolescent EPNs that appropriately integrates the clinical, radiologic, and histologic aspects of this tumor, is essential for patients' prognosis and therapeutic orientation^{11, 12}.

Therefore, the present study aimed to investigate molecular alterations, with a potential prognostic marker and therapeutic target in EPN of childhood and adolescence using a specific NGS panel. We identified genetic variants in tumor samples for a comprehensive profiling of EPN and correlated our findings with the patients' clinical and histopathological features.

MATERIALS AND METHODS

Samples

All 61 fresh-frozen EPN samples used in this study were obtained from patients treated at Pediatric Oncology Institute-Grupo de Apoio ao Adolescente e à Criança com Câncer/Federal University of Sao Paulo (IOP-GRAACC/UNIFESP) and belong to the

Institute Biobank (CONEP B-053). All 61 EPN samples were divided according to the anatomical compartment of the CNS: 42 PF-EPN, 14 ST-EPN and five SP-EPN samples.

Patient characteristics

We selected 61 patients diagnosed with EPN and admitted to treatment at IOP-GRAACC/UNIFESP between 2003 and 2020. The age range of the patients is from 0.39 to 22.00 years, with a median age of 3.33 years at diagnosis. All primary tumors were classified according to histological type and tumor grade, based on 2016 World Health Organization classification of tumors of the CNS (2016 CNS WHO)¹³ - myxopapillary EPN (grade I), papillary EPN (grade II), EPN (grade II) and anaplastic EPN (grade III). All patients underwent surgery (gross total resection or subtotal resection) or biopsy, and were treated with chemotherapy, radiotherapy, or concomitant chemotherapy and radiotherapy, following standard techniques and protocols. Clinical and histopathological details of the patients analyzed in this study, categorized by tumor subgroup, are summarized in Table 1.

DNA and RNA extraction and cDNA synthesis

Total DNA and RNA were extracted from frozen tumor samples using FastPrep[®]-24 Tissue Ruptor (MP Biomedicals[®]) and AllPrep DNA/RNA Mini Kit (QIAGEN[®]) according to the manufacturer's instructions. Synthesis of complementary DNA (cDNA) was performed using 20ng of total RNA according to the manufacturer's protocol of SuperScript Vilo IV[®] (Thermo Fisher Scientific[®]).

Next-Generation Sequencing

Sequencing libraries were prepared from 20ng of DNA and 20ng of cDNA from each tumor sample, following the manufacture's protocol for the OCCRA[®] (Thermo Fisher Scientific[®]). Amplicon libraries with barcodes specific to each sample were generated from DNA and cDNA, and automated clonal amplification was performed in Ion Chef[™] System (Thermo Fisher Scientific[®]). After the preparation was completed, the libraries were loaded into the Ion 540[™] chip (Thermo Fisher Scientific[®]) and inserted into the Ion S5[™] System Sequencer (Thermo Fisher Scientific[®]).

Sequencing was performed by using 200-bp reads and the Ion 540[™] chip on the Ion S5[™] System sequencing platform. At the end of the sequencing run, the data generated by the large-scale sequencing was performed and the quality for each reading was evaluated using Torrent Suite[™] software version 5.2.1 (Thermo Fisher Scientific[®]). Only amplicon readings that showed a ratio between the forward and reverse primers ≥ 0.6 and ≤ 1.4 were selected. The readings obtained were aligned with the human reference genome hg19/GHCh37 within Torrent Suite[™] (Thermo Fisher Scientific[®]) and were considered readings with a minimum

coverage of 2000x. The generated BAM files were analyzed using Integrative Genomics Viewer software (IGV Software, San Diego, CA, USA). The Variant Call Format files were obtained and the variants identified were compared with the following databases: COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer), dbSNP (Single Nucleotide Polymorphism Database), and ExAC (The Exome Aggregation Consortium).

OncoPrint Childhood Cancer Research Assay[®] sequencing panel analysis

All tumor samples included in this study were subjected to targeted sequencing using the OCCRA[®] panel (Thermo Fisher Scientific[®]) that includes a total of 255 genes (Online Resource 1) known to participate in oncogenic events in pediatric tumors. Sequencing analysis contains information about multi-nucleotide variants (MNVs), single-nucleotide variants (SNVs), insertions or deletions (InDels), copy number variations (CNVs) and gene fusions. Genetic variants were classified according to class (SNV or InDel), functional effect (missense, nonsense, synonymous, and frameshift), and clinical significance (pathogenic, likely pathogenic, uncertain significance, likely benign, and benign) according to FATHMM (Functional Analysis through Hidden Markov Model) prediction scores (0 – 1), with score ≥ 0.7 classified as pathogenic. Variant characteristics were evaluated using COSMIC, ClinVar (Clinically Relevant Variation), and VARSOME (The Human Genomic Variant Search Engine) databases.

Data and statistical analysis

Data analysis was performed using IBM SPSS Statistics version 21.0 (Armonk, NY: IBM Corp), *jamovi* version 1.2 (The Jamovi Project, Sidney, AU), and GraphPad Prism version 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) for Windows. Overall survival (OS) curves were generated by applying Kaplan-Meier method with a 95% confidence interval (95% CI), and then compared by Log-rank test. Statistical significance was taken as $p < 0.05$ (5%).

RESULTS

A total of 61 EPN samples from our institution were sequenced and somatic genetic variants were identified in 24 of 61 (39.3%) tumors: 15 PF-EPN (15/42=35.7%), eight ST-EPN (8/14=57.1%) and one SP-EPN (1/5=20.0%). We observed 18 altered genes and 23 genetic variants, which include 10 SNVs (43.5%), six InDels (26.1%), five CNVs (21.7%) and two gene fusions (8.7%). Profile of genetic variants identified in tumor samples can be found in Table 2.

Identification of genetic variants in tumor samples

The most frequently detected genetic variants in EPN samples were involving *ASXL1* and *CIC* genes, each identified in six samples. Variants in *JAK2*, *KMT2D*, and *ABL2* genes were

also common, each of them observed in three samples. We identified a total of 10 and 12 altered genes in PF-EPN and ST-EPN samples, respectively, and *ASXL1* was the only altered gene detected in SP-EPN subgroup (Figure 1a).

SNVs were the majority of genetic variants detected in EPN samples and were observed in 12 PF-EPN, five ST-EPN, and one SP-EPN. InDels were also commonly identified and were present in six samples, three PF-EPN and three ST-EPN. CNVs were exclusively found in three PF-EPN samples and were involving *ABL2* and *MDM4* genes. In contrast, gene fusions were detected only in ST-EPN samples. *YAPI-MAMLD1* fusion, which consists in exon 5 of *YAPI* and exon 3 of *MAMLD1*, was observed in two ST-EPN samples and a fusion between the exon 1 of *MNI* and the exon 7 of *BEND2* was found in one ST sample (Table 2).

Moreover, chromosome 20 had the highest number of variants (19.0%), as *ASXL1* is located at the 20q11.21 region and was the most frequently altered gene detected (Figure 1b). Missense and frameshift insertion were the most common events, accounting for 43.8% and 31.3% of cases, respectively. Nonsense variants were responsible for 12.5% of cases and synonymous and frameshift deletion variants were observed in 6.2% of cases each (Figure 1c). Of all SNVs and InDels variants identified in EPN samples, 62.5% were pathogenic, 31.2% were likely pathogenic, and 6.3% were likely benign (Figure 1d).

Clinical and molecular profiling of EPN patients

Analysis of EPN molecular profiling was performed in order to evaluate a possible association between somatic genetic variants detected by the OCCRA[®] panel and the following clinical features of the patients: age at diagnosis, gender, actual status, tumor grade, and tumor location (Figure 2).

The pathogenic and synonymous mutation c.4533C>T of *CIC* gene, previously reported as a single-nucleotide polymorphism (SNP), was the most frequent variant detected in EPN samples. This variant was identified in six samples from patients with distinct clinical characteristics, four PF-EPN and two ST-EPN. *ASXL1* gene had the highest number of variants and was also observed in a group of six samples. *ASXL1* variants include two SNVs, one missense and one nonsense substitution, and two InDels with frameshift insertion effect. The pathogenic and missense c.3306G>T variant was the most common variant of *ASXL1* gene and was identified in three samples of grade II tumors, two PF-EPN and one SP-EPN. Also, *ASXL1* c.3306G>T variant was the only genetic alteration identified in SP-EPN subgroup. Other variant frequently observed in tumor samples was the pathogenic and missense c.1711G>A variant of *JAK2* gene, detected in three samples, two PF-EPN and one ST-EPN.

Overall survival comparisons between EPN subgroups

PF-EPN, ST-EPN, and SP-EPN patients included in the study were observed for a median of 37.85, 63.91, and 123.70 months, respectively, from date of diagnosis to last contact or death (Table 1). Survival analysis of all 61 EPN patients showed a median OS of 73.83 months (95% CI: 28.85 – 118.81) and 10-year OS rate of 45.9%. Also, OS curves showed a statistical difference between EPN subgroups ($\chi^2=9.51$, $p<0.0086$) (Figure 3), as PF patients revealed the lowest 10-year OS rate (22.8%) when compared to ST patients (71.6%) ($p<0.007$) (Table 1). Log-rank test comparisons between OS curves of EPN patients according to tumor location are provided in Online Resource 2.

DISCUSSION

We investigated the mutational signatures of childhood and adolescence EPN using a comprehensive genetic NGS-based panel specific for pediatric neoplasms, as increasing evidence suggests that pediatric tumors have distinct molecular profiles from those observed in adults^{10, 11}. Our findings showed that somatic genetic variants were present in 24 of 61 (39.3%) tumors, and the most frequently detected variants in EPN samples were in *CIC*, *ASXL1* and *JAK2* genes. Also, over 90.0% of all variants identified were pathogenic or likely pathogenic.

In our 61 patients analyzed, the most common genetic variant identified was *CIC* c.4533C>T variant, which was observed in six samples from patients with distinguished clinical characteristics. *CIC* c.4533C>T variant, previously reported as a SNP, is a pathogenic variant with synonymous effect and has already been described in meningioma and hemangioblastoma^{14, 15}. *CIC* gene is a transcriptional repressor that counteracts activation of genes downstream of *MAPK* signaling pathway, such as the tyrosine kinase receptor (*RTK*)/*Ras*/*ERK* pathway, which is known to regulate multiple biological processes, including cell proliferation, differentiation, and migration. Additionally, it has been demonstrated that deregulation of this pathway can lead to several diseases, most notably the development of neoplasms^{16, 17}, and *CIC* gene has been implicated in tumor progression, particularly in glioblastoma and oligodendrogliomas¹⁸⁻²⁰. Alterations in *CIC* gene, located at the 19q13.2 region, occur in approximately 70% of oligodendrogliomas that present 1p/19q co-deletion. In these tumors, the majority of *CIC* alterations observed, such as premature stop codons and frameshift insertions or deletions, are loss-of-function mutations that neutralize *CIC*'s repressive activity^{22, 23} and are associated with a poorer outcome¹⁷. Nevertheless, c.4533C>T variant of *CIC* gene, commonly detected in our samples, results from a hotspot mutation with gain-of-function. Although five of six patients with *CIC* c.4533C>T variant

were alive at the time of the analysis, it is not cautioning to consider this mutation as a favorable prognostic marker in EPN, given that our findings are based on a limited number of cases.

Alterations in *ASXL1* gene, responsible for regulating epigenetic functions, have been described mainly in myeloid neoplasms and previous studies have demonstrated that most of the variants observed in these tumors, which consist in nonsense and frameshift variants, are associated with worse prognosis, while the functional relevance of missense variants remains unclear^{24, 25}. In pediatric CNS tumors, *ASXL1* mutations have only been described in diffuse intrinsic pontine gliomas²⁶. The pathogenic and missense c.3306G>T variant of *ASXL1* gene, recurrently observed in our study, was detected in three samples from patients that died due to disease progression and was the only genetic alteration identified in SP-EPN samples. In children and adolescents, SP-EPN is an extremely rare tumor, representing less than 13% of all pediatric CNS EPNs²⁷. The age at diagnosis usually ranges between 10 and 14 years for pediatric patients and children with grade II SP-EPN commonly show favorable clinical outcomes, with 5-year OS rates of 90-100%^{27, 28}. In contrast to these previous studies, our patient with SP-EPN grade II, whose tumor showed no additional alterations besides the *ASXL1* c.3306G>T variant, was diagnosed with 3.16 years of age and submitted to several neurosurgical resections.

Moreover, *JAK2* gene, which was frequently observed in our samples, is a non-receptor tyrosine kinase that mediates signaling via the *JAK2/STAT3* pathway, and in some cancers, high expression of this pathway has been associated with poor prognosis and chemotherapy-resistance²⁹. In glioblastoma, *JAK2/STAT3* inhibition has been demonstrated to slow disease progression and in EPN its inhibitor is a promising therapeutic agent for intrinsically chemotherapy-resistant tumors, such as pediatric intracranial EPN^{29, 30}. However, little is known regarding *JAK2* role in EPN tumorigenesis. In our study, the pathogenic c.1711G>A variant of *JAK2* gene, commonly identified in PF and ST samples, has already been described as a key event in hematological malignancies³¹. In addition to *JAK2* c.1711G>A variant, *MNI-BEND2* fusion was also detected in the EPN sample located in the ST compartment. Recently, Sturm *et al.* (2016) identified a new entity of CNS tumors, the high-grade neuroepithelial tumors with MN1 alteration (HGNET-MN1), that are characterized by global patterns of methylation and gene fusions that target *MNI*, with *BEND2* being the most common partner gene³². Approximately 1/3 of HGNET-MN1 tumors are histologically diagnosed as astroblastoma, a rare glial neoplasm predominant in female patients that typically arises in the ST region, especially the cerebral hemispheres^{33, 34}. Thus, taking in

account that our findings include a ST tumor *MNI-BEND2* fusion-positive from a female patient and the current emergence of HGNET-MN1 group, our sample may be reclassified.

Previous studies that inquired genetic alterations in pediatric EPN have already proposed that ST-EPN differs from EPN located in the PF or SP region³⁵. Currently, it is known that *C11orf95-RELA* fusions are the most frequent genetic alteration in childhood ST-EPN, accounting for more than 70% of cases³⁶. In contrast, ST-EPNs with *YAPI-MAMLD1* fusions predominantly occur in infants and are a rare event, with few cases reported^{37, 38}. Unexpectedly, *C11orf95-RELA* fusions were not detected in ST-EPN samples of our study, while *YAPI-MAMLD1* fusions were observed in two cases. *YAPI-MAMLD1* fusion was identified in samples from two alive female patients with EPN grade II and with median age of 0.86 years at diagnosis. Also, OS curves showed a statistical difference between ST-EPN and PF-EPN patients, as ST patients revealed better outcomes, with a 10-year OS rate of 71.6%, when compared to PF patients. Hence, our findings are under previous reports on few *YAPI-MAMLD1*-fused EPNs, as this genetic signature occurs mostly in young girls under three years and is associated with a good prognosis^{37, 38}.

In our subset of samples analyzed, few were the number of EPNs that presented more than one genetic event since it is known that pediatric tumors typically show less somatic mutations than adult tumors^{10, 11}. Also, it has already been demonstrated that PF, ST and SP EPN subgroups often differ in terms of genetic and molecular hallmarks⁷. Interestingly, in our study, genetic variants of *CIC* (c.4533C>T), *ASXL1* (c.3306G>T) and *JAK2* (c.1711G>A) were observed in EPN samples from different tumor locations. Thus, these variants have been substantially described in glioma and hematological neoplasms, but have not been reported in EPN yet. These pieces of evidence indicate that, presumably, this is the first time that these variants of *CIC*, *ASXL1*, and *JAK2* genes were identified in EPN samples.

In conclusion, EPN molecular profiling by the OCCRA[®] panel showed mutational signatures not yet described in EPN analyzed by NGS previously, which highlights the clinical importance in identifying new genetic variants. Therefore, further complementary studies are needed to better comprehend the potential prognostic impact of molecular alterations in EPN of childhood and adolescence, as identification of genetic variants is central in patients' outcome and therapeutic orientation, and in tumor reclassification in clinical practice.

