PRISCILA OLIVEIRA DE CARVALHO

Análise da expressão, amplificação e deleção de EGFR e sua coexpressão com *IL13Rα2* em astrocitomas

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Neurologia

Orientadora: Profa. Dra. Suely Kazue Nagahashi Marie

SÃO PAULO

2009

PRISCILA OLIVEIRA DE CARVALHO

Análise da expressão, amplificação e deleção de EGFR e sua coexpressão com *IL13Rα2* em astrocitomas

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Neurologia

Orientadora: Profa. Dra. Suely Kazue Nagahashi Marie

SÃO PAULO

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Carvalho, Priscila Oliveira de
Análise da expressão, amplificação e deleção de EGFR e sua co-expressão com IL13α2 em astrocitomas / Priscila Oliveira de Carvalho. -- São Paulo, 2009.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Departamento de Neurologia.
Área de concentração: Neurologia.
Orientadora: Suely Kazue Nagahashi Marie.

Descritores: 1.Receptor do fator de crescimento epidérmico 2.Expressão gênica 3.Amplificação de genes 4.EGFRvIII 5.Subunidade alfa2 de receptor de interleucina 13

USP/FM/SBD-289/09

Dedico esta Tese aos meus pais, a todos da minha família, meus amigos e aos pacientes do Projeto Genoma Clínico.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus.

Agradeço aos meus pais Regina e Cordiniano, minha irmã Virginia, por sempre me incentivarem e continuarem acreditando em mim.

Agradeço a toda a minha família, inclusive aqueles com os quais não possuo laços sanguíneos, mas os laços afetivos superam de tal maneira que é impossível descrever: meus grandes amigos e meu namorado.

Agradeço por todo o apoio e estrutura que recebi dentro do laboratório LIM-15 e pelos três grandes grupos de que ele é constituído. Em especial, agradeço o grupo de Biologia Celular e Molecular, em particular a Profa Dra Suely Kazue Nagahashi Marie, minha orientadora. Agradeço a ela pela oportunidade grandiosa de me oferecer este projeto que desenvolvi com grande empenho, satisfação e amor à pesquisa, tornando-o, com a ajuda de muitas mãos, que citarei ao longo desta humilde mensagem, uma Tese de Doutorado. Além disso, agradeço a oportunidade de crescimento, tanto em conhecimento científico, quanto como pessoa. Muito obrigada Dra Suely.

Agradeço imensamente e de todo meu coração a Sueli Mieko Oba-Shinjo, por toda sua experiência de bancada, sem a qual eu não estaria onde estou hoje, por toda sua ajuda e paciência, nas horas difíceis, por todo meu crescimento e conhecimento na área, enfim, por tudo. Muito obrigada Dra Sueli.

Gostaria de fazer aqui um agradecimento especial a quem me ajudou muito neste trabalho e que considero grande amiga: Miyuki Uno. Agradeço por toda experiência, por todas as conversas e discussões que sempre me fizeram enxergar uma luz no fim do túnel e me fizeram crescer muito.

Agradeço do fundo do meu coração a todas as minhas grandes amigas do laboratório, e já peço perdão se por ventura vier esquecer de alguém: Roseli da Silva, Maria José Ferreira Alves, Mussya Rocha, Simone Kneip, Renata Correa, Thais Freire, Thais Galatro, Tatiana Bukstein, Thatiana Bastos, Mariana Brandão, Eliene Campos, Adriana Miti, Cinthia Elim e a nossa excelentíssima Celinha: o que seríamos sem o trabalho da

Célia? Além daqueles que não fazem mais parte do grupo, mas que foram fundamentais para a concretização deste meu sonho: Keila Barbosa, Marcelo Campos, Márcia Hiromi, Erika Midoli, Mariah Munhoz e Paulo Barilari.

Agradeço a Dra Alda Wakamatsu por todo o suporte técnico e realização das reações de imunohistoquímica.

Agradeço ao Departamento de Anatomia Patológica, ao Grupo de Cirurgia de Epilepsia e ao Grupo de Tumores Encefálicos e Metástases da Divisão de Clínica Neurocirúrgica do Instituto Central do Departamento de Neurologia do Hospital das Clínicas, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP).

E por último, e não menos importante, a todos os pacientes incluídos no Projeto Genoma Clínico que permitiram a realização deste trabalho, sem eles este estudo não seria possível.

Muitíssimo obrigada!

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas e Siglas
Lista de Figuras
Lista de Tabelas
Resumo
Abstract
1. Introdução.....1
1.1 – Revisão da Literatura.....4
1.1.1 – Receptores de Tirosinoquinase (RTK)..... 5
1.1.2 – Família dos Receptores de Superfície Celular HER / ErbB. 6
1.2 – Estrutura do EGFR.....9
1.3 – Citocinas e Interleucinas..... 12
1.4 – IL-13: Estrutura, Caracterização e Funções..... 12
1.5 – Receptores de IL-4 e IL-13, incluindo o Receptor de Interleucina-13α2 (IL-13Rα2).....14
1.6 – Vias de Sinalização da IL-13.....16
1.7 – Tumores do Sistema Nervoso Central (SNC)..... 17
1.7.1 – Astrocitoma Pilocítico (grau I)..... 19
1.7.2 – Astrocitoma Difuso ou de Baixo Grau (grau II)..... 21
1.7.3 – Astrocitoma Anaplásico (grau III)..... 23
1.7.4 – Glioblastomas Multiforme (grau IV)..... 25
1.8 – EGFR, IL13Rα2 e Câncer.....28
1.9 – Co-expressão entre *EGFR* e *IL13Rα2*..... 30
1.10 – Mecanismos para Ativação de EGFR Mediada pela Via de Transdução de Sinal em Gliomas..... 31
1.11 – Localização nuclear da Família HER/ErBb.....34
1.12 – Hiperexpressão e Amplificação de *EGFR*..... 35
1.13 – Mutações em *EGFR*.....41
1.14 – A Mutação Mais Comum em Gliomas: EGFRvIII..... 44
1.15 – Terapêutica..... 49
1.15.1 – Anticorpos Monoclonais para Terapia do Câncer..... 50

1.15.2 – Agentes de Pequenas Moléculas para Terapia do Câncer.....50
1.15.3 – Comparando Anticorpos Monoclonais (mAbs) e Inibidores de Tirosinoquinase (TKIs)..... 51
1.16 – EGFRvIII e Resposta aos Tratamentos..... 53
1.17 – Outras Modalidades de Tratamento.....54
1.17.1 – mAbs.....54
1.17.2 – TKIs.....56
2. Objetivos.....65
3. Pacientes e Métodos.....67
3.1 – Pacientes..... 68
3.2 – Extração de DNA de Tecido Tumoral.....69
3.3 – Extração de RNA..... 69
3.4 – Síntese da Primeira Fita de DNA Complementar (cDNA).....70
3.5 – Seleção dos *Primers*..... 71
3.6 – Deleção EGFRvIII por Reação em Cadeia de Polimerase Transcrição Reversa (RT-PCR).....71
3.7 – Deleção EGFRvIII, Expressão e Amplificação de EGFR e Expressão de IL-13Rα2 por Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real (RQ-PCR).....73
3.8 – Análise dos dados de Amplificação de EGFR e Expressão dos genes *EGFR* e *IL-13Rα2*..... 77
3.9 – Análise e Interpretação da Curva de Dissociação (*Melting Curve*)..... 79
3.10 – Imunohistoquímica (IHQ)..... 80
3.11 – Análise por Microscopia Óptica..... 82
3.12 – Análise Estatística..... 82
4 – Resultados..... 83
4.1 – Deleção.....84
4.2 – Amplificação.....87

