Keila Cardoso Barbosa

**Estudo de polimorfismos dos genes *EGF* e *EGFR* em
astrocitomas difusamente infiltrativos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Área de concentração: Neurologia

Orientadora: Profa. Dra. Suely Kazue Nagahashi Marie

São Paulo

2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Barbosa, Keila Cardoso

Estudo de polimorfismo dos genes EGF e EGFR em astrocitomas difusamente infiltrativos / Keila Cardoso Barbosa. -- São Paulo, 2008.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Departamento de Neurologia.

Área de concentração: Neurologia.

Orientadora: Suely Kazue Nagahashi Marie.

Descritores: 1.Polimorfismo genético 2.Polimorfismo de um único nucleotídeo 3.Genes erb B-1 4.Fator de crescimento epidérmico 5.Astrocitoma 6.Estudos de casos e controles

USP/FM/SBD-010/08

Aos meus pais, Tadeu e Mariusa, pelo apoio e dedicação, fazendo de suas vidas a minha vida para meu sucesso.

Aos meus irmãos, Ximene, Heuder e Eliene, pela paciência e apoio nas várias madrugadas em que passamos juntos fazendo esse trabalho.

Ao meu querido noivo André, meu companheiro e amigo, pela compreensão, paciência, auxílio, e sobretudo pelo amor que demonstra por mim. Você me ensinou e ajudou muito, e sem você tenho certeza que esse caminho seria muito árduo. Amo te.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho e que pra sempre estarão guardadas em minha memória e em meu coração. Obrigada a todos, amigos e família, por terem compartilhado comigo momentos decisivos de minha vida acadêmica, me apoiando, incentivando e lutando comigo em busca de meu ideal que agora se realiza na forma desse trabalho.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Suely Kazue Nagahashi Marie, que esteve ao meu lado, auxiliando nas minhas dúvidas. A senhora desde o começo me incentivou e me trouxe pelas mãos até o final dessa trajetória. Minha sincera gratidão e o meu muito obrigada por todos esses anos.

À Dr^a Sueli Mieko Oba Shinjo, pessoa a quem eu tenho um imenso carinho por tudo que me ensinou desde que iniciei minha vida na pesquisa laboratorial. A você devo minha eterna gratidão pela amizade e pelo profissionalismo que me conduziu em todos esses anos. Obrigada por sua imprescindível ajuda nesse trabalho e saiba que, com muito carinho, te guardo em meu coração e me espelho em você para um dia ser tão competente.

Aos professores Carlos Gilberto Carlott Júnior e Suzana M. Fleury Malheiros, pela ajuda na captação das amostras e encaminhamento dos casos que fizeram parte dessa casuística.

Ao Prof. Paulo Lotufo pelo apoio a ajuda nos cálculos estatístico epidemiológicos.

A grande amiga e irmã Eliene Dutra Campos, que com sua generosidade me permitiu a honra de sua amizade. Você me ajudou muito na composição desse trabalho trazendo alegria e maturidade para minha vida. Hoje você é parte de minha família e muito obrigada por ter aparecido no meu caminho.

Os meus queridos amigos Mônica Rusticci e Marcelo D. Campos pelo apoio, alegria, ajuda e pelas conversas que me trouxeram a realidade. Vocês são muito especiais.

À minha inesquecível amiga Miyuki Uno, por sua ajuda nos cálculos estatísticos e acima de tudo por sua amizade e lealdade. Nunca encontrei uma pessoa como você. Obrigada pelo apoio e pelo incentivo.

Aos meus amigos de laboratório – LIM 15: Célia Miyagui, Priscila Carvalho, Renata Correia, Mussya Cisotto, Thais Freire, Patrícia Takahashi, Juliana Kitahara, Márcia H. Matsunaga, Érica M. Matsunaga, Mariana Brandão, Thatiana Bastos, Mariah Munhoz, D. Alice Yamada, Márcia de Azevedo, Maria Eunice da Silva, Rose Bedim, Dra Mary S. de Carvalho, Dr Pedro A. Santana, Dra Valéria M.F. Muoio e Darcy T. Borges pelos momentos alegres e sobretudo pela amizade.

Aos amigos de laboratório – UNINOVE: Cristiane Cardelino, Fernanda Bróglia, Felipe M. Messias, Cristina S.S. Viana, Sandra T. R. Nora, Carlos C. Herman, Juliano M. do Prado, Regina M.M. Barreiro, Marta S. Pugas, Débora Ranzoni, Alicia Tartar, Ricardo Bucci e Fabiano Gontijo pela paciência e pela

descontração. Vocês me fazem muito bem. Agradeço a Deus por ter me dado a benção de conhecer vocês.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo suporte financeiro.

Aos pacientes e familiares que participaram desse trabalho por depositarem em nós, médicos e pesquisadores a confiança e por contribuírem hoje para uma melhor condição de vida futura.

Aos meus familiares Herbst: Marilda, Luciana, Alexandre Matias, Ana Paula, Patric Chaad, Luiz Henrique, Mara R.O.P., Clodoaldo, Bruna, Arnaldo, Áurea, Blenda e Amanda. Vocês são peças fundamentais da minha vida e sem vocês tenho certeza que não teria conseguido. Obrigada pelos momentos de alegria e valeu pela compreensão nesse ano que fui tão ausente. Amo vocês.

Aos meus familiares Fonseca: Elza, Mariene, Juliana, Márcio, Gerson, Cilene, Leonardo, Estela. Obrigada pelo apoio, carinho e por entenderem minha ausência. Obrigada pelos momentos felizes que juntos desfrutamos.

À Deus por ter me dado forças para seguir esse caminho e por ter me abençoado com pessoas especiais que marcaram minha vida.

Mestre não é quem sempre ensina, mas
quem de repente aprende.
João Guimarães Rosa/ Grande Sertão: Veredas

Sumário

Lista de Abreviaturas

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
1.1.1 - Astrocitomas Difusamente Infiltrativos.....	3
1.1.2 - Astrocitoma de Baixo grau ou Astrocitoma Grau II.....	5
1.1.3 - Astrocitoma Anaplásico ou Astrocitoma Grau III.....	8
1.1.4 - Glioblastoma ou Astrocitoma Grau IV.....	10
1.1.5 - Progressão Tumoral em Astrocitomas.....	13
1.2 - Desenvolvimento do Câncer.....	15
1.3 - Single Nucleotide Polimorfismo.....	16
1.3.1 - Receptor de Fator de Crescimento Epidérmico (<i>EGFR</i>).....	18
1.3.2 - SNP x Hiperexpressão do <i>EGFR</i>	23
1.3.2.1 - SNPs da Região Não Codificadora do Exon 1 do <i>EGFR</i>	25
1.3.2.2 - SNP do Exon 16 do <i>EGFR</i>	27
1.4 - Fator de Crescimento Epidermal (<i>EGF</i>).....	28
1.4.1 - SNP da Região Não Codificadora do Exon 1 do <i>EGF</i>	30
2 - OBJETIVOS.....	32
3 – CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	33

3.1 – Casuística.....	33
3.1.1 - Casos.....	33
3.1.2 - Controles.....	35
3.1.3 - Equipe de Captação do Material Biológico.....	37
3.1.4 - Aspectos Éticos.....	39
3.2 - Métodos.....	40
Extração de DNA de Sangue Periférico.....	40
Extração de RNA.....	42
3.2.1– Sequência, Localização dos Primers <i>EGFR</i> e <i>EGF</i>	44
Exon 1 - Região Não Codificadora do EGFR –	
Polimorfismos c.-191C>A e c.-216G>T.....	44
Exon 16 – Polimorfismo c.2073A>T (<i>EGFR</i>).....	45
Exon 1 - Região não Codificado de EGF– Polimorfismo c.61 A>G....	46
3.2.2 - Reação em Cadeia de Polimerase (PCR).....	47
3.2.3 - Sítos de Restrição das Endonucleases.....	50
Enzima <i>BseRI</i> e <i>SacII</i> - Polimorfismo c.-191C>A e c.-216G>T (<i>EGFR</i>).....	51
Enzima <i>BsrI</i> – Polimorfismo c.2073A>T (<i>EGFR</i>).....	51
Enzima <i>AluI</i> – Polimorfismo da Região Não Codificadora c.61A>G (<i>EGF</i>).....	52
3.2.4 - Reação de Digestão Enzimática.....	53
3.2.5 - Síntese da Primeira Fita de DNA Complementar (cDNA).....	57
3.2.6 - Reação de PCR em Tempo Real (Real Time PCR).....	58
3.2.7 - Curva de Dissociação (“ <i>Melting Curve</i> ”).....	60
3.2.8 - Quantificação Relativa de Expressão de <i>EGFR</i>	62

3.3 - Análise Estatística.....	63
4 - RESULTADOS.....	64
4.1 - Distribuição Demográfica dos Casos e Controles.....	64
4.2 - Determinação dos Genótipos dos Polimorfismos de <i>EGFR</i> e <i>EGF</i>	65
4.2.1 - <i>EGFR</i>	65
Polimorfismo c. 2073 A>T.....	65
Polimorfismo c.-191C>A.....	66
Polimorfismo c.-216 G>T.....	67
4.2.2 - <i>EGF</i>	68
Polimorfismo c. 61 A>G.....	68
4.3 - Frequências Alélicas.....	69
4.4 - Análise da Expressão Gênica do <i>EGFR</i>	72
4.4.1 - Análise da Expressão Relativa de <i>EGFR</i> em Relação aos Genótipos do Polimorfismo c. –191 C>A do <i>EGFR</i>	74
4.4.2 - Análise de expressão relativa de <i>EGFR</i> em relação aos genótipos no polimorfismo c.-216 G>T de <i>EGFR</i>	77
4.4.3 - Análise do Aumento de Expressão Relativa de <i>EGFR</i> em Relação aos Genótipos do Polimorfismo c.2073 A>T do <i>EGFR</i>	79
4.5 - Análise da Sobrevida em Relação ao Genótipo.....	82
5 - DISCUSSÃO.....	85
5.1 - Polimorfismos da Região Não Traduzida de <i>EGFR</i>	86
5.2 - Polimorfismo do Exon 16 de <i>EGFR</i>	89
5.3 - Polimorfismo da Região Não Traduzida de <i>EGF</i>	91
6 – CONCLUSÕES.....	94

Lista de Abreviaturas

AS1 - Hospital São Paulo Da Universidade Federal de São Paulo

AS2 - Hospital das Clínicas da Universidade de Ribeirão Preto

AS3 - Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo

BRAF – Proto-oncogene responsável por uma proteína da família das tirosina quinase

c-erbB1 – epidermal growth factor receptor

cDNA – DNA complementar

Ct - Threshold

DCC – “deleted in colorectal carcinoma”

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

Dnase - Deoxyribonuclease

dNTP - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

DTT - Dithiothreitol

EDTA - Ethylenediamine Tetraacetic Acid

EGF – Epidermal Growth Factor

EGFR - Epidermal Growth Factor Receptor

GBM – Glioblastoma

Grau I – Astrocitoma Pilocítico

Grau II – Astrocitoma de Baixo Grau

Grau III – Astrocitoma Anaplásico

H&E – Hemtatoxilina e Eosina

HPRT - Hipoxantina Riboxil Transferase

kDA - KiloDalton

KHCO₃ – Carbonato de Potássio

LOH – Loss of Heterozygosity

MDM-2 – gene regulador negativo de p53

Min. - Minutos

mM – Milimolar

NaCl – Cloreto de Sódio
ng/μL – nanograma/microlitro
NH₄Cl – Cloreto de Amônia
OMS – Organização Mundial da Saúde
OR - odds ratio
pb – pares de base
PCR – Polymerase Chain reaction
pmol – picomol
p53 – Gene supressor de tumor
PDGF-A – Platelet-derived growth factor, alfa polypeptide
PDGFR-α - “platelet-derived growth factor receptor, alfa peptide
PTEN – “phosphatase and tensin homolog” – gene associado a migração e adesão celular.
RAS – Oncogene responsável pela produção da proteína Ras.
RB – gene supressor de tumor associado ao retinoblastoma
RLT – Tampão de lise do Kit quiagen
RNA – Ácido Ribonucléico
RNAm – RNA mensageiro
RNase - Ribonuclease
RPE - Tampão de Lavagem 2 do Kit Qiagen
rpm – rotações por minuto
RW1 – Tampão de Lavagem 1 do Kit Qiagen
Seg. - Segundos
SDS – Dodecil Sulfato de Sódio
SNC – Sistema Nervoso Central
SNP – Single Nucleotide Polymorphism
TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TE – Tris-EDTA
TGF-α – Fator de Crescimento Transformador Alfa
TK – Tirosina Quinase

Tris-Hcl - TrisHydrochloride

U – unidade

UTR – Untranslated

μL – Microlitro

χ^2 – qui-quadrado

Lista de Tabelas

Tabela 1- Distribuição dos casos quanto a gênero, idade, grau de astrocitoma (OMS) e centro de origem dos casos.....	34
Tabela 2 - Distribuição dos controles quanto a gênero, idade e centro de origem controles.....	36
Tabela 3 - Seqüência de <i>primers</i> , tamanhos dos produtos de PCR utilizados para cada reação de PCR.....	47
Tabela 4 - Tamanho dos fragmentos após digestão com endonucleases para os polimorfismos do gene <i>EGFR</i> : c.2073 A>T, c.-216 G>T, c.-191 C>A, e para o gene <i>EGF</i> : c.61A>G.....	54
Tabela 5 - Seqüência de <i>primers</i> para análise de expressão de <i>EGFR</i> e <i>HPRT</i> por PCR em tempo real.....	58
Tabela 6 - Distribuição por idade, gênero, em casos com astrocitomas difusamente infiltrativos e controles.....	64
Tabela 7 - Freqüências alélicas dos polimorfismos dos genes <i>EGFR</i> e <i>EGF</i>	69
Tabela 8 - Razão de odds (OR) e 95% de intervalo de confiança (95% IC) entre casos de astrocitomas difusamente infiltrativos e controles de acordo com a idade, sexo, genótipo dos polimorfismos de <i>EGFR</i> e <i>EGF</i>	71

Lista de Figuras

Figura 1- Fotomicroscopia ótica em H&E de astrocitoma de baixo grau	7
Figura 2- Fotomicroscopia ótica em H&E de astrocitoma anaplásico...	9
Figura 3- Fotomicroscopia ótica de glioblastoma multiforme.....	12
Figura 4- Vias de alterações genéticas envolvidas na progressão de astrocitomas difusamente infiltrativos.....	14
Figura 5- Sinalização de ativação do EGFR e progressão celular.....	18
Figura 6- Sinalização da cascata do EGFR para sua ativação.....	19
Figura 7- Cromossomo 7 e seqüência do gene <i>EGFR</i>	20
Figura 8- EGFR e seus domínios.....	21
Figura 9- Alteração polimórfica c. -191 C>A.....	26
Figura 10- Alteração polimórfica c. -216 G>T.....	26
Figura 11- Alteração polimórfica c.2073 A>T.....	27
Figura 12- Cromossomo 4 e seqüência do gene <i>EGF</i>	29
Figura 13- Alteração polimórfica c. 61 A>G.....	31
Figura 14- Seqüência da região não codificadora do <i>EGFR</i>	44
Figura 15- Seqüência do exon 16 do <i>EGFR</i>	45
Figura 16- Seqüência do exon 1 do <i>EGF</i>	46
Figura 17- Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR.....	49
Figura 18- Sítios das enzimas de restrição <i>BseR I</i> e <i>Sac II</i>	51
Figura 19- Sítio da enzima de restrição <i>Bsr I</i>	51
Figura 20- Sítio das enzimas de restrição <i>AluI</i>	52
Figura 21- Eletroforese em gel de agarose e poliacrilamida dos fragmentos dos polimorfismos de <i>EGFR</i> e <i>EGF</i>	56
Figura 22- Curvas de dissociação de dos produtos de PCR do gene <i>EGFR</i>	60
Figura 23- Distribuição dos genótipos do polimorfismo c. 2073 A>T do gene <i>EGFR</i> em casos e controles.....	65
Figura 24- Distribuição dos genótipos do polimorfismo c.191C>A do gene <i>EGFR</i> em casos e controles.	66

Figura 25- Distribuição dos genótipos do polimorfismo c.-216G/T do gene <i>EGFR</i> em casos e controles.....	67
Figura 26- Distribuição dos genótipos do polimorfismo c.61 A>G do gene <i>EGF</i> em casos e controles.....	68
Figura 27- Expressão relativa do gene <i>EGFR</i> em astrocitomas.....	72
Figura 28- Expressão relativa de <i>EGFR</i> nos genótipos do polimorfismo c.-191 C>A de <i>EGFR</i> em astrocitomas de diferentes graus de malignidade.....	76
Figura 29- Expressão relativa de <i>EGFR</i> nos genótipos do polimorfismo c.-216G>T de <i>EGFR</i> em astrocitomas de diferentes graus de malignidade.....	78
Figura 30- Expressão relativa de <i>EGFR</i> nos genótipos do polimorfismo c.2073 A>T de <i>EGFR</i> em astrocitomas de diferentes graus de malignidade.....	81
Figura 31- Kaplan-Meier dos casos de GBM no polimorfismo c.-191 C>A do <i>EGFR</i>	83
Figura 32- Kaplan-Meier dos casos de GMB no polimorfismo c.-216 G>T do <i>EGFR</i>	83
Figura 33- Kaplan-Meier dos casos de GBM no polimorfismo c.2073A>T do <i>EGFR</i>	84
Figura 34- Kaplan-Meier dos casos de GBM no polimorfismo c.61 A>G do <i>EGF</i>	83

Resumo

INTRODUÇÃO: Os astrocitomas difusamente infiltrativos são os tumores mais freqüentes de Sistema Nervoso Central (SNC) com uma taxa de 5-7 novos casos por 100.000 pessoas ano. São tumores altamente invasivos e estão associados com alterações de alguns genes como *EGF* (fator de crescimento epidérmico) e o *EGFR* (receptor do fator de crescimento epidérmico), que podem criar um aumento da atividade mitogênica, acarretando aumento de proliferação e maturação celular, apoptose, angiogênese e metástase. O nível de expressão destes genes pode ser influenciado por alterações genéticas, como a presença de polimorfismos. Uma mudança única de base (SNP) pode alterar a expressão gênica e, sendo assim, estar associada ao aumento do risco de desenvolver astrocitomas. Nesse trabalho, foram analisados 2 SNPs na região não traduzida (c.-191C>A e c.-216G>T) e um SNP no exon 16 (c.2073A>T) do gene *EGFR*, e um outro SNP na região não traduzida no gene *EGF* (c.61A>G). Os SNPs foram associados a expressão gênica do *EGFR* e a sobrevida dos pacientes. **MÉTODOS:** Foi realizado um estudo caso-controle com 193 casos de astrocitomas difusamente infiltrativos e 200 controles por amplificação por PCR seguido de digestão enzimática. Os produtos digeridos das amostras foram analisados por eletroforese em gel de agarose e poliacrilamida e corados com brometo de etídeo. A expressão gênica foi realizada após extração de RNA do tecido tumoral seguida de transcrição reversa e PCR em tempo real. Testes de qui-quadrado, *odds ratio* (OR), intervalo de confiança 95% (IC95%), t de Student e curvas de Kaplan-Meier foram realizados para análises estatística. **RESULTADOS:** A análise das freqüências dos genótipos dos polimorfismos mostrou uma diferença na distribuição entre casos e controles para o polimorfismo c.2073A>T. Pacientes com o genótipo TT apresentou um menor risco para astrocitoma quando comparados com o genótipo AA (OR=0,51, IC95%=0,29-0,99). Nenhuma correlação foi encontrada para os outros polimorfismos analisados. Também

não foi encontrada correlação entre os genótipos dos polimorfismos e os níveis de expressão de *EGFR* e a sobrevida dos pacientes. CONCLUSÃO: Nosso trabalho mostrou haver um possível fator de proteção quando o paciente é portador do genótipo TT, o que pode levar a uma diminuição do risco de desenvolver o tumor. Pacientes com genótipo TT do polimorfismo c.2073A>T do gene *EGFR* apresentam um menor risco para astrocitomas difusamente infiltrativos do que os com o genótipo AA.

Summary

INTRODUCTION: Diffusely infiltrative astrocytomas are the most frequent tumors of the Central Nervous System (CNS) with a rate of 5-7 new cases in 100,000 individuals per year. They are highly invasive, and they are associated to alterations in some genes as *EGF* (epidermal growth factor) and *EGFR* (epidermal growth factor receptor), which may increase mitogenic activity, leading to increase of proliferation, cellular maturation, apoptosis, angiogenesis, and metastasis. Genetic alterations, as presence of polymorphisms of single nucleotide change (SNP) could influence their expression level, and thus could be associated to increased risk in developing astrocytomas. In the present study, two SNP of non-coding region (c.-191C>A and c.-216G>T) and one SNP in exon 16 (c.2073A>T) of *EGFR*, and another SNP of non-coding region of *EGF* (c.61A>G) were analyzed. The SNPs were associated to *EGFR* expression level and to survival time. **METHOD:** a case-control study of 193 of diffusely infiltrative astrocytomas and 200 controls was carried out, with PCR amplification and enzymatic digestion, which products were analyzed in agarose gel or polyacrylamide gel electrophoresis stained by ethidium bromide. *EGFR* expression level was studied by real time PCR after RNA extraction followed by reverse transcription of tumor tissues compared to epileptic non-neoplastic brain tissues. Statistical analysis were performed by χ -square, odds ratio (OR), 95% confidence interval (95% CI), Student-t test and Kaplan Meier. **RESULTS:** The polymorphic genotype frequency was different between case and controls for the polymorphism c.2073A>T. Patients with TT genotype presented lower risk to develop astrocytoma when compared to genotype AA (OR=0.51, CI95%=0.29-0.99). No other correlation was observed for the remaining studied polymorphisms. There was neither correlation between the polymorphic genotypes and the *EGFR* expression levels nor with survival time. **CONCLUSION:** The present study showed a possible protection factor in

developing astrocytomas for the patients harboring the genotype TT of c.2073A>T polymorphism of *EFGR*, thus the patients presenting TT genotype have lower risk to develop diffusely infiltrative astrocytoma than patients presenting the genotype AA.