DECLARATIONS

Funding

This work was supported by grants from FAPESP (Sao Paulo Research Foundation – no.

2019/12074-5) and IOP-GRAACC/UNIFESP.

Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethics approval

All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional research committee (Research Ethics Committee – Federal University of Sao Paulo no. 0915/2019). This article does not contain any studies with animals performed by any of the authors.

Informed Consent

Samples from each primary tumor were collected after informed consent was signed by patients/guardians according to the institutional research committee (Research Ethics Committee – Federal University of Sao Paulo no. 0915/2019). The biological material is acquired via a Biobank of the Pediatric Oncology Institute-GRAACC/UNIFESP (Commission of Ethics in Research - CONEP B-053).

Data Availability Statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

REFERENCES

1. Gajjar A, Pfister SM, Taylor MD, Gilbertson RJ (2014) Molecular insights into pediatric brain tumors have the potential to transform therapy. *Clinical Cancer Research* 20(22):5630-5640. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-0833
2. Lillard JC, Venable GT, Khan NR, Tatevossian RG, Dalton J, Vaughn BN, Klimo P (2019) Pediatric Supratentorial Ependymoma: Surgical, Clinical, and Molecular Analysis. *Neurosurgery* 85(1):41-49. <https://doi.org/10.1093/neuros/nyy239>
3. Khatua S, Mangum R, Bertrand KC, Zaky W, McCall D, Mack SC (2018) Pediatric ependymoma: current treatment and newer therapeutic insights. *Future Oncology* 14(30):3175-3186. <https://doi.org/10.2217/fon-2018-0502>
4. Lundar T, Due-Tønnessen BJ, Scheie D, Brandal P (2014) Pediatric spinal ependymomas: an unpredictable and puzzling disease. Long-term follow-up of a single consecutive institutional series of ten patients. *Child's Nervous System* 30(12):2083–2088. <https://doi.org/10.1007/s00381-014-2491-7>
5. Witt H et al (2011) Delineation of two clinically and molecularly distinct subgroups of posterior fossa ependymoma. *Cancer Cell* 20(2):143–157. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.07.007>
6. Pajtler KW, Witt H, Sill M et al (2015) Molecular Classification of Ependymal Tumors across All CNS Compartments, Histopathological Grades, and Age Groups. *Cancer Cell* 27(5):728-743. doi:10.1016/j.ccell.2015.04.002
7. Ellison DW, Aldape KD, Capper D et al (2020) cIMPACT-NOW update 7: advancing the molecular classification of ependymal tumors. *Brain Pathology* 30(5):863-866. doi:10.1111/bpa.12866
8. Pajtler KW, Mack SC, Ramaswamy V et al (2017) The current consensus on the clinical management of intracranial ependymoma and its distinct molecular variants. *Acta Neuropathologica* 133(1):5-12. doi:10.1007/s00401-016-1643-0
9. Kline CN et al (2017) Targeted next-generation sequencing of pediatric neuro-oncology patients

- improves diagnosis, identifies pathogenic germline mutations, and directs targeted therapy. *Neuro-Oncology* 19(5):699-709. <https://doi.org/10.1093/neuonc/now254>
10. Ahmed AA, Vundamati DS, Farooqi MS, Guest E (2018) Precision Medicine in Pediatric Cancer: Current Applications and Future Prospects. *High Throughput* 7(4):39. doi:10.3390/ht7040039
 11. Hiemenz MC, Ostrow DG, Busse TM et al (2018) OncoKids: A Comprehensive Next-Generation Sequencing Panel for Pediatric Malignancies. *Journal of Molecular Diagnostics* 20(6):765-776. doi:10.1016/j.jmoldx.2018.06.009
 12. Williams HL, Walsh K, Diamond A, Oniscu A, Deans ZC (2018) Validation of the Oncomine™ focus panel for next-generation sequencing of clinical tumour samples. *Virchows Archiv: European Journal of Pathology* 473(4):489-503. doi:10.1007/s00428-018-2411-4
 13. Banan R, Hartmann C (2016) The new WHO 2016 classification of brain tumors – what neurosurgeons need to know. *Acta neurochirurgica* 159(3):403-418.
 14. Jungwirth G et al (2019) Intraventricular meningiomas frequently harbor NF2 mutations but lack common genetic alterations in TRAF7, AKT1, SMO, KLF4, PIK3CA, and TERT. *Acta Neuropathologica Communications* 7(1):140. doi: 10.1186/s40478-019-0793-4.
 15. Shankar GM et al (2014) Sporadic hemangioblastomas are characterized by cryptic VHL inactivation. *Acta Neuropathologica Communications* 2:167. doi: 10.1186/s40478-014-0167-x.
 16. Bunda, S, Heir P, Metcalf J et al (2019) CIC protein instability contributes to tumorigenesis in glioblastoma. *Nature Communications* 10:661. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08087-9>
 17. Jiménez G, Shvartsman SY, Paroush Z (2012) The Capicua repressor--a general sensor of RTK signaling in development and disease. *Journal of Cell Science* 125(Pt6):1383-1391. doi:10.1242/jcs.092965
 18. Liu Z, Liu H, Liu Z, Zhang J (2015) Oligodendroglial tumours: subventricular zone involvement and seizure history are associated with CIC mutation status. *BMC Neurology* 19(1):134. doi:10.1186/s12883-019-1362-y
 19. Cahill DP, Louis DN, Cairncross JG (2015) Molecular background of oligodendroglioma: 1p/19q, IDH, TERT, CIC and FUBP1. *CNS Oncology* 4(5):287-294. doi:10.2217/cns.15.32
 20. Yip S, et al (2012) Concurrent CIC mutations, IDH mutations, and 1p/19q loss distinguish oligodendrogliomas from other cancers. *Journal of Pathology* 226(1):7-16. doi: 10.1002/path.2995
 21. Yang R, et al (2017) CIC Loss Promotes Gliomagenesis via Aberrant Neural Stem Cell Proliferation and Differentiation. *Cancer Research* 77(22):6097-6108. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-1018
 22. Weissmann S, et al (2018) The Tumor Suppressor CIC Directly Regulates MAPK Pathway Genes via Histone Deacetylation. *Cancer Research* 78(15):4114-4125. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-0342
 23. Simón-Carrasco L, Jiménez G, Barbacid M, Drosten M (2018) The Capicua tumor suppressor: a gatekeeper of Ras signaling in development and cancer. *Cell Cycle* 17(6):702-711. doi:10.1080/15384101.2018.1450029
 24. Inoue D, Fujino T, Kitamura T (2018) ASXL1 as a critical regulator of epigenetic marks and therapeutic potential of mutated cells. *Oncotarget* 9(81):35203-35204. doi:10.18632/oncotarget.26230
 25. Gelsi-Boyer V, Brecqueville M, Devillier R, Murati A, Mozziconacci MJ, Birnbaum D (2012) Mutations in ASXL1 are associated with poor prognosis across the spectrum of malignant myeloid diseases. *Journal of Hematology & Oncology* 5:12. doi:10.1186/1756-8722-5-12
 26. Lulla RR, Saratsis AM, Hashizume R (2016) Mutations in chromatin machinery and pediatric high-grade glioma. *Science Advances* 2(3):e1501354–e1501354. doi:10.1126/sciadv.1501354
 27. Szathmari A, Zerah M, Vinchon M, Dufour C, Gimbert E, Di Rocco F, Chabaud S, Conter C, Mottollese C, Frappaz D (2019) Ependymoma of the Spinal Cord in Children: A Retrospective French Study. *World Neurosurgery* 126:e1035-e1041. doi: 10.1016/j.wneu.2019.03.033.
 28. Lin Y, Jea A, Melkonian SC, Lam S (2015) Treatment of pediatric Grade II spinal ependymomas: a population-based study. *Journal of Neurosurgery Pediatrics* 15(3):243-9. doi: 10.3171/2014.9.PEDS1473.
 29. Phi JH et al (2015) Overcoming Chemoresistance of Pediatric Ependymoma by Inhibition of STAT3 Signaling. *Translational Oncology* 8(5):376-386. doi: 10.1016/j.tranon.2015.08.001

30. Mukthavaram R et al (2015) Effect of the JAK2/STAT3 inhibitor SAR317461 on human glioblastoma tumorspheres. *Journal of Translational Medicine* 13:269. doi: 10.1186/s12967-015-0627-5
31. Lin M et al (2019) JAK2 p.G571S in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: a synergizing germline susceptibility. *Leukemia* 33(9):2331-2335. doi: 10.1038/s41375-019-0459-z
32. Sturm D, Orr BA, Toprak UH, et al (2016) New Brain Tumor Entities Emerge from Molecular Classification of CNS-PNETs. *Cell* 164(5):1060-1072. doi:10.1016/j.cell.2016.01.015
33. Burford A, Mackay A, Popov S, et al (2018) The ten-year evolutionary trajectory of a highly recurrent paediatric high grade neuroepithelial tumour with MN1:BEND2 fusion. *Scientific Reports* 8(1):1032. doi:10.1038/s41598-018-19389-9
34. Yamasaki K, Nakano Y, Nobusawa S, Okuhiro Y, Fukushima H, Inoue T, Murakami C, Hirato J, Kunihiro N, Matsusaka Y, Honda-Kitahara M, Ozawa T, Shiraishi K, Kohno T, Ichimura K, Hara J (2020) Spinal cord astroblastoma with an EWSR1-BEND2 fusion classified as a high-grade neuroepithelial tumour with MN1 alteration. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 46(2):190-193. doi: 10.1111/nan.12593
35. Pietsch T et al (2014) Supratentorial ependymomas of childhood carry C11orf95-RELA fusions leading to pathological activation of the NF- κ B signaling pathway. *Acta Neuropathologica* 127(4):609-11. doi: 10.1007/s00401-014-1264-4
36. Pajtler KW et al (2019) YAP1 subgroup supratentorial ependymoma requires TEAD and nuclear factor I-mediated transcriptional programmes for tumorigenesis. *Nature Communications* 10(1):3914. doi: 10.1038/s41467-019-11884-5
37. Andreiuolo F, Varlet P, Tauziède-Espariat A, et al (2019) Childhood supratentorial ependymomas with YAP1-MAMLD1 fusion: an entity with characteristic clinical, radiological, cytogenetic and histopathological features. *Brain Pathology* 29(2):205-216. doi:10.1111/bpa.12659
38. de Sousa GR, Lira RCP, de Almeida Magalhães T, et al (2021) A coordinated approach for the assessment of molecular subgroups in pediatric ependymomas using low-cost methods. *Journal of Molecular Medicine* 10.1007/s00109-021-02074-2. doi:10.1007/s00109-021-02074-2

FIGURE AND TABLE LEGENDS

Fig. 1 Distribution of genetic alterations identified in tumor samples. **a.** Altered genes in PF-EPN, ST-EPN, and SP-EPN samples. **b.** Number of variants located on each chromosome. **c.** Number of variants according to class and functional effect **d.** Number of variants according to clinical significance.

Fig. 2 Genomic landscape of EPN patients. Left pane indicates the altered gene across all the samples. Each vertical bar represents an individual case.

Fig. 3 Overall survival curves. Kaplan-Meier curves with Log-rank test for OS showed statistical difference between EPN subgroups ($\chi^2=9.51$, $p<0.0086$), as PF-EPN patients had the lowest 10-year OS rate.

Table 1 Clinical and histopathological features of EPN patients

Table 2 Profile of genetic variants identified in EPN samples

Fig. 1

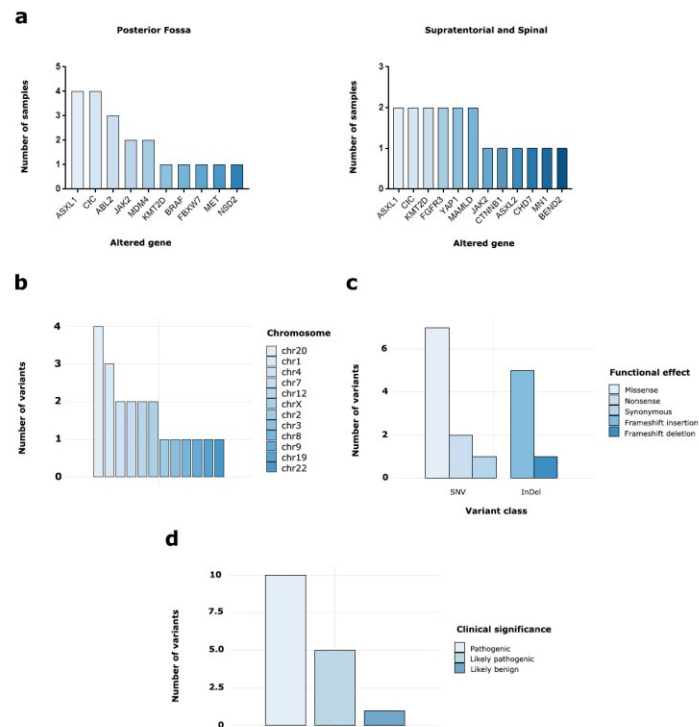


Fig. 2

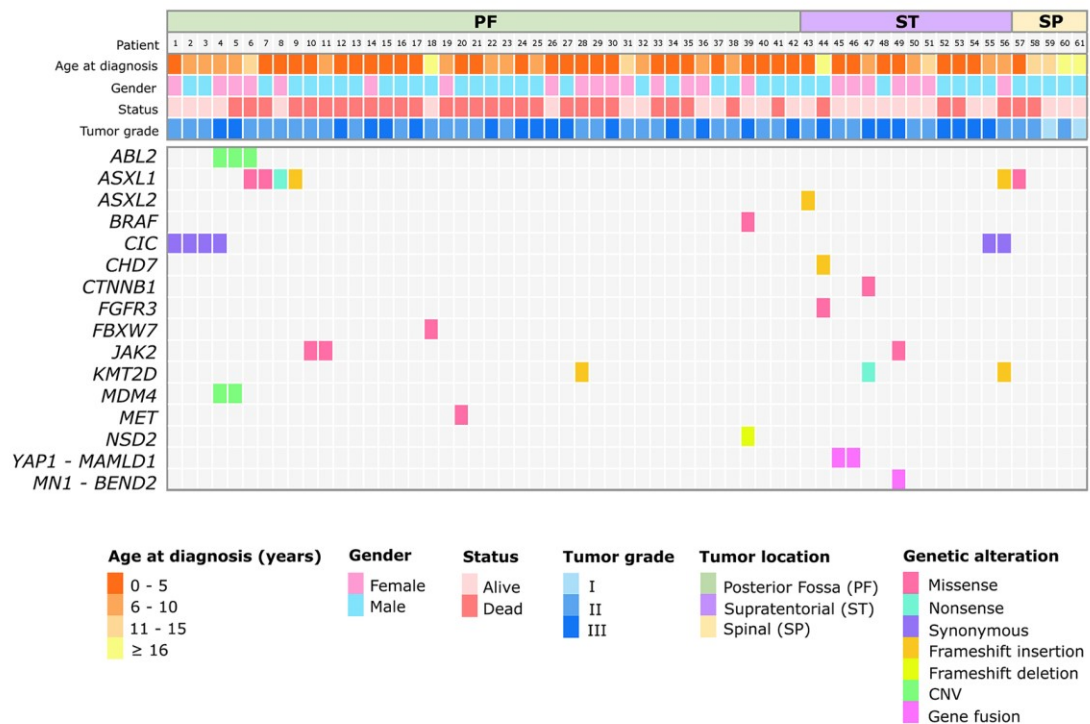


Fig. 3

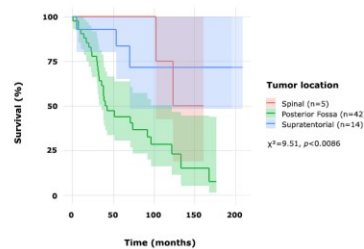


Table 1

Characteristic	Total (N=61)					
	Posterior Fossa		Supratentorial		Spinal	
	N=42		N=14		N=5	
	No.	%	No.	%	No.	%
Age at diagnosis, years						
Median	3.41		4.75		6.50	
Range	0.72 - 17.08		0.39 - 18.08		3.17 - 22.00	
Mean	5.14		5.88		14.45	
Standard Deviation	4.06		5.51		6.90	
Follow-up, months						
Median	37.85		63.91		123.70	
Range	0.88 - 176.68		4.91 - 208.81		20.85 - 161.11	
Mean	53.06		77.72		107.77	
Standard Deviation	44.42		56.69		52.94	
10-year overall survival						
Rate	22.8%		71.6%		50.0%	
Gender						
Male	26	62	7	50	5	100
Female	16	38	7	50	0	0
Histologic subtype						
Myxopapillary EPN	0	0	0	0	2	40
Papillary EPN	0	0	1	7	0	0
EPN	26	62	5	36	3	60
Anaplastic EPN	16	38	8	57	0	0
Relapse						
Yes	25	60	5	36	1	20
No	17	40	9	64	4	80
Status						
Complete remission	11	26	8	58	2	40
In treatment	3	7	3	21	1	20
Dead	28	67	3	21	2	40
Therapy						
Chemotherapy alone	5	12	1	8	0	0
Radiotherapy alone	17	40	4	28	3	60
Chemotherapy + Radiotherapy	18	43	4	28	1	20
None	2	5	5	36	1	20