4.3 – Expressão do RNA mensageiro..... 89
4.3.1 – Expressão relativa do gene *EGFR*..... 89
4.3.2 – Expressão relativa do gene *IL-13Rα2*..... 91
4.4 – Expressão da Proteína EGFR.....94
4.5 – Análises de *EGFR*: Associações com as Características Histopatológicas, Situação do Paciente, Gênero e Idade..... 98
4.6 – Expressão de *IL13Rα2*: associações com as características histopatológicas, Situação do Paciente, Gênero e Idade..... 106
4.7 – Co-expressão: *EGFR* e *IL13Rα2*..... 107
5 – Discussão.....109
5.1 – EGFRvIII em Tumores..... 110
5.2 – EGFRvIII em GBMs e Diminuição da Sobrevida.....111
5.3 – Correlação da Presença da Forma EGFRvIII com a Amplificação de *EGFR*..... 112
5.4 – Correlação da Amplificação de *EGFR* com os Dados Clínicos.... 113
5.5 – Correlação da Amplificação e Expressão do RNA mensageiro e da Proteína..... 115
5.6 – Correlação da Expressão de EGFR, EGFRvIII e os Dados Clínicos..... 117
5.7 – Outros Mecanismos Regulatórios da Hiperexpressão de EGFR..... 117
5.8 – Co-expressão de *EGFR* e *IL13Rα2*..... 119
6 – Conclusões..... 122
7 – Referências Bibliográficas..... 125
8 – Anexos 150

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa	Aminoácido
AG I	Astrocitoma pilocítico ou grau I
AG II	Astrocitoma de baixo grau ou grau II
AG III	Astrocitoma anaplásico ou grau III
AA	Astrocitoma anaplásico ou grau III
AP	Astrocitoma pilocítico ou grau I
AR	Anfiregulina
ATP	Adenosina Trifosfato
BTC	Beta-celulina
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CSF	Fator estimulador de Colônias
C-terminal	Carboxil-terminal
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	Deoxinucleotídeos trifosfatados
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGF	*epidermal growth factor*
EGFR	*epidermal growth factor receptor*
EGFRvI	Forma deletada vI de EGFR
EGFRvII	Forma deletada vII de EGFR
EGFRvIII	Forma deletada vIII de EGFR
EGFRvIV	Forma deletada vIV de EGFR
EGFRvV	Forma deletada vV de EGFR
EGFRwt	Forma selvagem de EGFR
EPR	Epiregulina
ErbB 1	Receptor do fator de crescimento epidérmico
FGFR	*fibroblast growth factor receptor*
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GBM	Glioblastoma multiforme
GUS-Beta	*beta-glucoronidase gene*
HB-EGF	Heparina-EGF
HC	Hospital das Clínicas
HCl	Ácido clorídrico
HPRT	*hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase gene*
H&E	Hematoxilina-eosina
H_2O_2	Água oxigenada
IHQ	imunohistoquímica
IL	Interleucinas
IL-13Rα2	*interleukin-13 receptor alpha2*
IFN	Interferon
KCl	Cloreto de potássio

$KHCO_3$	Carbonato de potássio hidrogenado
kDa	Kilodalton
mg	Miligrama
$MgCl_2$	Cloreto de magnésio
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
ng	Nanograma
NGFR	*nerve growth factor receptor*
NH_4Cl	Cloreto de amônio
NRGs	Neuregulinas
NRG-1	Neuregulina – 1
NRG-2	Neuregulinas – 2
N-terminal	Amino-terminal
OMS	Organização mundial da saúde
p	Braço curto do cromossomo
p	Probabilidade
pb	Pares de bases
PBS	Solução tampão fosfato salina
PCR	Peação em cadeia polimerase
PDGF	*platelet-derived growth factor*
pH	Potencial de hidrogênio
PTEN	*phosphatase and tensin homolog gene*
q	Braço longo do cromossomo
RNA	Ácido ribonucléico
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
rpm	Rotações por minuto
RQ-PCR	PCR semi-quantitativo em tempo real
RTK	Receptores de Tirosinoquinase
RT-PCR	Transcriptase Reversa PCR
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SNC	Sistema nervoso central
TAE	Tris-acetato EDTA
TGF-α	*transforming growth factor alpha*
TGF-β	*transforming growth factor beta*
TE	Tris-EDTA
TNF-α	Fator de necrose tumoral alpha
TNF-β	Fator de necrose tumoral beta
TP53	*tumor protein p53 gene*
UV	Ultra violeta
μL	Microlitro

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 Estrutura da proteína selvagem EGFR (EGFRwt) composta por seus 3 domínios principais e 1210 aminoácidos.....11
FIGURA 2 Representação linear da proteína selvagem EGFR.....11
FIGURA 3 Esquema ilustrando as vias de sinalização intracelular através da ativação dos 4 receptores de IL-4 e IL-13 15
FIGURA 4 Microscopia óptica corada com Hematoxilina-eosina (HE) de um caso de astrocitoma pilocítico.....20
FIGURA 5 Microscopia óptica corada com HE de um caso de astrocitoma de baixo grau.....22
FIGURA 6 Microscopia óptica corada com HE de um caso de astrocitoma anaplásico.....24
FIGURA 7 Microscopia óptica corada com HE de um caso de glioblastoma multiforme.....26
FIGURA 8 Vias de alterações genéticas mais comuns envolvidas na progressão de astrocitomas difusos.....27
FIGURA 9 Mecanismos de ativação de EGFR pelas vias de transdução de sinal PI3K/Akt/PTEN e Ras/Raf/MAPK.....33
FIGURA 10 Representação linear da estrutura da proteína truncada EGFRvIII e a sua sequência de DNA complementar (cDNA) deletada, comparada com a sequência de cDNA de EGFRwt.....43
FIGURA 11 Sinalização de sobrevivência em gliomas malignos.....49
FIGURA 12 Figura esquemática do desenho de *primers* para a reação de RT-PCR.....72
FIGURA 13 Determinação das eficiências de amplificação de RQ-PCR dos genes EGFR e HPRT.....75

FIGURA 14 Curva de amplificação de *EGFR* em relação ao gene HBb.....78
FIGURA 15 Curva de amplificação de *EGFR* em relação ao gene HBb.....78
FIGURA 16 Curva de dissociação de RQ-PCR do gene EGFR para a análise de sua expressão em astrocitomas.....74
FIGURA 17 Produtos de amplificação de RT-PCR com par de *primer* geral de *EGFR* em GBM.....85
FIGURA 18 Produtos de amplificação de RT-PCR com pares de *primers* específicos de *EGFR* em GBM.....85
FIGURA 19 Gráfico demonstrando o número de casos com a deleção EGFRvIII exclusiva em GBMs em relação ao número total de casos.....86
FIGURA 20 Curva de sobrevida entre casos de GBM com e sem a deleção EGFRvIII.....86
FIGURA 21 Gráfico demonstrando o número de casos com amplificação do gene EGFR em relação ao número total de casos para cada grau de astrocitoma (I-IV).....87
FIGURA 22 Curva de sobrevida entre casos de GBM com e sem amplificação de *EGFR*.....88
FIGURA 23 Curva de sobrevida entre os casos de GBM com apenas a amplificação de *EGFR* e casos de GBM apresentando amplificação de *EGFR* e deleção EGFRvIII concomitantemente.....88
FIGURA 24 Gráfico demonstrando o número de casos com aumento de expressão do gene EGFR em relação ao número total de casos para cada grau de astrocitoma (I-IV).....89
FIGURA 25 Gráfico de expressão relativa do gene EGFR em todos os graus de astrocitomas em relação ao tecido não tumoral.....90
FIGURA 26 Curva de sobrevida entre casos de GBM com e sem aumento de expressão do gene EGFR.....91

FIGURA 27 Gráfico demonstrando o número de casos com expressão do gene IL-13Rα2 em relação ao número total de casos para cada grau de astrocitoma (I-IV) 92

FIGURA 28 Gráfico de expressão relativa do gene IL-13Rα2 em todos os graus de astrocitomas em relação ao tecido não tumoral.....92

FIGURA 29 Curva de sobrevida entre casos de GBM com e sem aumento de expressão do gene IL-13Rα2.....93

FIGURA 30 Gráfico demonstrando o número de casos com expressão da proteína EGFR com relação ao número total de casos.....94

FIGURA 31 Curva de sobrevida entre casos de GBM com e sem aumento de expressão da proteína EGFR.....95

FIGURA 32 Fotomicroscopia óptica de imunohistoquímica de EGFR do caso 194 de GBM com marcação citoplasmática.....96

FIGURA 33 Fotomicroscopia óptica de imunohistoquímica de EGFR do caso 1162 de GBM com marcação citoplasmática e nuclear.....97

FIGURA 34 Gráfico de barras mostrando o número de casos com marcação nuclear de acordo com a análise qualitativa realizada na leitura de IHQ.....97