1 – Introdução

O ministério da saúde relata que os tumores de Sistema Nervoso Central (SNC) são a oitava causa de morte entre todas as neoplasias, com aproximadamente 5500 casos no ano de 2002, o último ano com informações disponíveis (<http://www.datasus.gov.br>), acesso em 05 de janeiro de 2003). Estes representam, em todas as faixas etárias apenas 4% das mortes por todas as neoplasias, porém até os vinte anos de idade, uma em cinco mortes por câncer é decorrente de tumores do SNC.

Os gliomas são os tumores mais freqüentes de SNC e são definidos patologicamente como os tumores que evidenciam a diferenciação glial na histologia, imunohistoquímica e ultraestrutura. Entre os tumores gliais, os astrocitomas são mais freqüentes. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), os astrocitomas são classificados baseados na presença de indicadores como atipia nuclear, mitoses (com configuração normal e anormal), hiperproliferação endotelial, na qual a luz do vaso é cercada por células endoteliais empilhadas ao invés de uma única camada e necrose. A gradação tumoral é determinada pelo número de critérios, sendo que o astrocitoma grau I não apresenta critério de malignidade; a grau II, apresenta 1 critério que geralmente é atipia nuclear; o grau III, apresenta 2 critérios, sendo geralmente atipia celular e mitoses; e o grau IV apresenta 3 ou 4 critérios, que são atipia nuclear, mitoses, proliferação endotelial e/ou necrose. Dessa forma, os

astrocitomas são classificados de acordo com a sua diferenciação e malignidade nos estágios de I a IV (Cavanee *et al.*, 2000 ; Louis *et al.*, 2007).

As alterações polimórficas envolvendo a troca de apenas 1 nucleotídeo (SNP) em genes específicos podem estar envolvidas em processos neoplásicos, ativando a proliferação celular como o caso dos genes *EGF* (fator de crescimento epidérmico) e *EGFR* (receptor do fator de crescimento epidérmico). Esses genes foram descritos como sendo possíveis marcadores genéticos de tumorigênese, inclusive nos gliomas. Por esse motivo o presente estudo analisou a presença de 3 polimorfismos do *EGFR* e 1 polimorfismo do *EGF* e a correlação destes com o grau de malignidade em astrocitomas difusamente infiltrativos.

1.1 – Revisão Bibliográfica

1.1.1 - Astrocitomas Difusamente Infiltrativos

Os tumores que se originam no tecido cerebral são denominados tumores primários do SNC e são classificados pelo tipo de célula do qual se originam. Os astrocitomas são tumores originados de células gliais astrocíticas. Os astrocitomas de grau II a IV, são conhecidos como astrocitomas difusamente infiltrativos, apresentam grande poder de invasão celular de tecido cerebral normal adjacente e as seguintes características:

- podem ocorrer em todas as partes do SNC, preferencialmente nos hemisférios cerebrais
- ocorrem em adultos, em sua maioria
- apresentam heterogeneidade histopatológica.
- apresentam uma progressão da malignidade tumoral.

Incidência:

Os astrocitomas são tumores mais freqüentes intracranianos e ocorrem em mais de 60% entre todos os tumores primários de SNC. A incidência difere

entre as regiões geográficas, mas normalmente a taxa é de 5-7 novos casos por 100.000 pessoas por ano (Kleihues e Cavanee, 2000).

1.1.2 - Astrocitoma de baixo grau ou Astrocitoma grau II

O astrocitoma de baixo grau (grau II) é caracterizado pelo alto grau de diferenciação celular e crescimento lento (Kleihues e Cavanee, 2000). Pode estar localizado em qualquer região do SNC, mas aparece preferencialmente na região supratentorial do cérebro .

Ocorrem, em sua grande maioria, em adultos jovens com faixa etária entre 30 e 40 anos, sendo predominante no sexo masculino.

Os astrocitomas de baixo grau representam de 10 a 15% de todos os tumores astrocíticos, com uma incidência de 1,4 casos novos por cada 1 milhão de pessoas ao ano e podem se localizar em qualquer região do SNC, mas preferencialmente nos hemisférios cerebrais. Apresenta uma média de sobrevida de cerca de 6 a 8 anos após intervenção cirúrgica, embora haja uma variação individual, com alguns casos permanecendo latentes por vários anos e outros progredindo para astrocitomas de maior grau de malignidade (Daumas-Duport et al., 1988).

Quando os pacientes com astrocitoma grau II desenvolvem uma recidiva tumoral, a segunda amostra cirúrgica freqüentemente mostra evidências de aumento de atipia nuclear, hipercromasia, atividade mitótica característica de astrocitoma anaplásico e, eventualmente, proliferação microvascular e/ou necrose característica de GBM. A progressão para anaplasia é imprevisível, bem como o tempo que estas mudanças levam para ocorrer (Kleihues e Cavanee, 2000).

Com relação a fatores prognósticos, a menor idade e a ressecção total são consideradas preditivas para recorrência e progressão mais lenta do tumor (Shafqat et al., 1999).

Os caminhos moleculares e citogenéticos para a formação tumoral ainda não foram elucidados, sendo muito complexos e envolvem o acúmulo de alterações genéticas em genes que normalmente regulam a proliferação, diferenciação e morte celular. Dois exemplos são os genes *EGF* e *EGFR* que podem acelerar o crescimento tumoral partir da amplificação do gene ou a partir de mutações e/ou polimorfismos nestes genes (Kleihues e Cavanee, 2000).

As características histológicas dos astrocitomas de baixo grau estão ilustradas na Figura 1.

FIGURA 1: Fotomicroscopia ótica em H&E de astrocitoma de baixo grau

A Figura mostra uma grande celularidade, atipia nuclear e com componente gemistocítico (seta). Aumento de 200X (A) e 400X (B).

1.1.3 - Astrocitoma Anaplásico ou Astrocitoma grau III

O astrocitoma anaplásico é um tumor com anaplasia focal ou dispersa e com um grande potencial proliferativo.

Ocorrem preferencialmente em homens adultos com idade média de 41 anos e apresentam localização semelhante à dos astrocitomas de baixo grau, com preferência pelos hemisférios cerebrais (Kleihues e Cavane, 2000).

Embora esses tumores possam se originar da progressão de um astrocitoma de baixo grau, possuem uma tendência intrínseca de progressão para GBMs, em um intervalo médio de aproximadamente 2 anos (Watanabe et al., 1997). Entretanto, o período de latência e a rapidez com que progredem variam consideravelmente, indicando assim, a necessidade de marcadores prognósticos adicionais. Do ponto de vista clínico, morfológico e genético, o astrocitoma anaplásico constitui um estágio intermediário na rota de progressão para um GBM.

Assim como no astrocitoma grau II o *EGFR* e o *EGF* são importantes marcadores moleculares por induzirem a proliferação celular.

A Figura 2 representa algumas características histológicas dos astrocitomas anaplásicos.

FIGURA 2: Fotomicroscopia ótica em H&E de astrocitoma anaplásico

As figuras mostram uma grande celularidade, atipia nuclear, atividade mitótica. Aumento de 200X (A) e 400X (B).

1.1.4 - Glioblastoma ou Astrocitoma grau IV

O glioblastoma, também conhecido como glioblastoma multiforme (GBM), são os mais malignos dos tumores astrocíticos.

São também os mais freqüentes do SNC, perfazendo de 20 a 25% do total das neoplasias intracranianas e cerca de 50% dos tumores astrocíticos (Surawics et al., 1999). Os GBMs podem se manifestar em qualquer idade, mas afetam preferencialmente adultos, mais freqüentemente homens, em aproximadamente 70% dos casos entre 45 e 70 anos de idade. Os GBMs ocorrem mais freqüentemente na substância branca dos hemisférios cerebrais.

Os GBMs são classificados como primários e secundários e acometem pacientes em faixas etárias diferentes com respostas a terapias adjuvantes distintas (Scherer, 1940; Kleihues e Ohgaki, 1999). Os GBMs primários são mais freqüentes em uma faixa etária maior (idade média de 55 anos). Após uma história clínica muito curta, normalmente menos de 3 meses, eles se manifestam *de novo*, ou seja, sem qualquer evidência clínica ou histopatológica da existência de uma lesão menos maligna anterior. Este tipo de GBM parece ser resistente à radioterapia e, deste modo, apresenta um prognóstico ruim (Nozaki et al.; 1999).

Os GBMs secundários se desenvolvem tipicamente em pacientes mais jovens, com idade média de 45 anos, através de uma progressão maligna de um astrocitoma de baixo grau ou de um astrocitoma anaplásico. O tempo de evolução varia consideravelmente, com intervalos entre 1 ano ou mais de 10

anos (Ohgaki et al., 1999). Ocorrem em pacientes com história clínica e biópsias seqüenciais de astrocitomas de menor grau (Ohgaki et al., 1999).

Como nos tumores de menor malignidade, o *EGFR* e o *EGF* desempenham um papel na proliferação celular e desenvolvimento tumoral nos GBMs. Por ser um tumor altamente maligno apresentando características mais acentuadas de progressão tumoral, conseqüentemente, esses dois genes podem estar intimamente relacionados a esse tipo de alteração.

As características histológicas relevantes dos GBMs estão ilustradas na Figura 3.

FIGURA 3: Fotomicroscopia ótica de GBM

As figuras mostram **A**-células em paliçada (seta vermelha), células multinucleadas, neoangiogênese (seta preta) e necrose (seta azul) **B**- neovascularização do tipo glomerulóide (seta preta) corados com H&E. Aumento de 400X

1.1.5 - Progressão Tumoral em Astrocitomas

Observam-se alterações distintas na progressão dos astrocitomas difusamente infiltrativos, havendo um número cada vez maior de evidências de que GBMs possam ser primários e secundários, pois evoluem passando por aquisições cumulativas de múltiplas e diferentes alterações genéticas (Collins e James, 1993; Furnari et al., 1996; Louis e Gusella, 1995; Von Deimling et al., 1995), com o envolvimento de um grande número de oncogenes. GBM secundário é aquele que evolui a partir de um astrocitoma menos maligno e o primário aquele que se apresenta já na sua forma mais maligna. A hiperexpressão de vários genes acelera o crescimento celular, incluindo a hiperexpressão do receptor do fator de crescimento epidérmico (*EGFR*). Esta hiperexpressão pode decorrer da amplificação gênica, de mutações ou da perda de heterozigotidade de várias porções dos cromossomos, incluindo 9p, 10q, 11p e 19q, o que leva a perda de loci com possíveis genes supressores de tumor (Von Deimling et al., 1995). A Figura 4 mostra as duas maneiras possíveis de desenvolvimento dos GBMs (primário ou secundário) a partir das alterações genéticas anteriormente descritas.

Figura 4: Vias de alterações genéticas envolvidas na progressão de astrocitomas difusamente infiltrativos.

O esquema mostra os dois tipos possíveis de desenvolvimento do GBM. O GBM secundário se desenvolve a partir de um astrocitoma de baixo grau ou de um astrocitoma anaplásico, e GBM primário se manifesta *de novo*, sem qualquer evidência clínica ou histopatológica da existência de uma lesão menos maligna anterior.

1.2- Desenvolvimento do câncer

Recentemente houve um grande avanço em relação às informações entre a variação genética natural do genoma humano e suas implicações clínicas e funcionais. Isso foi possível devido à silenciosa revolução na tecnologia de genotipagem e do desenvolvimento da bioinformática, possibilitando a análise do genótipo de grande quantidade de indivíduos, com fácil acesso às informações e análise do complexo banco de dados.

As doenças multi-fatoriais como o câncer podem ocorrer devido à interação entre fatores genéticos e ambientais. Apenas na vigência da combinação destes múltiplos fatores há predisposição à doença na presença de alterações genéticas.

Estas variações genéticas do genoma humano são numerosas e sabe-se hoje que excede o estimado. A variação mais comum é a substituição de uma única base, ou seja, polimorfismo de uma única base (SNP – “single nucleotide polymorphisms”).

1.3 – Single Nucleotide Polymorphism (SNP)

Dentre os genes relacionados com o desenvolvimento de câncer, incluindo os gliomas, muitos são polimórficos, apresentando SNPs ou variações do número de pequenas seqüências repetidas de DNA. O SNP pode ser definido como uma alteração de uma única base de nucleotídeo que apresenta uma freqüência menor que 1% na população, sendo a maior determinante de variações possíveis em desenvolver uma doença, resposta a medicação, e resposta a toxicidade (Risch, 2000).

Estas variações do genoma humano podem, ainda, influenciar na taxa de transcrição gênica, na estabilidade do RNA mensageiro (RNAm), ou na quantidade e atividade das proteínas. Desse modo, uma doença pode ser agravada devido à influência de alelos específicos de genes polimórficos.

Observações iniciadas em 1950, sugerem que as pessoas exibem diferentes respostas aos medicamentos e que essas variações poderiam estar relacionadas com a hereditariedade (Evans and Johnson, 2001). Análises da seqüência do genoma humano têm mostrado um elevado número de variações no genoma humano (inserção, deleção, substituição), bem maior do que o estimado (Sachidanandam *et al.*, 2001), sendo o SNP a mais comum. O valor estimado de SNPs é de 30.000 a 1.000.000 e o valor encontrado por Sachidanandam foi de 1.420.000 alterações.

Numerosos SNPs têm sido identificados em genes que podem estar relacionados com o desenvolvimento e progressão do câncer e também com resposta ao tratamento, onde se incluem genes relacionados à resposta inflamatória, regulação do ciclo celular, metabolismo, angiogênese, migração celular e reparo do DNA.

Entre os genes com polimorfismos funcionalmente importantes, inclui-se o fator de crescimento epidérmico (*EGF*) e o seu receptor (*EGFR*), que apresentam um importante papel no crescimento, desenvolvimento, diferenciação e motilidade das células normais e cancerígenas (Hsieh *et al.*, 2005).

1.3.1 - Receptor de fator de crescimento epidérmico (*EGFR*)

A maior parte dos eventos envolvendo amplificação do gene em astrocitomas de alto grau envolve o gene *EGFR*. *EGFR* é um receptor de tirosina quinase (TK) de superfície celular, cujos ligantes extracelulares, entre eles o *EGF* e o fator de crescimento transformador alfa (TGF- α), levam à sua ativação inicializando processos diversos como crescimento, proliferação, apoptose, adesão, migração e diferenciação, além de ser um bom marcador de superfície celular de tumores sólidos (Anderson *et al.*, 2004; Roskoski, 2004; Artega, 2002; Ciardello & Tortora, 2003, Venook, 2005, Rocha-Lima *et al.*, 2007). A Figura 5 ilustra o processo de ativação do *EGFR* a partir de seus ligantes.

Figura 5: Sinalização para ativação do *EGFR* e progressão celular

A figura mostra a ativação do ciclo celular (proliferação, apoptose, angiogênese, metástase) decorrente da ligação do *EGFR* com um de seus ligantes. Figura retirada e adaptada do site www.merck.de/servlet/PB/menu/1381570/index.html

O *EGFR* é expresso em epitélio normal, estroma, células gliais e células da musculatura lisa, o que media o crescimento, desenvolvimento e diferenciação (Venook *et al.*, 2005). Ativado por seus ligantes, o *EGFR* ativa mediadores de tirosina quinase para sinalização de caminhos envolvendo Ras/mitogênese ativador de tirosina quinase, phosphoinositol-3-quinase/ATK, e janus quinase/ sinal de transdução e ativação de fatores de transcrição, ativando fatores transcritos nos núcleos celulares (Talapatra e Thompson, 2001; Woodburn, 1999), conforme ilustra a Figura 6.

Figura 6: Sinalização da cascata do *EGFR* para sua ativação.

Diagrama esquemático do *EGFR* e do caminho de sinalização da cascata do *EGFR*. Esquema modificado de Venook, 2005.

EGFR é uma proteína que na sua forma selvagem possui peso molecular de 170 kDa, e é codificada pelo proto-oncogene *c-erbB1* localizado no cromossomo 7p12.1-12.3, constituído por 28 exons. A Figura 7 mostra a localização do gene *EGFR* no cromossomo 7 e ainda todos os 28 exons e introns com seus respectivos tamanhos em pares de base (pb).

Figura 7: Cromossomo 7 e sequência do gene *EGFR*

Representação esquemática do cromossomo 7 e da estrutura do gene *EGFR*. O gene *EGFR* possui 28 exons (E1 a E28), introns de diferentes tamanhos (In.1 a In.27).

A proteína é composta por três domínios ou regiões principais (Kleihues & Cavanee et al., 2000; Anderson et al., 2004; Roskoski, 2004; Arteaga, 2002; Ciardello & Tortora, 2003; Holbro & Hynes, 2004).

- a) Domínio extracelular, que possui a região na qual se acopla ao ligante;
- b) Domínio transmembrânico;
- c) Domínio intracelular, com o sítio catalítico da tirosina quinase

Kleihues & Cavanee (2000) e Pedersen (2001) consideram um quarto domínio na região C-terminal, responsável pela endocitose, que finaliza o processo de ativação do *EGFR*.

Figura 8: *EGFR* e seus domínios

Mostrando a estrutura conformacional do gene *EGFR* e um diagrama caracterizando seus domínios. Figura retirada e adaptada de Pedersen *et al.*, 2001

O *EGFR* desempenha um papel essencial na sinalização da transdução para a proliferação, diferenciação e sobrevivência celular (Liu *et al.*, 2005). O domínio extracelular é rico em cisteína, e o domínio intracelular contém um sítio de TK e múltiplos sítios de autofosforilação agrupados na porção C-terminal. A porção extracelular é dividida em quatro domínios. Os domínios I e III são pobres em cisteína e contêm conformacionalmente o sítio em que o ligante (*EGF*) ou fator de transformação de crescimento alfa ($TGF\alpha$) se acoplam. Os domínios ricos em cisteína, II e IV, contêm sítios de N-glicosilação e pontes dissulfeto, sítios e pontes, que determinam a conformação terciária do domínio externo do receptor (Kuan *et al.*, 2001). A Figura 8 ilustra os domínios com exatidão.

Em muitas linhagens de células humanas, a expressão de $TGF\alpha$ possui uma forte correlação com a hiperexpressão de *EGFR*. Assim, o $TGF\alpha$ parece agir de maneira autócrina, estimulando a produção via ativação de *EGFR*. A junção do ligante ao domínio extracelular do *EGFR* resulta em dimerização do receptor e início da transdução de sinal intracelular, cujo primeiro passo é a ativação da TK. A consequência primária desta ativação é a fosforilação dos próprios resíduos de tirosina (autofosforilação), seguida de ativação de transdutores de sinal que levam à mitogênese (Kuan *et al.*, 2001).

1.3.2 - SNP e Hiperexpressão do *EGFR*

O aumento de expressão do *EGFR* é encontrada em aproximadamente 30% dos tumores primários humanos e tem sido associado com o estágio da doença, prognóstico, sobrevida, e resposta à quimioterapia. Entre os mecanismos do aumento de expressão do *EGFR* estão a ativação da transcrição e a amplificação do gene. Esse aumento de expressão foi detectado em uma variedade de tumores epiteliais, como câncer de mama, pulmão, bexiga, ovário, próstata e cabeça e pescoço (Grandis & Sok, 2004). Causas epigenéticas, como ativação transcricional, são os principais responsáveis pela elevação dos níveis de *EGFR* detectada na maioria dos cânceres (Grandis & Sok, 2004), com exceção dos gliomas nos quais a amplificação do gene é relativamente comum.

A superexpressão do *EGFR* e/ou mutações na seqüência do gene têm sido encontradas em GBMs, tumores de esôfago, próstata, cólon, mama, ovário, pâncreas, cabeça e pescoço, entre outros. Sugere-se que a formação do tumor resulte da ativação constitutiva do receptor, ou a ativação e degradação do receptor inapropriadamente prolongada, o que bloquearia a endocitose do receptor (Ware *et al.*, 2003; Kitange *et al.*, 2003; Maher *et al.*, 2001.).

Muitos GBMs (astrocitoma grau IV) com amplificação de *EGFR* apresentam também mutações (Ekstrand *et al.*, 1992). O receptor mutante resulta de rearranjos do gene com deleções internas (Sugawa *et al.*, 1990). A

maioria das deleções são específicas de exons que codificam a porção do domínio extracelular da molécula de *EGFR*, podendo então levar a uma ativação constitutiva da cascata de sinalização sem a necessidade do ligante (Pederson *et al.*, 2001; Kuan *et al.* 2001).

Um terceiro mecanismo que pode levar a um aumento de expressão de *EGFR* é a presença de polimorfismos. Para facilitar e homogeneizar a correta descrição dos polimorfismos, nosso trabalho se baseou na descrição do banco de dados do Human Genome Variation Society [(HGVS) www.hgvs.org/mutnomen.html] que determina regras para utilização da nomenclatura. Os trabalhos publicados há cerca de 10 anos mostram que o sistema de nomenclatura tinha sido determinado pela descrição da alteração (mutações e polimorfismos) na cadeia de DNA ou na sequência da proteína (Antonarakis *et al.*, 1998). Essas recomendações de nomenclatura têm sido amplamente aceitas e estimularam a uniformização e a correta descrição das mudanças nas seqüências.