Table 2

Genetic characteristic					Number of samples				
Gene	Coding	Aminoacid change	Variant Class	Variant effect	Clinical significance	PF-EPN	ST-EPN	SP-EPN	Total
<i>ABL2</i>	N/A	N/A	CNV	N/A	N/A	3	0	0	3
<i>ASXL1</i>	c.3306G>T	p.Glu1102Asp	SNV	Missense	Pathogenic	2	0	1	3
	c.2077C>T	p.Arg693Ter	SNV	Nonsense	Pathogenic	1	0	0	1
	c.2322_2323delAT	p.Arg774fs	InDel	Frameshift Insertion	Likely pathogenic	1	0	0	1
	c.1953_1954insA	p.Gly652fs	InDel	Frameshift Insertion	Likely pathogenic	0	1	0	1
<i>ASXL2</i>	c.2978_2979insG	p.Ile994fs	InDel	Frameshift Insertion	Pathogenic	0	1	0	1
<i>BEND2</i>	N/A	N/A	Gene fusion	N/A	N/A	0	1	0	1
<i>BRAF</i>	c.1387A>G	p.Ile463Val	SNV	Missense	Likely pathogenic	1	0	0	1
<i>CHD7</i>	c.1939_1940insA	p.Ser647fs	InDel	Frameshift Insertion	Pathogenic	0	1	0	1
<i>CIC</i>	c.4533C>T	p.Arg1512Cys	SNV	Synonymous	Pathogenic	4	2	0	6
<i>CTNNB1</i>	c.104T>G	p.Ile35Ser	SNV	Missense	Pathogenic	0	1	0	1
<i>FBXW7</i>	c.1394G>A	p.Arg465His	SNV	Missense	Pathogenic	1	0	0	1
<i>FGFR3</i>	c.1150T>C	p.Phe384Leu	SNV	Missense	Likely benign	0	1	0	1
<i>JAK2</i>	c.1711G>A	p.Gly571Ser	SNV	Missense	Pathogenic	2	1	0	3
<i>KMT2D</i>	c.6184C>T	p.Gln2062Ter	SNV	Missense	Pathogenic	2	1	0	3
<i>MAMLD1</i>	N/A	N/A	Gene fusion	N/A	N/A	0	2	0	2
<i>MDM4</i>	N/A	N/A	CNV	N/A	N/A	2	0	0	2
<i>MET</i>	c.3029C>T	p.Thr1010Ile	SNV	Missense	Pathogenic	1	0	0	1
<i>MN1</i>	N/A	N/A	Gene fusion	N/A	N/A	0	1	0	1
<i>NSD2</i>	c.4028delC	p.Pro1343fs	InDel	Frameshift Deletion	Likely pathogenic	1	0	0	1
<i>YAP1</i>	N/A	N/A	Gene fusion	N/A	N/A	0	2	0	2

N/A not applicable, SNV single-nucleotide variant, InDel insertion-deletion, CNV copy number variation, EPN ependymoma, PF posterior fossa, ST supratentorial, SP spinal

7.2. Artigo científico em elaboração

Low-grade and high-grade gliomas in children and adolescents: investigation of molecular alterations with a potential prognostic and therapeutic impact

ABSTRACT

Purpose Gliomas represent the most aggressive central nervous system tumor in children and adolescents. However, therapeutic strategies for these patients, based on tumor molecular profile, are still limited compared to the wide range of treatment options for the adult population. We aimed to investigate molecular alterations, with a potential prognostic marker and therapeutic target in gliomas of childhood and adolescence using the NGS strategy.

Methods We selected 95 gliomas samples from patients treated at Pediatric Oncology Institute-GRAACC/UNIFESP. All samples were categorized according to tumor grade – 39 low-grade gliomas (LGGs) and 56 high-grade gliomas (HGGs), of which four cases were classified as congenital glioblastoma (cGBM). NGS was performed to identify somatic genetic variants in tumor samples using the OncoPrint Childhood Cancer Research Assay[®] (OCCRA[®]) panel. **Results** Genetic variants were identified in 76 of 95 (80.0%) tumors. In HGGs, the most common molecular alteration detected was *H3F3A* c.83A>T variant (H3.3 K27M) and co-occurring mutations in *ATRX*, *TP53*, *PDGFRA*, *MET* and, *MYC* genes were also observed. In LGGs, four *KIAA1549–BRAF* fusion variants were detected and this alteration was the most frequent genetic event and favorable prognostic factor identified, accounting for 26 of 39 (40.7%) tumors. Additionally, genetic variants of *ALK* and *NTRK* genes, which may provide potential target for therapy with Food and Drug Administration-approved drugs, were identified in two cGBM cases. **Conclusion** Thus, molecular profiling by the OCCRA[®] panel comprehensively addressed the most relevant alterations in HGGs and LGGs in children and adolescents.

INTRODUCTION

Gliomas are the most aggressive central nervous system (CNS) tumors of childhood and adolescence that can be divided into three distinct categories based on histopathological features and degree of malignancy – low-grade gliomas (LGGs), high-grade gliomas (HGGs) and a separate class of diffuse intrinsic pontine gliomas (DIPGs)^{1, 2}.

LGGs are a diverse spectrum of grade I and II tumors that represent the most common CNS neoplasia in children, accounting for approximately 30-40% of all primary pediatric

brain tumors³. Pilocytic astrocytoma (PA) is the most frequent histological subtype in children and adolescents and these patients frequently display an overall survival (OS) rate that can exceed 90% in 10 years. However, local recurrence occurs in 10-20% of cases and in patients where the primary lesion was not subjected to gross total resection, tumor progression rate is about 50-80%^{3, 4}. In contrast to adult LGGs, alterations in *IDH* gene are extremely rare in children, with the gain of 7q34 region of *BRAF* oncogene being the most common mutation in childhood tumors. This tandem duplication of the 7q34 region results in *KIAA1549-BRAF* gene fusions that can be observed in about 50-85% of PAs⁵. Although neurosurgical, radiotherapy, and chemotherapy techniques have improved in the last few years, the treatment of pediatric LGGs is still a major challenge due to morbidity, progression and tumor recurrence⁴.

HGGs and DIPGs are malignant, diffuse and infiltrating grade III and IV tumors that represent 8-12% of childhood CNS neoplasms, with anaplastic astrocytoma (AS) and glioblastoma (GBM) being the most frequent entities. Pediatric patients with HGGs show long-term OS rates lower than 10% and in most cases, these tumors are incurable^{6, 7}. Thus, childhood HGGs and DIPGs can be classified into subgroups based on the most recurrent genetic and epigenetic alterations and its biological and clinical characteristics.

Somatic histone H3 alterations, such as K27M and G34R/V mutations, are specific molecular markers for pediatric HGGs, mostly for GBM and DIPG. These hotspot mutations affect two distinct amino acid residues, K27 and G34, of *H3F3A* gene that encodes the histone H3.3 variant. Pediatric HGGs with *H3F3A* K27M mutations are midline tumors frequently observed in children aged 7 to 10 years old that show a poor prognosis. Differently from *H3F3A* K27M tumors, *H3F3A* G34R/V mutations occur in hemispheric tumors, are commonly observed in adolescents and young adults aged 10 to 25 years old, and are associated with a slighter longer survival than others HGGs^{8, 9}. Accordingly, recent methylation profile analyzes of childhood HGGs revealed six distinct tumor groups with alterations in *H3F3A*, *HIST1H3B*, *IDH1/2* and *BRAF* genes, comprising the H3.3 K27M, H3.3 G34R/V, H3.1 K27M, *IDH* and *BRAF* V600E subgroups, respectively¹⁰.

Despite histological similarities, the mutational characteristics of childhood gliomas are distinct to those frequently observed in adult, as these tumors typically show a heterogeneous molecular profile¹¹. Additionally, therapeutic strategies for pediatric neoplasms, based on tumor molecular profile, are still limited compared to the wide range of treatment options for the adult population. The OncoPrint Childhood Cancer Research Assay[®] (OCCRA[®]) is the first next-generation sequencing(NGS)-based panel designed exclusively for the

investigation of the main genetic events in childhood and adolescence neoplasms and includes diagnostic, prognostic and therapeutic markers that address a broad spectrum of tumors in a DNA and RNA sequencing assay^{12, 13}. Considering the genomic and prognostic heterogeneity of pediatric and adolescent gliomas¹⁰, and the unavailability of agents that target the most common molecular alterations present in these tumors¹⁴, a specific NGS genetic panel can provide information for patients' stratification into risk groups and possible therapeutic targets.

Therefore, the present study aimed to investigate molecular alterations, with a potential prognostic marker and therapeutic target in gliomas of childhood and adolescence using the NGS strategy. We identified somatic genetic variants in tumor samples for a comprehensive molecular profiling of LGGs and HGGs using the OCCRA[®] panel.

MATERIAL AND METHODS

Tumor samples

All 95 fresh-frozen gliomas samples used in this study were obtained from patients treated at Pediatric Oncology Institute-Grupo de Apoio ao Adolescente e à Criança com Câncer/Federal University of Sao Paulo (IOP-GRAACC/UNIFESP). All tumor samples used in this study belong to the Institute Biobank. This study was approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Sao Paulo, and written informed consent was obtained from all patients/guardians.

Characteristics of patient cohort

We selected 95 cases identified via a retrospective database review of all patients with the diagnosis of gliomas admitted to treatment at IOP-GRAACC/UNIFESP between 2000 and 2020. The analysis included 39 patients with LGGs (41.0%) and 56 patients with HGGs (59.0%). Among the 56 HGGs selected, 23 (41.1%) were infant cases.

All primary tumors were classified according to the morphological characteristics of the tumor tissues analyzed by immunohistochemistry and based on the 2016 World Health Organization classification of tumors of the CNS (2016 CNS WHO)¹⁵ and all internal cases were jointly re-evaluated by two pathologists of our institution. Inclusion criteria was histological diagnosis of WHO grade I, II, III and IV gliomas. LGGs samples included 28 cases of PA (71.8%), five cases of diffuse AS (12.8%), three cases of pilomyxoid AS (7.7%), two cases of AS (5.1%), one case of ganglioglioma (2.6%). HGGs samples were comprised by 42 cases of GBM (75.0%), of which four were classified as congenital GBM (cGBM), nine cases of anaplastic AS (16.1%), two cases of anaplastic pleomorphic xanthoastrocytoma (PXA) (3.6%), two cases of DIPGs (3.6%), and one case of anaplastic ganglioglioma (1.8%).

For the 95 gliomas patients analyzed, the sex ratio was 1:1 (male: 49.5%; female: 50.5%), and the median age at diagnosis was 5.82 years (range: 0.38 – 16.67 years) and 7.59 years (range: 0.0 – 18.75 years) for LGGs and HGGs patients, respectively. Classification criteria for infant HGG was diagnosis under 3 to 5 years old¹⁶ and congenital cases consisted in those patients that had symptoms occurring at birth, within the first week of life, or within the first months of age¹⁷. For the four patients with cGBM analyzed in the present study, two patients had a postnatal diagnosis, with mean age at diagnosis of 1.3 months, and two patients had a prenatal diagnosis. cGBM patients consisted in four females and all tumors affected the cerebral hemispheres of the supratentorial compartment. Clinical and histopathological details of the 95 gliomas patients analyzed in this study, categorized by tumor grade, are summarized in Table 1.

DNA and RNA isolation and quantification

Total DNA and RNA were extracted from frozen tumor samples using FastPrep[®]-24 Tissue Ruptor (MP Biomedicals[®]) and AllPrep DNA/RNA Mini Kit (QIAGEN[®]) according to the manufacturer's instructions. After extraction, samples were diluted in nuclease-free water and quantified in Nanodrop 2000[®] (Thermo Fisher Scientific[®]). The ratio between the 260nm and 280nm absorbances was used as quality control (QC) for the extractions: an A260/280 ratio between 1.6-1.8 and 1.8-2.0 was adopted for DNA and RNA, respectively. All samples were also quantified in the Qubit 3[®] fluorometer (Thermo Fisher Scientific[®]) using Qubit RNA HS Assay Kit[®] and Qubit dsDNA HS Assay Kit[®]. Only samples with the expected QC standards were included in the study. After quantification, synthesis of complementary DNA was performed using 20ng of total RNA according to the manufacturer's protocol of SuperScript Vilo IV[®] (Thermo Fisher Scientific[®]).

Library preparation

Sequencing libraries were prepared from 20ng of DNA and 20ng of cDNA from each tumor sample, following the manufacture's protocol for the OCCRA[®] (Thermo Fisher Scientific[®]). Amplicon libraries with barcodes specific to each sample were generated from DNA and cDNA, and automated clonal amplification was performed in Ion Chef[™] System (Thermo Fisher Scientific[®]). Only the beads that were enriched with a unique template (monoclonal), that yielded reads of 25bp or longer after a 3'15bp-wide sliding-window quality trimming approach with q17 threshold, and which do not belong to the library internal controls (test fragments), were considered for further analyses. After the preparation was completed, the libraries were loaded into the Ion 540[™] chip (Thermo Fisher Scientific[®]) and inserted into the Ion S5[™] System Sequencer (Thermo Fisher Scientific[®]).

Next-generation sequencing run

Sequencing was performed by using 200-bp reads and the Ion 540™ chip on the Ion S5™ System sequencing platform. At the end of the sequencing run, the data generated by the large-scale sequencing was performed and the quality for each reading was evaluated using Torrent Suite™ software version 5.2.1 (Thermo Fisher Scientific®). Only amplicon readings that showed a ratio between the forward and reverse primers ≥ 0.6 and ≤ 1.4 were selected. The readings obtained were aligned with the human reference genome hg19/GHCh37 within Torrent Suite™ (Thermo Fisher Scientific®) and were considered readings with a minimum coverage of 2000x. The generated BAM files were analyzed using Integrative Genomics Viewer software (IGV Software, San Diego, CA, USA). The Variant Call Format files were obtained and the variants identified were compared with the following databases: COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer), dbSNP (Single Nucleotide Polymorphism Database), and ExAC (The Exome Aggregation Consortium).

Variant analysis using the OncoPrint Childhood Cancer Research Assay® panel

All tumor samples included in this study were subjected to targeted sequencing using the OCCRA® panel (Thermo Fisher Scientific®) that comprises a total of 255 tumor-associated genes, 3069 amplicons, and 1421 gene fusion primer pairs (Table S1 Online Resource 1). Sequencing analysis contains information about somatic variants, including multi-nucleotide variants (MNVs), single-nucleotide variants (SNVs), insertions or deletions (InDels), copy number variations (CNVs), and gene fusions. Variants were classified according to class (SNV or InDel), functional effect (missense, nonsense, synonymous, frameshift, and nonframeshift), and clinical significance (pathogenic, likely pathogenic, uncertain significance, likely benign, and benign) according to FATHMM (Functional Analysis through Hidden Markov Model) prediction scores (0 – 1), with score ≥ 0.7 classified as pathogenic. For CNVs, samples with MAPD (Median of the Absolute values of all Pairwise Differences) ≤ 0.35 were considered. Variant characteristics were evaluated using COSMIC, ClinVar, VARSOME, UCSC Genome Browser, and Ensembl Genome Browser databases.