FIGURA 35 Gráfico de correlação entre a expressão do RNAm e da proteína.....105

FIGURA 36 Gráfico de análise global de EGFR para todos os graus de astrocitomas.....106

FIGURA 37 Gráficos da análise de coexpressão entre os genes EGFR e IL13Rα2 para cada grau de astrocitoma pela correlação de Spearman.....108

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Relação entre os membros da família HER e seus ligantes.....8

TABELA 2 Classificação dos astrocitomas segundo a organização mundial da saúde (2007)..... 18

TABELA 3 Dados da literatura sobre análise da expressão e amplificação de *EGFR* em tumores..... 36

TABELA 4 Descrição das mutações do gene EGFR já descritas em gliomas, comparando com a forma selvagem desse receptor.....42

TABELA 5 Dados da literatura sobre análise da deleção EGFRvIII isolados ou em conjunto com a análise da expressão e amplificação de *EGFR* em tumores..... 46

TABELA 6 Vantagens e desvantagens no tratamento com TKIs e mAbs em tumores..... 52

TABELA 7 Dados da literatura sobre o tratamento com anticorpos monoclonais e inibidores de pequenas moléculas em tumores..... 58

TABELA 8 Casuística de acordo com o grau de astrocitoma (OMS).....68

TABELA 9 Seqüência de nucleotídeos, tamanho do produto de PCR, temperatura de anelamento e número de ciclos utilizados na reação de RT-PCR.....73

TABELA 10 Seqüência de nucleotídeos, tamanho do produto de PCR, temperatura de anelamento, número de ciclos, e concentração final utilizados na reação de RQ-PCR.....77

TABELA 11 Expressão de *EGFR* de com relação ao gênero, idade, *status*, características histopatológicas, imunohistoquímica e amplificação de *EGFR* em astrocitomas..... 99

TABELA 12 Amplificação do gene EGFR de acordo com gênero, idade, *status*, características histopatológicas e expressão da proteína..... 100

TABELA 13 Deleção de *EGFR* de acordo com gênero, idade, *status*, expressão e amplificação do gene e expressão da proteína em AA e GBM..... 101

TABELA 14 Os 11 casos de GBM, com idade ao diagnóstico e sobrevida, que apresentaram simultaneamente expressão e amplificação de *EGFR*, expressão da proteína e presença da deleção EGFRvIII..... 103

TABELA 15 Os 5 casos de GBM ainda vivos juntamente com as análises realizadas para a verificação da expressão e amplificação de *EGFR*, expressão da proteína e presença da deleção EGFRvIII..... 104

TABELA 16 Expressão de *IL13Rα2* de acordo com gênero, idade, *status*, e características histopatológicas em astrocitomas..... 107

RESUMO

CARVALHO, PO. Análise da expressão, amplificação e deleção de EGFR e sua coexpressão com IL13Rα2 em astrocitomas. **São Paulo, 2009.**

O Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (do inglês, EGFR) é uma proteína de membrana celular que consiste em um domínio extracelular para o acoplamento do ligante e em um domínio intracelular apresentando sítio catalítico de tirosinoquinase. Em ~40% dos GBMs primários é observada a amplificação de *EGFR* resultando na sua hiperexpressão, o que raramente ocorre em GBM secundário. Mais da metade dos casos de GBM com amplificação do receptor está associado com rearranjo do gene, uma forma deletada de EGFR (EGFRvIII). Adicionalmente, o receptor de interleucina 13 alfa-2 (IL-13Rα2), apresenta-se abundante e especificamente hiperexpresso em gliomas de alto grau, em particular, GBM. O objetivo do presente estudo é analisar a expressão, amplificação, e deleção de EGFR em astrocitomas, bem como a coexpressão entre esse gene e o da IL-13Rα2. Foram analisadas 145 astrocitomas (22 astrocitomas pilocíticos (AP); 22 astrocitomas grau II (AGII); 17 astrocitomas anaplásico (AA); e 84 GBM) e 17 tecidos cerebrais não tumorais provenientes de cirurgia de epilepsia. A deleção EGFRvIII foi analisada por RT-PCR, e confirmada por PCR em tempo real (RQ-PCR). A expressão relativa de *EGFR* e *IL-13Rα2* foi estudada por RQ-PCR utilizando-se o método SYBR Green, comparado ao tecido não tumoral, e normalizado para os genes de referência endógena, *HPRT* e *Gus-β.* A amplificação de *EGFR* foi também determinada por RQ-PCR com relação ao gene da beta-hemoglobina, descrito como um gene de cópia única. Foi realizada imunohistoquímica para analisar a expressão da proteína EGFR. A deleção EGFRvIII foi somente encontrada em GBM (19/84, 23%), demonstrando a exclusividade dessa alteração num grau tumoral de maior malignidade e uma diminuição da sobrevida desses pacientes (p = 0,030). A hiperexpressão de *EGFR* foi encontrada em 88

casos (61%), correspondendo a 50% de GBM, 88% de AA, e interessantemente em 77% de AGII e 64% de AP. Da mesma maneira, a hiperexpressão de *IL-13Rα2* foi encontrada em 62 casos (43%), correspondendo a 48% de GBM, 29% de AA, 18% de AGII e, surpreendentemente em 59% de AP. Embora tenha havido um aumento de expressão de ambos os genes em todos os graus de astrocitomas, não houve coexpressão dos mesmos. A amplificação de *EGFR* foi observada em 29 casos (20%) correspondendo a 31% de GBM e ainda um caso para cada um dos demais graus de astrocitomas, sendo que dos 29 casos amplificados, 21 pacientes eram mais velhos que 45 anos ($p < 0,001$) e 50% dos casos de GBM com amplificação de *EGFR*, apresentaram simultaneamente EGFRvIII. Adicionalmente, o acúmulo citoplasmático da proteína foi detectado em 74 casos (51%), correspondendo a 55% de GBM, 47% de AA, 54,5% de AGII e 37% de AP, além de um acúmulo nuclear detectado em 15% dos casos de astrocitomas difusamente infiltrativos. Assim, a alta freqüência de hiperexpressão dos genes estudados em todos os graus de astrocitomas, principalmente a amplificação de *EGFR* e a presença da deleção EGFRvIII foram observados entre os astrocitomas de alto grau, especialmente em GBM. Os resultados apresentados contribuem para um melhor direcionamento no futuro em métodos terapêuticos específicos, salientando a importância da análise de expressão molecular, protéica e das alterações mutacionais que envolvem genes candidatos, em particular, *EGFR* e *IL-13Rα2*.

ABSTRACT

Carvalho, PO. Analysis of EGFR expression, amplification and deletion and its coexpression with IL13Rα2 in astrocytomas. **São Paulo, 2009.**

Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR is a transmembrane protein consisting of an extracellular EGF-binding domain and an intracellular domain with ligand-activated tyrosine kinase activity. In ~40% of primary GBM is observed amplification leading to overexpression of *EGFR*, but rarely in secondary GBM. Over the half of primary GBM with *EGFR* amplification is associated to gene rearrangement, a deleted form of EGFR (EGFRvIII). Additionally, the interleukin-13 alpha 2 receptor (IL13Rα2) is abundant and specifically overexpressed in high-grade gliomas, particularly in GBM. The aim of the present study is to analyze the EGFR expression, amplification, and deletion in astrocytomas as well as its coexpression with *IL13Rα2*. We have analyzed 145 surgical astrocytoma samples (22 pilocytic astrocytomas (PA); 22 low-grade astrocytomas (LGA); 17 anaplastic astrocytomas (AA); and 84 GBM) and 17 non-neoplastic brain tissue from epilepsy surgery. EGFRvIII deletion was analyzed by RT-PCR, and also confirmed by real time PCR (RQ-PCR). The relative *EGFR* and *IL-13Rα2* expression was studied by RQ-PCR using SYBR Green method, compared to non-neoplastic tissue, normalized for *HPRT* and *Gus-β* genes. The EGFR amplification was also determined by RQ-PCR relative to the hemoglobin beta gene, described as a single copy gene. Immunohistochemistry was performed to analyze the protein expression in tumor samples. The EGFRvIII deletion was found only in GBM cases (19/84, 23%) demonstrating the exclusivity of this alteration in higher tumor grade and survival was decreased in these patients (p = 0.030). *EGFR* overexpression was found in 88 cases (61%), corresponding to 50% of GBM, 88% of AA, and interestingly in 77% of LGA and 64% of PA. In the same way, the overexpression of *IL-13Rα2* was found in 62 cases (43%), corresponding to 48% of GBM, 29% of AA, 18% of LGA and, surprising in 59% of PA. Although increased expression of both genes was demonstrated