1.3.2.1 - SNPs da Região Não Codificadora (UTR) do Exon 1 do *EGFR*

O *EGFR* é um possível fator genético de risco de câncer (Liu *et al.*, 2005). Dois polimorfismos importantes são os c.-191C>A e o c.-216G>T resultante de uma substituição de uma citosina por uma adenina, e de uma guanina por uma timina respectivamente, na região promotora do gene do *EGFR*. Eles estão localizados em uma região crítica para a atividade do promotor; onde estão localizados os sítios de início transcrpcionais e de afinidade com múltiplas proteínas nucleares (Liu *et. al*, 2005). Estudos de transfecção transitória em células primárias de câncer humano (células linfoblastóides) mostraram uma diferença significativa da atividade do promotor entre os dois haplótipos mais comuns (-216G-191C e -216T-191C). A substituição de guanina por timina na posição -216 aumenta a atividade do promotor em 30%. A expressão do RNA mensageiro (RNAm) com o haplótipo T-C foi significativamente maior quando comparada ao haplótipo G-C ($p < 0,02$) (Li *et al.*, 2005). As Figuras 9 e 10 ilustram a localização desses polimorfismos no DNA genômico.

➤ Polimorfismo c. -191C>A

Figura 9: Alteração polimórfica c. -191C>A

Esquema ilustrando a localização do polimorfismo c.-191C>A na região promotora (vermelha) do exon 1 (verde) do gene *EGFR*. A sequência normal e polimórfica estão apresentadas em vermelho caracterizando região não codificadora e em azul mostrando a troca de nucleotídeo (SNP).

➤ Polimorfismo c. -216G>T

Figura 10: Alteração polimórfica c. -216G>T

Esquema ilustrando a localização do polimorfismo c.-216G>T na região não traduzida (vermelha) do exon 1 (verde) gene *EGFR*. A sequência normal e polimórfica estão apresentadas em vermelho caracterizando região não codificadora e em azul mostrando a troca de nucleotídeo (SNP)

1.3.2.2 - SNP do Exon 16 do *EGFR*

Outro polimorfismo funcionalmente importante é o c.2073A>T com substituição de uma adenina por uma timina no exon 16. O ponto de mutação 2073 ACT → ACA altera o códon de parada na produção da cisteína (Shintani *et al.*, 1999). Sugere-se que o *EGFR* truncado possa interferir na conformação tridimensional da estrutura transmembrânica, assim como na expressão do *EGF*, causando uma disfunção do receptor. A Figura 11 mostra a localização do polimorfismo c.2073A>T no exon 16.

➤ Polimorfismo c. 2073 A>T

Figura 11: Alteração polimórfica c. 2073A>T

Esquema ilustrando a localização do polimorfismo c.2073A>T na região do exon 16 (verde) do gene *EGFR*. A sequência normal e polimórfica estão apresentadas em azul caracterizando exon 16, preto intron 15 e em vermelho mostrando a troca de nucleotídeo (SNP).

1.4 - Fator de Crescimento Epidérmico (*EGF*)

Uma das características dos tumores é a desregulação do crescimento celular. Essa desregulação pode se dar, entre outras causas, através de alteração genética adquirida, ou ainda por alterações epigenéticas em genes que influenciam sinal de transdução.

Em tumores primários de SNC, receptores de TK, que são necessários para uma proliferação normal e diferenciação celular, são importantes marcadores de gliomagenese (Kleihues and Cavenee, 2000; Smith *et. al*, 2001 e Kapoor and O'Rourke, 2003). Alterações no *EGF* e no *EGFR* acontecem em mais da metade de todos os pacientes com GBM (Libermann *et. al*, 1985; Wong *et. al*, 1992; Nishikawa *et. al*, 1994; Frederick *et. al*, 2000).

O gene de *EGF* está localizado no cromossomo 4q25-27 com 24 exons e codifica uma proteína que ativa a síntese de DNA, proliferação celular e estimula a mitose nas células epidérmicas (Araújo *et al.*, 2007; Laurence and Gusterson, 1990; Carpenter and Cohen, 1990).

A Figura 12 mostra com detalhes a localização cromossômica desse gene e detalha o tamanho de cada intron e cada exon desse gene.

Recentemente, Shahbazi (2002) estudou o gene *EGF* em melanoma e encontrou uma menor produção de *EGF* em indivíduos com genótipo AA, comparativamente aos indivíduos com GG e AG. Entretanto, esses achados não foram confirmados pelo grupo russo (McCarron *et al.*, 2003).

Figura 12: Cromossomo 4 e sequência do gene *EGF*

Representação esquemática do cromossomo 4 e da estrutura do gene *EGF*. O gene *EGF* possui 24 exons (E1 a E24), introns de diferentes tamanhos (In.1 a In.23).

Os receptores do *EGF* são ativados por ligantes da família dos fatores de crescimento do *EGF* que são produzidos pelas mesmas células que expressam receptores ErbB (secreção autócrina), ou por células vizinhas (secreção parácrina). As proteínas que pertencem a essa família são caracterizadas pela presença de um domínio *EGF*-like que são constituídos por três grupos: grupo intramolecular dissulfeto (confere ligação específica), uma estrutura adicional que é um domínio de imunoglobulina e um sítio de glicosilação.

É bem descrita a relação de interação entre *EGF* e *EGFR* podendo ser um fator de susceptibilidade e prognóstico em variados tumores como melanoma, GBM, ou câncer gástrico (Araújo, *et al.* 2007; Moulder, *et al.* 2001)

1.4.1 - SNP da Região Não Codificadora do Exon 1 (UTR)

Shahbazi *et. al* (2002) identificou um SNP na região 5' não traduzida (UTR) do gene *EGF* que parece ter uma seqüência funcional. O polimorfismo c.61 A>G apresenta a substituição de uma guanina (G) por uma adenina (A) e aumenta a produção de *EGF* em cultura de células de sangue periférico. Pacientes com melanoma com genótipo GG apresentam um aumento de risco relativo de desenvolver o tumor comparado com a população normal.

Pouco se conhece a respeito da atuação do *EGF* como fator mediador no desenvolvimento do câncer, mas hipoteticamente ele está fortemente associado à tumorigênese (Shahbazi, 2002). O que dá subsídios para essa teoria são as análises mutacionais e funcionais, que demonstram *EGF* operando pelas vias RAS e BRAF em tumores melanocíticos (Mattei *et al.*, 1994 ; Okamoto *et al.*, 2006). A Figura 13 mostra a localização do polimorfismo c.61A>G na região não codificadora do exon 1 do gene *EGF*.

➤ Polimorfismo c.61A>G

Figura 13: Alteração polimórfica c.61A>G

Esquema ilustrando a localização do polimorfismo c.61A>G na região não traduzida (vermelho) do exon 1 (azul) do gene *EGF*. A sequência normal e polimórfica estão apresentadas em vermelho caracterizando UTR do exon 1 e em azul mostrando a troca de nucleotídeo (SNP).

2 – Objetivos

Os objetivos deste estudo são:

1- Analisar os polimorfismos dos genes *EGFR* e do gene *EGF* em um estudo caso-controle.

1.1 – Polimorfismo do gene *EGFR*:

a) c.-191C>A

b) c.-216G>T

c) c.2073A>T

1.2 – Polimorfismo do gene *EGF*:

a) c.61A>G

2- Correlacionar os polimorfismos com a sobrevida dos pacientes e os níveis de expressão do gene *EGFR*.

3 - Casuística e Métodos

3.1 - Casuística:

As amostras foram coletadas no período de abril de 2002 a fevereiro de 2006. Foram selecionados para este estudo dois grupos: A) pacientes submetidos à cirurgia de SNC e diagnosticado histopatologicamente pelo serviço de anatomia patológica como astrocitoma grau II, grau III e grau IV; e B) grupo controle, ou seja, sem neoplasia.

3.1.1 – Casos

O grupo de casos (A) foi composto por 128 pacientes provenientes do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (AS3); 33 pacientes do Hospital São Paulo (AS1); 31 pacientes do Hospital das Clínicas da Universidade de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (AS2), totalizando 193 pacientes subdivididos em: 34 astrocitomas grau II, 30 astrocitomas grau III, e 129 astrocitomas grau IV (Tabela 1). A tabela completa detalhada dos casos está apresentada no Anexo I.

Tabela 1: Distribuição dos casos quanto a gênero, idade, grau de astrocitoma (OMS) e centro de origem dos casos.

		Sexo			Idades (anos)			
		Nº	Feminino	Masculino	Mínima	Máxima	Média	
Astrocitoma	Grau II	AS - 1	7	0	7	29	65	42.9
		AS - 2	4	2	2	28	44	38.5
		AS - 3	23	11	12	23	56	35.0
		Total	34	13	21			
Astrocitoma	Grau III	AS - 1	7	1	6	25	61	42.1
		AS - 2	4	0	4	32	42	37.6
		AS - 3	19	7	12	15	58	33.8
		Total	30	8	22			
Astrocitoma	Grau IV	AS - 1	19	7	12	20	76	52.3
		AS - 2	24	10	14	18	78	55.6
		AS - 3	86	32	54	11	78	53.3
		Total	129	49	80			

3.1.2 – Controles

O grupo controle consistiu de 200 indivíduos sem neoplasia para compor (pacientes hospitalizados nas respectivas instituições pareados aos casos por faixa etária e gênero). Trinta e quatro amostras foram provenientes do grupo AS1, 37 do grupo AS2, 129 amostras do grupo AS3. A tabela com as características dos controles está apresentada no Anexo II detalhada por instituição.

Esses pacientes foram incluídos a partir de um questionário seletivo e não podiam apresentar doenças relacionadas a fumo e álcool; doenças ocupacionais; doenças crônicas não-neoplásicas da cavidade oral, faringe e laringe; doenças crônicas não-neoplásicas do trato digestivo; condições crônicas; imunodeficiência; doenças mentais; doenças do SNC e capacidade grave ou incapacidade para compreender ou responder. Além disso, os critérios de inclusão/ exclusão incluíram o local de moradia, aceitando-se somente aqueles pacientes residentes na região metropolitana de São Paulo. A tabela completa de diagnósticos a serem excluídos como causa de hospitalização ou de atendimento ambulatorial para captação de controles e a lista de cidades incluídas como sendo da região metropolitana de São Paulo encontram-se nos Anexo III e IV respectivamente.

Tabela 2: Distribuição dos controles quanto a gênero, idade e centro de origem dos controles.

		Sexo		Idades / anos		
		Nº	Feminino	Masculino	Mínima	Máxima Média
AS - 1	34	10	24	23	77	48.4
AS - 2	37	14	23	17	76	51.5
AS - 3	129	50	79	17	77	47.2
Total	200	74	126			

3.1.3 – Equipe de Captação do Material Biológico

A coleta das amostras casos e controles foi multicêntrica e multidisciplinar, com o envolvimento de profissionais de diversas áreas. Cada instituição colaboradora do projeto Genoma Clínico contou com uma equipe especialmente capacitada para garantir a integridade do material a ser analisado. Todos os pacientes foram entrevistados para obtenção de dados demográficos e epidemiológicos, com assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido após explicação do objetivo do projeto. Todos os casos foram e/ou estão sendo acompanhados ambulatorialmente, foram submetidos a tratamento complementar padronizado e realizaram exames de ressonância nuclear magnética periodicamente.

- **Coleta da Amostra Tumoral** – Para que os exames moleculares não sofressem alterações foi necessário o congelamento imediato da amostra tumoral em nitrogênio líquido após sua ressecção. Para tanto, cada uma das instituições contou com um profissional específico para tal procedimento.
- **Coleta de Sangue** – A coleta do sangue foi feita no momento da intervenção cirúrgica.

- **Análise Histopatológica** – O diagnóstico de astrocitoma foi realizado pelo neuropatologista de cada centro participante do projeto.
- **Equipe Médica** – Foi realizado acompanhamento clínico de todos os casos incluídos de modo regular segundo protocolo implantado.

3.1.4 – Aspectos éticos

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para análise de Projetos de Pesquisa da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo [(Protocolo de Pesquisa 209/05), Anexo V] e nos comitês de ética dos demais centros participantes. Todos os pacientes foram informados da natureza do projeto de pesquisa e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Este termo foi preenchido por uma mesma pessoa envolvida no projeto e teve por meta esclarecer sobre os objetivos da pesquisa, sanar possíveis dúvidas sobre os procedimentos e ainda informar sobre a finalidade da coleta do material cirúrgico. O termo de consentimento utilizado em nosso projeto de pesquisa está apresentado no Anexo VI, sendo aplicado o mesmo termo nos demais centros.

Os tecidos não tumorais utilizados como controles normais não neoplásicos foram colhidos com o mesmo rigor das amostras tumorais de cirurgias de pacientes epiléticos que também assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (modelo no Anexo VII).

3.2– Métodos

- **Extração de DNA de Sangue Periférico**

A extração do DNA genômico foi realizada de acordo com procedimento previamente descrito por MILLER et al. (1988) a partir de 10 mL de sangue periférico total coletado em tubos com EDTA 5% de todos os pacientes e controles do estudo. Ao sangue foram adicionados 50 mL de solução de lise (NH_4Cl 150 mM, KHCO_3 100nM, EDTA 10 mM, pH 7,4). A mistura foi mantida em banho de gelo por 30 min. e em seguida foi centrifugada por 15 min. a 1800 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado resuspenso em 10 mL de solução de lise e em seguida novamente centrifugado por 5 min. a 1800 rpm. O precipitado foi novamente resuspenso em 3 mL de solução de lise de núcleos (Tris-HCl 100 mM, NaCl 4M, EDTA 20 mM, pH 8,2), acrescido de 50 μL de proteinase K (10 mg/mL) e 300 μL de SDS 10%. A solução resultante foi incubada a 37°C, por 18 horas. Adicionou-se 1 mL de NaCl 6M, seguido de centrifugação por 20 min. a 2600 rpm. O precipitado foi descartado e o sobrenadante centrifugado por 15 min. a 2600 rpm. O sobrenadante foi separado e precipitado com 2 a 3 volumes de etanol absoluto gelado. O DNA precipitado foi removido com um capilar e armazenado em um microtubo onde foi diluído com tampão TE (Tris – HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM pH 8.0).

As concentrações das amostras de DNA foram determinadas através de leitura em espectrofotômetro GeneQuant Pro (GE Healthcare) em comprimento de onda de 260 nm. As amostras selecionadas foram aliquotadas e diluídas para concentração de 50 a 100 ng/μL e armazenadas a 4°C até a utilização.

- **Extração de RNA**

Para a extração de RNA de tecido (tumoral e não neoplásico) foram utilizados 30 mg de tecido, processado com kit da Qiagen (RNeasy® Mini Kit). O tecido congelado foi estocado em nitrogênio líquido e permaneceu nessas condições até a primeira lise com 600µL tampão RLT (tampão rico em guanidina tiocianato) e homogeneização no aparelho polytron (PowerGen 125, Fisher Scientific). Em seguida o lisado foi centrifugado e o sobrenadante foi cuidadosamente transferido para um novo tubo e para cada 1 volume (700 µL) de lisado foi utilizado a mesma quantidade de etanol 70%. Essa mistura foi homogeneizada e transferida para um outro tubo contendo a coluna de purificação proveniente do kit a uma velocidade de 10.000 rpm por 15 seg. O filtrado foi descartado e adicionou-se mais 1 volume de tampão RW1 [tampão rico em etanol e pouca quantidade de guanidina tiocianato (700 µL)] na coluna. Novamente a coluna foi centrifugada a 10.000 rpm por 15 seg., e o filtrado foi descartado. Posteriormente a coluna foi transferida para novo tubo e foram adicionados mais 500 µL de tampão RPE (solução tamponada com pH entre 7,5 - 8) e centrifugado a 10.000 rpm por 2 min. para secar a membrana de sílica-gel. Para a eluição do RNA a coluna foi transferida para um novo tubo e foram adicionados de 30-50 µL de água livre de RNase. Após repouso de 2 min., a coluna foi centrifugada a 10.000 rpm por 1 min. O RNA foi eluído em volume de aproximadamente 40 µL e a leitura de sua concentração foi realizada

no espectrofotômetro GeneQuant (GE Healthcare) sob comprimento de onda de 260 nm. Amostras com valor abaixo de 1.7 não foram selecionadas para compor a casuística. As amostras quantificadas foram armazenadas em freezer a temperatura de -80°C.

3.2.1 – Sequência e Localização dos Primers para estudo dos polimorfismos de *EGFR* e *EGF*

As seqüências dos primers foi determinada a partir da análise da seqüência anteriormente publicada. Os *primers* foram desenhados com tamanho entre 17 a 21 nucleotídeos. A seqüência de cada *primer* está apresentada a seguir:

- **Exon 1 - Região Não Codificadora do *EGFR* - Polimorfismo c.-191C>A e c.-216G>T**

As seqüências dos *primers* da região não traduzida do exon 1 do *EGFR* estão apresentadas na Figura 14 em verde. O tamanho do produto de PCR é de 489pb.

Figura 14: Sequência da região não codificadora do *EGFR*
Localização dos *primers sense* e *antisense* (em verde) para amplificação do fragmento de PCR da região não codificadora (em vermelho) do exon 1 do gene *EGFR* (letras maiúsculas).

- Exon 16 – Polimorfismo c.2073A>T (*EGFR*)

A sequência dos primers do exon 16 do *EGFR* está apresentadas na Figura 15. O tamanho do produto de PCR é de 207pb.

Figura 15: Sequência do exon 16 do *EGFR*

Localização dos primers *sense* e *antisense* (em verde) para amplificação do fragmento de PCR do Exon 16 do gene *EGFR* (letras maiúsculas). A região em amarelo mostra o sítio de restrição da enzima *BsrI*.

- Exon 1 - Região Não Codificadora do *EGF* - Polimorfismo c.61A>G

Os *primers* da região não codificadora do exon 1 do gene *EGF* estão ilustrados na Figura 16. O tamanho do produto de PCR é de 242 pb.

Figura 16: Sequência do exon do *EGF*

Localização dos *primers sense e antisense* (em verde) para amplificação do fragmento de PCR da não codificadora do exon 1 do gene *EGF* (letras maiúsculas). A região em amarelo mostra o sítio de restrição da enzima .

3.2.2 - Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

Foram utilizadas amostras de DNA extraídas de sangue periférico e aliquotadas em concentrações de 50 a 100 ng/μL.

Os parâmetros de amplificação das regiões estudadas, as seqüências dos *primers* e o tamanho do produto de PCR estão descritos abaixo:

Tabela 3 : Seqüência de *primers*, tamanhos dos produtos de PCR utilizados para cada reação de PCR.

Gene	Região	Seqüência	Fragmento
EGFR	Reg. Não Traduzida c.-216 G>T ^A e c.-191 C>A ^A	F: CGCTGCTGGTTCTCCTCCCT R: GCGAGACACGCCCTTACCTTT	489 pb
	Exon 16 c.2073 A>T ^B	F: ATATATGCCAAAGAAGTAGA R: AGAAACTTGATCAGGACAGA	207 pb
EGF	Região Não Traduzida c.61 A>G ^C	F: TGTCACTAAAGGAAAGGA R: TTCACATTTAACAGCCC	242 pb

A: Liu, 2005

B: Hsieh, 2005

C: Bhowmick, 2004

As reações de PCR para o exon 16 do gene *EGFR* e para a região não codificadora do exon 1 do *EGF* foram realizadas utilizando-se 100ng de DNA de sangue periférico em tampão Tris-HCl 10mM (pH 9,0), KCl 50mM, contendo 1,5mM de $MgCl_2$, 0,25mM de cada dNTP, 20 pmols de cada *primer* e 0,5 unidade de enzima Tth DNA polymerase (Biotools) em um volume final de 25 μ L. Para amplificação da região não codificadora do exon 1 do gene *EGFR* foram utilizados os mesmos reagentes nas mesmas concentrações, adicionando-se DMSO 10%.

As reações de PCR foram realizadas no termociclador com sistema Peltier (PTC – 200, “MJ Research Peltier Thermal Cycler, Watertown”, EUA) e consistiram de uma denaturação inicial de 94°C durante 5 min., seguida por 35 ciclos de denaturação por 20 seg. a 94°C, anelamento de 20 seg. a uma temperatura de 52°C e uma extensão por 20 seg. a 72°C. Por fim, foi realizada uma extensão final por 10 min. a 72°C. A reação foi mantida a 4°C até sua análise por eletroforese em gel de agarose.

Os produtos de PCR foram analisados quanto às eficiências das reações e aos tamanhos dos produtos esperados por eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TAE (tris-acetato EDTA) e visualizados após coloração com brometo de etídio, luz UV (ultra-violeta) e respectiva captação de imagem em Image Master® (Pharmacia Biotech). O padrão de tamanho molecular de 100 pb (Invitrogen) foi utilizado. A Figura 17 mostra a análise dos produtos de PCR.

Figura 17: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR

Produtos de amplificação do exon 16 do gene *EGFR* correspondente a um tamanho de fragmento de 207pb (A), região não codificadora do mesmo gene com um fragmento de 489pb (B) e produto amplificado da região não codificadora do exon 1 do gene *EGF* representando fragmento de 249 pb (C). Foi utilizado marcador de tamanho molecular de 100pb.

3.2.3 - Sítios de Restrição das Endonucleases.

As enzimas de restrição auxiliaram na determinação dos genótipos dos polimorfismos.

Em nossa casuística foram utilizados 4 enzimas de restrição

- Alu I
- BseR I
- Bsr I
- Sac II.

A seguir estão apresentadas as características de cada enzima, com seus pontos de restrição e a localização/alteração provocada pelo polimorfismo.

- Enzima *BseR I* e *Sac II* - Polimorfismo c.-191C>A e c.-216G>T (*EGFR*)

O polimorfismo c.-216 G>T é reconhecido pela enzima de restrição *BseR I* e o c.-191C>A pela enzima *Sac II*. O sítio de restrição dessas enzimas está apresentada abaixo na Figura 18.