Data and statistical analysis

Data analysis was performed using IBM SPSS Statistics version 21.0 (Armonk, NY: IBM Corp), *jamovi* version 1.2 (The Jamovi Project, Sidney, AU), and GraphPad Prism version 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) for Windows. OS curves were generated by applying Kaplan-Meier method with a 95% confidence interval (95% CI), and then compared by Log-rank test. Statistical significance was taken as $p < 0.05$ (5%).

RESULTS

A total of 95 gliomas samples from our institution were sequenced for the presence of somatic genetic variants using the OCCRA[®] panel. Sequencing analyzes showed that variants were present in 76 of 95 (80.0%) tumors, 33 LGGs (40.5%) and 43 HGGs (76.8%). We observed 51 altered genes and 123 genetic variants, which included 60 SNVs (48.8%), 22 InDels (17.9%), 29 CNVs (23.6%) and 12 gene fusions (9.7%). Profile of genetic variants identified in tumor samples can be found in Table S2 (Online Resource 2).

Identification of genetic variants in gliomas samples using the OCCRA[®] panel

In LGGs samples the most common events were *KIAA1549–BRAF* fusions (26/33=78.8%) and mutations in *BRAF* gene (28/33=85.0%). The most frequent variants identified in HGGs samples were in *H3F3A* (17/43=39.5%), *TP53* (17/43=39.5%) and *ATRX* (9/43=21.0%) genes. The distribution of all 51 altered genes detected in gliomas samples can be observed in Figure 1a.

SNVs were the majority of all genetic variants detected in HGGs and were identified in 32 (43.1%) samples. InDels and CNVs were also frequently observed, accounting for 16 (24.6%) and 15 (23.1%) samples, respectively. Gene fusions were less common in HGGs and were identified in six (9.2%) samples. In contrast, gene fusions were the most recurrent genetic event in LGGs and were identified in 27 samples (75.0%), of which 26 (96.3%) showed *KIAA1549–BRAF* fusions. Also, SNVs, InDels and CNVs were observed in six (16.7%), two (5.6%) and one (2.7%) sample, respectively.

Genetic variants analysis

Chromosome 17 had the highest number of variants (21.2%), followed by chromosome 7 (21.2%), as *TP53*, *KIAA1549* and *BRAF* genes were the most frequently altered genes detected in tumor samples and are located at 17p13.1 and 7q34, respectively (Figure 1b). Variants with missense and nonsense effect were the most common, accounting for 46.3% and 25.6% of cases, respectively. InDels were also frequently identified, as frameshift deletion variants were responsible for 19.5% of cases and frameshift insertions were observed in 6.1% of cases. Synonymous and nonframeshift variants were found in 1.2% of cases each (Figure 1c). Of all variants analyzed, 91.5% are classified as pathogenic, 6.1% are likely pathogenic, 1.2% are neutral and 1.2% have not been reported yet (Figure 1d).

Comprehensive molecular profiling of gliomas

The genomic landscape of LGGs and HGGs patients analyzed in the present study using the OCCRA[®] panel can be found in Figure 2a and Figure 2b, respectively. Gene fusions were detected in 34 samples from 27 LGGs and seven HGGs patients. *KIAA1549–BRAF* fusion

was the most recurrent fusion variant identified and was observed in 26 LGGs: 22 PA (84.7%), two diffuse AS (7.7%), one AS (3.8%), and one pilomyxoid AS (3.8%). Among the 26 LGGs samples with *KIAA1549-BRAF* fusions, 24 (92.3%) cases were located in the posterior fossa region, mainly in the cerebellum, one (3.8%) case was diencephalic/thalamic, and one case (3.8%) was ventricular/intraventricular.

Four *KIAA1549-BRAF* fusion variants were detected and the most common was between exon 15 of *KIAA1549* and exon 9 of *BRAF* (15;9), observed in 11 of 26 (42.3%) cases. *KIAA1549-BRAF* fusion variants 14;9 and 15;11 were also prevalent, observed in eight (30.8%) and six (23.1%) of 26 cases, respectively. Less common fusion variant included exon 17 of *KIAA1549* and exon 10 of *BRAF* (17;10), identified in one case (3.8%) (Table 2). In addition to *KIAA1549-BRAF* fusions, a fusion between the exon 7 of *EWSR1* gene and the exon 5 of *ATF1* gene (*EWSR1-ATF*) was identified in one LGG sample, classified as pilomyxoid AS.

In HGGs, c.83A>T variant of *H3F3A* gene (H3.3 K27M) was identified in 16 samples and c.103G>A variant of *H3F3A* gene (H3.3 G34R) was detected in one sample. Additionally, c.83A>T variant of *HIST1H3B* gene (H3.1 K27M) was observed in two GBM samples, and c.1799T>A variant of *BRAF* gene (*BRAF* V600E) was identified in four tumor samples, three GBM and one anaplastic PXA. None of the DIPGs samples analyzed showed variants in *H3F3A* or *HIST1H3B* genes, and no alterations in *IDH1* or *IDH2* genes were detected by the panel. Interestingly, co-occurring mutations were observed in tumor samples from HGGs patients harboring variants in *H3F3A* gene: 58.8% (10/17) of cases had variants in *TP53*, 35.3% (6/17) of cases showed *ATRX* loss-of-function mutations, either frameshift deletion or nonsense substitution, 23.5% (4/17) of cases had *PDGFRA*-amplification and 17.6% (3/17) of cases showed *MET* or *MYC* amplifications. Moreover, tumor samples from three GBM patients showed concomitantly variants in *H3F3A*, *TP53*, and *ATRX* genes, which two were positive for *H3F3A* c.83A>T variant, while one harbored *H3F3A* c.103G>A variant (Figure 3a).

Of all four cGBM patients analyzed, two cases exhibited tumors with genetic variants. One patient showed an increase of 11.2 copies of *ALK* gene and a gene fusion between the exon 5 of *PPP1CB* and the exon 20 of *ALK* (*PPP1CB-ALK*), and one patient presented a *NTRK* gene fusion, which consisted in the exon 7 of *TPM3* and the exon 10 of *NTRK1* (*TPM3-NTRK1*) (Table 3).

Subgroup of childhood and adolescence HGGs with histone H3.3 K27M mutation

H3F3A c.83A>T variant, which defines the H3.3 K27M molecular subgroup, was responsible

for the majority of all genetic alterations detected in HGGs. *H3F3A* c.83A>T variant was identified in 12 GBM and four anaplastic AS samples, and *H3F3A* c.103G>A variant that characterizes the H3.3 G34R subgroup was observed in one GBM sample (Figure 3b). Of all 16 H3.3 K27M HGGs samples analyzed, 14 affected midline regions of the CNS, which included seven thalamic (43.8%) samples, five spinal cord (31.2%) samples, and two samples from the cerebellum/brainstem (12.5%), while two samples affected the cerebral hemisphere of the supratentorial compartment (12.5%). H3.3 G34R HGG sample was hemispheric (Figure 3c).

In addition, HGGs patients with K27M-mutant tumors had a median OS of 9.18 months (95% CI: 4.03 – 14.32) and OS curves analysis showed a statistical difference between the H3.3 K27M subgroup (n=16) and HGG patients with tumors that were absent for genetic variants, the H3.3 K27 wild-type subgroup (n=13). H3.3 K27M subgroup had a worse OS ($\chi^2=11.99$, $p=0.0005$) and 5-year OS rate (6.3%) when compared to the H3.3 K27 wild-type subgroup (61.5%) ($p<0.001$) (Figure 4d).

High frequency of DNA copy number variations in HGGs

Increased DNA copy number were common events in HGGs samples. Of all 29 CNVs detected by the panel, 28 were identified in HGGs and included 23 cases of GBM (82.1%), four cases of anaplastic AS (14.3%), and one case of DIPG (3.6%). Increase in the number of copies of 12 genes was observed, with *MET*, *MYC* and *PDGFRA* genes being responsible for the majority of cases: CNVs of *MET* and *MYC* genes were identified in five (17.8%) of 28 cases each, and CNVs of *PDGFRA* gene were observed in four (14.3%) of 28 cases. The median DNA copy number was 6.96 copies (range: 1.24 – 270.0 copies; standard deviation: 50.15) and the distribution of all CNVs detected in HGGs samples, according to gene, number of copies and histological subtype is summarized in Table S3 (Online Resource 3).

Survival comparisons between LGGs and HGGs patients

LGGs and HGGs patients included in the study were observed for a median of 51.21 months and 19.02 months, respectively, from date of diagnosis to last contact or death. For LGGs patients, the median OS was 187.21 months (95% CI: 182.58 – 191.84) and the 5-year and 10-year OS rates were 90.7% and 87.2%, respectively. For HGGs patients, the median OS was 23.6 months (95% CI: 10.39 – 36.82) and the 5-year and 10-year OS rates were 24.6% and 12.3%, respectively.

OS curves showed a statistical difference between tumor groups ($\chi^2=34.59$, $p<0.0001$) (Figure 4a) and according to tumor grade ($\chi^2=35.39$, $p<0.0001$) (Figure 4b). Patients with grade III gliomas revealed the lowest 5-year OS rate (20.8%), and patients with grade I

gliomas, mainly comprised by PA, showed the highest 5-year OS rate (100.0%) ($p<0.001$). Although patients with grade IV gliomas, including mostly GBM, revealed a higher 5-year OS rate (26.0%) when compared to grade III patients (20.8%), this difference was not statistically significant ($p=0.678$).

DISCUSSION

Recent advancements in molecular profile analysis of pediatric gliomas revealed specific genetic alterations in different tumor subtypes, as *KIAA1549–BRAF* fusions have been described to be present in most cases of LGGs, and variants in *H3F3A* gene, mostly H3.3 K27M mutation, are frequently observed in HGGs. However, the development of new targeted treatments for children and adolescents with gliomas are still limited^{14, 18}. Considering that pediatric gliomas are clinically and biologically distinct from their adult counterparts, we investigated the presence of somatic genetic variants with a potential prognostic and therapeutic impact in LGGs and HGGs of childhood and adolescence for a comprehensive molecular profiling.

Mutations in *BRAF* gene represent the most frequently known and well-established genetic alteration in pediatric gliomas and are commonly identified in PAs. These tumors are characterized by an oncogenic fusion comprising *KIAA1549* and *BRAF* genes that are formed by tandem duplications on chromosome 7q34^{19, 20}. *KIAA1549–BRAF* fusion is detected in 50-85% of PAs, of which 80% are cerebellar, leading to deregulation of the *MAPK* signaling pathway¹⁹. Currently, there are nine known *KIAA1549–BRAF* fusion junctions, with the majority involving fusions between *KIAA1549* exon 16 and *BRAF* exon 9 (68%), *KIAA1549* exon 16 and *BRAF* exon 11 (10%), and *KIAA1549* exon 15 and *BRAF* exon 9 (9%)²¹⁻²³.

In the present study, *KIAA1549–BRAF* 15;9 fusion was the most frequent variant detected in LGGs, accounting for 42.3% of cases, a higher rate than the described in the literature for this fusion variant. The second variant most commonly detected in our study was *KIAA1549–BRAF* 14;9 fusion, observed in 30.8% of cases, and has not been reported in PA yet. *KIAA1549–BRAF* 15;11 fusion has been suggested to be less prevalent (3.0%)²¹, yet, in our study, we identified this variant in 23.1% of cases. Unexpectedly, *KIAA1549–BRAF* 16;9 fusion, generally the most recurrent variant²¹, was not identified in our tumor samples.

It has been suggested that *KIAA1549–BRAF* may lead to a less aggressive phenotype due to the process of oncogene-induced cell senescence²¹. Our clinical and molecular analysis revealed that *KIAA1549–BRAF* fusion was the most significant favorable prognostic factor in LGGs, as these patients showed a 5-year OS rate of 100.0% and 95.7% had tumors that were absent for other somatic variants detected by the panel. Among the 29 LGGs patients

analyzed, three (10.3%) died due to disease progression after 20 years of follow-up and only one case was *KIAA1549–BRAF* fusion-positive. However, FDA (Federal Drug Administration)-approved therapies specific to this fusion is still lacking and currently, treatment options for LGGs involve targeting other alterations that dysregulate the *MAPK* pathway, such as *MEK* inhibitors²¹. Consequently, identification of *KIAA1549–BRAF* fusion variants is essential in the context of clinical trials and treatment management for these patients.

In addition to *KIAA1549–BRAF* fusion, a fusion between the exon 7 of *EWSR1* gene and the exon 5 of *ATF1* gene (*EWSR1–ATF1*) was identified in LGGs samples. Gene fusions involving *EWSR1* gene and members of the CREB (*cAMP response element binding protein*) family, such as *ATF1* gene, have been reported in a diverse group of tumors. In 2017, Kao YC *et al.* investigated a cohort of children and young adults, aged 12 to 23 years old, with myxoid mesenchymal tumors positive for fusions between *EWSR1* gene and members of the CREB family, including *EWSR1–ATF1* fusion, and whose tumors had distinct histological features and predilection for intracranial locations, including the meninges²⁴. These recent findings suggest a new brain tumor entity entitled intracranial myxoid mesenchymal tumors with *EWSR1* and CREB family gene fusions (*EWSR1–CREB*), and to date, only 15 cases have been reported in the literature^{24–32}. In our study, *EWSR1–ATF1* gene fusion was detected in a pilomyxoid AS that affected the optic region from a patient diagnosed with 12.6 years of age. Accordingly, our results appear to corroborate with previous clinical and histopathological findings regarding this new CNS tumor entity, indicating a possible tumor reclassification.

Recently, it has been proposed six distinct subgroups of childhood HGGs that display alterations in *H3F3A*, *HIST1H3B*, *IDH1/2* and *BRAF* genes, and comprise the H3.3 K27M, H3.3 G34R/V, H3.1 K27M, *IDH* and *BRAF* V600E subgroups, respectively¹⁰. H3.3 K27M mutation occurs in 70–80% of childhood GBMs and DIPGs, whereas H3.1 K27M variant is less frequent and more specific for DIPGs^{33, 34}. *IDH* subgroup represents less than 5% of pediatric HGGs, and tumors with *BRAF* V600E alteration are histologic similar to PXA and accounts for 5–10% of cases¹⁰. In our study, alterations in *H3F3A* gene were the most common events observed in HGGs, as 16 cases harbored H3.3 K27M mutation and one case had H3.3 G34R variant. Additionally, *BRAF* V600E mutation was identified in one anaplastic PXA sample and no alterations in *IDH* were detected. Thus, identification of *H3F3A* c.83A>T, *H3F3A* c.103G>A, *HIST1H3B* c.83A>T and *BRAF* c.1799T>A variants in HGGs samples allowed the classification of these tumors into four distinct molecular subgroups.

Genomic profile analysis of pediatric HGGs has demonstrated that K27M and G34R

mutations are mutually exclusive and intrinsically associated with the anatomic tumor location, with H3.3 K27M subgroup displaying predilection for the midline brain location, especially for the thalamic region, while H3.3 G34R subgroup predominantly affects the cerebral hemisphere^{35, 36}. Similarly, among the 16 H3.3 K27M-mutant samples analyzed in our study, 87.5% were midline, and 100% of H3.3 G34R-mutant tumors were hemispheric. G34R mutation is highly expressed in the neocortex during the early stages of embryonic development. In contrast, K27M mutation is associated with the intermediate and late stages mainly of the thalamic region. These findings revealed that HGGs harboring H3.3 K27M and H3.3 G34R mutations have specific patterns of gene expression during embryonic development that correlate to their subsequent tumor location, indicating that these two molecular subgroups may differ regarding the initiation of the neoplastic process or its cellular origin³³. Consequently, K27M and G34R mutations define two clinically and biologically distinct subgroups of childhood HGGs⁹.