in all astrocytoma grades, it was no coexpression of the genes. The amplification was observed in 29 cases (20%) corresponding to 31% of GBM and only one case each of PA, LGA and AA. Among 29 cases with *EGFR* amplification, 21 patients were older than 45 years ($p < 0.001$) and 50% of GBM with *EGFR* amplification presented simultaneously the EGFRvIII. Moreover, the EGFR cytoplasmic accumulation was detected in 74 cases (51%), corresponding to 55% of GBM, 47% of AA, 54.5% of LGA and 37% of PA, and nuclear accumulation was detected in 15% of diffusely infiltrative astrocytomas. Thus, the high overexpression frequency of the genes studied in all grades of astrocytomas, mainly the *EGFR* amplification and presence of EGFRvIII deletion were observed among high-grade astrocytomas, mainly in GBM. The present results contribute to better tailoring specific future therapeutical approach in patients with astrocytomas, pointing out the importance of the molecular, protein expressions and mutational analyses of candidates genes, in particular, *EGFR* and *IL-13Rα2*.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

As células, em organismos complexos, são influenciadas de modo contínuo por informações advindas tanto do meio extracelular quanto das células vizinhas. A interpretação correta e integração dessas sinalizações são essenciais para a homeostase, sobrevivência e adaptação das células, assim como o do próprio organismo.

Durante a evolução, vários mecanismos celulares foram desenvolvidos para a execução dessas tarefas; sendo os receptores de membranas exemplos importantes. Entre esses receptores estão os de fatores de crescimento celular, que desempenham papel importante na modulação da divisão e na regulação do crescimento, proliferação e diferenciação celular. Estes recebem toda a informação proveniente do meio extracelular através dos seus ligantes e retransmitem à célula, iniciando uma série de sinalizações intracelulares, incluindo ativação do receptor, estimulação da cascata de quinases, transcrição de fatores e, finalmente, a transcrição de genes.

Da mesma maneira, pode ocorrer ativação do receptor de membrana em resposta a uma emissão de sinal entre as células durante o desencadeamento da resposta imune e inflamatória, através de pequenas moléculas protéicas, denominadas citocinas. As diferentes citocinas podem ser enquadradas em diversas categorias, e dentre estas, estão as interleucinas.

O controle homeostático da sinalização mediada por citocinas, em geral, requisita um equilíbrio delicado entre os eventos moleculares que ativam e amplificam o sinal e o mecanismo que inibe a geração e transmissão do mesmo da superfície celular ao núcleo.

No momento em que há algum desequilíbrio entre essa transmissão de sinal da superfície celular ao núcleo, e por esse motivo, as células que escapam a essa homeostasia e adquirem um crescimento desordenado e irregular, são denominadas malignas.

Os receptores de fatores de crescimento, em especial o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR, *epidermal growth factor receptor*) estão associados a um vasto número de neoplasias humanas, como: câncer de mama, pulmão, próstata e tumores do sistema nervoso central. Adicionalmente, outro receptor de superfície amplamente estudado e, também identificado como um novo alvo terapêutico, o receptor de interleucina 13 alfa-2 (IL-13Rα2), apresenta-se abundante e especificamente hiperexpresso em gliomas de alto grau, em particular, glioblastoma multiforme.

Os mecanismos pelos quais tornam o EGFR um oncogene são inúmeros: sinalização autócrina, hiperexpressão e/ou amplificação do gene EGFR, deleções/mutações que possibilitam a ação do receptor independente de ligantes, ou seja, constitutiva, e ainda a sua interação, podendo promover a sua coexpressão, com outros receptores de superfície, como a IL-13Rα2. Por tudo isso, *EGFR* e *IL-13Rα2* são fortes candidatos para alvo terapêutico em diversos tipos de câncer.

No intuito de se oferecer aos pacientes com astrocitomas (I-IV), principalmente aqueles com maior grau de malignidade (III-IV), a possibilidade de uma terapia personalizada, este estudo realizou a análise molecular dos genes IL13Rα2 e EGFR, e sua coexpressão, bem como a análise da poteína EGFR e as correlações desses dados com os dados clínicos de pacientes com astrocitomas.

1.1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 – REVISÃO DA LITERATURA

1.1.1 – Receptores de Tirosinoquinase (RTK)

Os receptores de tirosinoquinase (RTK) constituem o segundo maior tipo de receptores celulares de superfície, entre os quais se incluem o receptor do fator de crescimento neural (NGFR, *nerve growth factor receptor*), o do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR, *platelet-derived growth factor receptor*), o do fator de crescimento de fibroblastos (FGFR, *fibroblast growth factor receptor*), e o do fator de crescimento epidérmico (EGFR, *epidermal growth factor receptor*) (Lodish et al., 2000).

O fator de crescimento epidérmico (EGF) foi descoberto no início dos anos 60 por Levi-Montalcini e o embriologista Stanley Cohen, e foi um dos primeiros peptídeos de fatores de crescimento a ser descoberto (Haley et al., 1987 apud Pedersen et al., 2001). Em meados dos anos 70, uma proteína da membrana plasmática que liga EGF foi reportada e nomeada como receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), sendo que esta foi a primeira proteína quinase a ser descrita por Cohen e colaboradores (Haley et al., 1987 apud Pedersen et al., 2001; Roskoski, 2004; Nicholas et al., 2006).

A ativação dos RTK, ou seja, a ligação de um ligante a esse tipo de receptor, estimula a atividade proteinoquinásica deste último, o qual, subseqüentemente, estimula a cascata de transdução de sinal, conduzindo a uma série de sinalizações intracelulares, que conduz a mudanças na fisiologia celular e/ou nos modelos de expressão gênica (Lodish et al., 2000; Yarden & Sliwkowsky, 2001; Kleihues & Cavanee, 2000; Arteaga, 2002).

Os caminhos de sinalização RTK têm um extenso espectro de funções, incluindo a ordem da proliferação e da diferenciação celulares, da promoção da sobrevivência da célula e da modulação do metabolismo celular (Lodish et al., 2000). Assim, os RTK desempenham um papel importante e complexo em uma extensa variedade de desordens, incluindo o câncer (Andersson et al., 2004).

Alguns RTK foram identificados em estudos sobre o câncer humano associados com formas mutantes de receptores do fator de crescimento, que enviam um sinal de proliferação para as células, mesmo na ausência do fator de crescimento, o que contribui para a proliferação celular descontrolada (Lodish et al., 2000; Ware et al., 2003; Kitange et al., 2003; Maher et al., 2001; Sellers & Meyerson, 2005; Kuan et al., 2001; Leenstra et al., 1998; Frederick et al., 2000; Shinojima et al., 2003; Reifenberger & Collins, 2004).

Todos os RTK abrangem um domínio extracelular contendo um sítio de acoplamento para o ligante, uma única α-hélice hidrofóbica transmembrânica e um domínio citoplasmático que inclui uma região com atividade proteinoquinásica. O acoplamento de um ligante leva a maior parte dos RTK a dimerizar-se; a proteinoquinase de cada receptor monômero fosforila, então, um grupo distinto de resíduos de tirosina no domínio citoplasmático de seu parceiro dimérico, num processo chamado autofosforilação (Lodish et al., 2000).

A autofosforilação ocorre em dois estágios. No primeiro, resíduos de tirosina na extremidade fosforilada perto do sítio catalítico são fosforilados. Isso leva a uma mudança na conformação que facilita a ligação do ATP em alguns receptores e a ligação de substratos protéicos em outros receptores. A atividade quinásica do receptor fosforila, então, outros sítios do domínio citoplasmático (Lodish et al., 2000).