Figura 18: Sítios das enzimas de restrição *BseR I* e *Sac II*

- Enzima *Bsr I* – Polimorfismo c.2073A>T (*EGFR*)

O polimorfismo c.2073A>T é reconhecido pela enzima de restrição *Bsr I*. O sítio de restrição desta enzima está ilustrada abaixo na Figura 19:

Figura 19: Sítio da enzima de restrição *Bsr I*

- Enzima *Alu I* – Polimorfismo da Região Não Codificadora c.61A>G (*EGF*)

O polimorfismo c.61 A>G é reconhecido pela enzima de restrição (*Alu I*) que é um produto proveniente de um gene clonado de *Arthrobacter luteus* em *E. coli*. O sítio de restrição desta enzima está ilustrada abaixo na Figura 20:

Figura 20: Sítio da enzima de restrição *Alu I*

3.2.4 – Reação de Digestão Enzimática

Foi utilizado 5 µL de produto de PCR amplificado para a digestão do produto de amplificação para estudo do polimorfismo do exon 16 (A2073T) do gene *EGFR* com 1U de *BsrI* e tampão 10x em volume final de 15 µL. Os fragmentos originados foram: 195 e 12 pb para o homozigoto AA, 136, 59 e 12 pb para o homozigoto TT e 195, 136, 59 e 12 pb para o heterozigoto AT (Tabela 4). Para a região promotora c.-216G>T, a enzima de restrição utilizada foi a *BsrI* e para região c.-191C>A utilizou-se a enzima *SacII*, ambas em quantidade de 1U em volume de 15 µL. Os fragmentos originados a partir da digestão da região promotora -216 (c. -216 G>T) foram: 489 pb para o homozigoto GG, 326, 19, 13, 11, 10, 10, 9, 8 e 6 pb para o homozigoto TT e 489, 326, 19, 13, 11, 10, 10, 9, 8 e 6 pb para o heterozigoto TG (Tabela 4); e da mesma forma os fragmentos de digestão da região promotora -191 (c. -191 C>A) foram: 489 pb para o homozigoto AA, 294 e 195 pb para o homozigoto CC e 489, 294 e 195 para o heterozigoto CA. Para a digestão do produto de amplificação do polimorfismo do região não codificadora do exon 1 (c.61 A>G) do gene *EGF* realizada com 1 U de enzima *AluI* os fragmentos originados foram: 193, 49 pb para homozigoto AA, 102, 91 e 49 pb para o homozigoto GG, e 193, 102, 91, 49 pb para o heterozigoto AG (Tabela 4). Os produtos de digestão foram analisados em eletroforese em gel de agarose 2% ou de poliacrilamida 10% corados com brometo de etídeo.

Tabela 4: Tamanho dos fragmentos após digestão com endonucleases para os polimorfismos do gene *EGFR*: c.2073 A>T, c.-216 G>T, c.-191 C>A, e para o gene *EGF*: c.61A>G.

Gene	Região	Produto de Digestão				
		Polimorfismo	Endonuclease	Genótipos		
				Tamanho dos Fragmentos (pb)		
				AA	TT	AT
<i>EGFR</i>	Exon 16	c.2073 A>T	<i>BsrI</i>	195, 12	136, 59, 12	195, 136, 59, 12
	Região Não Codificadora	c.-216 G>T	<i>BsrI</i>	GG	TT	GT
				489	326, 86	489, 326, 19, 13, 11, 10, 10, 9, 8, 6
		c.-191 C>A	<i>SacII</i>	AA	CC	CA
				489	294, 195	489, 294, 195
	Região Não Codificadora	c.61 A>G	<i>AluI</i>	AA	GG	AG
				193, 49	102, 91, 49	193, 102, 91, 49

Com a confirmação do tamanho dos fragmentos amplificados foram analisados os tipos de genótipo para cada SNP. O gel de poliacrilamida foi, ainda, submetido à coloração por nitrato de prata. Essa técnica foi feita com a manutenção do gel em etanol 10% por 8 min., seguida de ácido nítrico 1% por 3 min. Após esse período o gel foi lavado em água Milli-Q e mantido em solução com nitrato de prata 0,1% e formaldeído 0,055% por 20 min. Após nova lavagem com H₂O Milli-Q, procedeu-se à revelação com carbonato de sódio 3% contendo 0,111% de formaldeído seguida de uma nova solução de carbonato de sódio 3% contendo 0,055% de formaldeído até a visualização das bandas e, por fim, a reação foi interrompida com ácido acético 10% durante 5 min. e, o gel foi lavado e mantido em água Milli-Q. Os géis demonstrando exemplos de análise dos produtos de digestão da região promotora estão apresentados na Figura 21.

Figura 21: Eletroforese em gel de agarose e poliacrilamida dos produtos de PCR para análise dos polimorfismos de *EGFR* e *EGF*

A: genótipos do SNP c.2073 A>T de *EGFR*

B: genótipos do SNP c.-191 C>A de *EGFR*

C: genótipos do SNP c.-216 G>T de *EGFR*

D: genótipos do SNP c.61 A>G de *EGF*

3.2.5-Síntese da Primeira Fita de DNA Complementar (cDNA)

Para cada 7,0µL (1µg) de RNA a ser reversamente transcrito, acrescentou-se 0,5µL de DNase (10U/µL), 2,0µL do tampão de síntese 5x (First Strand Buffer, Invitrogen) e 0,5µL de inibidor de RNase (RNase-OUT, Invitrogen). Este produto foi incubado por 10 min. a 37°C e por 5 min. à temperatura de 75°C para o processo de denaturação.

A seguir, foi adicionado a cada amostra 0,1µL de *Random Primers* (3µg/µL; Invitrogen), 1,0µL de solução com mistura de dNTPs (*deoxyNucleotide mix* 10mM; Invitrogen) e 0,9µL de água MilliQ autoclavada. As amostras foram incubadas por mais 5 min. a 65°C.

Ao final deste processo, as amostras foram imediatamente resfriadas (em gelo) e foi acrescentado a cada amostra 2,0µL do tampão de síntese 5x (First Strand Buffer), 1,0µL de DTT 0,1M (Invitrogen, EUA), 0,5µL do inibidor de RNase, 3,5µL de água milliQ autoclavada e 1,0µL de Transcriptase reversa (*SuperScript III Reverse Transcriptase* 200U/µL; Invitrogen). As amostras foram levemente homogeneizadas e incubadas por 5 min a 25°C, 60 min. a 50°C e 15 min a 70°C.

As amostras foram diluídas com TE e armazenadas a -20°C.

3.2.6-Reação de PCR em Tempo Real (Real Time PCR)

Os níveis de expressão de RNAm do gene *EGFR* e do gene de referência endógena Hipoxantina Riboxil Transferase (*HPRT*) foram quantificados através da técnica de PCR em tempo real baseada na emissão de fluorescência SYBR Green I. Todas as reações foram realizadas no aparelho *Gene Amp 7500 Sequence Detection System* (Applied Biosystems).

As reações foram preparadas utilizando-se SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) contendo SYBR Green, *AmpliTaq Gold DNA Polimerase*, dNTPs (com dUTP), uracil N-glicosilase (NG), referência passiva e tampão otimizado. O preparo e o armazenamento foram realizados segundo as instruções do fabricante, exceto pelo volume final de cada reação que foi de 12 μ L, sendo utilizados 6 μ L de SybrR Green PCR Master Mix, 3,0 μ L de cDNA e *primers sense* e *antisense* na concentração final de 200nM para *HPRT* e 200nM para *EGFR*. A sequência de *primers* está apresentada na Tabela 5.

Tabela 5: Sequência de *primers* para análise de expressão de *EGFR* e *HPRT* por PCR em tempo real

Gene	Região	Sequência (5'-3')	Fragmento (pb)
<i>EGFR</i>	Exon 27	F: TGCAGCGATACAGCTCAGACCC	123
	Exon 28	R: TTTGGGAACGGACTGGTTTATG	
<i>HPRT</i>	Exon 2	F: TGAGGATTTGGAAAGGGTGT	118
	Exon 3	R: GAGCACACAGAGGGCTACAA	

Os parâmetros do aparelho foram ajustados para digestão pela UNG a 50°C por 2 min., denaturação à 95° C por 10 min. e 40 ciclos de amplificação (15 seg. a 95° C e 60 seg. a 60° C). No final de todas as reações foram analisadas as curvas de dissociação.

Cada amostra foi testada em duplicata e todas as reações de PCR consideradas para análise apresentaram eficiência igual ou superior a 95%.

Para as análises de expressão gênica de tecido não tumoral de cérebro foi utilizado como agente calibrador.

3.2.7- Curva de Dissociação (“*Melting Curve*”)

As curvas de dissociação das amostras foram realizadas para análise de contaminação, formação de dímeros de *primers*, e amplificação inespecíficas. As curvas de dissociação de todos os produtos de PCR apresentam a mesma temperatura de dissociação. Após a amplificação do PCR em tempo real, programou-se o aparelho para realizar uma curva de dissociação. Nesta fase, a temperatura da reação foi elevada e o aparelho captou a mudança na emissão de fluorescência. No ponto de dissociação, as duas cadeias de cDNA se separaram e a fluorescência diminuiu gradativamente. O *software* do aparelho forneceu um gráfico que determinou a mudança de fluorescência emitida com a temperatura. A Figura 22 ilustra exemplos das curvas de dissociação do *EGFR*.

Figura 22: Curvas de dissociação dos produtos de PCR em tempo real do gene *EGFR*

No final de cada reação realizada a temperatura foi aumentada gradativamente para a determinação da curva de dissociação. As curvas mostram as derivadas de fluorescência nas reações com picos únicos dos produtos de PCR

As amostras que apresentaram curvas de dissociação com temperaturas diferentes e/ou apresentaram mais de um ponto de dissociação foram desconsideradas e as reações foram repetidas para estas amostras.

3.2.8-Quantificação Relativa de Expressão de *EGFR*

Os valores de Ct foram obtidos utilizando-se o *threshold* determinado individual e manualmente para cada gene. Foi utilizada a média aritmética dos valores de Ct encontrados para cada amostra testada em duplicata.

A equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ foi utilizada para calcular a expressão do gene *EGFR* em amostras de tumores em relação a média de expressão nos tecidos não tumorais, onde $\Delta Ct = Ct_{EGFR} - Ct_{HPRT}$, e $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{tumor} - \text{média } \Delta Ct_{\text{tecidos não tumorais}}$ (Livak, Schmittgen, 2001). Os resultados foram apresentados em escala $\log_{10}$ para melhor visualização.

3.3 – Análise Estatística

O teste qui-quadrado (χ^2), cálculo de *odds ratio* (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC95%) foram utilizados para avaliar as associações entre os genótipos de polimorfismos de *EGFR* e *EGF* e o risco de desenvolver astrocitoma. As distribuições dos genótipos relacionados aos genes foram verificadas utilizando o teste de equilíbrio de *Hardy-Weinberg*. Estes cálculos estatísticos foram realizados utilizando-se o programa STATA versão 7 (STATA Corp., College Station, Texas, Estados Unidos).

O teste não paramétrico (*t* de Student) foi utilizado para avaliar o nível de expressão relativa do gene *EGFR* com os genótipos dos polimorfismos c.2073A>T, c.-191C>A, c.-216G>T utilizando-se o programa GraphPad Prism versão 4 (San Diego, Califórnia, Estados Unidos). Valores de $p < 0,05$ foram considerados com significância estatística.

A análise de sobrevida foi realizada através de curva de Kaplan-Meier, utilizando-se teste de long rank. Os cálculos foram realizados através do programa SPSS versão 10 (Chicago, Leinois, Estados Unidos).

4 - Resultados

4.1 - Distribuição demográfica dos casos e controles

Foram analisadas 193 amostras de casos e 200 de controles pareados por gênero e idade. A Tabela 6 mostra a distribuição dos casos e controles quanto a idade e gênero.

Tabela 6: Distribuição por idade, gênero, em casos com astrocitomas difusamente infiltrativos e controles.

	Astrocitomas	%	Controles	%
Pacientes	193	100	200	100
Idade (anos)				
<30	25	13,0	26	13,0
30-39	37	19,2	41	20,5
40-49	39	20,2	39	19,5
50-59	40	20,7	36	18,0
60-69	40	20,7	42	21,0
>70	12	6,2	16	8,0
Total	193	100,0	200	100,0
Gênero				
Masculino	123	63,7	126	50,6
Feminino	70	36,3	74	51,4
Total	193	100,0	200	100,0

4.2 - Determinação dos genótipos dos polimorfismos de *EGFR* e *EGF*

4.2.1 - *EGFR*

A – Polimorfismo c.2073A>T

A frequência dos genótipos AA, AT, TT foi observada nos casos em uma percentagem de 16,6% (32/193), 51,8% (100/193) e 31,6% (61/193), respectivamente. Já nos controles, os mesmos genótipos foram observados nas seguintes percentagens: 10,0% (20/200), 53,0% (106/200) e 37,0% (74/200), respectivamente (Figura 23). Não houve diferença na distribuição genotípica entre casos e controles ($p=0,131$).

Figura 23: Distribuição dos genótipos do polimorfismo c. 2073 A>T do gene *EGFR* em casos e controles.

B – Polimorfismo c.-191C>A

Nesse estudo foi observada a seguinte distribuição dos genótipos nos casos: 1,0% (2/193) de AA, 13,5% (26/193) de CA, 85,5% (165/193) CC. Nos controles a distribuição foi semelhante: 2,0% (4/193) de AA, 13,0% (26/193) de CA, 85,0% (170/193) de CC (Figura 24). Não houve diferença na distribuição genotípica entre os casos e controles ($p=0,735$).

Figura 24: Distribuição dos genótipos do polimorfismo c.191C>A do gene *EGFR* em casos e controles.

C – Polimorfismo c.-216G>T

A seguinte distribuição genotípica foi observada nos casos: GG, 48,2% (93/193), TG, 49,2% (95/193) e TT, 2,6% (5/193). Nos controles os resultados foram similares: 50,0% de GG (100/150), 45,0% de TG (90/193), 5,0% de TT (10/200). Não houve diferença estatística entre os genótipos ($p=0,381$) (Figura 25), nos casos e controles.

Figura 25: Distribuição dos genótipos do polimorfismo c.-216G>T do gene *EGFR* em casos e controles.

4.2.2 - EGF

A – Polimorfismo c. 61 A>G

Com relação aos genótipos AA, AG, GG, foram observados nos casos em uma percentagem de 28,0% (54/193), 63,2% (122/193) e 8,8% (17/193), respectivamente. Já nos controles, os mesmos genótipos foram observados nas seguintes percentagens: 28,5% (57/200), 62,0% (124/200) e 9,5 (19/200), respectivamente ($p=0,959$). A Figura 26 mostra a distribuição dos genótipos encontrada nos casos e controles.

Gráfico 26: Distribuição dos genótipos do polimorfismo c.61 A>G do gene *EGF* em casos e controles.

4.3- Frequência Alélica

A Tabela 7 apresenta os dados das frequências alélicas dos quatro polimorfismos analisados.

Tabela 7 : Frequências alélicas dos polimorfismos dos genes *EGFR* e *EGF*

Freq. Alélica	Casos	%	Controles	%
EGFR c.2073 A>T				
A	164	42,4	146	36,5
T	222	57,6	254	63,5
	p = 0,403		p = 0,043	
EGFR c.-191 C>A				
C	356	92,0	366	91,5
A	30	8,0	34	8,5
	p = 0,402		p = 0,020	
EGFR c.-216 G>T				
G	281	72,8	290	72,5
T	105	27,2	110	27,5
	p = 0,007		p = 0,069	
EGF c.61 A>G				
A	230	59,6	238	59,5
G	156	40,4	162	40,5
	p = 0,000		p = 0,0001	

Foi observado que alguns polimorfismos estão em desequilíbrio para o teste de Hardy-Weinberg. A análise do gene *EGFR* apresentou alteração no polimorfismo c.2073A>T no grupo controle ($p=0,043$), no polimorfismo c.-191C>A no grupo controle ($p=0,020$) e no polimorfismo c.-216G>T no grupo de casos ($p=0,007$). Para o polimorfismo do gene *EGF* ambos os grupos, casos e controles, apresentaram características de desequilíbrio menor que 0,05.

Foi realizada a análise dos dados de distribuição dos casos de astrocitomas difusos comparados a controles quanto a idade, gênero, genótipo dos polimorfismos de *EGFR* e *EGF*. Observou-se um discreto predomínio de pacientes com idade menor que 50 anos do gênero masculino e estas proporções foram mantidas entre os controles (Tabela 8)

O cálculo de OR e IC95% foi realizado para idade, gênero, genótipos dos polimorfismos de *EGFR* e *EGF* e, ainda, para a combinação de genótipos dos polimorfismos c.-191 C>A e c. -216 G>T, não resultando em dados estatisticamente relevantes no presente estudo, exceto pelo polimorfismo c.2073 A>T que apresentou fator de risco 51% menor dos portadores do genótipo TT em desenvolver astrocitoma que os portadores do genótipo AA.

Não foram encontradas associações entre os demais polimorfismos isolados ou em conjunto analisados (*EGFR* c.-191C>A, c.-216G>T; *EGF* c.61^A>G; associação c.-191C>A e c.-216G>T) e susceptibilidade no desenvolvimento de astrocitomas difusamente infiltrativos.

Tabela 8: Razão de odds (OR) e 95% de intervalo de confiança (95% IC) entre casos de astrocitomas difusamente infiltrativos e controles de acordo com a idade, sexo, genótipo dos polimorfismos de *EGFR* e *EGF*.

	Astrocitomas difusos	%	Controles	%	p (valor)	OR (IC 95%)
Total	193		200			
Idade (anos)						
≤50 anos	101	52,3	106	53,0	0,894	1
>50 anos	92	47,7	94	47,0		1 (0,99-1,00)
Sexo						
Masculino	123	63,7	126	63,0	0,881	1
Feminino	70	36,3	74	37,0		0,87 (0,55-1,38)
EGFR - A2073T						
AA	32	16,6	20	10,0		1
AT	100	51,8	106	53,0	0,131	0,59 (0,32-1,09)
TT	61	31,6	74	37,0		0,51 (0,27-0,99)
AT/TT	161	83,4	180	90,0		0,56 (0,31-1,01)
EGFR C-191A						
CC	165	85,5	170	85,0		1
CA	26	13,5	26	13,0	0,735	1,03 (0,57-1,85)
AA	2	1,0	4	2,0		0,51 (0,09-2,85)
CA/AA	28	14,5	30	15,0		0,96 (0,55-1,68)
EGFR G-216T						
GG	93	48,2	100	50,0		1
TG	95	49,2	90	45,0	0,381	1,13 (0,76-1,70)
TT	5	2,6	10	5,0		0,54 (0,18-1,63)
TG/TT	100	51,8	100	50,0		1,07 (0,72-1,60)
EGFR C-191A&G-216T						
CC&GG	73	37,8	76	38,0		1
CA&GG	18	9,3	20	10,0	0,744	0,94 (0,46-1,91)
CA&TG	8	4,1	6	3,0		1,39 (0,46-4,19)
CC&TG	87	45,1	84	42,0		1,08 (0,69-1,67)
CC&TT	5	2,6	10	5,0		0,52 (0,17-1,59)
AA&GG	2	1,0	4	2,0		0,52 (0,92-2,93)
EGF A61G						
AA	54	28,0	57	28,5		1
AG	122	63,2	124	62,0	0,959	1,03 (0,66-1,63)
GG	17	8,8	19	9,5		0,94 (0,44-2,01)
AG/GG	139	72,0	143	71,5		1,02 (0,66-1,59)

Idade calculada no dia da cirurgia

IC 95%: intervalo de confiança de 95%

OR: odds ratio

4.4 – Análise da expressão gênica do *EGFR*

A análise de expressão gênica de *EGFR* foi efetuada com uma casuística de 85 pacientes do grupo AS3, subdividida em 18 astrocitomas grau II, 14 grau III, 53 grau IV. O grupo controle constituiu de 10 amostras cerebrais não neoplásicas. A Figura 27 mostra a distribuição de expressão relativa de *EGFR* nas amostras normais, astrocitoma grau II, grau III e grau IV. A tabela completa dos dados de expressão relativa pode ser analisada no Anexo I.

Figura 27: Expressão relativa do gene *EGFR* em astrocitomas

Pode-se observar uma homogeneidade na expressão de *EGFR* em amostras normais, com uma baixa expressão do gene. As amostras tumorais, apresentam uma grande variação dos níveis de expressão relativa, com média de expressão aproximada entre os pacientes com astrocitoma grau II e III, e uma média mais elevada nos casos de GBM.

4.4.1 – Análise da expressão relativa de *EGFR* em relação aos genótipos do polimorfismo c. -191 C>A do *EGFR*.

Os dados observados nesses gráficos ficaram difíceis de serem comparados nos casos, pois o genótipo AA é raro, impossibilitando o cálculo para análise estatística, uma vez que o programa não permite o cálculo para menos de 3.

Devido a insuficiência de amostras com genótipos AA e CA apresentados nos casos de astrocitoma grau II, não foi realizada a análise estatística.

Quando foi possível a análise, observou-se expressão relativa com uma média alta de CC em relação a CA. A análise estatística comparativa desses dois genótipos não mostrou resultado significativo.

A expressão relativa nos casos de astrocitoma grau III apresentou uma média de expressão relativa maior em casos com genótipo CC do que CA. A análise estatística comparativa desses dois genótipos não mostrou resultados significantes ($p=0,54$).

Embora a quantidade de pacientes com GBM fosse maior que a de pacientes com grau II e III, não foi encontrado nenhum paciente com genótipo AA. A média de expressão relativa de CA foi maior que CC, porém sem diferenças estatísticas ($p=0,64$).

Quando todos os casos de astrocitomas grau II e III foram analisados juntamente, observou-se que os níveis de expressão de *EGFR* nos casos com genótipos CA e CC foram semelhantes ($p=0,41$).

Entre todos os casos de astrocitoma graus II, III e IV, houve um único caso que apresentou genótipo AA. As médias de expressão relativa de *EGFR* das amostras de genótipo CA e CC foram semelhantes e o cálculo estatístico também não apresentou diferença ($p=0,54$).

Os níveis de expressão relativa de *EGFR* nos diferentes genótipos do polimorfismo c.-191C>A e nos grupos de astrocitoma podem ser visualizados na Figura 28.