Interestingly, *H3F3A* c.83A>T variant was observed to simultaneously overlapped with other specific alterations within the same tumor, mostly involving *TP53* and *ATRX* loss-of-function mutations, and amplifications of *PDGFRA*, *MET* and *MYC* genes. Approximately 60% of H3.3 K27M mutations are associated with alterations in *TP53* and about 30% in *ATRX*^{37 - 39}. Thus, comparative analyzes revealed that mutations in *H3F3A* and *ATRX* are specific to childhood GBM, which molecularly distinguishes pediatric GBM from their adult counterparts. *ATRX* gene is known to encode a member of the chromatin remodeling complex essential for the incorporation of histone H3.3 in the heterochromatin, telomeres, and in several transcription factor binding sites. In this context, *ATRX* loss-of-function mutations reduce the incorporation of H3.3 in a subset of genes involved in the neoplastic process and impair the transport of this histone to the telomeres. Consequently, inactivating mutations in *ATRX* interrupt the heterochromatic state and facilitate the alternative lengthening of telomeres. These findings indicate that defects in chromatin architecture, such as mutations in *H3F3A* and *ATRX*, are fundamental in the pathogenesis of childhood GBM³⁶.

HGGs samples, mostly comprised by GBM, presented a high frequency of DNA copy number variations, with *MET* (17.8%), *MYC* (17.8%) and *PDGFRA* (14.3%) amplifications being the most frequent. Several studies have proposed that *MET* gene plays a critical role in cell proliferation, survival, migration, invasion and therapeutic resistance in GBM^{40, 41}, and *MYC* amplification is enriched in a subset of pediatric GBM⁴². In gliomas, *MET* and *MYC* amplifications have been associated with a worse prognosis^{43, 44}, and in pediatric HGGs, *PDGFRA* gene is the most frequent target of focal amplification, identified in approximately

8-26% of GBMs⁴³. Additionally, increasing evidences suggest that tumors harboring H3.3 K27M mutation contain higher numbers of copy number alterations^{36, 39}, with *MYC* and *PDGFRA* gene amplifications being the most commonly observed⁴⁶.

Recent analyzes have demonstrated that H3.3 K27M-mutant gliomas show a poor clinical prognosis regardless the anatomical CNS location affected, tumor grade and extent of neurosurgical resection^{37,38}. In the present study, a clinically significant finding is the fact that HGGs patients harboring H3.3 K27M mutation had a median OS (9.18 months) lower than the median OS of all 56 HGGs patients analyzed (23.6 months), and a worse 5-year OS when compared with the H3.3 K27 wild-type group, reinforcing that H3.3 K27M is an adverse prognostic factor in pediatric HGGs. In this context, our results suggest that identification of *H3F3A* c.83A>T variant, which characterizes the H3.3 K27M molecular subgroup, can be used as a predictive diagnostic biomarker in HGGs of childhood and adolescence and that these patients may benefit from therapies that target chromatin remodeling agents or post-transcriptional histone modifications.

Congenital brain tumors represent less than 2% of all pediatric CNS tumors and cGBM is among the rarest type^{17, 47}. To date, approximately 120 cGBM cases have been reported^{48, 49} and due to its infrequent occurrence, few studies have focused on the molecular and genetic features of this disease. In the present study, an increase in the number of copies of *ALK* gene and *PPP1CB-ALK* fusion were identified in tumor sample from one cGBM patient. Interestingly, Zhong *et al.* (2021) recently reported a case of a female patient with cGBM that died due to disease progression two days after birth and had similar genetic alterations to those observed in our patient, as they detected an *ALK* amplification and *PPP1CB-ALK* fusion, which resulted of a local chromothripsis and consisted of the exon 1-5 of *PPP1CB* and exon 20-29 of *ALK*⁴⁸.

Although *ALK* fusion proteins are oncogenic and can be detected in a diverse group of neoplasms, *PPP1CB-ALK* fusions have been described in a few cases in the literature, with the majority being pediatric patients with HGGs^{48 - 54}. Currently, efforts are underway to develop small molecule tyrosine kinase inhibitors (TKIs) that penetrate the blood-brain barrier, since therapies targeting alterations in *ALK* have demonstrated to improve overall outcomes in patients whose CNS tumors arise from these genetic alterations^{55, 56}. *PPP1CB-ALK* fusions are one of the most common receptor tyrosine kinase fusions in infantile gliomas⁴⁸ and recent findings have demonstrated that tumor cells and xenograph tumors positive for this fusion are sensitive to *ALK*-inhibitors^{53, 54}. In this context, *PPP1CB-ALK* fusion and *ALK* amplification may be potential biomarkers for cGBM.

Additionally, *TPM3-NTRK1* fusion, which has already been shown to act as an oncogenic driver in HGG⁵⁷⁻⁵⁹, was identified in one cGBM case. Gliomas can harbor *NTRK* fusions with frequencies of 5-25%^{59, 60} and *NTRK* fusions have been reported in up to 40% of non-brainstem HGGs in children under 3 years of age^{16, 61, 62}. Our cGBM patient, whose tumor is located hemispheric and is *TPM3-NTRK1* fusion-positive, was diagnosed with 2.5 months of age and showed no other significant additional alterations. These results seem to corroborate with previous findings that identified *TPM3-NTRK1* fusion in a particular subset of infant patients with non-brainstem HGGs^{16, 63}.

NTRK fusions are a pharmacologically targetable genetic alteration and identification of fusion genes responsible for altering the activity of *NTRK* kinase domains has allowed the emergence of specific TKIs for these proteins⁵⁹. Currently, multiple TKIs with activity against the tyrosine kinase family are available or being investigated in clinical trials. The first-generation TKIs, larotrectinib (Vitrakvi®) and entrectinib (Rozlytrek®), represent the two compounds that are furthest in clinical development so far, and were the first United States Food and Drug Administration(FDA)-approved TKIs for adult and pediatric solid tumors with *NTRK* fusions^{64, 65}. Although our patient has not received treatment with larotrectinib, a recent study has demonstrated the regression of a *NTRK* fusion-positive GBM of an 18-month-old female patient after first-treatment with this compound⁶⁶, suggesting that TKIs can be integrated as a first-line therapy for pediatric GBM harboring *NTRK* fusions. Hence, alterations in *ALK* and *NTRK* genes can provide a potential target for therapy.

In conclusion, molecular profiling by the OCCRA® panel comprehensively addressed the most relevant alterations in pediatric and adolescent gliomas. *KIAA1549-BRAF* fusion was the most significant favorable prognostic factor in LGGs and *H3F3A* c.83A>T variant, commonly detected in HGGs, was associated to a worse OS in those patients. Alterations in *ALK* and *NTRK* genes were identified in cGBMs, which provide a potential target for therapy with FDA-approved drugs. Also, none of cGBM cases showed variants in *H3F3A*, *TP53* and *ATRX* genes, alterations which are frequently seen in pediatric and adolescent GBM, suggesting that cGBM may comprise a unique tumor entity. Therefore, we detected specific somatic mutations of childhood and adolescence LGGs and HGGs, as these tumors present distinguished molecular and genetic alterations, outcomes, and effectiveness to therapies when compared to adult tumors.

REFERENCES

1. Minturn JE, Fisher MJ. Gliomas in children. Curr Treat Options Neurol. 2013;15(3):316-327. doi:10.1007/s11940-013-0225-x

2. Blionas A, Giakoumettis D, Klonou A, Neromyliotis E, Karydakis P, Themistocleous MS. Paediatric gliomas: diagnosis, molecular biology and management. *Ann Transl Med*. 2018;6(12):251. doi:10.21037/atm.2018.05.11
3. Hargrave D. Paediatric high and low grade glioma: the impact of tumour biology on current and future therapy. *Br J Neurosurg*. 2009;23(4):351-363. doi:10.1080/02688690903158809
4. Jones DT, Gronych J, Lichter P, Witt O, Pfister SM. MAPK pathway activation in pilocytic astrocytoma. *Cell Mol Life Sci*. 2012;69(11):1799-1811. doi:10.1007/s00018-011-0898-9
5. Drobysheva A, Klesse LJ, Bowers DC, et al. Targeted MAPK Pathway Inhibitors in Patients With Disseminated Pilocytic Astrocytomas. *J Natl Compr Canc Netw*. 2017;15(8):978-982. doi:10.6004/jnccn.2017.0139
6. Braunstein S, Raleigh D, Bindra R, Mueller S, Haas-Kogan D. Pediatric high-grade glioma: current molecular landscape and therapeutic approaches. *J Neurooncol*. 2017;134(3):541-549. doi:10.1007/s11060-017-2393-0
7. Fangusaro J. Pediatric high grade glioma: a review and update on tumor clinical characteristics and biology. *Front Oncol*. 2012;2:105. Published 2012 Aug 24. doi:10.3389/fonc.2012.00105
8. Ebrahimi A, Skardelly M, Schuhmann MU, et al. High frequency of H3 K27M mutations in adult midline gliomas. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2019;145(4):839-850. doi:10.1007/s00432-018-02836-5
9. Sturm D, Bender S, Jones DT, et al. Paediatric and adult glioblastoma: multifactorial (epi)genomic culprits emerge. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(2):92-107. doi:10.1038/nrc3655
10. Pollack IF, Agnihotri S, Broniscer A. Childhood brain tumors: current management, biological insights, and future directions. *J Neurosurg Pediatr*. 2019;23(3):261-273. doi:10.3171/2018.10.PEDS18377
11. Ahmed AA, Vundamati DS, Farooqi MS, Guest E. Precision Medicine in Pediatric Cancer: Current Applications and Future Prospects. *High Throughput*. 2018;7(4):39. Published 2018 Dec 13. doi:10.3390/ht7040039
12. Lorentzian A, Biegel JA, Ostrow DG, et al. Tumor Variant Identification That Accounts for the Unique Molecular Landscape of Pediatric Malignancies. *JNCI Cancer Spectr*. 2018;2(4):pky079. doi:10.1093/jncics/pky079
13. Hiemenz MC, Ostrow DG, Busse TM, et al. OncoKids: A Comprehensive Next-Generation Sequencing Panel for Pediatric Malignancies. *J Mol Diagn*. 2018;20(6):765-776. doi:10.1016/j.jmoldx.2018.06.009
14. Terashima K, Ogiwara H. [Pediatric Glioma]. *No Shinkei Geka*. 2021 May;49(3):640-646. Japanese. doi: 10.11477/mf.1436204438. PMID: 34092570.
15. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*. 2016;131(6):803-820. doi:10.1007/s00401-016-1545-1
16. Clarke M, Mackay A, Ismer B, et al. Infant High-Grade Gliomas Comprise Multiple Subgroups Characterized by Novel Targetable Gene Fusions and Favorable Outcomes. *Cancer Discov*. 2020;10(7):942-963. doi:10.1158/2159-8290.CD-19-1030
17. Solitare GB, Krigman MR. Congenital intracranial neoplasm. A case report and review of the literature. *J neuropathol exp neurol*. 1964;23:280-292.
18. Blattner-Johnson M, Jones DTW, Pfaff E. Precision medicine in pediatric solid cancers. *Semin Cancer Biol*. 2021;S1044-579X(21)00178-4. doi:10.1016/j.semcancer.2021.06.008
19. Jones DT, Kocialkowski S, Liu L, Pearson DM, Bäcklund LM, Ichimura K, Collins VP. Tandem duplication producing a novel oncogenic BRAF fusion gene defines the majority of pilocytic astrocytomas. *Cancer Res*;68(21):8673-7. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2097
20. Kaul A, Chen YH, Emnett RJ, Dahiya S, Gutmann DH (2012) Pediatric glioma-associated KIAA1549:BRAF expression regulates neuroglial cell growth in a cell type-specific and mTOR-dependent manner. *Genes Dev*; 26(23):2561-6. doi: 10.1101/gad.200907.112
21. Srinivasa K, Cross KA, Dahiya S. BRAF Alteration in Central and Peripheral Nervous System Tumors. *Front Oncol*. 2020;10:574974. doi:10.3389/fonc.2020.574974
22. Dahiya S, Yu J, Kaul A, Leonard JR, Gutmann DH (2012) Novel BRAF Alteration in a Sporadic Pilocytic Astrocytoma. *Case Rep Med*; 2012:418672. doi: 10.1155/2012/418672
23. Appay R, et al (2018) Duplications of KIAA1549 and BRAF screening by Droplet Digital PCR

- from formalin-fixed paraffin-embedded DNA is an accurate alternative for KIAA1549-BRAF fusion detection in pilocytic astrocytomas. *Mod Pathol*; 31(10):1490-1501. doi: 10.1038/s41379-018-0050-6
24. Kao YC, Sung YS, Zhang L, et al. EWSR1 Fusions With CREB Family Transcription Factors Define a Novel Myxoid Mesenchymal Tumor With Predilection for Intracranial Location. *Am J Surg Pathol*. 2017;41(4):482-490. doi:10.1097/PAS.0000000000000788
 25. De Los Santos Y, Shin D, Malnik S, et al. Intracranial myxoid mesenchymal neoplasms with EWSR1 gene rearrangement: report of 2 midline cases with one demonstrating durable response to MET inhibitor monotherapy. *Neurooncol Adv*. 2021;3(1):vdab016. Published 2021 Feb 4. doi:10.1093/oaajnl/vdab016
 26. Ballester LY, Meis JM, Lazar AJ, et al. Intracranial Myxoid Mesenchymal Tumor With EWSR1-ATF1 Fusion. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2020;79(3):347-351. doi:10.1093/jnen/nlz140
 27. Bale TA, Oviedo A, Kozakewich H, et al. Intracranial myxoid mesenchymal tumors with EWSR1-CREB family gene fusions: myxoid variant of angiomatoid fibrous histiocytoma or novel entity?. *Brain Pathol*. 2018;28(2):183-191. doi:10.1111/bpa.12504
 28. Gareton A, Pierron G, Mokhtari K, et al. ESWR1-CREM Fusion in an Intracranial Myxoid Angiomatoid Fibrous Histiocytoma-Like Tumor: A Case Report and Literature Review. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2018;77(7):537-541. doi:10.1093/jnen/nly039
 29. Konstantinidis A, Cheesman E, O'Sullivan J, et al. Intracranial Angiomatoid Fibrous Histiocytoma with EWSR1-CREB Family Fusions: A Report of 2 Pediatric Cases. *World Neurosurg*. 2019;126:113-119. doi:10.1016/j.wneu.2019.02.107
 30. White MD, McDowell MM, Pearce TM, Bukowinski AJ, Greene S. Intracranial Myxoid Mesenchymal Tumor with Rare EWSR1-CREM Translocation. *Pediatr Neurosurg*. 2019;54(5):347-353. doi:10.1159/000501695
 31. Sciot R, Jacobs S, Calenbergh FV, Demaerel P, Wozniak A, Debiec-Rychter M. Primary myxoid mesenchymal tumour with intracranial location: report of a case with a EWSR1-ATF1 fusion. *Histopathology*. 2018;72(5):880-883. doi:10.1111/his.13437
 32. Liu C, Liu Y, Zhao Y, et al. Primary Intracranial Mesenchymal Tumor with EWSR1-CREM Gene Fusion: A Case Report and Literature Review. *World Neurosurg*. 2020;142:318-324. doi:10.1016/j.wneu.2020.07.015
 33. Sturm D, Witt H, Hovestadt V, et al. Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma. *Cancer Cell*. 2012;22(4):425-437. doi:10.1016/j.ccr.2012.08.024
 34. Venneti S, Garimella MT, Sullivan LM, et al. Evaluation of histone 3 lysine 27 trimethylation (H3K27me3) and enhancer of Zest 2 (EZH2) in pediatric glial and glioneuronal tumors shows decreased H3K27me3 in H3F3A K27M mutant glioblastomas. *Brain Pathol*. 2013;23(5):558-564. doi:10.1111/bpa.12042
 35. Oliveira VF, De Sousa GR, Dos Santos AC, et al. Evaluating H3F3A K27M and G34R/V somatic mutations in a cohort of pediatric brain tumors of different and rare histologies. *Childs Nerv Syst*. 2021;37(2):375-382. doi:10.1007/s00381-020-04852-8
 36. Schwartzentruber J, Korshunov A, Liu XY, et al. Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature*. 2012;482(7384):226-231. Published 2012 Jan 29. doi:10.1038/nature10833
 37. Deng H, Zeng J, Zhang T, et al. Histone H3.3K27M Mobilizes Multiple Cancer/Testis (CT) Antigens in Pediatric Glioma. *Mol Cancer Res*. 2018;16(4):623-633. doi:10.1158/1541-7786.MCR-17-0460
 38. Huang TY, Piunti A, Lulla RR, et al. Detection of Histone H3 mutations in cerebrospinal fluid-derived tumor DNA from children with diffuse midline glioma. *Acta Neuropathol Commun*. 2017;5(1):28. Published 2017 Apr 17. doi:10.1186/s40478-017-0436-6
 39. Yuen BT, Knoepfler PS. Histone H3.3 mutations: a variant path to cancer. *Cancer Cell*. 2013;24(5):567-574. doi:10.1016/j.ccr.2013.09.015
 40. Cheng F, Guo D. MET in glioma: signaling pathways and targeted therapies. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019;38(1):270. Published 2019 Jun 20. doi:10.1186/s13046-019-1269-x
 41. Awad AJ, Burns TC, Zhang Y, Abounader R. Targeting MET for glioma therapy. *Neurosurg Focus*. 2014;37(6):E10. doi:10.3171/2014.9.FOCUS14520