1.1.2 – Família dos Receptores de Superfície Celular HER / ErbB

EGFR é um membro de uma família denominada HER ou ErbB composta, além do EGFR (também conhecido como ErbB-1 ou HER1), por ErbB-2/Neu/HER-2, ErbB-3/HER3 e ErbB-4/HER4. Todos os membros possuem em comum uma região de sítio de ligação extracelular, uma região transmembrânica pequena e um domínio citoplasmático contendo o sítio de tirosinoquinase, exceto HER3 que não possui este último domínio ativo (Ullrick et al., 1984; Gullick, 1998; Olayioye et al., 2000; Yarden, 2001;

Holbro & Hynes, 2004; Normanno et al., 2006). Entretanto, quando HER3 dimeriza-se com outro membro da família, torna-se fosforilado e capaz de provocar sinalização intracelular (Carraway et al., 1997; Grünwald & Hidalgo, 2003).

O domínio intracelular de tirosinoquinase dos receptores ErbB é altamente conservado em todos eles. Em contraste, os domínios extracelulares são menos conservados entre esses quatro receptores, sugerindo um complexo ligante-receptor bem variado e numeroso, ou seja, cada receptor tem um ligante específico, mas não exclusivo (Olayioye et al., 2000; Yarden, 2001; Yarden & Sliwkowsky, 2001; Normanno et al., 2006).

Os receptores ErbB são ativados pela ligação dos fatores de crescimento que são produzidos na mesma célula que expressam esses receptores (sinalização autócrina) ou por células vizinhas (sinalização parácrina) (Lodish et al., 2000; Olayioye et al., 2000; Yarden & Sliwkowsky, 2001; Normanno et al., 2006).

As proteínas que pertencem a essa família são caracterizadas pela presença de pontes dissulfeto, que conferem especificidade por domínios de imunoglobulinas, por sítios de ligação com heparina e por sítios de glicosilação. Dessa maneira, a afinidade dos fatores de crescimento com um ou mais receptores, permite dividí-los em três grupos (Riese & Stern, 1998; Olayioye et al., 2000; Yarden & Sliwkowsky, 2001; Holbro & Hynes, 2004).

O primeiro grupo inclui o fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento transformador alfa (TGF-α) e anfiregulina (AR), que se ligam especificamente ao EGFR. O segundo grupo inclui β-celulina (BTC), heparina-EGF (HB-EGF) e epiregulina (EPR), que apresentam ligação com EGFR e ErbB-4. O terceiro grupo é composto pelas neuregulinas (NRGs) e podem ser divididas em dois subgrupos baseados na afinidade de ligação ao ErbB-3 e ErbB-4 (NRG-1 e NRG-2) ou somente ao ErbB-4 (NRG-3 e NRG-4) (Carraway et al., 1997; Chang et al., 1997; Zhang et al., 1997; Harari et al., 1999; Nicholas et al., 2006). Nenhum dos peptídeos da família EGF ligam-se ao ErbB-2, devido à conformação do seu domínio extracelular (Holbro & Hynes, 2004; Nicholas et al., 2006) (Tabela 1).

Em condições fisiológicas normais, a ativação dos receptores de ErbB é controlado pela expressão espacial e temporal de seus ligantes (Riese & Stern, 1998). No momento em que um ligante específico do fator de crescimento se acopla ao domínio extracelular do EGFR, este se dimeriza com outro EGFR (homodimerização) ou com outro membro da família ErbB (heterodimerização), induzindo a formação de diferentes homo e heterodímeros e, como conseqüência, o domínio intrínseco de quinase é ativado, resultando na autofosforilação, e sendo finalizado pela quebra da proteína no lisossomo com a parada da sinalização (Riese & Stern, 1998; Kleihues & Cavanee, 2000; Olayioye et al., 2000; Yarden & Sliwkowsky, 2001; Arteaga, 2002; Roskoski, 2004).

A Tabela 1 mostra de forma resumida os 4 membros dessa família, seus respectivos ligantes e parceiros na dimerização, e se possuem atividade quinásica ou não.

TABELA 1 – RELAÇÃO ENTRE OS MEMBROS DA FAMÍLIA HER E SEUS LIGANTES.

Receptor	Sinônimos	Ligantes	Parceiros na dimerização	Atividade quinásica
EGFR	ErbB1, HER1	EGF, TGF-α, HB-EGF, AR, BTC, EPR	EGFR, HER2, HER4	+
HER2	ErbB2, neu	—	EGFR, HER3, HER4	+
HER3	ErbB3	NRG-1	HER2, HER3, HER4	-
HER4	ErbB4	NRG-1, NRG-2, NRG-3, NRG-4,	EGFR, HER2, HER3, HER4	+

1.2 – Estrutura do EGFR

O EGFR é um receptor de superfície celular que controla a iniciação de processos celulares como adesão e migração e apresenta um papel essencial na transdução de sinal para proliferação, crescimento, diferenciação, sobrevivência e apoptose celulares, quando ativado por seus ligantes específicos (Riese & Stern, 1998; Woodburn, 1999; Olayioye et al., 2000; Yarden & Sliwkowsky, 2001; Andersson et al., 2004; Roskoski, 2004; Arteaga, 2002; Ciardello & Tortora, 2003).

O gene EGFR humano está localizado no braço curto do cromossomo 7, mais especificamente na região 7p12.1-12.3 e codifica, via *splicing* alternativo, 4 diferentes isoformas. A isoforma 1 (também conhecida como *p170*) que é a mais estudada pelos oncologistas, é composta por 28 exons, 1210 aminoácidos (aa) e transcreve 1500 pb em seu RNAm. Proteínas menores como as isoformas 3 (*p110* com 705 aa, com perda do aa 706 ao 1210) e 4 (com 628 aa, com perda do aa 629 ao 1210) resultam do processamento do gene, e a isoforma 2 (*p60* ou *TEGFR*, *truncated EGFR*, com 405 aa, com perda do aa 405 em diante) deve agir como uma antagonista para o sinal principal traduzido pela isoforma 1 (Belda-Iniesta et al, 2008).

A proteína analisada no presente estudo é a isoforma 1 ou EGFR do tipo selvagem (wild-type EGFR, EGFRwt), uma glicoproteína transmembrânica, que possui 170 kDa (decorrendo a denominação *p170*) e é composta por três domínios ou regiões principais (Riese & Stern, 1998; Woodburn, 1999; Kleihues & Cavanee, 2000; Olayioye et al., 2000; Yarden & Sliwkowsky, 2001; Andersson et al., 2004; Roskoski, 2004; Arteaga, 2002; Ciardello & Tortora, 2003; Holbro & Hynes, 2004; Belda-Iniesta et al, 2008), conforme mostra a Figura 1:

1 – domínio extracelular, com estrutura acopladora do ligante;

2 – domínio transmembrânico, que ancora e estabiliza a estrutura do receptor como um todo;

3 – domínio intracelular, com o sítio catalítico da tirosinoquinase e múltiplos sítios de autofosforilação agrupados na porção C-terminal.

Segundo Kleihues & Cavanee (2000) há um quarto domínio na região C-terminal, responsável pela endocitose, que finaliza o processo da ativação do EGFR.

Dos 28 exons, os exons 1 ao 14 codificam o domínio extracelular, o exon 15 codifica o domínio transmembrânico, e os exons 16 ao 28 codificam o domínio intracelular, incluindo o domínio de tirosinoquinase (Pedersen et al., 2001).

A porção extracelular é dividida em quatro domínios menores. Os domínios I (ou L1) e III (ou L2) são pobres em cisteína e contém conformacionalmente o sítio em que o ligante (EGF ou TGF-α) se acopla (Figura 2). Os domínios ricos em cisteína, II (ou CR1) e IV (ou CR2), contêm sítios de N-glicosilação e cerca de 10 (dez) pontes dissulfeto cada, que determinam a conformação terciária do domínio externo do receptor (Carpenter & Cohen, 1990; Roskoski, 2004; Nair, 2005).

O acoplamento do ligante ao domínio extracelular do EGFR resulta em dimerização do receptor e, uma vez ativado, essa ativação enzimática irá iniciar uma cascata de fosforilação em muitas proteínas responsáveis na modulação da proliferação, diferenciação e motilidade celular (Belda-Iniesta et al, 2008). Dessa maneira, a ativação da tirosinoquinase tem como conseqüência primária a autofosforilação, seguida de ativação de moléculas sinalizadoras que levará à transdução de sinal intracelular, e em seguida, à mitogênese (Carpenter & Cohen, 1990; Kuan et al., 2001). Além dos resíduos de tirosina, a porção carboxi-terminal também possui resíduos de serina-treonina, necessários à endocitose do receptor (Nair, 2005). A perda de todo esse controle, por ligantes em excesso, perda dos mecanismos de controle, presença de receptores mutantes, e assim por diante, podem levar essa sinalização intracelular a promover todos esses efeitos, beneficiando o crescimento de células tumorais (Belda-Iniesta et al, 2008).