Figura 28: Expressão relativa de *EGFR* nos genótipos do polimorfismo c.-191 C>A de *EGFR* em astrocitomas de diferentes graus de malignidade

4.4.2 – Análise de expressão relativa de *EGFR* em relação aos genótipos no polimorfismo c.-216 G>T de *EGFR*.

Nos casos de astrocitoma grau II, não foi encontrado o genótipo TT. Foram verificados diferentes níveis de expressão de *EGFR* entre os casos com genótipo GG e TG nos casos de astrocitoma grau II, mas sem diferença estatisticamente significativa. As médias das amostras nos dois genótipos foram diferentes, sendo a média de expressão relativa do genótipo GG mais elevada.

Analisando as amostras de astrocitoma grau III, observou-se que a média da expressão relativa nos genótipos GG e TG foram semelhantes ($p=0,75$).

Nos casos de GBM, observou-se médias de expressão relativa de *EGFR* semelhante e alta ($p=0,93$).

Quando agrupadas as amostras de astrocitomas graus III e IV e subdivididas por genótipo, ou todos os graus, não foram encontradas diferenças nos níveis de expressão de *EGFR* entre os genótipos GG e TG ($p=0,91$ e $p=0,55$).

Os níveis de expressão relativa de *EGFR* nos diferentes genótipos no polimorfismo c.-216G>T e nos grupos de astrocitoma estão apresentados na Figura 29.

Figura 29: Expressão relativa de *EGFR* nos genótipos do polimorfismo c.-216 G>T de *EGFR* em astrocitomas de diferentes graus de malignidade.

4.4.3 – Análise da expressão relativa de *EGFR* em relação aos genótipos do polimorfismo c.2073 A>T do *EGFR*.

A análise comparativa da distribuição dos genótipos polimórficos por grau de malignidade não demonstrou diferenças significativas entre os genótipos estudados.

Nos casos de astrocitoma grau II, a média de expressão relativa do *EGFR* foi maior nos casos com genótipo TT do que AA, porém sem diferenças estatísticas ($p=0,63$). Não houve também diferença de expressão relativa entre os casos e controles com genótipo AA e AT ($p=0,76$) e TT e AT ($p=0,39$).

Com relação aos casos de astrocitoma grau III, a expressão gênica de *EGFR* foi maior nos casos heterozigotos AT, mas sem diferença em relação ao homozigoto TT ($p=0,21$).

Os casos de GBM apresentaram uma expressão relativa de *EGFR* muito variada nos três genótipos possíveis, sendo a média de expressão dos casos com genótipos AA e TT bem semelhantes ($p=0,28$ e $p=0,29$ respectivamente).

Quando os casos de astrocitoma graus III e IV foram analisados juntos, resultados semelhantes ao GBM foram observados, sem diferença de expressão relativa de *EGFR* entre os genótipos: AA x AT, $p=0,92$; AA x TT, $p=0,93$; TT x AT, $p=0,72$.

Quando todos os casos com astrocitomas graus II, III, IV foram analisados conjuntamente, não houve diferença de expressão relativa de *EGFR* ($p=0,57$ para AA x TT, $p=0,48$ para AA x AT e $p=0,94$ para TT x AT).

A Figura 30 mostra os níveis de expressão relativa de *EGFR* nos diferentes genótipos do polimorfismo c.2073A>T e nos astrocitomas de diferentes graus de malignidade.

Figura 30: Expressão relativa de *EGFR* nos genótipos do polimorfismo c.2073 A>T de *EGFR* em astrocitomas de diferentes graus de malignidade.

4.5 – Análise da sobrevida com relação ao genótipo

Foi realizada análise para estabelecer a relação entre o tempo de sobrevida dos pacientes após ressecção cirúrgica e os genótipos dos diferentes polimorfismos analisados. Essa análise foi feita em pacientes com GBM.

As Figuras 31 a 34 apresentam os resultados das curvas de Kaplan-Meier dos pacientes com GBM em associação dos genótipos ou cada genótipo em separado. Não foi verificada correlação dos genótipos com a sobrevida dos pacientes.

Figura 31: Kaplan-Meier dos casos de GBM no polimorfismo c.-191 C>A do *EGFR*.

Figura 32: Kaplan-Meier dos casos de GMB no polimorfismo c.-216 G>T do *EGFR*.

Figura 33: Kaplan-Meier dos casos de GBM no polimorfismo c.2073A>T do EGFR.

Figura 34: Kaplan-Meier dos casos de GBM no polimorfismo c.61 A>G do EGF.

5 - Discussão

A comparação dos genótipos dos polimorfismos dos genes *EGFR* e *EGF* em pacientes com astrocitomas difusamente infiltrativos e controles mostrou que somente o polimorfismo c.2073 A>T do *EGFR* está associado com este tipo de câncer. Pacientes com genótipo TT apresentaram menor risco para desenvolver astrocitoma do que os com genótipo AA.

Para os outros polimorfismos analisados, (c.191C>A, c.216G>T, c.61A>G) não foram observadas diferenças significativas na distribuição dos genótipos entre os grupos de casos e de controles.

5.1 - Polimorfismos da Região Não Traduzida de *EGFR*

O estudo dos polimorfismos c.-191C>A e c.-216G>T não revelou associação destes polimorfismos com expressão de *EGFR* e o tempo de sobrevida dos pacientes em nossa casuística. Uma possível explicação para esse resultado é a baixa frequência dos genótipos AA (c.-191C>A) e TT (c.-216G>T) na população estudada. Um aumento da casuística poderia ajudar na melhor análise da distribuição dos genótipos destes polimorfismos nos casos e controles.

Bandrés *et al.* (2006) analisaram 78 casos de pacientes da Espanha com tumor de cabeça e pescoço e não observaram associação dos genótipos destes polimorfismos com características clínicas, patológicas e de mortalidade, resultados semelhantes aos do presente estudo. A frequência dos genótipos AA do polimorfismo c.-191C>A e TT do polimorfismo c.-216G>T encontrada nos pacientes espanhóis também foi baixa (10% e 3%, respectivamente).

Liu *et al.* (2005) descreveram pela primeira vez estes dois SNPs na região reguladora 5' do gene do *EGFR* (c.-216G>T e c.-191C>A) localizados em regiões essenciais de ligação de fatores para início da transcrição, sendo a região -216 localizada em um sítio de reconhecimento de Sp1. O principal papel de Sp1 na atividade promotora do *EGFR* já foi descrito (Ishii *et al.*, 1985; Kageyama *et al.*, 1988; Xu *et al.*, 1993; Grinstein *et al.*, 2002), sendo este fator de transcrição necessário para a ativação da região promotora de *EGFR* (Nomura *et al.*, 2007 ; Merlino *et al.*, 1985).

Polimorfismos na região promotora, portanto, podem influenciar na atividade promotora do gene e, conseqüentemente, na expressão de *EGFR*. Liu *et al.* (2005) analisaram linhagens celulares e verificaram que os haplótipos -216T e -191C apresentam uma maior expressão de *EGFR* quando comparado com o haplótipo -216G e -191C.

Nomura *et al.* (2007) estudaram a frequência dos polimorfismos c.-191C>A e c.-216G>T em 556 casos de câncer de pulmão e comparou com 556 indivíduos normais de diversas etnias (336 asiáticos, 213 europeus, e 7 indivíduos de outras etnias). Os autores encontraram diferenças entre a frequência dos polimorfismos e sua região de ocorrência, sendo o c.-216G>T (GT e TT) e c.-191C>A (CA e AA) menos freqüentes em asiáticos que em europeus. Adicionalmente, um estudo *in vitro*, demonstrou um aumento da expressão do gene *EGFR* em culturas com os genótipos GT ou TT do polimorfismo c.-216G>T. Porém, nenhuma correlação entre os genótipos destes polimorfismos e a expressão do gene *EGFR* foi encontrada em câncer de cólon (Spindler *et al.*, 2006), semelhante aos dados do presente estudo.

Em relação à associação do polimorfismo com a sobrevida, Nomura *et al.* (2007) não conseguiram demonstrar relação de nenhum dos dois polimorfismos isoladamente ou em combinação, mesmo ajustando idade, gênero, etnia, tabagismo e tipo histológico do tumor. Entretanto, o polimorfismo c.-216 G>T foi correlacionado com a resposta ao tratamento em pacientes com câncer de cólon; pacientes com alelo T responderam melhor à radioterapia (Spindler *et al.*, 2006). Em um estudo com pacientes

com câncer de pulmão, *Liu et al.* (2005) encontraram uma correlação da presença do alelo T com maior sobrevida dos pacientes, bem como com uma melhor resposta ao tratamento com gefitinib, um inibidor de *EGFR* (*Liu et al.*, 2007).

5.2- Polimorfismo do Exon 16 de *EGFR*

Foi observado, no presente estudo, diferenças nas distribuições dos genótipos no polimorfismo c.2073 A>T do gene *EGFR* entre pacientes com astrocitomas difusamente infiltrativos e os controles. Pacientes com genótipo TT apresentaram menos risco para astrocitoma do que os pacientes com genótipo AA (OR=0,51 e IC95%=0,27-0,99). Entretanto, a análise da sobrevida desses pacientes não mostrou correlação com os diferentes genótipos.

Este polimorfismo foi descrito por Shintani *et al.* (1999), comparando-se queratinócitos normais e tumorais em cultura. O estudo mostrou que o alelo T estava correlacionado com tumor oral maligno e com a transcrição de um *EGFR* truncado a nível protéico. O possível mecanismo sugerido pelos autores é o de que a troca de A por T altera o códon da cisteína por um códon de parada prematura, interferindo possivelmente com a estrutura tridimensional do domínio transmembrânico do *EGFR* e, conseqüentemente, com a expressão de *EGF* e a função do receptor.

Os dados do presente trabalho mostraram que o genótipo TT é um fator protetor para o desenvolvimento de astrocitoma, possivelmente porque a presença de T na posição 2073 do gene *EGFR* leva à formação do códon de parada prematura e, como conseqüência, uma proteína truncada, menos funcional, alterando a via de sinalização do *EGF* e seu receptor. Entretanto, não se observou interferência dos genótipos na expressão do gene *EGFR*.

Hsieh *et al.* (2005) analisaram 122 casos de endometriose, 159 casos de leiomioma e 139 controles normais de etnia chinesa. Os autores observaram que as frequências dos genótipos e dos alelos foram diferentes nos grupos de endometriose e leiomioma em relação aos controles: maiores porcentagens de genótipos AT e TT foram encontrados nos indivíduos com endometriose e leiomioma comparados com os controles normais. Não houve diferença na distribuição dos genótipos nos grupos com endometriose e leiomioma. Entretanto, os dados não foram confirmados na população japonesa em pacientes com câncer de endométrio (Kitao *et al.*, 2007) e endometriose (Inagaki *et al.*, 2007).

O presente estudo, portanto, apresenta os primeiros dados da distribuição dos genótipos do polimorfismo c.2073A>T do gene *EGFR* em pacientes com astrocitoma e uma associação com o risco para este tipo de tumor.

5.3 - Polimorfismo da Região Não Traduzida de *EGF*

O único polimorfismo funcional do gene *EGFR* consiste na substituição de um G por A na região 5' não traduzida do gene (Shabazi *et al.*, 2002). Há vários trabalhos na literatura que estudaram a associação deste polimorfismo com diferentes tipos de câncer.

Shahbazi *et al.* (2002) foram os primeiros a identificar este polimorfismo em um estudo caso-controle de melanoma, demonstrando que indivíduos com genótipo GG apresentaram maior risco de desenvolver melanoma quando comparado com aqueles com genótipo AA. Além disso, os autores também mostraram que células de indivíduos homozigotos AA produzem menos *EGF* do que as de indivíduos homozigotos GG ou heterozigotos AG. Okamoto *et al.* (2006) confirmaram que o genótipo GG representa um fator de risco para melanoma e para sobrevida comparado com o genótipo AA. Outros estudos em melanoma, entretanto, não confirmaram estes achados (McCarron *et al.*, 2003; Amend *et al.*, 2004; James *et al.*, 2004; Randerson-Moor *et al.*, 2004), e o papel do genótipo de *EGF* na susceptibilidade ao melanoma ainda não é conclusivo (Howell, 2004).

Os resultados da análise deste polimorfismo em câncer gástrico também são controversos. Hamai *et al.* (2005) e Jim *et al.* (2007) encontraram associação do polimorfismo, enquanto que Goto *et al.* (2005) não confirmaram tal associação.

Outras análises do papel do polimorfismo c.61 A>G do gene *EGF* foram realizadas em câncer de pulmão (Kang *et al.*, 2007) e câncer de útero, sem encontrar qualquer associação dos genótipos e risco para estes tumores. Em um estudo recente, entretanto, Tanabe *et al.* (2008) demonstraram que o alelo G leva a uma maior produção de *EGF* do que aqueles com alelo A, além de apresentar um maior risco para carcinoma hepatocelular.

Dados controversos também são descritos em GBM. Bhowmick *et al.* (2004) relataram o papel do polimorfismo ao verificarem que pacientes com genótipo GG ou GA apresentam maiores níveis de *EGF* nos tumores, além de maior recidiva e menor sobrevida do que pacientes com genótipo AA. Embora Costa *et al.* (2007) tenham confirmado que o alelo G confere maior risco para GBMs, os autores não encontraram correlação com a sobrevida. Porém, estes mesmos autores demonstraram que o polimorfismo é funcional com experimentos *in vitro* de transfecção, ao verificaram que o alelo G leva a uma maior atividade do promotor de *EGF*. Este dado funcional foi confirmado por Vauleon *et al.* (2007), porém os autores não confirmaram que o polimorfismo é um fator de risco significativo para GBM e que afete a sobrevida dos pacientes.

Os dados do presente estudo não demonstraram correlação entre os genótipos deste polimorfismo e o risco para astrocitoma, bem como com a sobrevida dos pacientes, semelhante aos dados encontrados por Vauleon *et al.* (2007), cujo trabalho apresenta a maior casuística de GBMs (209 casos), em comparação com os de Bhowmick *et al.* (2005) (42 casos) e Costa *et al.*

(2007) (79 casos), o que poderia explicar os dados discrepantes. A mesma análise foi realizada no presente estudo somente nos casos de GBMs (129 casos). Não foi encontrada associação dos genótipos e risco para GBM. Não houve, também, correlação com a sobrevida.

6 – Conclusões

- Os genótipos dos polimorfismos da região não codificadora de *EGFR* (c.-191C>A e c.-216G>T) e *EGF* (c.61A>G) não mostraram diferenças entre os casos de astrocitomas e os controles.
- O polimorfismo do exon 16 (c.2073 A>T) do gene *EGFR* apresentou uma distribuição de genótipos diferente entre o grupo de casos e de controles. Pacientes com genótipo TT apresentaram menor risco para astrocitoma do que com genótipo AA.
- A análise de sobrevida não mostrou correlação dos genótipos e o tempo de sobrevida dos pacientes com GBM.
- Os genótipos do gene *EGFR* não influenciam os níveis de expressão do gene.

Anexo I - Casos de Astrocitomas Difusos

Polimorfismo														Expressão Relativa
Grupo	Nome	Sexo	Idade	Nasc	Sobrevida (meses)	Status	Óbito	Cirurgia	Diag. Patológico	EGFR			EGF	EGFR 2 ^{-ΔΔCT}
										Exon 16	Não Codificadora			
										2073	-191	-216	61	
AS1 - 0002	MMF	F	49	15/08/52	0	1	01/08/02	29/07/02	GBM	TT	CC	TG	AA	*
AS1 - 0003	SGS	M	38	26/07/64	6	1	08/02/03	09/08/02	GBM	TT	CC	GG	AA	*
AS1 - 0005	VC	F	67	02/09/34	20	1	27/04/04	13/08/02	GBM	TT	CC	TG	AG	*
AS1 - 0006	NOG	F	52	04/05/50	11	1	23/08/03	19/09/02	GBM	AT	CC	TG	AG	*
AS1 - 0008	CV	M	25	25/09/77	34	1	12/08/05	09/10/02	GBM	AT	CC	TG	AA	*
AS1 - 0011	AOB	M	38	22/10/63	59	0	-	03/10/02	Astrocitoma grau II	AT	CC	TT	AG	*
AS1 - 0013	JTA	M	62	02/10/40	6	1	15/05/03	21/11/02	GBM	TT	CC	GG	AG	*
AS1 - 0017	EMO	M	29	19/06/73	2	1	02/02/03	11/12/02	Astrocitoma grau II	TT	CC	TG	AG	*
AS1 - 0020	ARG	M	51	06/02/51	12	1	30/01/04	17/01/03	GBM	AT	CC	TG	AA	*
AS1 - 0023	ACL	M	42	06/05/59	70	0	-	14/11/01	Astrocitoma grau III	TT	CC	TT	AG	*
AS1 - 0027	AP	M	30	21/06/72	12	1	01/04/04	14/03/03	Astrocitoma grau III	AT	CC	GG	AG	*
AS1 - 0029	ER	M	65	02/12/37	2	1	20/05/03	20/03/03	Astrocitoma grau II	AA	CC	TG	AG	*
AS1 - 0030	GR	F	20	06/07/81	2	1	12/04/02	08/03/02	GBM	AA	CA	GG	GG	*
AS1 - 0031	CAF	M	74	15/02/29	3	1	13/07/03	02/04/03	GBM	TT	CC	TG	AG	*
AS1 - 0032	GBS	M	61	06/07/41	29	1	31/10/05	02/04/03	Astrocitoma grau III	TT	CA	GG	AG	*
AS1 - 0035	JGN	M	64	06/08/38	3	1	22/08/03	08/05/03	GBM	AT	CC	GG	GG	*
AS1 - 0036	EGM	F	56	28/10/46	3	1	18/08/03	23/05/03	GBM	AA	CA	GG	AG	*
AS1 - 0038	PM	M	64	20/03/39	9	1	27/02/04	29/05/03	GBM	AA	CC	TG	AG	*
AS1 - 0043	NJS	M	39	16/04/64	52	0	-	26/06/03	Astrocitoma grau II	AA	CC	GG	AG	*
AS1 - 0044	MLFS	F	76	13/07/27	12	1	30/07/04	10/07/03	GBM	TT	CC	GG	AG	*
AS1 - 0046	MLAO	F	45	18/09/57	17	1	23/12/04	21/07/03	GBM	AA	CC	GG	AA	*
AS1 - 0050	ILCM	M	55	16/10/47	8	1	18/04/04	06/08/03	Astrocitoma grau II	AT	CC	GG	AA	*
AS1 - 0051	ACPF	M	42	08/09/60	49	0	-	06/08/03	Astrocitoma grau II	AT	CC	GG	GG	*
AS1 - 0052	RB	M	50	23/05/53	17	1	07/01/05	20/08/03	GBM	AT	CC	TG	AG	*

Anexo I (continuação)- Casos de Astrocitomas Difusos

										Polimorfismo				Expressão Relativa
2073	-191	-216	61	Nasc	Sobrevida (meses)	Status	Óbito	Cirurgia	Diag. Patológico	EGFR		EGF	EGFR	
										Exon 16	Não Codificadora	Não Codificadora	2 ^{-ΔΔCT}	
										2073	-191	-216	61	
AS1 - 0059	MBG	M	32	01/06/71	47	0	-	16/10/03	Astrocitoma grau II	TT	CC	GG	AA	*
AS1 - 0060	RHS	F	41	03/03/62	18	1	25/05/05	13/11/03	Astrocitoma grau III	TT	CC	GG	AG	*
AS1 - 0068	FAL	M	25	04/07/78	45	0	-	04/12/03	Astrocitoma grau III	AA	CA	TG	AA	*
AS1- 0080	MVB	M	56	10/04/47	37	1	11/02/07	30/01/04	Astrocitoma grau III	AT	CC	TG	AA	*
AS1- 0081	CRP	M	47	09/01/57	15	1	14/05/05	22/01/04	GBM	AT	CC	GG	AA	*
AS1- 0086	AS	M	54	29/08/49	0	1	05/05/04	16/04/04	GBM	AT	CC	GG	AA	*
AS1- 0094	JSC	M	51	14/11/52	6	1	14/10/04	15/04/04	GBM	TT	CA	GG	AA	*
AS1- 0111	RDS	M	40	15/05/64	10	1	30/06/05	25/08/04	Astrocitoma grau III	AA	CA	GG	AG	*
AS1- 0122	PLC	M	49	04/08/55	13	1	02/01/06	29/11/04	GBM	TT	CC	GG	AG	*
AS2 - 0001	AOC	F	46	15/11/55	12	1	20/07/03	26/06/02	GBM	AT	CC	TG	AG	*
AS2 - 0002	OSF	F	67	02/02/35	6	1	11/02/03	16/07/02	GBM	TT	CC	TG	AA	*
AS2 - 0004	JRV	M	40	05/11/62	12	1	19/08/03	08/08/02	GBM	TT	CC	TT	AA	*
AS2 - 0010	JB	M	44	01/04/58	63	0	-	27/06/02	Astrocitoma grau II	AT	CC	GG	AG	*
AS2 - 0011	MM	M	62	23/03/40	60	0	-	11/09/02	GBM	AT	CC	GG	AG	*
AS2 - 0012	GLS	F	71	04/12/30	11	1	14/08/03	19/09/02	GBM	AT	CC	GG	AG	*
AS2 - 0013	MAGP	F	44	14/02/58	34	1	01/05/05	25/07/02	Astrocitoma grau II	AT	CC	GG	AG	*
AS2 - 0015	WJG	M	61	03/05/41	19	1	01/08/04	28/01/03	GBM	AT	CA	TG	AG	*
AS2 - 0016	AV	M	69	22/01/34	19	1	09/10/04	13/03/03	GBM	AT	CC	TG	AG	*
AS2 - 0031	JTFN	M	39	06/11/63	35	1	09/02/06	27/03/03	Astrocitoma grau III	TT	CC	GG	AG	*
AS2 - 0038	JRL	M	32	18/08/70	9	1	24/01/04	29/04/03	Astrocitoma grau III	TT	CC	TG	AA	*
AS2 - 0039	ISS	M	55	15/03/48	9	1	03/02/04	08/05/03	GBM	AT	CC	GG	AG	*
AS2 - 0046	ARM	F	71	07/07/31	0	1	03/06/03	29/05/03	GBM	TT	CC	TG	AG	*
AS2 - 0054	MLSB	F	78	17/09/24	12	1	31/07/04	23/07/03	GBM	AA	CC	GG	AG	*
AS2 - 0059	FML	M	32	23/05/79	36	1	31/10/06	16/10/03	GBM	AT	CC	TG	AG	*
AS2 - 0060	JBV	M	47	23/06/56	3	1	19/01/04	30/10/03	GBM	TT	CC	GG	AG	*
AS2 - 0068	MAFS	F	64	06/11/39	11	1	29/12/04	29/01/04	GBM	TT	CC	TG	AG	*