42. Hutter S, Bolin S, Weishaupt H, Swartling FJ. Modeling and Targeting MYC Genes in Childhood Brain Tumors. *Genes* (Basel). 2017;8(4):107. Published 2017 Mar 23. doi:10.3390/genes8040107
43. Pierscianek D, Kim YH, Motomura K, et al. MET gain in diffuse astrocytomas is associated with poorer outcome. *Brain Pathol.* 2013;23(1):13-18. doi:10.1111/j.1750-3639.2012.00609.x
44. Kong DS, Song SY, Kim DH, et al. Prognostic significance of c-Met expression in glioblastomas. *Cancer.* 2009;115(1):140-148. doi:10.1002/cncr.23972
45. Koschmann C, Zamler D, MacKay A, et al. Characterizing and targeting PDGFRA alterations in pediatric high-grade glioma. *Oncotarget.* 2016;7(40):65696-65706. doi:10.18632/oncotarget.11602
46. Korshunov A, Ryzhova M, Hovestadt V, et al. Integrated analysis of pediatric glioblastoma reveals a subset of biologically favorable tumors with associated molecular prognostic markers. *Acta Neuropathol.* 2015;129(5):669-678. doi:10.1007/s00401-015-1405-4
47. Severino M, Schwartz ES, Thurnher MM, Rydland J, Nikas I, Rossi A. Congenital tumors of the central nervous system. *Neuroradiology* . 2010;52(6):531-48.
48. Zhong Y, Lin F, Xu F, Schubert J, Wu J, Wainwright L, Zhao X, Cao K, Fan Z, Chen J, Lang SS, Kennedy BC, Vaeane AN, Santi M, Resnick AC, Storm PB, Li MM. Genomic characterization of a PPP1CB-ALK fusion with fusion gene amplification in a congenital glioblastoma. *Cancer Genet.* 2021 Apr;252-253:37-42.
49. Chmielecki J, Bailey M, He J, Elvin J, Vergilio JA, Ramkissoon S, Suh J, Frampton GM, Sun JX, Morley S, Spritz D, Ali S, Gay L, Erlich RL, Ross JS, Buxhaku J, Davies H, Faso V, Germain A, Glanville B, Miller VA, Stephens PJ, Janeway KA, Maris JM, Meshinchi S, Pugh TJ, Shern JF, Lipson D. Genomic Profiling of a Large Set of Diverse Pediatric Cancers Identifies Known and Novel Mutations across Tumor Spectra. *Cancer Res.* 2017;77(2):509-519.
50. Lake JA, Donson AM, Prince E, Davies KD, Nellan A, Green AL, Mulcahy Levy J, Dorris K, Vibhakar R, Hankinson TC, Foreman NK, Ewalt MD, Kleinschmidt-DeMasters BK, Hoffman LM, Gilani A. Targeted fusion analysis can aid in the classification and treatment of pediatric glioma, ependymoma, and glioneuronal tumors. *Pediatr Blood Cancer* . 2020;67(1):e28028.
51. Štiková Z, Ptáková N, Horáková M, Kostun J, Ondič O. Inflammatory myofibroblastic tumor of the uterus - case report. *Cesk Patol.* 2019;55(4):239-243.
52. Aghajan Y, Levy ML, Malicki DM, Crawford JR. Novel PPP1CB-ALK fusion protein in a high-grade glioma of infancy. *BMJ Case Rep.* 2016;2016:bcr2016217189.
53. Guerreiro Stucklin AS, et al. Alterations in ALK/ROS1/NTRK/MET drive a group of infantile hemispheric gliomas. *Nat Commun.* 2019;10(1):4343.
54. Ng A, Levy ML, Malicki DM, Crawford JR. Unusual high-grade and low-grade glioma in an infant with PPP1CB-ALK gene fusion. *BMJ Case Rep.* 2019;12(2):e228248.
55. Holla VR, Elamin YY, Bailey AM, et al. ALK: a tyrosine kinase target for cancer therapy. *Cold Spring Harb Mol Case Stud.* 2017;3(1):a001115.
56. Wong A. The emerging role of targeted therapy and immunotherapy in the management of brain metastases in non-small cell lung cancer. *Front Oncol* . 2017;7:33.
57. Créancier L, Vandenberghe I, Gomes B, Dejean C, Blanchet JC, Meilleroux J, Guimbaud R, Selves J, Kruczynski A. Chromosomal rearrangements involving the NTRK1 gene in colorectal carcinoma. *Cancer Lett.* 2015;365(1):107-11.
58. Bongarzone I, Pierotti MA, Monzini N, Mondellini P, Manenti G, Donghi R, Pilotti S, Grieco M, Santoro M, Fusco A, et al. High frequency of activation of tyrosine kinase oncogenes in human papillary thyroid carcinoma. *Oncogene.* 1989;4(12):1457-62.
59. Lange AM, Lo HW. Inhibiting TRK Proteins in Clinical Cancer Therapy. *Cancers* (Basel). 2018;10(4):105
60. Macy ME, Birks DK, Barton VN, Chan MH, Donson AM, Kleinschmidt-Demasters BK, Bemis LT, Handler MH, Foreman NK. Clinical and molecular characteristics of congenital glioblastoma. *Neuro Oncol.* 2012;14(7):931-41.
61. Espiritu AI, Terencio BB, Jamora RDG. Congenital Glioblastoma Multiforme with Long-Term Childhood Survival: A Case Report and Systematic Review. *World Neurosurg.* 2020;139:90-96
62. Gambella A, Senetta R, Collemi G, Vallero SG, Monticelli M, Cofano F, Zeppa P, Garbossa D, Pellerino A, Rudà R, Soffietti R, Fagioli F, Papotti M, Cassoni P, Bertero L. NTRK Fusions in

- Central Nervous System Tumors: A Rare, but Worthy Target. *Int J Mol Sci.* 2020;21(3):753.
63. Wu G, Diaz AK, Paugh BS, et al. The genomic landscape of diffuse intrinsic pontine glioma and pediatric non-brainstem high-grade glioma. *Nat Genet.* 2014;46(5):444-450.
64. Rolfo C. NTRK gene fusions: a rough diamond ready to sparkle. *Lancet Oncol.* 2020;21(4):472-474.
65. Jiang T, Wang G, Liu Y, et al. Development of small-molecule tropomyosin receptor kinase (TRK) inhibitors for NTRK fusion cancers. *Acta Pharm Sin B.* 2021;11(2):355-372.
66. Alharbi M, Mobark NA, Balbaid AAO, et al. Regression of ETV6-NTRK3 Infantile Glioblastoma After First-Line Treatment With Larotrectinib. *JCO Precis Oncol.* 2020;4:PO.20.00017.

8. ANEXOS

8.1. Anexo 1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



Termo de Consentimento BIOBANCO Livre e Esclarecido para concessão de material biológico e registro de informações associadas, ao Biobanco do Instituto de Oncologia Pediátrica IOP – GRAACC/UNIFESP

Nome: _____

RH: _____ NG: _____ Data de Nasc.: ____ / ____ / ____

Você/seu filho(a) foi admitido(a) no Instituto de Oncologia Pediátrica –GRAACC/UNIFESP para o tratamento de _____. Como parte do tratamento você/seu filho(a) poderá ser submetido a exames laboratoriais para coletas de sangue periférico e/ou medula óssea e/ou líquido e/ou procedimentos cirúrgicos. Os materiais biológicos coletados serão utilizados para o diagnóstico e para o acompanhamento da doença. Parte desse material pode ser usado para pesquisa, com o objetivo de conhecer melhor a doença, se você/seu filho(a) autorizar.

Leia com atenção o texto a seguir para entender o que é, e para que se destina o BIOBANCO do IOP-GRAACC/UNIFESP, onde seu material/seu filho(a) será arquivado após autorização.

1. APRESENTAÇÃO

O BIOBANCO do Instituto de Oncologia Pediátrica GRAACC/UNIFESP, garante as condições técnicas adequadas, assim como dos aspectos éticos e legais associados para o armazenamento de materiais biológicos humanos e informações associadas concedidos ao Instituto de Oncologia Pediátrica GRAACC/UNIFESP, com a finalidade de uso compartilhado em diferentes projetos de pesquisa.

O prazo de armazenamento de material biológico humano em biobanco é indeterminado, sendo a manutenção de seu credenciamento subordinada ao atendimento das normas vigentes, conforme Resolução CNS nº 441 de 2011.

2. O QUE SIGNIFICA PARTICIPAR COMO CONSENTIDOR?



Rua Pedro de Toledo, 572, Vila Clementino | São Paulo/SP
CEP: 04039-001 | (11) 5908-9100 | graacc.org.br | graacc@graacc.org.br

Caso assine esse termo, você permitirá que o material biológico solicitado seja retirado e armazenado no BIOBANCO do Instituto de Oncologia Pediátrica GRAACC/UNIFESP. Igualmente, as informações associadas a este material serão registradas através da utilização de um sistema seguro que anonimiza/codifica a identificação das suas amostras e as informações associadas coletadas.

Esse presente termo tem validade para todas as coletas realizadas no decorrer do seu tratamento.

3. COMO PARTICIPAR?

Sua participação consistirá em conceder o material biológico solicitado e autorizar o seu uso e das informações a ele associadas. O procedimento de retirada dependerá do tipo de material biológico concedido, com base nos procedimentos operacionais padrão (POPs) desenvolvido para cada tipo de material.

4. QUAL É A IMPORTÂNCIA DE PARTICIPAR COMO CONSENTIDOR?

A importância é garantir a qualidade e a confiabilidade dos resultados das pesquisas científicas que necessitem utilizar o material biológico concedido e as informações associadas. O material biológico vai ser armazenado e cuidado com base nos procedimentos operacionais padrão (POPs), os quais são constantemente revisados por profissionais do Comitê Gestor do BIOBANCO do Instituto de Oncologia Pediátrica GRAACC/UNIFESP.

É importante informar que todos os futuros projetos de pesquisa que vierem a utilizar estes materiais armazenados no BIOBANCO do Instituto de Oncologia Pediátrica GRAACC/UNIFESP, obrigatoriamente, deverão ser aprovados pela Comissão Científica do Instituto de Oncologia Pediátrica GRAACC/UNIFESP e pelo Comitê de ética em pesquisa da UNIFESP.

5. POSSO DESISTIR?

Sim, você tem plena liberdade de desistir, da participação, a qualquer momento, sem que haja necessidade de justificativa e sem que haja nenhum tipo de penalidade. Isto significa que o material biológico concedido não mais poderá ser utilizado em projetos de pesquisa a partir desta decisão.

Ressalva-se que as informações associadas ao material biológico retirado do Biobanco, somente poderão ser utilizadas em trabalhos acadêmicos em curso e em publicações científicas já previstas no momento da desistência.

6. COMO DESISTIR?

Você deve fazer esta solicitação por escrito, a qualquer tempo, utilizando um formulário criado especificamente para esta finalidade, e encaminhado diretamente a Chefia do BIOBANCO do Instituto de Oncologia Pediátrica GRAACC/UNIFESP, no oitavo andar do Instituto de Oncologia Pediátrica.

7. O QUE VAI ACONTECER COM O MEU MATERIAL CASO EU DESISTA?

O material biológico armazenado será retirado do BIOBANCO do Instituto de Oncologia Pediátrica GRAACC/UNIFESP por profissional habilitado e devolvido ao paciente. Caso seja da sua vontade, podemos descartar essa amostra, respeitando as normas de biossegurança do Instituto de Oncologia Pediátrica e da ANVISA (RDC) nº 306 de 2004. As informações associadas a este material serão retiradas dos sistemas de informação, a partir da data do protocolo de recebimento do formulário de desistência.

Destaca-se que as informações associadas ao material biológico retirado do Biobanco, somente poderão ser utilizadas em trabalhos acadêmicos em curso e em publicações científicas já previstas no momento da desistência.

8. O MATERIAL BIOLÓGICO E AS INFORMAÇÕES ASSOCIADAS SERÃO UTILIZADOS COMO E PARA QUÊ?

O material biológico e as informações a ele associadas somente serão utilizados para fins de pesquisa científica. Você será informado sobre qualquer dado relevante, obtido através do seu material, tais como marcadores biológicos e possíveis alvos terapêuticos.

Ressalta-se que o material biológico e informações associadas não serão objeto de nenhuma forma de comercialização.

8.1 DADOS

8.1.1 Descrição do material biológico coletado

SANGUE [Sim] [Não]

MEDULA ÓSSEA [Sim] [Não]

SALIVA [Sim] [Não]

PELE [Sim] [Não]

FRAGMENTO DE TECIDOS E CÉLULAS [Sim] [Não]

URINA [Sim] [Não]

CABELO [Sim] [Não]

FEZES [Sim] [Não]

LÍQUOR [Sim] [Não]

OUTROS [Sim] [Não] **Descrição de OUTROS:**

8.1.3 Método de coleta do material concedido

Descrição:

8.1.4 Método de armazenamento do material concedido

Descrição:

8.1.5 Forma de registro das informações associadas do material concedido

Descrição:

9. QUEM PODERÁ UTILIZAR O MATERIAL BIOLÓGICO ARMAZENADO E AS INFORMAÇÕES ASSOCIADAS?

O material biológico armazenado apenas poderá ser utilizado por pesquisadores cadastrados e autorizados pelo Comitê gestor do BIOBANCO do Instituto de Oncologia Pediátrica GRAACC/UNIFESP e que tiverem os seus projetos de pesquisa aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP.

10. COM QUEM EU POSSO FALAR CASO QUEIRA MAIS INFORMAÇÕES?

Você poderá contatar: Responsável pelo BIOBANCO e guardião das amostras do Instituto de Oncologia Pediátrica GRAACC/UNIFESP.

Nome: Dra Silvia Regina Caminada de Toledo

Telefone: 11-50808582

Endereço: IOP-GRAACC/UNIFESP. Rua Pedro de Toledo, 572, 8º andar, Laboratório de Genética, Vila Clementino, São Paulo-SP, CEP: 04039-001

E-mail: silviatoledo@graacc.org.br

Você também poderá entrar em contato com o responsável do CEP:

Nome: Dr. Miguel Roberto Jorge

Telefone: 11-5571-1062

Endereço: Rua Botucatu, 572 – cj41 – Vila Clementino, São Paulo – SP - (atendimento diário das 9:00 às 13:00)

Email: secretaria.cepunifesp@gmail.com

Você será informado caso haja perda ou destruição de suas amostras biológicas e/ou aconteça o encerramento do biobanco, assim como terá o direito a qualquer momento ao acesso às informações obtidas/associadas do (ao) seu material biológico armazenado no biobanco.

11. MINHA DECISÃO

() **Aceito conceder para o BIOBANCO** do Instituto de Oncologia Pediátrica GRAACC/UNIFESP e autorizo que meu material/material de meu filho seja utilizado em projetos futuros, aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP, sem necessidade de meu consentimento. O meu consentimento só será necessário quando eu atingir a maioridade.