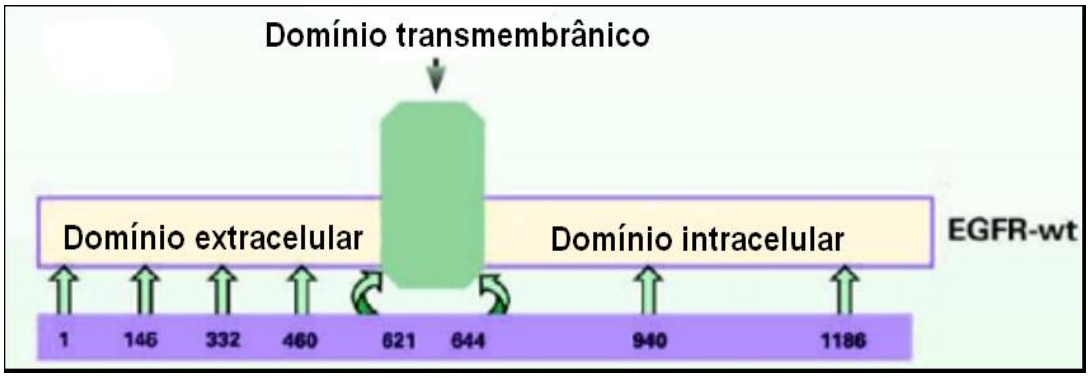


FIGURA 1. ***Estrutura da proteína selvagem EGFR (EGFRwt) composta por seus 3 domínios principais e 1210 aminoácidos.*** Esquema modificado de Nicholas et al. (2006).

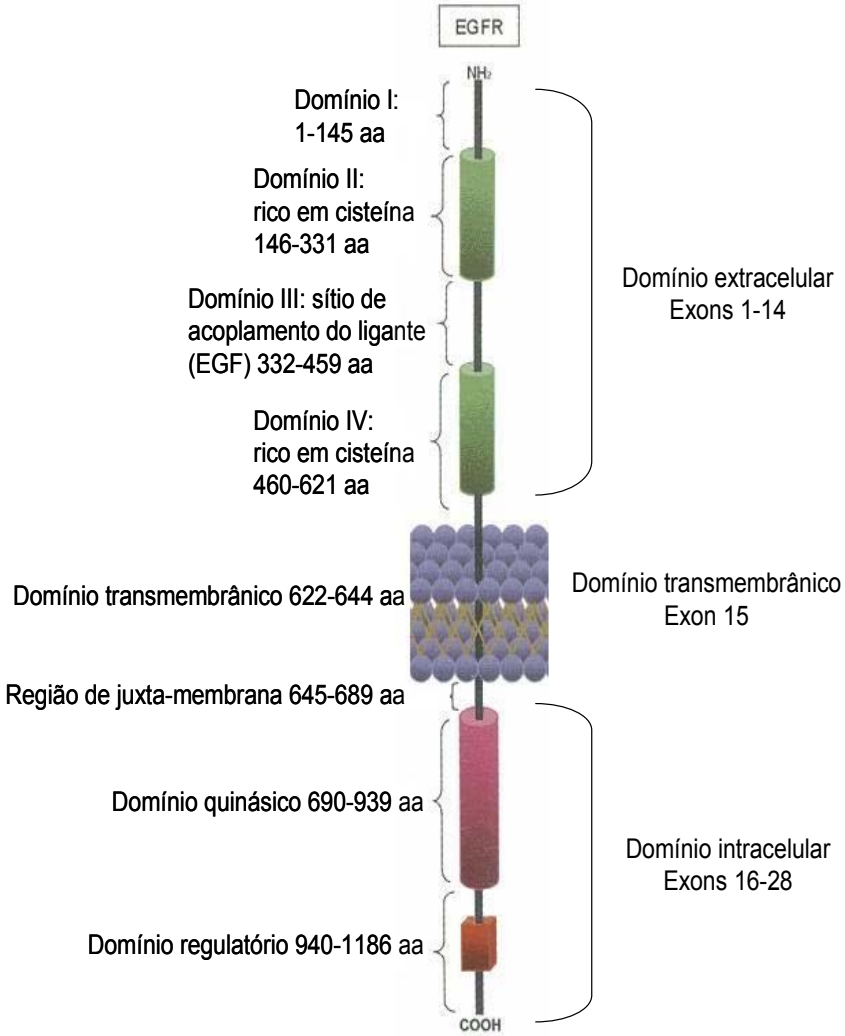


FIGURA 2. ***Representação linear da proteína selvagem* EGFR.** A porção extracelular é constituída por seus 4 domínios menores (I-IV), além do domínio transmembrânico e o intracelular, constituído pela região de juxta-membrana e pelos domínios quinásico e regulatório, todos com seus respectivos aminoácidos (aa) e exons correspondentes. NH_2: região amino-terminal; COOH: região carboxi-terminal. Esquema modificado de Pedersen et al. (2001).

1.3 – Citocinas e Interleucinas

Citocinas é o termo genérico empregado para designar um grupo muito extenso de moléculas envolvidas na emissão de sinais entre as células durante o desencadeamento das respostas imunes. Todas as citocinas são pequenas proteínas ou peptídeos, algumas contendo moléculas de açúcar ligadas, denominadas glicoproteínas, sendo que as diferentes citocinas podem ser enquadradas em diversas categorias: fator estimulador de colônias (CSF), fator de necrose tumoral (TNFα e TNFβ), fator de transformação de crescimento (TGFβ), interferons (IFN), e interleucinas (IL) (Naoum, 2001).

As interleucinas compõem um grande grupo de citocinas denominadas por IL-1 a IL-15, produzidas principalmente por células T, embora algumas sejam sintetizadas também por macrófagos e células teciduais. Estes grupos são constituintes dos sistemas imunológicos dos organismos e possuem uma variedade de funções, mas a maioria delas está envolvida na indução da divisão de outras células. Cada interleucina atua sobre um grupo limitado e específico de células que expressam receptores adequados para cada interleucina (Naoum, 2001).

1.4 – IL-13: Estrutura, Caracterização e Funções

A interleucina 13 (IL-13) foi primeiramente descrita em 1989 como P600, uma proteína preferencialmente produzida por células T_H2 ativadas de camundongos (Hershey, 2003). Dessa maneira, a IL-13 é uma citocina pleiotrópica, ou seja, pode atuar sobre diversos tipos celulares, e secretada pelas células B, mas predominantemente pelas células T_H2 ativadas (Murata et al, 1997; Thompson & Debinski, 1999; Hershey, 2003; Han et al., 2005).

O gene que codifica a IL-13 é composto por 4 exons e 3 introns, e está localizado no braço curto do cromossomo 5, na região 5q31, a mesma região cromossômica dos genes que codificam, além da IL-4, a IL-3, IL-5 e IL-9 (Hershey, 2003).

Pertencendo à família de citocinas de classe tipo I, cujos membros exibem uma homologia estrutural, embora uma dessemelhança na seqüência de aminoácidos, a IL-13 compartilha muitas de suas características e propriedades funcionais com a interleucina 4 (IL-4), incluindo a subunidade α do receptor da IL-4 (IL-4Rα), embora também apresentem funções distintas uma da outra (Murata et al, 1997; Thompson & Debinski, 1999; Hershey, 2003; Han et al., 2005).