Anexo I (continuação)- Casos de Astrocitomas Difusos

										Polimorfismo				Expressão Relativa
Grupo	Nome	Sexo	Idade	Nasc	Sobrevida (meses)	Status	Óbito	Cirurgia	Diag. Patológico	EGFR			EGF	EGFR
										Exon 16	Não Codificadora		Não Codificadora	2 ^{-ΔΔCT}
										2073	-191	-216	61	
AS2 - 0069	JAB	F	54	02/10/49	3	1	13/05/04	18/02/04	GBM	AA	CC	GG	AA	*
AS2 - 0072	TVF	M	36	27/09/67	42	0	-	09/03/04	GBM	AT	CA	GG	AG	*
AS2 - 0073	LMF	F	68	05/11/35	16	1	14/07/05	18/03/04	GBM	TT	CC	TG	AA	*
AS2 - 0074	RAP	M	42	15/08/61	11	1	24/02/05	17/03/04	Astrocitoma grau III	AT	CC	TG	AG	*
AS2 - 0075	JAP	M	66	13/10/37	6	1	01/10/04	26/03/04	GBM	TT	CC	GG	AG	*
AS2 - 0078	JD	M	63	23/06/40	3	1	13/08/04	06/05/04	GBM	TT	CC	TG	AA	*
AS2 - 0079	MARM	F	50	24/04/54	5	1	03/11/04	12/05/04	GBM	AT	CC	TG	AA	*
AS2 - 0080	MJC	M	38	13/01/66	16	1	14/10/05	26/05/04	Astrocitoma grau II	AT	CC	GG	AG	*
AS2 - 0081	AFLL	F	50	18/12/53	13	1	01/08/05	22/06/04	GBM	AT	CA	TG	AA	*
AS2 - 0082	DF	M	69	24/06/35	5	1	06/01/05	04/08/04	GBM	AT	CC	GG	AG	*
AS2 - 0083	HFL	M	18	01/09/85	5	1	16/01/05	29/07/04	GBM	TT	AA	GG	AG	*
AS2 - 0085	ERS	M	31	26/10/43	3	1	16/02/05	14/11/04	GBM	TT	CC	GG	AG	*
AS2 - 0086	FDP	M	66	20/02/38	4	1	15/03/05	25/10/04	GBM	AT	CC	GG	AA	*
AS2 - 0087	ECMS	F	28	25/07/76	35	0	-	27/10/04	Astrocitoma grau II	TT	CC	TG	AG	*
AS3 - 0001	AMM	M	43	13/09/58	65	0	-	01/04/02	Astrocitoma grau II	AT	CC	TG	AG	21,57
AS3 - 0002	AMC	F	46	02/08/55	24	1	30/07/03	23/07/01	Astrocitoma grau II	AT	CC	GG	AG	10,38
AS3 - 0003	AC	M	32	27/12/69	7	1	21/10/02	08/03/02	Astrocitoma grau III	TT	CC	GG	AG	80,50
AS3 - 0004	BCJ	F	47	20/12/54	17	1	27/09/03	19/04/02	GBM	TT	CC	TG	AG	276,47
AS3 - 0005	ESB	M	19	02/09/82	76	0	-	03/05/01	Astrocitoma grau III	AA	CC	GG	AG	*
AS3 - 0006	GAB	M	54	27/06/67	83	0	-	30/10/00	Astrocitoma grau III	AT	CC	GG	AG	50,25
AS3 - 0007	GSP	M	11	31/08/90	68	0	-	02/01/02	GBM	TT	CC	GG	AG	*
AS3 - 0008	GPJ	M	37	25/08/65	60	0	-	23/09/02	Astrocitoma grau III	AT	CA	TG	AG	81,91
AS3 - 0009	JS	M	74	17/06/28	12	1	23/08/03	30/08/02	GBM	TT	CC	TG	AG	58,32
AS3 - 0010	JNO	F	24	25/10/77	75	0	-	04/06/01	Astrocitoma grau II	AT	CC	GG	AG	392,35
AS3 - 0011	LKH	F	37	21/01/65	14	1	14/10/03	05/08/02	Astrocitoma grau III	AA	CC	GG	AA	53,11
AS3 - 0012	MPS	M	54	25/11/47	46	1	25/09/04	24/11/00	GBM	AT	CC	TG	AA	6,95

Anexo I (continuação)- Casos de Astrocitomas Difusos

										Polimorfismo			Expressão Relativa	
Grupo	Nome	Sexo	Idade	Nasc	Sobrevida (meses)	Status	Óbito	Cirurgia	Diag. Patológico	EGFR			EGF	EGFR
										Exon 16	Não Codificadora		Não Codificadora	2 ^{-ΔΔCT}
										2073	-191	-216	61	
AS3 - 0013	NV	M	63	05/07/39	15	1	27/10/03	01/07/02	GBM	AT	CC	TG	AG	*
AS3 - 0014	ML	M	28	04/12/73	32	1	04/12/05	23/03/01	Astrocitoma grau II	AA	CC	TG	AA	67,00
AS3 - 0015	CHR	M	39	18/04/63	62	0	-	17/07/02	Astrocitoma grau II	AT	CC	TG	AG	0,15
AS3 - 0016	RTP	M	23	03/06/79	61	0	-	15/08/02	Astrocitoma grau II	TT	CC	TG	AA	2,99
AS3 - 0017	WCS	M	15	20/04/87	61	0	-	19/08/02	Astrocitoma grau III	TT	CC	TG	AG	1,93
AS3 - 0018	ISCK	F	32	04/07/70	60	0	-	13/09/02	Astrocitoma grau III	AT	CA	TG	AG	32,70
AS3 - 0019	WAS	M	45	12/07/57	14	1	04/11/03	27/09/02	GBM	AT	CC	TG	AG	13,32
AS3 - 0020	CSS	M	45	27/04/57	5	1	14/03/03	25/10/02	GBM	AT	CC	TG	AG	64,49
AS3 - 0021	IPP	F	54	16/03/48	13	1	06/12/03	07/11/02	GBM	TT	CC	TG	AG	4,07
AS3 - 0022	ARV	F	38	09/05/64	58	0	-	11/11/02	Astrocitoma grau II	AA	AA	GG	AA	12,39
AS3 - 0023	MVC	F	40	22/11/62	14	1	22/01/04	18/11/02	GBM	TT	CC	TG	AG	907,65
AS3 - 0024	MCS	F	58	08/12/43	5	1	30/04/03	20/11/02	GBM	TT	CC	GG	AG	2,22
AS3 - 0025	DS	M	54	13/10/48	5	1	18/04/03	29/11/02	GBM	AT	CC	TG	AG	*
AS3 - 0026	PMP	F	19	02/01/83	23	1	28/09/04	28/10/02	Astrocitoma grau III	AT	CC	GG	AA	*
AS3 - 0027	ASCS	F	61	25/06/41	13	1	15/02/04	08/01/03	GBM	TT	CC	GG	AG	*
AS3 - 0028	AJS	F	51	11/11/51	5	1	13/07/03	23/01/03	GBM	AA	CC	TG	AG	9,10
AS3 - 0029	MJO	F	71	22/12/30	2	1	15/09/02	24/06/02	GBM	AT	CC	TG	AG	3,99
AS3 - 0030	VAS	F	36	14/03/66	16	1	12/10/03	10/06/02	GBM	AT	CC	TG	AG	*
AS3 - 0031	APC	M	56	01/02/46	0	1	27/06/02	05/06/02	GBM	TT	CA	GG	AG	*
AS3 - 0032	MMLP	F	46	24/10/54	3	1	11/09/02	28/05/02	GBM	AT	CC	TG	AG	*
AS3 - 0033	MCE	F	78	14/06/23	12	1	02/05/03	23/05/02	GBM	AA	CC	TG	AG	598,83
AS3 - 0034	OE	M	60	02/08/41	14	1	17/07/03	09/05/02	GBM	AA	CC	GG	AG	*
AS3 - 0035	ASM	M	52	27/05/49	3	1	04/08/02	30/04/02	GBM	TT	CC	GG	AG	*
AS3 - 0036	ELAD	F	65	28/02/37	0	1	18/04/02	12/04/02	GBM	AT	CC	TG	AA	479,70
AS3 - 0037	CDS	M	41	25/11/60	2	1	14/06/02	21/03/02	GBM	TT	CC	GG	AG	39,97
AS3 - 0038	MGSJ	F	24	18/06/77	44	1	18/11/05	15/03/02	Astrocitoma grau II	AT	CC	TG	AA	46,56

Anexo I (continuação)- Casos de Astrocitomas Difusos

										Polimorfismo			Expressão Relativa	
Grupo	Nome	Sexo	Idade	Nasc	Sobrevida (meses)	Status	Óbito	Cirurgia	Diag. Patológico	EGFR			EGF	EGFR
										Exon 16	Não Codificadora		Não Codificadora	2 ^{-ΔΔCT}
										2073	-191	-216	61	
AS3 - 0039	MBC	F	30	25/08/71	13	1	22/04/03	11/03/02	Astrocitoma grau II	AT	CC	TG	GG	5,66
AS3 - 0040	JRA	M	56	25/07/45	67	0	-	22/02/02	Astrocitoma grau II	AT	CA	GG	AG	182,40
AS3 - 0041	OAA	F	58	12/07/43	1	1	16/03/02	15/02/02	Astrocitoma grau III	TT	CA	TG	AG	19,17
AS3 - 0042	MRC	F	67	02/10/34	4	1	10/06/02	18/01/02	GBM	AA	CC	TG	GG	138,24
AS3 - 0043	EFC	M	62	09/08/39	6	1	24/07/02	04/01/02	GBM	AT	CC	TG	AG	4,93
AS3 - 0044	BL	F	71	01/10/39	7	1	06/08/02	21/12/01	GBM	AT	CC	TG	AG	8,70
AS3 - 0045	MRPS	F	49	01/01/30	31	1	02/07/04	14/12/01	GBM	TT	CC	TG	AA	*
AS3 - 0046	OB	M	71	29/05/30	22	1	01/10/03	30/11/01	GBM	AT	CC	TG	AG	311,05
AS3 - 0047	MTC	F	56	07/04/45	5	1	31/03/02	26/10/01	GBM	AA	CC	TG	AG	2,72
AS3 - 0048	ACO	M	50	20/06/51	7	1	10/06/02	19/10/01	GBM	AT	CC	TG	AG	5,08
AS3 - 0049	MJAS	F	49	30/11/52	38	1	21/06/04	26/04/01	GBM	AT	CC	GG	AG	45,44
AS3 - 0050	UC	M	75	25/10/26	17	1	29/08/02	19/03/01	GBM	TT	CA	GG	AG	1152,86
AS3 - 0051	MCV	F	25	08/04/76	77	1	19/03/07	16/03/01	Astrocitoma grau III	AT	CA	GG	AG	89,33
AS3 - 0052	NNS	M	36	20/06/67	32	1	01/08/06	13/05/03	Astrocitoma grau II	TT	CC	TG	AG	64,49
AS3 - 0053	MGCJ	M	19	06/09/82	82	0	-	20/11/00	Astrocitoma grau III	AT	CC	TG	AA	94,75
AS3 - 0054	JCPS	M	34	11/04/68	11	1	05/02/04	07/02/03	GBM	AA	CC	GG	AG	704,77
AS3 - 0055	MSS	M	68	12/05/34	4	1	18/06/03	17/02/03	GBM	AT	CC	GG	AA	31,36
AS3 - 0056	VRS	M	56	11/10/46	23	1	28/05/05	10/06/03	GBM	TT	CA	GG	AG	4,86
AS3 - 0058	CMT	F	61	26/08/41	14	1	13/05/04	06/03/03	GBM	AT	CC	TG	AG	10,35
AS3 - 0059	VAP	F	41	15/08/62	28	1	23/03/06	13/11/03	GBM	AT	CC	GG	AG	*
AS3 - 0060	JOJ	M	28	23/12/74	54	0	-	11/03/03	Astrocitoma grau II	TT	CC	TG	AA	78,30
AS3 - 0061	MAA	M	60	23/04/42	3	1	15/07/03	16/03/03	GBM	TT	CA	TG	AA	25,47
AS3 - 0062	MRS	M	41	15/11/61	54	0	-	10/03/03	Astrocitoma grau II	AT	CC	TG	AG	48,20
AS3 - 0063	MAM	F	41	25/10/61	30	1	06/09/06	27/03/03	Astrocitoma grau II	AA	CC	TG	AG	28,07
AS3 - 0064	ASM	M	38	12/11/66	21	1	12/01/05	11/04/03	Astrocitoma grau III	AT	CA	GG	AG	10,31
AS3 - 0065	GP	F	17	06/02/86	4	1	15/10/03	23/05/03	GBM	AT	CC	TT	AG	111,89

Anexo I (continuação)- Casos de Astrocitomas Difusos

										Polimorfismo			Expressão Relativa	
Grupo	Nome	Sexo	Idade	Nasc	Sobrevida (meses)	Status	Óbito	Cirurgia	Diag. Patológico	EGFR			EGF	EGFR
										Exon 16	Não Cofificadora		Não Codificadora	
										2073	-191	-216	61	2 ^{-ΔΔCT}
AS3 - 0066	JRF	M	63	17/07/39	2	1	25/08/03	02/06/03	GBM	AA	CC	TG	AG	9,65
AS3 - 0067	AAS	M	29	04/08/73	57	0	-	19/12/02	Astrocitoma grau III	AT	CC	GG	AG	26,74
AS3 - 0068	LZ	M	45	07/03/58	10	1	28/12/04	16/02/04	GBM	AT	CC	TG	AG	9,36
AS3 - 0069	MFC	M	48	20/05/55	12	1	20/07/04	27/06/03	GBM	AT	CC	GG	AA	5,53
AS3 - 0070	ZFR	F	59	05/11/43	8	1	11/03/04	30/06/03	GBM	AA	CC	TT	AG	29,57
AS3 - 0071	SASC	F	57	30/10/45	8	1	25/01/04	22/05/03	GBM	AA	CC	TG	AG	188,84
AS3 - 0072	ASS	M	67	18/02/36	6	1	30/11/03	01/05/03	GBM	TT	CA	GG	AA	17,28
AS3 - 0073	LFF	M	37	10/11/65	51	0	-	16/06/03	Astrocitoma grau III	TT	CA	GG	AG	26,93
AS3 - 0074	AA	M	71	15/08/31	13	1	15/09/04	31/07/03	GBM	AT	CC	GG	AA	0,75
AS3 - 0075	ATO	M	39	10/12/63	4	1	19/10/03	13/06/03	GBM	TT	CC	GG	AG	*
AS3 - 0076	VFC	M	47	12/03/48	2	1	28/01/04	20/11/03	GBM	AT	CC	GG	AA	2,11
AS3 - 0077	EM	M	50	14/11/52	9	1	04/06/04	03/09/03	GBM	AT	CC	TG	AG	6,35
AS3 - 0078	RNN	F	35	08/10/67	48	0	-	09/05/03	Astrocitoma grau II	TT	CC	GG	AG	282,28
AS3 - 0079	MRKMB	F	41	01/10/62	48	0	-	24/09/03	GBM	AT	CC	GG	AA	3,75
AS3 - 0080	ERL	M	58	25/09/45	9	1	15/12/04	27/02/04	GBM	AA	CC	TG	AG	1,50
AS3 - 0081	JRSR	M	68	12/05/35	16	1	04/05/05	12/12/03	GBM	AT	CC	GG	AG	*
AS3 - 0082	NDT	M	43	18/12/60	17	1	04/05/05	21/11/03	GBM	AA	CC	TG	AG	11,88
AS3 - 0083	SMGN	F	40	14/04/63	44	0	-	29/01/04	GBM	TT	CC	TG	AA	*
AS3 - 0084	AFP	M	66	11/12/37	8	1	06/08/04	05/12/03	GBM	TT	CC	TG	AA	*
AS3 - 0085	JLS	M	64	25/06/38	14	1	15/01/05	11/11/03	GBM	AT	CC	TG	AA	0,78
AS3 - 0086	LPS	F	59	12/12/44	5	1	13/05/04	26/03/04	GBM	TT	CC	GG	GG	5,88
AS3 - 0087	ADM	F	56	15/12/47	3	1	15/05/04	12/02/04	GBM	AT	CC	TG	AA	36,53
AS3 - 0088	AOE	F	27	26/10/76	9	1	10/01/05	22/03/04	Astrocitoma grau II	AT	CC	GG	AG	25,74
AS3 - 0089	MAP	F	38	21/03/64	80	0	-	02/01/01	Astrocitoma grau II	AT	CC	TG	AG	11,84
AS3 - 0090	JCN	M	38	15/06/76	10	1	18/07/05	22/08/04	GBM	AT	CC	GG	AG	96,74
AS3 - 0091	BMJ	F	66	31/12/36	4	1	06/05/04	08/12/03	GBM	AA	CA	GG	GG	*

Anexo I (continuação)- Casos de Astrocitomas Difusos

										Polimorfismo			Expressão Relativa	
Grupo	Nome	Sexo	Idade	Nasc	Sobrevida (meses)	Status	Óbito	Cirurgia	Diag. Patológico	EGFR			EGF	EGFR
										Exon 16	Não Codificadora		Não Codificadora	2 ^{-ΔΔCT}
										2073	-191	-216	61	
AS3 - 0092	FCRN	M	58	04/10/80	56	0	-	24/01/03	Astrocitoma grau III	AT	CC	TG	AG	64,71
AS3 - 0093	ESM	M	39	08/02/65	37	0	-	05/08/04	Astrocitoma grau II	AT	CA	TG	AG	42,40
AS3 - 0094	ACB	M	64	10/02/40	6	1	08/04/05	14/10/04	GBM	AT	CC	TG	AG	*
AS3 - 0095	GFS	M	45	17/06/58	35	0	-	27/10/04	GBM	AT	CC	GG	AA	823,71
AS3 - 0096	JBF	M	49	25/01/55	4	1	22/04/05	07/12/04	GBM	AT	CC	GG	AG	236,55
AS3 - 0097	IS	M	34	21/12/69	1	1	14/01/05	16/07/04	GBM	AT	CC	TG	GG	2,14
AS3 - 0098	ILR	F	52	15/01/52	28	1	08/04/07	10/12/04	GBM	AT	CC	TG	GG	65,16
AS3 - 0099	AM	M	61	27/07/43	3	1	18/03/05	02/12/04	GBM	AT	CC	GG	GG	7,09
AS3 - 0100	SRS	M	31	14/07/72	41	0	-	27/04/04	Astrocitoma grau III	AA	CA	GG	AG	6,26
AS3 - 0101	NR	M	51	23/09/52	6	1	25/11/04	13/05/04	GBM	TT	CC	TG	AG	39,97
AS3 - 0102	MCF	F	58	27/11/46	22	1	15/10/06	14/12/04	GBM	AT	CC	GG	AA	*
AS3 - 0103	AG	M	60	19/08/44	3	1	12/02/05	22/10/04	GBM	AT	CC	GG	GG	1,99
AS3 - 0104	GMS	M	16	07/11/88	2	1	12/03/05	05/01/05	GBM	AT	CA	GG	AA	32,47
AS3 - 0105	MRS	M	45	01/01/59	7	1	03/07/05	23/12/04	GBM	AT	CC	TG	AA	*
AS3 - 0106	PMO	M	40	08/09/64	13	1	22/03/06	25/02/05	GBM	AA	CC	GG	AA	58,12
AS3 - 0107	ASA	M	26	01/10/78	30	0	-	03/03/05	GBM	TT	CC	GG	GG	37,69
AS3 - 0108	PGO	M	64	23/02/41	13	1	18/04/06	18/03/05	GBM	TT	CC	GG	AG	*
AS3 - 0109	AS	F	65	07/04/40	5	1	28/10/05	13/05/05	GBM	AT	CC	GG	AG	*
AS3 - 0110	DGS	F	68	25/03/37	4	1	30/11/05	17/07/05	GBM	AT	CC	GG	AG	*
AS3 - 0111	GSS	M	56	08/02/49	22	1	29/11/06	11/01/05	GBM	AT	CC	TG	AG	*
AS3 - 0112	MMC	M	40	29/01/65	8	1	04/10/05	15/07/05	GBM	TT	CC	GG	AG	*
AS3 - 0113	ALOB	F	38	07/08/67	17	1	12/03/06	22/07/05	Astrocitoma grau II	AT	CC	TG	AG	*
AS3 - 0114	MAPL	F	38	25/10/66	32	0	-	25/07/05	GBM	AT	CC	TG	AA	*
AS3 - 0115	JWMS	M	26	19/08/79	32	0	-	12/07/05	Astrocitoma grau II	AT	CC	TG	AA	*
AS3 - 0116	EMN	M	28	15/10/76	28	0	-	18/05/05	Astrocitoma grau III	TT	CC	TG	AG	*