() **Aceito conceder para BIOBANCO** do Instituto de Oncologia Pediátrica GRAACC/UNIFESP e desejo ser contatado para dar meu consentimento todas as vezes que meu material seja utilizado em projetos futuros, aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP.



() **Não aceito conceder para BIOBANCO** do Instituto de Oncologia Pediátrica GRAACC/UNIFESP.

Você receberá uma via desse documento, uma via irá para o banco de tecido e o original será arquivado em seu prontuário. Todas as páginas desse presente documento deverão ser rubricadas por você e pelo profissional aqui presente. Todas as páginas deverão ser rubricadas e assinadas pelo responsável pelo Biobanco ou, na sua ausência, pelo profissional que o represente.

Nome do(a) paciente: _____

Assinatura do(a) paciente: _____

Nome da mãe: _____

Assinatura do representante legal 1(mãe): _____

Nome do pai: _____

Assinatura do representante legal 2 (pai): _____

Nome e assinatura do responsável pela obtenção do Termo de Consentimento

Nome: _____

Assinatura: _____

Data: ____ / ____ / ____

Nome e assinatura do responsável pelo BIOBANCO ou seu representante

Nome: _____

Assinatura: _____

Data: ____ / ____ / ____



Rua Pedro de Toledo, 572, Vila Clementino | São Paulo/SP
CEP: 04039-001 | (11) 5908-9100 | graacc.org.br | graacc@graacc.org.br



12. OUTRAS PESSOAS PODEM TOMAR DECISÕES POR MIM (Somente para maiores de 18 anos)?

Você pode autorizar outras pessoas, desde que maiores e capazes, para lhe representar em alguma decisão referente ao seu consentimento.

Você deseja autorizar outras pessoas para tomarem decisão em seu nome no futuro, caso esteja impossibilitado?

() SIM () NÃO

Assinatura: _____

NOME: _____

ENDEREÇO: _____

TELEFONE: _____

E-MAIL: _____



Rua Pedro de Toledo, 572, Vila Clementino | São Paulo/SP
CEP: 04039-001 | (11) 5908-9100 | graacc.org.br | graacc@graacc.org.br

8.2. Anexo 2. Aprovação do Comissão de Ética e Pesquisa da UNIFESP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Investigação das alterações genéticas dos ependimomas da infância utilizando a estratégia de sequenciamento de nova geração.

Pesquisador: Sílvia Regina Caminada de Toledo

Área Temática: Genética Humana:
(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 19234619.6.0000.5505

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.704.864

Apresentação do Projeto:

Projeto CEP/UNIFESP n: 0915/2019 (parecer final)

Trata-se de projeto de Mestrado de Débora Cabral de Carvalho Corrêa.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Sílvia Regina Caminada de Toledo

Projeto vinculado ao Departamento de Pediatria, Campus São Paulo, Escola Paulista de Medicina, UNIFESP.

Área Temática: Genética Humana (Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP)

-As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa (<PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1401228.pdf> postado em 11/08/2019).

APRESENTAÇÃO: Os tumores de sistema nervoso central (SNC) representam os tumores sólidos mais comuns da infância e adolescência e o ependimoma (EPN) é o terceiro grupo de tumor

Endereço: Rua Botucatu, 740
Bairro: VILA CLEMENTINO **CEP:** 04.023-900
UF: SP **Município:** SÃO PAULO
Telefone: (11)5571-1062 **Fax:** (11)5539-7162 **E-mail:** cep@unifesp.br

cerebral mais frequente em crianças. A criação de um painel genético para os EPN a partir do sequenciamento de nova geração permite uma caracterização molecular mais acurada dos subgrupos desse tipo tumoral, uma vez que essa plataforma permite avaliar todas as classes de alvos relevantes, como mutações pontuais, inserções ou deleções e até mesmo fusões gênicas. Fusões gênicas que envolvem os genes NTRK conferem um potencial oncogênico à célula. Devido à sua atividade oncogênica, as fusões de NTRK têm sido investigadas como alvos terapêuticos e detectadas em diversos tumores pediátricos. Ainda, epigenomas aberrantes definem muitos tumores de SNC em crianças, como demonstrado por mudanças nos padrões de metilação do DNA, marcas de histonas e ruptura na estrutura da cromatina. Estudos recentes revelaram um padrão epigenético dos EPN com ênfase particular nas modificações das histonas e identificaram uma diminuição na H3K27me3, permitindo uma distinção entre as subclasses dos EPN. Assim, as modificações genéticas e epigenéticas são fundamentais na compreensão da biologia e no processo de tumorigênese dos EPN. A utilização de um painel genético desenvolvido somente para tumores da infância e adolescência, a partir da plataforma de sequenciamento de nova geração, permite o estabelecimento de uma distinção molecular dos subgrupos de EPN, sendo possível determinar possíveis alvos terapêuticos para esses tumores.

HIPÓTESE: Nossa compreensão acerca dos fatores moleculares dos tumores cerebrais em crianças e adolescentes avançou drasticamente nos últimos anos e a heterogeneidade molecular desses tumores pode predizer o prognóstico clínico desses pacientes, sendo possível o direcionamento de uma terapia personalizada. No entanto, os ependimomas da infância são tumores de crescimento lento e não costumam responder bem à quimioterapia, sendo seu tratamento ainda um grande desafio. Assim, a classificação desse tipo de tumor baseada em um perfil molecular é importante para a utilização de tratamentos específicos para cada subgrupo. O Oncomine Childhood Cancer Research Assay (OCCRA) é o primeiro painel genético específico e abrangente das neoplasias da infância e adolescência. Entre as informações de mais de 250 genes quanto à presença de mutações, CNVs, rearranjos e expressão gênica, temos os genes NTRK1, NTRK2 e NTRK3 com droga alvo já desenvolvida e em fase de liberação na ANVISA, com resultados impressionantes. Não há dados na literatura acerca das fusões de NTRK em amostras de ependimoma da infância, sendo de extrema relevância sua investigação, pois tem sido demonstrado que o uso de terapia alvo para NTRK pode beneficiar muitos outros pacientes com tumores de SNC. A investigação

Endereço: Rua Botucatu, 740		
Bairro: VILA CLEMENTINO		
UF: SP	Município: SAO PAULO	CEP: 04.023-900
Telefone: (11)5571-1062	Fax: (11)5539-7162	E-mail: cep@unifesp.br

utilizando o painel OCCRA possibilitará, análise de um grande número de genes que podem contribuir para o processo de tumorigênese dos tumores da infância e adolescência, como o ependimoma, permitindo que seja estabelecido um perfil para esses tumores. Ainda, os ependimomas de fossa posterior compreendem duas subclasses moleculares distintas: EPN-PF-A, que são mais invasivos, e os EPN-PF-B que possuem um melhor prognóstico. A imunexpressão de H3K27me3, uma modificação de histona importante para a regulação gênica e identidade celular, estratifica os ependimomas de fossa posterior de uma forma binária em tumores H3K27me3-negativos e tumores H3K27me3-positivos correspondentes ao EPN-PF-A e EPN-PF-B, respectivamente. Assim, as modificações genéticas e epigenéticas são fundamentais na compreensão da biologia e no processo de tumorigênese dos ependimomas. A investigação da expressão proteica de H3K27 permitirá uma informação que contribuirá para o aumento da acuidade do diagnóstico e da determinação do prognóstico para os pacientes com tumores investigados. Além disso, a utilização de um painel desenvolvido somente para tumores da infância e adolescência, a partir da plataforma de sequenciamento de nova geração, permite o estabelecimento de uma distinção molecular desses subgrupos, sendo possível determinar possíveis alvos terapêuticos para esses tumores.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO PRIMÁRIO: Detectar e investigar alterações moleculares, com potencial marcador prognóstico e alvo terapêutico em ependimoma, utilizando a estratégia de sequenciamento de nova geração (NGS).

OBJETIVO SECUNDÁRIO:

- Investigar amostras de ependimoma, utilizando a estratégia de NGS através de painel específico para neoplasias da infância e adolescência.
- Investigar a presença de rearranjos de NTRK, identificar o parceiro do gene e sua relação com o prognóstico dos pacientes, além da informação clínica de quais pacientes poderiam ser beneficiados por terapia alvo.
- Investigar a presença de alterações genéticas que permitem a classificação molecular dos ependimomas, como os rearranjos: RELA e YAP1; mutações dos genes KDM4C, IDH1, IDH2, MSH6, TERT; CNVs em genes como MYC, MYCN, GLI1, GLI, EGFR e cobertura total de região exônica dos genes APC, KDM6A, PTCH1, PTEN, RB, SUFU, TP53, TSC1, TSC2.

Endereço: Rua Botucatu, 740		CEP: 04.023-900
Bairro: VILA CLEMENTINO		
UF: SP	Município: SAO PAULO	
Telefone: (11)5571-1062	Fax: (11)5539-7162	E-mail: cep@unifesp.br



Continuação do Parecer: 3.704.864

- Investigar a presença de H3K27me3, por meio de imunohistoquímica, que permite diferenciar as duas subclasses dos ependimomas e prever o papel prognóstico.
- Determinar o papel prognóstico dos marcadores moleculares investigados, a partir da correlação dos resultados dos achados moleculares com os aspectos clínico-histopatológicos dos pacientes.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Em relação aos riscos e benefícios, o pesquisador(a) declara:

RISCOS: As amostras são coletadas durante o procedimento cirúrgico com finalidade de biópsia ou de retirada do tumor como forma de tratamento. Os riscos não estão relacionados à coleta do material, mas são inerentes ao procedimento cirúrgico.

BENEFÍCIOS: Possibilidade de identificação de marcadores prognósticos e alvos terapêuticos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

TIPO DE ESTUDO:

LOCAL: Instituto de Oncologia Pediátrica IOP-GRAACC/UNIFESP

PARTICIPANTES: 30 amostras de ependimoma.

PROCEDIMENTOS: Amostra e parâmetros clínicos As amostras utilizadas no projeto fazem parte do Biobanco do Instituto de Oncologia Pediátrica IOP-GRAACC/UNIFESP (B-053). Foram selecionadas 30 amostras de ependimoma. O processamento das amostras só será feito após confirmação da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do Biobanco, sem necessidade de reaconsentimento ou após reaconsentimento, quando essa foi a escolha do participante. O mesmo critério será aplicado para os Termos de Assentimento (6 a 12 anos e 13 a 17 anos). Extração de RNA e DNA e síntese de cDNA Para a extração de moléculas das amostras tumorais será utilizado o FastPrep®-24 Tissue Ruptor (MP Biomedicals®), um homogeneizador de alta velocidade para a lise de amostras biológicas. A extração de moléculas de DNA e RNA será feita utilizando o Kit AllPrep DNA/RNA mini kit (QIAGEN®). Após a extração, as amostras serão diluídas em água livre de nucleases e armazenadas em freezer -80°C. O DNA e o RNA serão quantificados utilizando o 4200 TapeStation System (Agilent®). O cDNA será sintetizado a partir do RNA utilizando a enzima SuperScript Vilo (ThermoFisher Scientific®) Expressão gênica e qRT-PCR Para as amostras tumorais que mostrarem presença de rearranjo NTRK, será realizado o PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) a partir de ensaios TaqMan® Gene Expression, para quantificação da expressão do gene parceiro. A fluorescência de cada ensaio será captada e quantificada pelo termociclador Applied

Endereço: Rua Botucatu, 740
Bairro: VILA CLEMENTINO **CEP:** 04.023-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)5571-1062 **Fax:** (11)5539-7162 **E-mail:** cep@unifesp.br

Página 04 de 09



Continuação do Parecer: 3.704.864

Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System®. As reações serão realizadas em triplicata e os genes ACTB e GAPDH serão utilizados como controles endógenos da reação. A análise dos resultados do qRT-PCR será realizada através do método Ct padrão.

- Cultura de células primárias de EPN Foi estabelecida uma cultura de cinco células primárias de EPN a partir de amostras de EPN anaplásico (grau III) de fossa posterior obtidas de pacientes pediátricos com 1-10 anos de idade pelo IOP-GRACC/UNIFESP e pelo Departamento de Neurologia e Neurocirurgia da Escola Paulista de Medicina (UNIFESP/EPM). A caracterização estrutural e a avaliação dos níveis de expressão de diferentes marcadores tumorais foram realizadas pela Dra. Lorena Favaro Pavon Profirio com artigo publicado [29] e outro aceito para publicação [30]. Essas células serão melhor caracterizadas molecularmente por meio de análise citogenética e sequenciamento de nova geração.

- Imunohistoquímica O marcador utilizado na investigação imunohistoquímica será a H3K27me3 e o procedimento será realizado pela Profa Dra. Maria Teresa de Seixas Alves, responsável pelo diagnóstico anátomo-patológico no IOP-GRACC/UNIFESP. Seções de (5µm) serão cortadas e usadas no procedimento de imunocoloração com o seguinte anticorpo: anti-H3K27me3 (C26B11, Cell Signaling, Danvers, MA, USA).

- Preparo das bibliotecas, corrida de sequenciamento e análise de dados Será utilizado 20ng de DNA e 20ng de RNA de cada amostra para o preparo das bibliotecas, utilizando o sistema Ion Chef™ (ThermoFisher Scientific®), seguindo o protocolo do fabricante. Após a finalização do preparo, as bibliotecas serão carregadas no chip selecionado (Ion 510™ e Ion 540™-ThermoFisher Scientific®) e estes serão inseridos no sequenciador Ion S5™ (ThermoFisher Scientific®). Será utilizado painel desenvolvido especificamente para as principais alterações descritas nas neoplasias da infância e adolescência, OncoPrint Childhood Cancer Research Assay (OCCRA). Serão abordadas alterações que podem contribuir para o diagnóstico, determinação prognóstica e terapêutica das formas mais comuns de câncer da infância e adolescência, SNVs, InDels, amplificação gênica e fusões gênicas. Alguns exemplos de alterações cobertas por esse painel: mutações em 86 genes, entre eles KDM4C, IDH1, IDH2, MSH6, TERT; 28 CNVs em genes como MYC, MYCN, GLI1, GLI, EGFR; cobertura total da região exônica de 44 genes.

(mais informações, ver projeto detalhado).

Endereço: Rua Botucatu, 740
Bairro: VILA CLEMENTINO CEP: 04.023-900
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)5571-1062 Fax: (11)5539-7162 E-mail: cep@unifesp.br

Página 05 de 09



Continuação do Parecer: 3.704.864

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

1-Foram apresentados adequadamente os principais documentos: folha de rosto; projeto completo; cópia do cadastro CEP/UNIFESP, orçamento financeiro e cronograma.

2-Outros documentos importantes anexados na Plataforma Brasil:

a) Carta do Graacc às pesquisadoras, com instruções dos procedimentos a serem realizados após aprovação do protocolo pelo CEP da Unifesp (Outros; IOP_010_2019_Carta_Pesquisador_Debora.pdf; 26/07/2019)

3- Os modelos dos TCLEs (para os pais/responsáveis, 6 a 12 anos e 13 a 18 anos) foram apresentados pelo pesquisador (TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência; Termo_Assentimento_BIOBANCO.docx; 26/07/2019, TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência; Termo_de_Assentimento_BIOBANCO_13_a_17_anos.docx; 26/07/2019 e TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência; Termo_de_Assentimento_BIOBANCO_6_a_12_anos.docx; 26/07/2019).

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Respostas ao parecer nº 3584319 de 18 de Setembro de 2019.

PENDÊNCIA 1. O cronograma informado no formulário de informações básicas indica que parte do estudo já será iniciada antes da aprovação do protocolo (Extração de DNA/RNA – início 01/08/2019). Favor corrigir o formulário. Lembramos que nenhum estudo pode ser iniciado antes da aprovação pelo CEP/UNIFESP (Norma Operacional CNS nº 001 de 2013, item 3.3.f).

Parte do estudo será iniciado após aprovação do protocolo. A alteração foi feita na página 5 do formulário de submissão, no cronograma de execução.