A IL-13 apresenta diversas funções em uma vasta variedade de tipos celulares, as quais desempenham papel chave na patogênese da inflamação alérgica, e no envolvimento em funções imunorregulatórias interagindo com células B, monócitos e macrófagos, e até mesmo com células somáticas, como as endoteliais (Thompson & Debinski, 1999; Hershey, 2003). Em células B, a IL-13 apresenta efeitos similares a IL-4, incluindo promoção de proliferação, crescimento e diferenciação das células B, e indução da expressão de antígenos de superfície. Nos monócitos e macrófagos, a IL-13 aumenta a expressão de muitos membros da família das integrinas, importantes na adesão celular. Adicionalmente, a IL-13 inibe a produção de mediadores pró-inflamatórios pelos monócitos e macrófagos, como as prostoglandinas, além de ativar os monócitos, contribuindo na síntese de IgE (Naoum, 2001; Hershey, 2003). A IL-13 possui funções importantes também em células não-hematopoiéticas, incluindo as células endoteliais, epiteliais, musculares e fibroblastos (Hershey, 2003).

Através de estudos de espectometria de massa foi revelado que, ao contrário da IL-4, a IL-13 contém duas pontes dissulfeto, ao invés de três. Outra notável diferença entre ambas as citocinas é a habilidade que possuem em agir em diferentes espécies. A IL-4 é espécie-específica, ou seja, a IL-4 humana somente age em células humanas, e a de camundongos somente age em células de camundongos. Contrariamente, a IL-13 não atua de modo espécie-específica, pois a IL-13 de camundongos pode agir tanto em células de camundongos quanto em humanas, entretanto, a IL-13 humana parece agir mais potencialmente em células humanas (Hershey, 2003). Adicionalmente, ao contrário da IL-4, a IL-13 não possui efeito nas

células T. Os efeitos dessas citocinas são mediados através de seus receptores de superfície (Murata et al, 1997; Hershey, 2003).

1.5 – Receptores de IL-4 e IL-13, incluindo o Receptor α2 de Interleucina-13 (IL-13Rα2)

Da mesma maneira que a IL-13 é uma citocina tipo I, seus receptores também o são, e, portanto, são definidos por diversas características, incluindo 4 resíduos de cisteína conservados e módulos de fibronectina tipo II no domínio extracleular, além de regiões ricas em prolina no domínio intracelular, importantes para a ligação no sítio Janus de tirosinoquinase (JAK). Esses receptores formam heterodímeros e não possuem atividade quinásica intrínsica, entretanto, possuem JAK associados constitutivamente (Hershey, 2003).

Existe um total de 4 receptores entre IL-4 e IL-13, os quais estão mostrados esquematicamente na Figura 3. Ambos, IL-4 e IL-13, utilizam uma proteína de 140 kDa, IL-4Rα, como componente de seus receptores, sendo que esta, apresenta maior afinidade a IL-4. IL-4Rα pode ser do tipo I, que apresenta uma cadeia comum γ (γc) (**1**), e do tipo II, que apresenta uma cadeia alternativa, IL-13Rα1 (**2**). A cadeia γc não se liga diretamente a IL-4 e IL-13, mas é essencial na sinalização desse receptor tipo I. A cadeia IL-13Rα1 é dita alternativa, devido a estudos realizados a respeito da função da cadeia γc, que demonstraram que ambas as citocinas IL-13 e IL-4, apresentavam respostas à ativação, mesmo na ausência de γc, o que sugeriu a presença de um receptor alternativo (Hershey, 2003; Kawakami et al., 2004).

Além de IL-13Rα1 (**3**), a IL-13 possui outro receptor cognato, o IL-13Rα2 (**4**). Ambos são membros da superfamília de receptor hematopoetina (família do receptor de citocina tipo I), compartilham 37% de homologia em sua seqüência de aminoácidos, entretanto, o IL-13Rα2 tem maior afinidade de ligação a IL-13. Contudo, quando IL-13Rα1 pareia-se com IL-4Rα, esse

complexo liga-se com grande afinidade a IL-13 (Hershey, 2003; Kawakami et al., 2004).

Ambos os genes desses receptores $\alpha 1$ e $\alpha 2$ de IL-13 estão localizados no braço longo do cromossomo X, nas regiões Xq13.1-q28 e Xq24, respectivamente. Este último codifica uma proteína de 65 kDa e com 380 aminoácidos, que tem sido encontrada no baço, fígado, pulmão, timo e cérebro (Hershey, 2003; Bozinov et al., 2008).

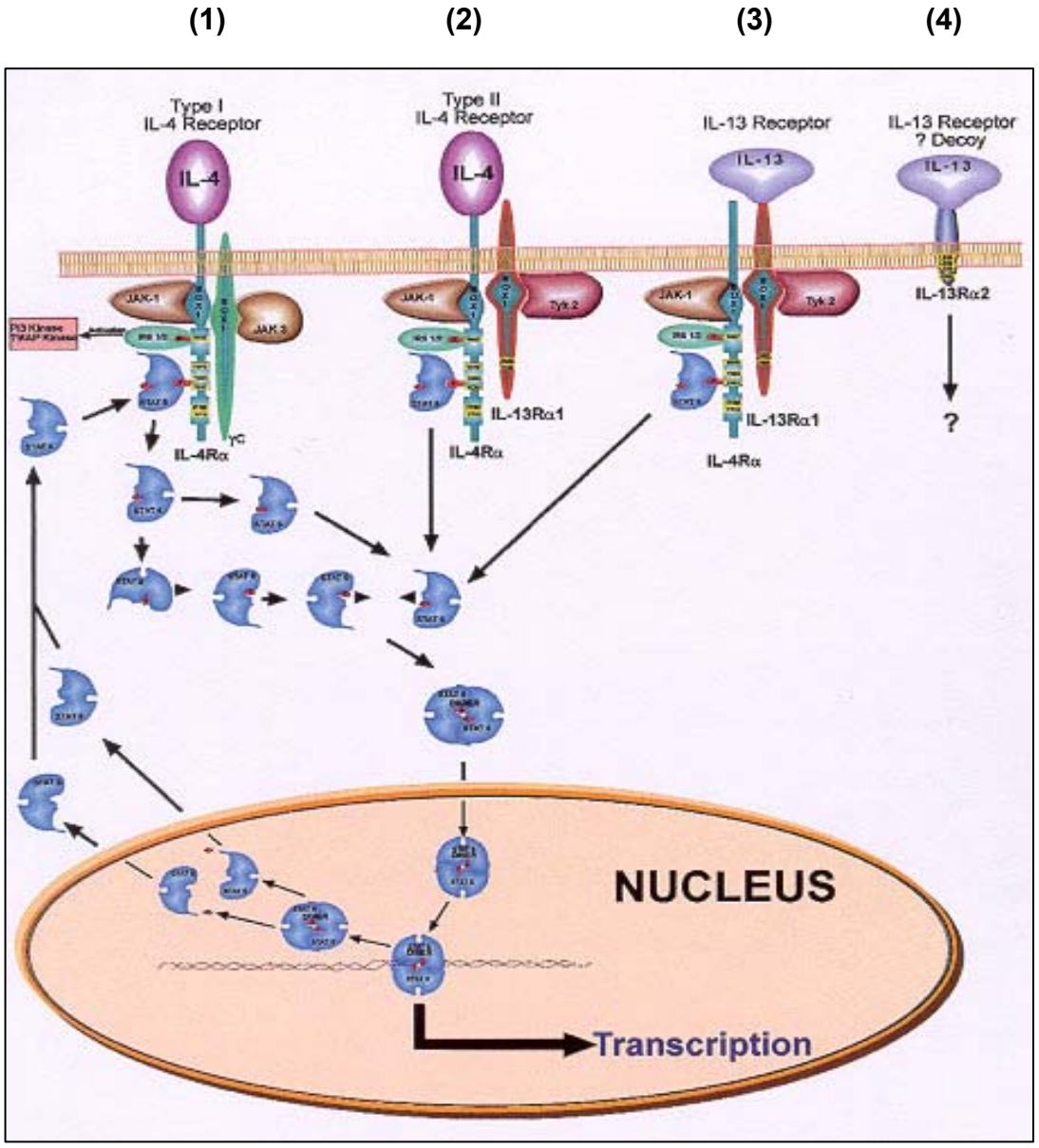


FIGURA 3. ***Esquema ilustrando as vias de sinalização intracelular através da ativação dos 4 receptores de IL-4 e IL-13*** **(Hershey, 2003).**

A expressão conjunta de IL-13Rα1 e IL-4Rα é suficiente para tornar as células sucetíveis a IL-13 e, portanto, o IL-13Rα2 não é requisitado para essa função. Estudos *in vitro* demonstram que IL-13Rα2 possui uma alta afinidade de ligação a IL-13, entretanto, essa forte ligação é insuficiente para a entrada dessa citocina nas células, mesmo na presença de IL-4Rα. Dessa maneira, especula-se que IL-13Rα2 seja um receptor atrativo ou armadilho, contudo, a função biológica desse receptor ainda não está muito esclarecida (Hershey, 2003).