Anexo I (continuação)- Casos de Astrocitomas Difusos														
										Polimorfismo			Expressão Relativa	
Grupo	Nome	Sexo	Idade	Nasc	Sobrevida (meses)	Status	Óbito	Cirurgia	Diag. Patológico	EGFR		EGF		EGFR $2^{-\Delta\Delta CT}$
										Exon 16	Não Codificadora		Não Codificadora	
										2073	-191	-216	61	
AS3 - 0117	FD	M	57	25/10/47	14	1	28/01/06	10/06/05	GBM	AT	CC	GG	GG	*
AS3 - 0118	JS	M	63	11/03/42	3	1	02/11/05	05/08/05	GBM	AT	CC	GG	AG	*
AS3 - 0119	ES	M	36	12/06/69	25	0	-	01/08/05	Astrocitoma grau II	AA	CC	TG	AA	*
AS3 - 0120	MDT	F	46	19/07/59	2	1	12/12/05	10/09/05	Astrocitoma grau III	AT	CC	GG	AG	*
AS3 - 0121	ANS	F	29	02/06/76	24	0	-	08/09/05	Astrocitoma grau III	AT	CC	GG	GG	*
AS3 - 0122	ILO	M	33	25/07/73	30	0	-	12/03/05	GBM	TT	CC	TG	GG	*
AS3 - 0123	AJ	M	56	18/04/51	6	1	07/07/06	13/01/06	GBM	AT	CC	GG	GG	*
AS3 - 0124	RP	F	69	26/12/38	20	0	-	10.01.06	GBM	TT	CC	TG	AA	*
AS3 - 0125	VMP	M	56	04.01.51	7	1	28/08/06	16.01.06	GBM	TT	CC	TG	AA	*
AS3 - 0126	JAS	M	62	07.01.45	19	0	-	17.02.06	GBM	AT	CA	GG	AA	*
AS3 - 0127	JPS	M	34	08.12.73	19	0	-	10.02.06	Astrocitoma grau II	AT	CC	TG	AG	*
AS3 - 0128	WJGS	M	58	05.09.49	11	1	01/09/07	03.02.06	GBM	AT	CC	GG	GG	*
AS3 - 0129	MGSA	F	34	06.03.73	19	0	-	07.02.06	Astrocitoma grau II	AA	CC	TG	AG	*

Status: 0=vivo 1=morto

Tempo de Sobrevida em meses atualizada até 09/2007

Anexo II - Controles

Grupo	Nome	Sexo	Idade	Nasc	EGFR			EGF
					Exon 16	Não Codificadora		Não Codificadora
					2073	-191	-216	61
AS1/0004	TFRM	F	69	12/04/1933	TT	CC	TG	AG
AS1/0007	MCM	F	42	10/02/1960	TT	CC	TG	GG
AS1/0009	FAK	M	23	09/11/1978	AT	CC	TG	AA
AS1/0010	NLS	M	37	06/06/1965	TT	CC	TT	AA
AS1/0012	PMS	M	36	29/06/1966	TT	CC	GG	AG
AS1/0016	AEC	M	62	30/07/1940	AT	CA	GG	AA
AS1/0022	ASB	M	30	16/07/1972	TT	CC	GG	AG
AS1/0025	GM	M	55	15/05/1947	AT	CC	TG	AA
AS1/0026	AP	F	38	05/07/1964	TT	CC	GG	AG
AS1/0033	TT	M	73	03/03/1930	AA	CC	GG	AA
AS1/0039	GSSJ	M	43	15/06/1959	TT	CA	TG	GG
AS1/0040	NS	M	61	03/09/1941	AT	CC	GG	GG
AS1/0041	EEF	M	36	12/12/1966	AT	CC	TG	AG
AS1/0047	MJVS	F	48	20/09/1954	AA	CA	GG	AG
AS1/0053	MAG	M	48	13/10/1954	TT	CC	TG	AG
AS1/0064	AMSL	F	39	16/02/1964	AT	CC	GG	AA
AS1/0066	FPCC	M	35	06/06/1968	AT	CC	TG	AG
AS1/0070	JMTS	M	51	24/05/1952	TT	CC	TG	AG
AS1/0071	EAS	M	32	26/07/1971	TT	CC	GG	AA
AS1/0072	ECS	M	65	07/09/1938	TT	CC	GG	AG
AS1/0073	PPS	M	69	20/04/1934	TT	CC	GG	AG
AS1/0087	IBFP	M	24	30/03/1979	AT	CA	GG	GG
AS1/0090	SDC	F	47	03/10/1956	AT	CC	TT	AG
AS1/0121	FRTS	M	61	06/08/1943	TT	CC	TG	AA
AS1/0124	DP	M	55	31/12/1948	AT	AA	GG	AA
AS1/0125	ABB	F	77	04/10/1927	AT	CC	TG	AG
AS1/0126	MCRS	F	28	21/08/1976	AT	CC	TG	AA
AS1/0127	LBA	M	28	21/01/1976	TT	CC	TG	AG
AS1/0128	JFA	M	76	15/06/1928	AA	CC	TT	AG
AS1/0131	MJLS	M	25	01/12/1979	AT	CA	GG	AG
AS1/0132	FBL	F	63	22/09/1941	TT	CC	GG	AG
AS1/0133	TJS	F	76	21/04/1928	AT	CC	GG	AG
AS1/0135	MVS	M	34	20/06/1970	TT	CC	GG	AA
AS1/0136	WS	M	59	10/02/1945	AT	CA	TG	AG
AS2/0501	CGCJ	M	43	30/05/60	AT	CC	TG	AA
AS2/0502	EA	M	39	31/03/62	TT	CC	TG	AG
AS2/0503	AMFF	F	47	14/01/56	TT	CC	TT	AG
AS2/0504	MACS	M	47	29/09/55	AT	CC	GG	AG
AS2/0505	IFC	F	46	01/04/57	AT	CC	TG	AG
AS2/0506	AARJ	M	32	01/03/71	AA	CC	TG	AG
AS2/0507	FS	M	38	28/10/64	TT	CC	GG	AG
AS2/0508	FOP	M	35	06/03/68	TT	CC	GG	AG
AS2/0509	RBR	M	38	14/05/65	AT	CC	TG	AG
AS2/0510	NMLM	F	44	13/01/59	AT	CC	GG	AG

Anexo II (continuação) - Controles

Grupo	Nome	Sexo	Idade	Nasc	EGFR			EGF
					Exon 16	Não Codificadora		Não Codificadora
					2073	-191	-216	61
AS2/0511	APL	M	55	01/12/47	AT	CA	GG	AA
AS2/0512	VAPA	F	49	28/02/54	AT	CA	GG	AG
AS2/0513	S	M	62	10/08/41	AT	CC	TG	AG
AS2/0514	HJS	M	63	21/06/40	AT	CC	TG	AG
AS2/0515	ARP	F	66	22/02/37	AT	CC	GG	AA
AS2/0516	DG	F	62	09/06/41	AT	CC	TG	AG
AS2/0517	SB	M	67	25/09/35	TT	CC	TG	AA
AS2/0518	MPS	F	71	22/02/1932	AT	CC	TG	GG
AS2/0519	ASS	F	73	12/04/31	AA	CC	TT	AG
AS2/0520	GPG	F	76	25/07/27	AA	CA	TG	AG
AS2/0521	TM	M	60	26/08/43	AA	CC	GG	AA
AS2/0522	BIC	F	66	15/08/37	AT	CA	GG	AG
AS2/0523	PLO	M	56	29/06/47	AT	CC	TG	GG
AS2/0524	SRS	M	37	15/01/66	AT	CC	TT	AA
AS2/0525	HAP	M	37	01/11/66	AT	CC	TG	AG
AS2/0526	MLGBS	F	52	18/02/51	AT	CC	TG	AG
AS2/0527	SOB	M	42	15/03/61	AT	CC	GG	GG
AS2/0528	ADR	F	26	26/03/77	AT	CC	TG	AG
AS2/0529	JLPM	M	63	17/05/40	AT	CC	TG	GG
AS2/0530	VFM	M	17	28/12/86	AA	CC	GG	AG
AS2/0531	JAAJ	M	61	17/07/42	TT	CC	GG	AG
AS2/0532	WGAB	M	22	28/09/81	AT	CC	TG	AG
AS2/0533	VL	F	47	20/07/53	AT	CC	GG	AG
AS2/0534	HF	M	64	06/02/39	AT	CC	GG	AG
AS2/0535	JDB	M	64	29/07/39	AT	CC	GG	AG
AS2/0536	RTN	F	71	11/02/32	TT	CC	TG	AA
AS2/0537	NS	M	67	05/11/36	AA	CC	TG	AG
CTO/0001	MAK	M	32	20/09/1970	TT	CC	GG	AA
CTO/0003	FS	M	63	15/07/1939	AT	CC	TG	AA
CTO/0006	ALA	M	54	10/12/1948	TT	CC	GG	AG
CTO/0007	ARG	M	17	26/05/1985	TT	CC	TG	AG
CTO/0008	TMS	M	58	09/02/1944	TT	CC	GG	AA
CTO/0010	JPC	M	63	16/11/1939	AT	CC	GG	AG
CTO/0011	MZPS	F	39	03/06/1963	TT	CC	TG	AA
CTO/0012	CCA	F	46	17/04/1956	AT	CC	TG	AA
CTO/0013	EAS	M	35	14/06/1967	TT	CC	TG	AA
CTO/0014	AFS	M	68	22/06/1934	TT	CC	TG	AA
CTO/0015	LL	M	20	07/06/1982	AT	CC	TG	GG
CTO/0016	MGA	F	38	24/04/1964	TT	CA	GG	AG
CTO/0018	EK	M	28	15/01/1974	TT	CC	GG	GG
CTO/0024	JSBM	M	62	29/09/1940	AT	CA	GG	AG
CTO/0026	JMG	F	42	01/12/1960	TT	CC	GG	AG
CTO/0029	RMRF	F	49	15/01/1953	AT	CC	TG	GG
CTO/0030	AF	F	47	30/04/1955	TT	CC	GG	AA
CTO/0032	ABF	M	45	08/04/1957	AA	CC	TG	AA

Anexo II (continuação) - Controles

Grupo	Nome	Sexo	Idade	Nasc	EGFR			EGF
					Exon 16	Não Codificadora		Não Codificadora
					2073	-191	2073	61
CTO/0036	AJS	M	54	20/02/1948	TT	CC	TG	AG
CTO/0037	DTB	F	57	20/06/1945	TT	CC	GG	AA
CTO/0038	CKM	F	40	13/10/1962	AT	CC	GG	GG
CTO/0039	MDC	M	21	11/12/1981	AT	CC	GG	AG
CTO/0046	ARC	F	67	23/02/1935	AT	CC	TG	AG
CTO/0047	JNVS	M	50	17/05/1952	AT	CC	TG	AA
CTO/0048	SAC	M	36	20/01/1967	AT	CC	GG	AG
CTO/0052	AAS	F	65	10/10/1937	AT	CA	GG	AG
CTO/0055	MJLS	F	46	19/03/1956	AT	CC	GG	AA
CTO/0057	HRG	M	42	13/01/1961	AT	CC	TG	AG
CTO/0058	MÊS	F	58	02/07/1944	AT	CC	GG	AG
CTO/0062	TMS	F	51	19/08/1951	AT	CA	GG	AG
CTO/0066	APP	M	75	12/10/1927	AT	CC	TG	AG
CTO/0067	ANFA	F	25	30/03/1977	AT	CC	TG	AG
CTO/0068	ADA	M	33	01/03/1969	TT	CC	GG	AA
CTO/0070	EAA	M	40	14/07/1962	AT	CC	GG	AG
CTO/0071	CRSO	M	30	22/03/1972	TT	CC	GG	AG
CTO/0074	MJSR	F	62	13/07/1940	AT	CC	TG	AA
CTO/0076	FPS	M	23	22/03/1979	AT	CA	GG	AA
CTO/0078	MNB	F	44	14/12/1958	AT	CC	GG	AG
CTO/0080	FGM	F	70	13/12/1932	AT	CC	GG	AA
CTO/0087	DCS	M	19	31/05/1983	AT	CC	GG	AG
CTO/0088	JCF	M	44	16/04/1958	AT	CC	TG	AA
CTO/0090	JCA	M	51	26/07/1951	TT	CC	TG	AG
CTO/0092	AUL	M	57	03/11/1945	TT	CA	GG	AG
CTO/0098	MDP	F	60	14/12/1942	AA	CC	GG	AG
CTO/0099	APS	M	29	30/10/1973	AT	CA	GG	AG
CTO/0103	TLS	M	21	29/11/1981	AT	CC	GG	AG
CTO/0104	RNO	M	40	20/07/1962	AT	CC	TG	AA
CTO/0107	JV	M	47	15/03/1956	TT	CC	GG	AG
CTO/0112	JS	M	35	10/12/1967	TT	CC	TG	AA
CTO/0114	JVS	M	43	14/01/1960	AT	AA	GG	AA
CTO/0115	GSS	F	18	02/09/1984	TT	CC	GG	AG
CTO/0119	APG	M	68	17/05/1934	AA	CC	TT	AG
CTO/0122	HS	M	57	02/04/1946	TT	CC	GG	AG
CTO/0127	ANC	F	23	12/08/1979	TT	CC	TG	AA
CTO/0128	CS	F	42	01/05/1960	AT	CC	TG	GG
CTO/0132	GM	M	26	27/06/1976	TT	CC	GG	AG
CTO/0134	DFS	M	61	05/02/1942	AT	CC	GG	AG
CTO/0135	MMB	M	44	18/08/1958	TT	CC	GG	AG
CTO/0136	MAF	F	58	04/05/1945	AA	AA	GG	AG
CTO/0139	VDS	M	19	01/10/1983	AT	CC	TG	AG

Anexo II (continuação) - Controles

Grupo	Nome	Sexo	Idade	Nasc	EGFR			EGF
					Exon 16	Nao Codificadora		Não Codificadora
					2073	-191	2073	61
CTO/0140	PTS	M	38	18/12/1964	AT	CC	GG	AA
CTO/0142	JEL	M	56	05/04/1934	AT	CC	GG	AG
CTO/0143	SLD	M	58	22/08/1946	AT	CA	TG	AA
CTO/0144	OAA	M	37	13/06/1944	AT	CA	GG	AG
CTO/0146	VRS	M	36	11/06/1965	TT	CC	TG	AG
CTO/0147	LGR	M	74	26/01/1929	AT	CC	TG	AG
CTO/0149	IV	M	68	08/06/1960	TT	CC	TG	GG
CTO/0151	FRM	F	32	13/08/1934	AT	CC	TG	AA
CTO/0155	MS	M	54	07/04/1930	TT	CC	GG	AA
CTO/0156	HR	M	61	29/11/1970	AA	CC	GG	GG
CTO/0158	SMJ	F	30	07/08/1972	AT	CC	TG	AG
CTO/0161	DVLM	M	58	26/07/1944	AT	CC	TG	AG
CTO/0162	VCOB	F	40	15/07/1962	AT	AA	GG	AG
CTO/0164	LGSCH	M	48	30/10/1954	AT	CC	GG	AG
CTO/0166	JMO	M	62	25/09/1940	AA	CC	TG	AG
CTO/0167	LPC	M	64	13/04/1939	TT	CC	TG	AG
CTO/0169	EAS	F	26	02/09/1977	AT	CC	TG	AA
CTO/0172	ARC	M	52	11/06/1951	TT	CC	GG	AA
CTO/0177	MRS	F	52	25/12/1950	TT	CC	TG	AG
CTO/0178	MTAC	F	59	08/05/1944	AA	CC	TG	AG
CTO/0185	NQT	F	33	18/05/1970	AT	CC	GG	AG
CTO/0187	LAD	F	60	23/10/1942	TT	CC	GG	AA
CTO/0188	MPN	F	41	11/01/1962	AT	CC	TG	AG
CTO/0192	RRS	F	37	13/07/1966	AT	CA	GG	AG
CTO/0196	MVSC	F	56	12/03/1947	TT	CC	GG	AG
CTO/0208	WBS	M	38	23/01/1965	TT	CC	TG	AG
CTO/0210	SJL	M	60	31/10/1943	TT	CC	GG	AA
CTO/0211	JCS	M	43	02/06/1960	TT	CC	TG	AA
CTO/0212	VAAMO	F	35	24/02/1968	AT	CC	GG	AG
CTO/0213	MSOC	F	49	27/07/1954	AA	CC	TG	AA
CTO/0214	BRS	M	29	25/02/1974	AT	CC	GG	AG
CTO/0215	ZFS	F	56	20/06/1947	AT	CA	TG	AG
CTO/0227	DPS	M	64	05/08/1939	AT	CC	TT	AG
CTO/0229	JLSS	M	39	15/02/1964	AT	CC	GG	AG
CTO/0233	EASC	F	54	29/10/1949	TT	CC	GG	AG
CTO/0235	JPO	M	67	17/11/1936	AA	CC	TG	AG
CTO/0238	DG	F	19	30/07/1984	AA	CC	GG	AG
CTO/0239	DLO	F	24	08/01/1979	TT	CC	GG	AA
CTO/0241	SBR	M	41	26/09/1962	TT	CC	GG	AA
CTO/0246	APSS	F	51	11/04/1952	AT	CC	TT	AA
CTO/0250	JPS	M	45	24/01/1958	TT	CC	TG	AG
CTO/0262	LSS	M	56	20/09/1947	TT	CC	TG	AG

Anexo II (continuação) - Controles

Grupo	Nome	Sexo	Idade	Nasc	EGFR			EGF
					Exon 16	Não Codificadora		Não Codificadora
					2073	-191	2073	61
CTO/0265	NNS	M	50	22/02/1953	TT	CC	TG	AG
CTO/0266	JDF	M	63	06/10/1940	TT	CC	TG	AG
CTO/0268	JBP	M	53	07/08/1950	TT	CC	GG	AA
CTO/0274	IBC	F	77	20/06/1926	AT	CA	GG	AG
CTO/0292	PO	M	66	06/02/1938	AA	CC	TG	AG
CTO/0304	HCSS	F	65	17/07/1938	AT	CC	GG	AG
CTO/0305	MM	F	71	01/03/1933	TT	CC	TG	AG
CTO/0306	MO	F	66	21/12/1937	AT	CC	GG	AG
CTO/0308	MRP	F	71	16/11/1932	AT	CC	TG	AG
CTO/0323	MAC	M	71	31/08/1932	AT	CC	TG	AG
CTO/0325	DRS	M	71	03/10/1932	AT	CC	GG	AA
CTO/0346	FALS	M	35	20/11/1968	AT	CC	TG	AG
CTO/0348	CB	M	40	13/07/1964	AT	CA	GG	AG
CTO/0354	MLGR	M	28	18/12/1975	TT	CC	GG	AG
CTO/0372	AAC	M	35	13/09/1968	TT	CC	TG	GG
CTO/0378	RRV	F	39	23/05/1965	AT	CC	GG	AG
CTO/0380	VF	M	33	17/05/1971	AT	CC	TG	AG
CTO/0386	RCBG	F	37	02/10/1967	TT	CA	GG	AG
CTO/0394	APJTC	F	35	16/08/1969	TT	CC	TG	GG
CTO/0407	AMLMB	F	34	21/08/1970	AT	CA	GG	AA
CTO/0409	APJ	F	62	05/11/1941	TT	CA	TG	GG
CTO/0413	JOC	M	46	03/02/1958	TT	CC	TG	AG
CTO/0415	GR	M	48	03/06/1956	AT	CC	TG	AG
CTO/0419	EAS	M	54	26/07/1950	AT	CC	TT	AG
CTO/0423	JRSM	M	59	20/10/1945	TT	CC	GG	GG
CTO/0450	MAS	M	55	21/04/1950	AT	CC	TG	AA
CTO/0456	DS	M	55	03/05/1950	AT	CC	GG	AA

Anexo III

Tabela de Diagnósticos a Serem Excluídos dos Controles

- **Qualquer tipo de Câncer**
- **Doenças Relacionadas com Fumo e Álcool**
 - Doença Pulmonar Crônica
 - Doença Coronariana Crônica
 - Trombose Venosa
 - Hepatite
 - Cirrose
- **Doenças Ocupacionais**
 - Asma
 - Pneumoconiose
 - Anemia Aplástica Adquirida
- **Doenças Crônicas Não-Neoplásicas da Cavidade Oral, Faringe e Laringe.**
 - Gengivite e Periodontite Crônica
 - Glossite, Estomatite e Laringite Crônica
 - Leucoplasia
 - Sinusite, Tonsilite e Laringite Crônica
 - Pólipos da Corda Vocal e da Laringe
 - Abscesso da Faringe

Continuação – Anexo III

➤ Doenças Crônicas Não-Neoplásicas do Trato Digestivo

- Esofagite de Refluxo Crônica
- Esôfago de Barrett
- Gastrite Atrófica
- Doença de Crohn
- Colite Ulcerativa
- Isquemia Mesentérica Crônica
- Pólipos Adenomatosos

➤ Condições Crônicas

- Diabetes

➤ Imunodeficiência

- Doenças Auto-imunes

➤ Doenças Mentais

- Condições Psicóticas Senis ou Presenis
- Outras psicoses, Retardo Mental

➤ Doenças do Sistema Nervoso Central

- Infecções
- Doenças Hereditárias ou Degenerativas
- Doença Cérebro-Vascular
- Tumores Cerebrais

➤ Enfermidade Grave ou Incapacidade para Compreender ou Responder

Anexo IV

Municípios da Região Metropolitana de São Paulo

1. Arujá	21. Mairiporã
2. Barueri	22. Mauá
3. Biritiba Mirim	23. Mogi das Cruzes
4. Caieiras	24. Osasco
5. Cajamar	25. Pirapora do Bom Jesus
6. Carapicuíba	26. Poá
7. Cotia	27. Ribeirão Pires
8. Diadema	28. Rio Grande da Serra
9. Embu	29. Salesópolis
10. Embú-Guaçu	30. Santa Izabel
11. Ferraz de Vasconcelos	31. Santana do Parnaíba
12. Francisco Morato	32. Santo André
13. Franco da Rocha	33. São Bernardo do Campo
14. Guararema	34. São Caetano do Sul
15. Guarulhos	35. São Lourenço da Serra
16. Itapecerica da Serra	36. São Paulo
17. Itapevi	37. Suzano
18. Itaquaquecetuba	38. Taboão da Serra
19. Jandira	39. Vargem Grande Paulista
20. Juquitiba	

Anexo V

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 13.04.05, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 209/05, intitulado: "Estudo de polimorfismos em tumores do sistema nervoso central" apresentado pelo Departamento de **NEUROLOGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador(a) Responsável: **Profa. Dra. Suely Kazue Nagahashi Marie**

Pesquisador(a) Executante: **Sra. Keila Cardoso Barbosa**

CAPPesq, 13 de Abril de 2005.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

Anexo VI

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

DA

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE :.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M F
DATA NASCIMENTO.:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:

PESQUISADOR:

CARGO/FUNÇÃO:

UNIDADE DO HCFMUSP:

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº:

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO

RISCO MÍNIMO **X**

RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO

RISCO MAIOR

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 3 anos

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

1. justificativa e os objetivos da pesquisa

Senhor(a) esta sendo admitido nesse hospital para tratamento de doença do sistema nervoso central. Como parte de seu tratamento, o senhor será submetido a um exame de sangue. Este sangue será utilizado em exames clínico laboratoriais, necessários para um diagnóstico definitivo.