EXTRAÇÃO DE DNA/RNA 01/11/2019 01/03/2020

TREINAMENTO DE SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DO PAINEL 01/11/2019 01/03/2020

SEQUENCIAMENTO 01/03/2020 01/08/2020

Análise de Bioinformática 01/03/2020 01/11/2020

Análises Estatísticas 01/02/2021 01/04/2021

Confecção de artigo científico 01/03/2021 01/04/2021

Relatório científico 01/03/2021 01/04/2021

Endereço: Rua Botucatu, 740
Bairro: VILA CLEMENTINO CEP: 04.023-900
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)5571-1062 Fax: (11)5539-7162 E-mail: cep@unifesp.br



Continuação do Parecer: 3.704.864

PENDÊNCIA ATENDIDA

PENDÊNCIA 2. Em relação ao orçamento: foi informado que o custo do projeto será de R\$ 98.605,24. Como este custo é relativamente alto, favor informar quem arcará com este custo.

O projeto é financiado a partir de uma doação feita ao Laboratório de genética do IOP-GRAACC/UNIFESP pela Dra. Clelia Maria Erwenne, oftalmologista especializada em retinoblastoma. O financiamento é para projetos que envolvem a metodologia de sequenciamento de nova geração no laboratório, incluindo os de tumores do sistema nervoso central. A alteração foi feita na página 5 do formulário de submissão em outras informações, justificativas ou considerações a critério do Pesquisador.

PENDÊNCIA 3. Na metodologia do projeto, item "5.1 Amostra e parâmetros clínicos", pg 12, lê-se: "As amostras utilizadas no projeto fazem parte do Biobanco do Instituto de Oncologia Pediátrica IOPGRAACC/UNIFESP (B-053). Foram selecionadas 30 amostras de ependimoma. O processamento das amostras só será feito após confirmação da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do Biobanco, sem necessidade de re consentimento ou após re consentimento, quando essa foi a escolha do participante. O mesmo critério será aplicado para os Termos de Assentimento (6 a 12 anos e 13 a 17 anos)."

- Em relação ao isto, solicitamos que seja enviado os modelos de TCLE e TALEs direcionados para a presente pesquisa, para ser aplicado aos participantes que optaram em ser re consentidos, a cada nova pesquisa. (só foram enviados os modelos de TCLE e TALEs relacionado a autorização para armazenamento de amostras biológicas em Biobanco.)

Segue em anexo o documento de Re consentimento direcionado para os participantes da presente pesquisa.

Considerações Finais a critério do CEP:

O CEP informa que a partir desta data de aprovação, é necessário o envio de relatórios parciais (semestralmente), e o relatório final, quando do término do estudo, por meio de notificação pela Plataforma Brasil.

Endereço: Rua Botucatu, 740
Bairro: VILA CLEMENTINO CEP: 04.023-900
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)5571-1062 Fax: (11)5539-7162 E-mail: cep@unifesp.br



Continuação do Parecer: 3.704.864

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1401228.pdf	02/10/2019 10:57:04		Aceito
Outros	Carta_Resposta.docx	02/10/2019 10:56:07	Silvia Regina Caminada de Toledo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_Reconsentimento.docx	02/10/2019 10:44:13	Silvia Regina Caminada de Toledo	Aceito
Outros	CEP_Comite_de_etica_UNIFESP.jpg	11/08/2019 20:13:10	DEBORA CABRAL DE CARVALHO CORREA	Aceito
Outros	IOP_010_2019_Carta_Pesquisador_Debora.pdf	26/07/2019 12:59:04	DEBORA CABRAL DE CARVALHO CORREA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Mestrado.pdf	26/07/2019 12:54:01	DEBORA CABRAL DE CARVALHO CORREA	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto_Plataforma_Brasil.pdf	26/07/2019 12:52:39	DEBORA CABRAL DE CARVALHO CORREA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_Consentimento_BIOBANCO.docx	26/07/2019 12:18:44	DEBORA CABRAL DE CARVALHO CORREA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_Assentimento_BIOBANCO_13_a_17_anos.docx	26/07/2019 12:18:32	DEBORA CABRAL DE CARVALHO CORREA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_Assentimento_BIOBANCO_6_a_12_anos.docx	26/07/2019 12:18:20	DEBORA CABRAL DE CARVALHO CORREA	Aceito

Situação do Parecer:

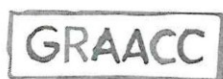
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Botucatu, 740
 Bairro: VILA CLEMENTINO CEP: 04.023-900
 UF: SP Município: SÃO PAULO
 Telefone: (11)5571-1062 Fax: (11)5539-7162 E-mail: cep@unifesp.br

8.3. Anexo 3. Aprovação do Comitê Científico do IOP-GRAACC/UNIFESP



Rua Botucatu, 743 – Vila Clementino
CEP: 04023-062 – São Paulo/SP – Brasil
Tel (+55 11) 5080-8400
www.graacc.org.br

São Paulo, 12 de julho de 2019

Autor do Projeto: Débora Cabral de Carvalho Corrêa

Instituição: IOP / GRAACC

c/c: Orientadora: Profª Dra Silvia Regina Caminada de Toledo

Ref: IOP- 010/2019 – “Investigação das alterações genéticas dos ependimomas da infância, utilizando sequenciamento de nova geração”

Prezado (a) Pesquisador (a),

O seu projeto de pesquisa foi **aprovado** para ser desenvolvido no Instituto de Oncologia Pediátrica - GRAACC/UNIFESP. Entretanto algumas normas estabelecidas pelo Comitê Científico devem ser observadas:

- O seu trabalho só poderá ser iniciado após o recebimento do parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNIFESP. **Deverá ser enviado uma cópia da carta de aprovação do CEP da UNIFESP para a secretaria do Comitê Científico comitecientifico@graacc.org.br.**
- O Comitê Científico indicará um profissional do IOP/GRAACC/UNIFESP que será o responsável pelo acompanhamento do projeto na instituição. Este profissional deverá ser necessariamente um dos autores do trabalho no momento de sua publicação e/ou apresentações em congressos e reuniões científicas.
- A cada seis meses todos os pesquisadores e/ou orientadores devem encaminhar ficha de acompanhamento de seu projeto para o Comitê Científico do IOP-GRAACC/UNIFESP pelo e-mail comitecientifico@graacc.org.br.

Informo abaixo algumas regras da instituição para seu conhecimento:

- Nossa missão é tratar crianças e adolescentes com câncer e suas famílias. Por isso nenhuma intervenção, sob nenhuma hipótese, pode prejudicar os pacientes.



Rua Botucatu, 743 – Vila Clementino
CEP: 04023-062 – São Paulo/SP – Brasil
Tel (+55 11) 5080-8400
www.graacc.org.br

- Não poderá ser feita nenhuma gravação e/ou divulgação de imagens ou fotografias de pacientes sem a devida solicitação e autorização prévia da instituição e após, a autorização por escrito do paciente e/ou responsável legal.
- Ao chegar ao IOP, por favor, identifique-se na portaria, dirija-se ao setor do profissional que irá acompanhá-lo durante a realização do seu trabalho para depois comparecer ao local onde você vai coletar seus dados.
- Por favor, use o crachá de visitante do IOP e o crachá da sua instituição durante todo o tempo.
- Solicite ao responsável do setor no qual você irá desenvolver seu trabalho as regras do local para não interferir com as atividades dos profissionais da área.
- A Instituição possui um manual de boas práticas, recomendamos que solicite, para leitura e conhecimento, na área onde irá desenvolver o seu projeto. As políticas e normas institucionais devem ser respeitadas.

Muito obrigado,

Dra. Simone de Campos Vieira Abib

Dra. Fabianne Altruda de Moraes Costa Carlesse

Comitê Científico

9. APÊNDICES

9.1. Apêndice 1. Projetos de Iniciação Científica

- **Instituto de Oncologia Pediátrica-GRAACC/UNIFESP**

Vínculo institucional: Bolsista; Enquadramento: Iniciação Científica

Projeto de Pesquisa Científica:

Expressão do gene que controla o tamanho do córtex cerebral, *ASPM*, nos tumores de sistema nervoso central.

Situação: Concluído; Financiador: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP

2018 – 2019

- **Departamento de Morfologia e Genética, Disciplina de Genética - Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP**

Vínculo institucional: Voluntário; Enquadramento: Estágio

Projeto de Pesquisa Científica:

Primeiro relato de Homem 46, XX, SRY-negativo com distúrbio de desenvolvimento sexual devido à uma deleção de 3-Mb em 15q detectada por SNP-array.

2016 - 2017

9.2. Apêndice 2. Atividades Acadêmicas (2019 – 2021)

Atividades Complementares

- Escola de Inverno em Neurologia e Neurociências. 2020 (48 horas) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, UNILA
- Medical Neuroscience. 2020 (62 horas) – Duke University, DUKE
- Curso de Atualização em Genética Médica. 2020 (62 horas) – Universidade Federal do Mato Grosso, UFMT
- Harvard Medical School Fundamentals Program in Genetics. 2019 (60 horas) – Harvard Medical School, HMX

Atividades Extracurriculares

- Comissão de Eventos de Pós-Graduação em Biologia Estrutural e Funcional UNIFESP
- Organização do VII Curso de Atualização em Biologia Estrutural e Funcional. 2020

Disciplinas de Pós-Graduação

- Estatística aplicada à Psicobiologia nível I. 2020 (105 horas) - Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia, UNIFESP
- Estatística aplicada à Psicobiologia nível II. 2020 (105 horas) - Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia, UNIFESP
- Segurança em Laboratórios: Aspectos Ambientais e Ocupacionais. 2020 (60 horas) - Pró-Reitoria de Administração, Departamento de Gestão e Segurança Ambiental, UNIFESP
- Novas Estratégias para o estudo de rearranjos citogenômicos. 2020 (45 horas) - Programa de Pós-Graduação em Biologia Estrutural e Funcional, UNIFESP
- Bioética. 2019 (45 horas) - Programa de Pós-Graduação em Ciência Cirúrgica Interdisciplinar, UNIFESP
- Herança epigenética transgeracional: fatos e perspectivas. 2019 (16 horas) - Programa de Pós-Graduação em Biologia Estrutural e Funcional, UNIFESP
- Seminários em Biologia Estrutural e Funcional. 2019 (45 horas) - Programa de Pós-Graduação em Biologia Estrutural e Funcional, UNIFESP
- Drogas psicodélicas: história, farmacologia e potencial terapêutico. 2019 (45 horas) - Programa de Pós-Graduação em Psiquiatria e Psicologia Médica, UNIFESP

9.3. Apêndice 3. Participação em Congressos, Simpósios e Eventos (2019 – 2021)

Simpósios e Eventos

- Encontro Digital de Genética: do Embrião ao Senescente. 2020 – Liga Acadêmica de Genética Médica, Universidade Federal do Mato Grosso, UFMT
- Simpósio 66 anos do DNA: Passado, Presente e Futuro. 2019 – Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP
- Simpósio de Inovações tecnológicas em Oncologia, do diagnóstico ao tratamento. 2019 - Pensabio Biotecnologia
- Using Next-Generation Sequencing for the Molecular Investigation of Genetic Diseases. 2019 – Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP
- Illumina Clinical Research Summit Brasil. 2019 – Illumina Inc. Brasil
- II Oncology Symposium UNIFESP. 2019 – Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP
- Ciência Aberta: Os genomas da população brasileira. 2019 – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP

Congressos Nacionais

- **XXXII Congresso Brasileiro de Genética Médica.** Apresentação de e-poster e vídeo. *Perfil genômico dos ependimomas da infância e adolescência: identificação de alterações genéticas para determinação prognóstica e terapêutica.* 2021
- **XX Congresso do Programa de Pós-Graduação em Biologia Estrutural e Funcional da UNIFESP.** Apresentação de pôster. *Investigação das alterações genéticas dos ependimomas e gliomas da infância e adolescência utilizando a estratégia de sequenciamento de nova geração.* 2019
- **IV Next Frontiers to Cure Cancer A. C. Camargo Cancer Center.** Apresentação de pôster. *The cerebral cortex size controlling gene, ASPM, gene expression in childhood and adolescence brain tumors.* 2019
- **V Congresso Acadêmico UNIFESP.** Apresentação oral. *Expressão do gene que controla o tamanho do córtex cerebral, ASPM, nos tumores de sistema nervoso central da infância e adolescência.* 2019

Congressos Internacionais

- **American Society of Clinical Oncology Annual Meeting (ASCO).** Publicação de trabalho. *Identification of genetic alterations in childhood and adolescence glioblastoma (GBM) using next generation sequencing strategy.* 2020
- **International Society of Pediatric Oncology 52th Congress (SIOP).** Apresentação de e-poster. *Identification of genetic alterations in childhood and adolescence glioblastoma (GBM) using next generation sequencing strategy.* 2020
- **American Association for Cancer Research Annual Meeting (AACR).** Apresentação de e-poster. *Genomic profiling of pediatric and adolescent ependymomas: Underlying genetic alterations for prognosis and therapeutic orientation.* 2021

Resumos publicados em anais de Congressos

- **American Society of Clinical Oncology Annual Meeting (ASCO)**
Cabral de Carvalho Corrêa, D.; Dias Oliveira, I.; de Seixas Alves, M. T.; Saba-Silva, N.; Capellano, A. M.; Dastoli, P.; Cavalheiro, S.; Petrilli, A. S.; Caminada de Toledo, S. R. *Identification of genetic alterations in childhood and adolescence glioblastoma (GBM) using next generation sequencing strategy.* In: American Society of Clinical Oncology (ASCO). 2020, *Journal of Clinical Oncology*, Volume 38, Issue 15, suppl e14547. doi: 10.1200/JCO.2020.38.15_suppl.e14547

- **International Society of Pediatric Oncology 52th Congress (SIOP)**

Cabral de Carvalho Corrêa, D.; Dias Oliveira, I.; de Seixas Alves, M.T.; Saba-Silva, N.; Capellano, A.M.; Dastoli, P.; Cavalheiro, S.; Petrilli, A.S.; Caminada de Toledo, S.R. *Identification of genetic alterations in childhood and adolescence glioblastoma (GBM) using next generation sequencing strategy*. In: Congress of the International Society of Paediatric Oncology (SIOP). 2020, Ottawa. *Pediatric Blood & Cancer*, 2020. Volume 67, Issue S4, suppl e28742. doi: 10.1002/pbc.28742

- **American Association for Cancer Research Annual Meeting (AACR)**

Cabral de Carvalho Corrêa, D.; Dias Oliveira, I.; de Seixas Alves, M.T.; Saba-Silva, N.; Capellano, A.M.; Dastoli, P.; Cavalheiro, S.; Caminada de Toledo, S.R. *Genomic profiling of pediatric and adolescent ependymomas: Underlying genetic alterations for prognosis and therapeutic orientation*. In: Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting (AACR). 2021; Apr 10-15 and May 17-21. Philadelphia (PA): AACR; *Cancer Res* 2021;81(13_Suppl):Abstract nr 2167. doi: 10.1158/1538-7445.AM2021-2167

9.4. Apêndice 4. Artigos publicados

- **Cabral de Carvalho Corrêa, D.;** Dias Oliveira, I.; Mascaro Cordeiro, B. et al. Abnormal spindle-like microcephaly-associated (ASPM) gene expression in posterior fossa brain tumors of childhood and adolescence. *Childs Nerv Syst*. 2021;37(1):137-145. doi:10.1007/s00381-020-04740-1
- Moysés-Oliveira, M.; Cabral, V.; Gígek, C.O.; **Corrêa, D.C.C.;** Di-Battista, A.; Stumpp, T.; Melaragno, M.I. Search for appropriate reference genes for quantitative reverse transcription PCR studies in somite, prosencephalon and heart of early mouse embryo. *Gene*. 2019;710:148-155. doi:10.1016/j.gene.2019.05.042

9.5. Apêndice 5. Artigos submetidos para publicação

- **Cabral de Carvalho Corrêa, D.;** Tesser-Gamba, F.; Dias Oliveira, I.; Saba da Silva, N.; Maria Capellano, A.; de Seixas Alves, M.A.; Alessandra Dastoli, P.; Cavalheiro, S.; Caminada de Toledo, S.R. Molecular profiling of pediatric and adolescent ependymomas: identification of genetic variants using a next-generation sequencing panel. *Journal of Neuro-Oncology*, Maio de 2021.