Para obter um maior conhecimento clínico e científico das doenças de sistema nervoso central, o corpo clínico deste hospital (médicos e pesquisadores) desenvolve pesquisa clínica e científica. Através dessa pesquisa é possível conhecer melhor os mecanismos da doença e, portanto oferecer novas possibilidades de diagnóstico e tratamento. Ainda mais, este trabalho envolve a busca de lesões genéticas em genes já existentes.

O objetivo desse trabalho é analisar a quantidade e o tipo de polimorfismo (lesões/alterações em genes) encontrados em um grupo de pacientes com tumor de sistema nervoso central e comparar com um grupo de indivíduos não portadores de tumor.

2. procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais

Será realizada a coleta de sangue para extração de DNA e conseqüente análise de polimorfismos a partir de técnicas moleculares laboratoriais.

Todas as amostras utilizadas nessa pesquisa serão identificadas no laboratório por código formado por números e letras e, portanto, sua privacidade e identidade serão preservadas. A eventual inclusão dos resultados em publicação científica será feita de modo a manter o anonimato do paciente.

3. desconfortos e riscos esperados

O único desconforto esperado do exame de coleta de sangue é o da introdução da agulha na sua veia.

O risco é mínimo, podendo o senhor(a) apresentar tonturas e mal estar devido ao medo desse procedimento.

4. benefícios que poderão ser obtidos

Através da pesquisa é possível conhecer melhor os mecanismos da doença (tumor de sistema nervoso central), e assim poder oferecer novas possibilidades de diagnóstico e tratamento.

5. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

1. acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.

2. liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.

3. salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.
4. disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.
5. viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, 01 de JULHO de 2003.

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)

Anexo VII

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE :
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M F
DATA NASCIMENTO.:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:

PESQUISADOR:

CARGO/FUNÇÃO:

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº:

UNIDADE DO HCFMUSP:

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO

RISCO MÍNIMO **X**

RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO

RISCO MAIOR

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 3 anos

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

1. justificativa e os objetivos da pesquisa

Senhor(a) esta sendo admitido nesse hospital para tratamento de epilepsia. Como parte de seu tratamento, o senhor será submetido a um exame de sangue. Este sangue será utilizado em exames clínico laboratoriais, necessários para um diagnóstico definitivo.

Para obter um maior conhecimento clínico e científico sobre o câncer, o corpo clínico deste hospital (médicos e pesquisadores) desenvolve pesquisa clínica e científica. Através dessa pesquisa é possível conhecer melhor os mecanismos da doença e, portanto oferecer novas possibilidades de diagnóstico e tratamento. Ainda mais, este trabalho envolve a busca de novos genes ou de lesões genéticas em genes já existentes.

Para fazer este estudo é necessário comparar os resultados obtidos em pacientes que têm câncer com aqueles de pessoas que não têm câncer, como o senhor(a). Por isso, o senhor(a) está sendo convidado a colaborar com este estudo, autorizando que quando se coletar sangue para exames de laboratório, seja colhida uma pequena amostra adicional para pesquisa científica. O uso deste material não implicará riscos adicionais para o senhor(a), nem exigirá que se submeta a qualquer procedimento adicional. Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, de acordo com o processo nº 830/01, e todo estudo que vier a utilizar este material será previamente apresentado à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital.

O objetivo desse trabalho é analisar a quantidade e o tipo de polimorfismo (lesões/alterações em genes) encontrados em um grupo de pacientes com tumor de sistema nervoso central e comparar com um grupo de indivíduos não portadores de tumor.

2. procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais

Será realizada a coleta de sangue para extração de DNA e conseqüente análise de polimorfismos a partir de técnicas moleculares laboratoriais.

Todas as amostras utilizadas nessa pesquisa serão identificadas no laboratório por código formado por números e letras e, portanto, sua privacidade e identidade serão preservadas. A eventual inclusão dos resultados em publicação científica será feita de modo a manter o anonimato do paciente.

3. desconfortos e riscos esperados

O único desconforto esperado do exame de coleta de sangue é o da introdução da agulha na sua veia.

O risco é mínimo, podendo o senhor(a) apresentar tonturas e mal estar devido ao medo desse procedimento.

4. benefícios que poderão ser obtidos

Através da pesquisa é possível conhecer melhor os mecanismos da doença (tumor de sistema nervoso central), e assim poder oferecer novas possibilidades de diagnóstico e tratamento.

5. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

1. acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
2. liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
3. salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.
4. disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.
5. viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, 01 de JULHO de 2003.

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)

6 – Bibliografias

Amend KL, Elder JT, Tomsho LP, Bonner JD, Johnson TM, Schwartz J, Berwick M, Gruber SB. *EGF* gene polymorphism and the risk of incident primary melanoma. *Cancer Res.* 2004; 64: 2668-2672.

Anderson U, Guo G, Bergebheim BMAT, Hedman TBH, Henriksson R. Epidermal growth factor receptor family (EGFR, ErbB2-4) in gliomas and meningiomas. *Acta Neuropathol.* 2004; 108:35-142.

Antonarakis SE. The Nomenclature Working Group. Recommendations for a nomenclature for a system for human gene mutations. *Hum Mutat.* 1998; 11:1-3.

Araújo A, Ribeiro R, Azevedo I, Coelho A, Soares M, Sousa B, Pinto D, Lopes C, Medeiros R, Scagliotti GV. Genetic polymorphisms of the epidermal growth factor and related receptor in non-small cell lung cancer--a review of the literature. *Oncologist.* 2007; 12(2):201-210.

Arteaga CL. Epidermal growth factor receptor dependence in human tumors: more than just expression? *Oncologist.* 2002; 4:31-39.

Bandrés E, Barricarte R, Cantero C, Honorato B, Malumbres R, Zárate Ruth, Alcalde J, Garcia-Foncillas J. Epidermal growth factor receptor (EGFR) polymorphism and survival in head and neck cancer patients. *Oral Oncology.* 2006; 1-7.

Bhowmick DA, Zhuang Z, Wait SD, Weil RJ. A functional polymorphism in the *EGF* gene is found with increased frequency in glioblastoma multiforme patients and is associated with more aggressive disease. *Cancer Res.* 2004; 64(4):1220-1223.

Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. J Biol Chem. 1990; 265(14):7709-7712.

Cavanee Wk, Furnari FB, Nagane M, Huang HJS, Newcomb EW, Bigner DD. Diffusely infiltrating astrocytomas. In: Kleihues P, Cavanee WK. editors. Pathology and genetics of tumors of the nervous system. Lyon: IARC Press; 2000; 9-52.

Ciardiello F, Tortora G. Epidermal growth factor receptor (EGFR) as a target in cancer therapy: understanding the role of receptor expression and other molecular determinants that could influence the response to anti-EGFR drugs. Eur J Cancer. 2003; 39(10):1348-1354.

Collins VP, James CD. Gene and chromosomal alterations associated with the development of human gliomas. FASEB J. 1993; 7(10):926-930.

Costa BM, Ferreira P, Costa S, Canedo P, Oliveira P, Silva A, Pardal F, Suriano G, Machado JC, Lopes JM, Reis RM. Association between functional *EGF* +61 polymorphism and glioma risk. Clin Cancer Res. 2007; 13(9): 2621-2626.

Daumas-Duport C, Scheithauer B, O'Fallon J, Kelly P. Grading of astrocytomas. A simple and reproducible methos. Cancer. 1988; 62(10):2152-2165.

Ekstrand AJ, Sugawa N, James CD, Collins VP. Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N and C-terminal tails. Proc Natl Acad Sci USA. 1992; 89(10):4309-4313.

Evans WE, Johnson, JA. Pharmacogenomics: the inherited basis for interindividual differences in drug response. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2001; 2:9-39.

Frederick L, Wang XY, Eley G, James CD. Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas. *Cancer Res.* 2000; 60(5):1383-1387.

Furnari FB, Huang HJ, Cavenee WK. Molecular biology of malignant degeneration of astrocytoma. *Pediatr Neurosurg.* 1996; 24(1):41-49.

Grandis JR, Sok JC. Signaling through the epidermal growth factor receptor during the development of malignancy. *Pharmacol Ther.* 2004; 102(1):37-46.

Grinstein E, Jundt F, Weinert I, Wernet P, Royer HD. Sp1 as G1 cell cycle phase specific transcription factor in epithelial cells. *Oncogene.* 2002; 21(10):1485-1492.

Hamai Y, Matsumura S, Matsusaki K, *et al.* A single nucleotide polymorphism in the 5' untranslated region of the *EGF* gene is associated with occurrence and malignant progression of gastric cancer. *Pathobiology.* 2005; 72: 133-138.

HolbroT, Hynes NE. ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life. *Annu. Rev.Pharmacol. Toxicol.* 2004; 44:195-217.

Howell WM. Epidermal growth factor gene polymorphism and development of cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol.* 2004; 123: xx-xxi [medline].

Hsieh YY, Chang CC, Tsai FJ, Lin CC, Tsai CH. T homozygote and allele of epidermal growth factor receptor 2073 gene polymorphism are associated

with higher susceptibility to endometriosis and leiomyomas. *Fertil Steril*. 2005; 83(3):796-799.

Inagaki M, Yoshida S, Kennedy S, Takemura N, Deguchi M, Ohara N, Maruo T. Association study between epidermal growth factor receptor and epidermal growth factor polymorphisms and endometriosis in a Japanese population. *Gynecol Endocrinol*. 2007; 1-5.

Ishii S, Xu YH, Stratton RH, Roe BA, Merlino GT, Pastan I. Characterization and sequence of the promoter region of the human epidermal growth factor receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985; 82(15):4920-4924.

James MR, Hayward NK, Dumenil T, Montgomery GW, Martin NG, Duffy DL. Epidermal growth factor gene (*EGF*) polymorphism and risk of melanocytic neoplasia. *J Invest Dermatol*. 2004; 123: 760-762.

Jin G, Miao R, Deng Y, Hu Z, Zhou Y, Tan Y, Wang J, Hua Z, Ding W, Wang L, Chen W, Shen J, Wang X, Xu Y, Shen H. Variant genotypes and haplotypes of the epidermal growth factor gene promoter are associated with a decrease risk of gastric cancer in a high-risk Chinese population. *Cancer Sci*. 2007; 98(6): 864-868.

Kageyama R, Merlino GT, Pastan I. Epidermal growth factor (EGF) receptor gene transcription. Requirement for Sp1 and an EGF receptor-specific factor. *J Biol Chem*. 1988; 263(13):6329-6336.

Kang HG, Choi JE, Lee WK, Kam S, Cha SI, Kim CH, Jung TH, Park JY. +61A>G polymorphism in the *EGF* gene does not increase the risk of lung cancer. *Respirology*. 2007; 12: 902-905.

Kapoor GS, O'Rourke DM. Mitogenic signaling cascades in glial tumors. *Neurosurgery*. 2003; 52(6):1425-1434.

Kitange GJ, Templeton KL, Jenkins RB. Recent advances in the molecular genetics of primary gliomas. *Curr Opin Oncol*. 2003; 15(3):197-203.

Kitao K, Yoshida S, Kennedy S, Takemura N, Sugimoto M, Deguchi M, Ohara N, Maruo T. Epidermal growth factor receptor and human epidermal growth factor receptor 2 gene polymorphisms in endometrial cancer in a Japanese population. *Reproductive Sciences*. 2007; 14: 349-356.

Kleihues P, Ohgaki H. Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro Oncol*. 1999; 1(1):44-51.

Kleihues P, Cavenee WK. *Pathology & Genetics Tumors of the Nervous System*. Lyon: IARC/WHO; 2000.

Kuan CT, Wikstrand CJ, Bigner DD. EGF mutant receptor VIII as a molecular target in cancer therapy. *Endocr Relat Cancer*. 2001; 8(2):83-86.

Laurence DJ, Gusterson BA. The epidermal growth factor. A review of structural and functional relationships in the normal organism and in cancer cells. *Tumour Biol*. 1990; 11(5):229-261.

Libermann TA, Nusbaum HR, Razon N, Kris R, Lax I, Soreq H, Whittle N, Waterfield MD, Ullrich A, Schlessinger J. Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumours of glial origin. *Nature*. 1985; 313(5998):144-147.

Liu W, Innocenti F, Wu MH, Desai AA, Dolan ME, Cook EH, Ratain MJ. A functional common polymorphism in a Sp1 recognition site of the epidermal growth factor receptor gene promoter. *Cancer Res*. 2005; 65(1):46-53.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*. 2001; 25: 402-408.

Louis D.N, Gusella JF. A tiger behind many doors: multiple genetic pathways to malignant glioma. *Trends Genet*. 1995; 11(10):412-415.

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. The 2007 WHO classification of tumors of the central nervous system. *Acta Neuropathol*. 2007; 114(2):97-109.

McCarron SL, Bateman AC, Theaker JM, Howell WM. EGF +61 gene polymorphism and susceptibility to and prognostic markers in cutaneous malignant melanoma. *Int J Cancer*. 2003; 107(4):673-675.

Maher EA, Furnari FB, Bachoo RM, Rowitch DH, Louis DN, Cavenee WK, DePinho RA. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes Dev*. 2001; 15(11):1311-1333.

Mattei S, Colombo MP, Melani C, Silvani A, Parmiani G, Herley M. Expression of cytokine/growth factors and their receptors in human melanoma and melanocytes. *Int J Cancer*. 1994; 56: 853-857.

Merlino GT, Ishii S, Whang-Peng J, Knutsen T, Xu YH, *et al*. Structure and localization of genes encoding aberrant and normal epidermal growth factor receptor RNAs from A431 human carcinoma cells. *Mol Cell Biol*. 1985; 5: 1722-1734.

Moulder SL, Muthuswamy SK, Bianco R, Simpson JF, Arteaga CL. Epidermal growth factor receptor (HER1) tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa) inhibits HER2/neu (erbB2)-overexpressing breast cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res*. 2001; 61(24):8887-8895.

Nishikawa R, Ji XD, Harmon RC, Lazar CS, Gill GN, Cavennee WK, Huang HJ. A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91(16):7727-7731.

Nomura M, Shigematsu H, Li L, Suzuki M, Takahashi T, Estess P, Siegelman M, Feng Z, Kato H, Marchetti A, Shay JW, Spitz MR, Wistuba II, Minna JD, Gazdar AF. Polymorphism, Mutations, and Amplifications of the EGFR gene in Non-Small Cell Lung Cancers. *Plosmedicine*. 2007; 4: 715-727.

Nozaki M, Tada M, Kobayashi H, Zhang CL, Sawamura Y, Abe H, Ishii N, Van Meir EG. Roles of the functional loss of p53 and other genes in astrocytoma tumorigenesis and progression. *Neuro Oncol*. 1999; 1(2):124-137.

Ohgaki H, Watanabe K, Peraud A, Biernat W, von Deimling A, Yasargil MG, Yonekawa Y, Kleihues P. A case history of glioma progression. *Acta Neuropathol*. 1999; 97(5):525-532.

Okamoto I, Roka F, Krögler J, Endler G, Kaufmann S, Tockner S, Marsik C, Jilma B, Mannhalter C, Wagner O, Pehamberger H. The EGF A61G polymorphism is associated with disease-free period and survival in malignant melanoma. *J Invest Dermatol*. 2006;127(4):969-970.

Pedersen MW, Meltorn M, Damstrup L, Poulsen HS. The type III epidermal growth factor receptor mutation. Biological significance and potential target for anti-cancer therapy. *Ann Oncol*. 2001; 12(6):745-760.

Randerson-Moor JA, Gaut R, Turner F, Whitaker L, Barrett JH, Silva IS, Swerdlow A, Bishop DT, Newton Bishop JA. The relationship between the

epidermal growth factor (EGF) 5'UTR variant A61G and melanoma/nevus susceptibility. *J Invest Dermatol.* 2004; 123(4):755-759.

Risch NJ. Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature.* 2000; 405(6788):847-856.

Rocha-Lima CA, Soares HP, Raez LE, Singal R. EGFR Target of Solid Tumors. *Cancer Control.* 2007; 14: 295-304.

Roskoski RJr. The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinase and cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2004; 319:(1) 1-11.

Scherer HJ. Cerebral astrocytomas and their derivatives. *Am J Cancer.* 1940; 40:159-198.

Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, Sherry S, Mullikin JC, Mortimore BJ, Willey DL, Hunt SE, Cole CG, Coggill PC, Rice CM, Ning Z, Rogers J, Bentley DR, Kwok PY, Mardis ER, Yeh RT, Schultz B, Cook L, Davenport R, Dante M, Fulton L, Hillier L, Waterston RH, McPherson JD, Gilman B, Schaffner S, Van Etten WJ, Reich D, Higgins J, Daly MJ, Blumenstiel B, Baldwin J, Stange-Thomann N, Zody MC, Linton L, Lander ES, Altshuler D, International SNP Map Working Group. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature.* 2001; 409(6822):928-933.

Shafqat S, Hedley-Whyte ET, Henson JW. Age-dependent rate of anaplastic transformation in low-grade astrocytoma. *Neurology.* 1999 10;52(4):867-869.

Shahbazi M, Pravica V, Nasreen N, Fakhoury H, Fryer AA, Strange RC, Hutchinson PE, Osborne JE, Lear JT, Smith AG, Hutchinson IV. Association

between functional polymorphism in EGF gene and malignant melanoma. Lancet. 2002; 359(9304):397-401.

Shintani S, Matsuo K, Crohin CC, McBride J, Tsuji T, Donoff RB, Posner M, Todd R, Wong DT. Intragenic Mutation Analysis of the Human Epidermal Growth Factor Receptor (*EGFR*) Gene in Malignant Human Oral Keratinocytes. Cancer Res. 1999; 59(16):4142-4147.

Smith JS, Tachibana I, Passe SM, Huntley BK, Borell TJ, Iturria N, O'Fallon JR, Schaefer PL, Scheithauer BW, James CD, Buckner JC, Jenkins RB. PTEN mutation, EGFR amplification, and outcome in patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme. J Natl Cancer Inst. 2001; 93(16):1246-1256.

Splinder KLG, Nielsen JN, Linderbjerg J, Brandslund I, Jakobsen A. Prediction of response to chemoradiation in rectal cancer by a gene polymorphism in the epidermal growth factor receptor promoter region. Int J. Radiation Oncology Biol. Phys. 2006; 66 (2): 500-504.

Sugawa N, Ekstrand AJ, James CD, Collins VP. Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastoma. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990; 87(21):8602-8606.

Surawicz TS, McCarthy BJ, Kupelian V, Jukich PJ, Bruner JM, Davis FG. Descriptive epidemiology of primary brain and CNS tumors: results from the Central Brain Tumor Registry of the United States, 1990-1994. Neuro Oncol. 1999; 1(1):14-25.

Talapatra S, Thompson CB. Growth factor signaling in cell survival: implications for cancer treatment. J Pharmacol Exp Ther. 2001; 298: 873-878.

Tanabe KK, Lemoine A, Finkelstein DM, Kawasaki H, Fujii T, Chung RT, Lauwers GY, Kulu Y, Muzikansky A, Kuruppu D, Lanuti M, Goodwin JM, Azoulay D, Fuchs BC. Epidermal growth factor gene functional polymorphism and the risk of hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Jama*. 2008; 299(1): 53-60.

Vauleon E, Auger N, Benouaich-Amiel A, Laigle-Donadey F, Kaloahi G, Lejeune J, Delattre JY, Thillet J, Sanson M. The 61 A/G *EGF* polymorphism is functional but is neither a prognostic marker nor a risk factor for glioblastoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 2007; 172: 33-37

Venook AP. Epidermal growth factor receptor-targeted treatment for advanced colorectal carcinoma. *Cancer*. 2005; 103(12):2435-2446.

Von Deimling A, Louis DN, Wiestler OD. Molecular pathways in the formation of gliomas. *Glia*. 1995; 15(3):328-338.

Ware ML, Berger MS, Binder DK. Molecular biology of glioma tumorigenesis. *Histol Histopathol*. 2003; 18(1):207-216.

Watanabe K, Sato K, Biernat W, Tachibana O, von Ammon K, Ogata N, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Incidence and timing of p53 mutations during astrocytoma progression in patients with multiple biopsies. *Clin Cancer Res*. 1997; 3(4):523-530.

Wong AJ, Ruppert JM, Bigner SH, Grzeschik CH, Humphrey PA, Bigner DS, Vogelstein B. Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992; 89(7):2965-2869.

Woodburn JR. The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy. *Pharmacol Ther*. 1999; 82: 241-250.

Xu J, Thompson KL, Shephard LB, Hudson LG, Gill GN. T3 receptor suppression of Sp1-dependent transcription from the epidermal growth factor receptor promoter via overlapping DNA-binding sites. J Biol Chem. 1993; 268(21):16065-16073.