Além disso, estudos *in vivo* demonstram que a hiperexpressão de IL-13Rα2 pode diminuir a sinalização de IL-13. Recentemente, IL-13Rα2 foi identificado como uma molécula intracelular amplamente presente em cultura de monócitos, células epiteliais respiratórias, epitélio respiratório primário e monócitos humanos primários, concluindo-se que essa característica de IL-13Rα2 não é restrita a um único tipo celular (Hershey, 2003).

1.6 – Vias de Sinalização da IL-13

A sinalização da IL-13 dá-se através da utilização da via de transdução de sinal JAK e a via de transcrição ativadora STAT, especialmente a STAT6 (Hershey, 2003).

JAKs são tirosinoquinases que contêm um domínio catalítico verdadeiro e um pseudo domínio quinásico. São 4 JAKs: JAK1, JAK2, JAK3 e Tyk2 (Hershey, 2003).

A IL-4 inicia a sinalização na transmembrana ativando dois tipos de receptores: o receptor tipo I composto pela subunidade IL-4Rα que liga-se a IL-4 e a cadeia γc. Jak1 e Jak3 constitutivamente associam-se a IL-4Rα e a γc, respectivamente. O receptor tipo II consiste da cadeia IL-4Rα e da subunidade IL-13Rα1, receptor de baixa afinidade para IL-13, que constitutivamente associa-se a Jak2 ou Tyk2, levando a IL-13 utilizar-se desse receptor tipo II para a sua sinalização celular. Portanto, IL-4 e IL-13

apresentam funções biológicas superponíveis em muitos tipos celulares que expressam componentes do receptor tipo II (Rahaman et al, 2002).

A ligação da IL-4 ou IL-13 ao receptor leva a heterodimerização de duas subunidades do receptor, que por sua vez liga-se a duas moléculas de Jak que permite a trans-fosforilação de um resíduo específico de tirosina localizado no segmento ativado de Jak, promovendo a atividade quinásica da molécula de Jak. IL-4 e IL-13 ativam duas vias intracelulares de sinalização: via Jak-STAT e a via IRS-fosfatidilinositol 3´quinase. Enquanto a via IRS-fosfatidilinositol promove a proliferação celular e a sobrevivência, a via Jak-STAT induz os genes de transcrição que contêm o elemento STAT-6. Este, quando fosforilado, forma um homodímero e migra para o núcleo da célula, ligando-se a N6-GAS que estimula a transcrição (Figura 3) (Rahaman et al, 2002). Toda esta sinalização dos receptores de interleucinas 4 e 13 estão ilustradas na Figura 3.

A interação de IL-13 e IL13Rα2 não acarreta a ativação da via Jak/STAT6, apenas ocorre uma subseqüente internalização de IL-13 (Kawakami et al., 2001).

1.7 – Tumores do Sistema Nervoso Central (SNC)

Os tumores primários do SNC se originam no tecido cerebral e são classificados pelo tipo de células do qual se originam (Louis et al., 2007). Os tumores do SNC são raros, entretanto, sua incidência e mortalidade têm aumentado em muitos países, incluindo o Brasil (Monteiro & Koifman, 2003).

Os gliomas são os tumores do SNC mais freqüentes, derivando-se das células gliais. Há diversos tipos de gliomas, incluindo os oligodendrogliomas e os astrocitomas, sendo estes últimos, as neoplasias intracranianas mais freqüentes, perfazendo aproximadamente 60% dos tumores primários do SNC (Louis et al., 2007).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) os astrocitomas são classificados de acordo com a presença de indicadores como hiperproliferação endotelial (a parede do vaso é constituída por células endoteliais empilhadas ao invés de uma única camada), mitoses (com configuração normal e anormal), atipia nuclear e necrose (Louis et al., 2007).

Dessa maneira, a gradação tumoral é determinada pelo número de critérios, sendo que o astrocitoma grau I não apresenta características infiltrativas e, portanto, de malignidade; o grau II apresenta 1 critério de malignidade, geralmente atipia nuclear; o grau III apresenta 2 critérios, geralmente atipia nuclear e mitoses; e o grau IV apresenta 2 ou 3 critérios, atipia nuclear, mitoses, proliferação endotelial e/ou necrose. Adicionalmente, os astrocitomas do grau II a IV são denominados astrocitomas difusamente infiltrativos, por suas características infiltrativas (Tabela 2). Dessa forma, os astrocitomas são classificados de acordo com o grau de malignidade de I a IV (Louis et al., 2007).

TABELA 2 – CLASSIFICAÇÃO DOS ASTROCITOMAS SEGUNDO A ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (2007).

Grau		**Tumor**	**Características Histológicas**
I		Astrocitoma pilocítico	ausência de critério de anaplasia
Astrocitomas difusamente infiltrativos	**II**	Astrocitoma de baixo grau	1 critério, geralmente atipia nuclear
	III	Astrocitoma anaplásico	2 critérios, geralmente atipia nuclear e atividade mitótica
	IV	Glioblastoma multiforme	3 ou 4 critérios: atipia nuclear, mitoses, proliferação endotelial e/ou necrose

1.7.1 – Astrocitoma Pilocítico (grau I)

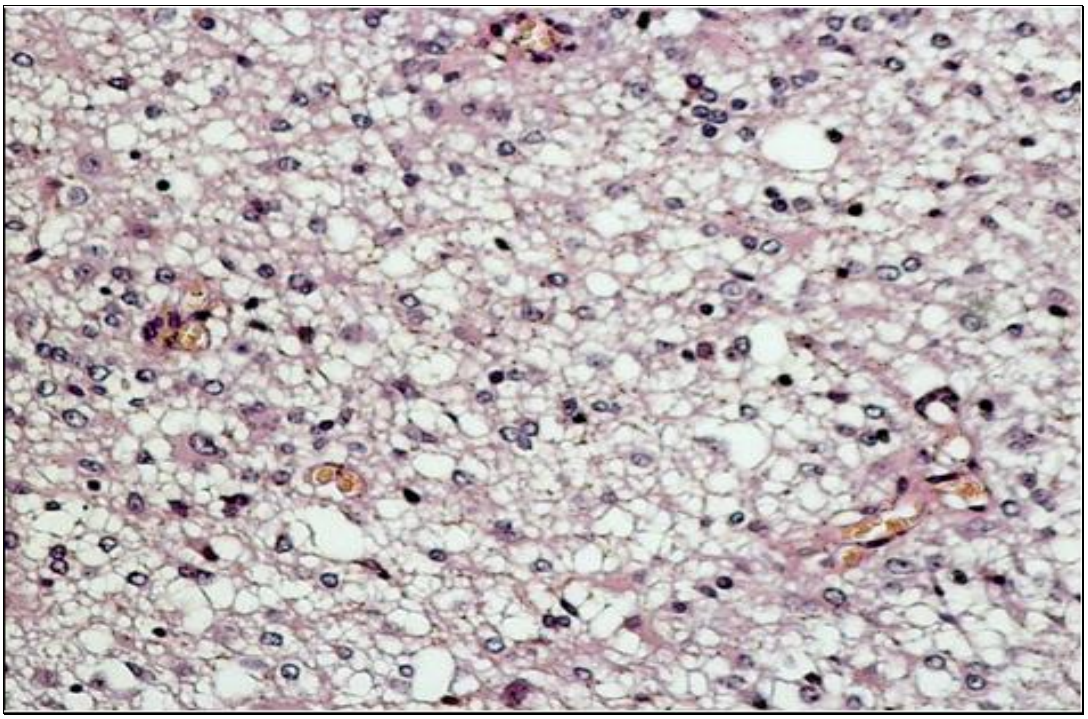
Astrocitomas pilocíticos são, em geral, circunscritos, de crescimento lento e mais comum em crianças e adultos jovens (Louis et al., 2007; Reifenberger & Collins, 2004). Histologicamente são caracterizados por baixa ou moderada celularidade, por um padrão bifásico com proporção variada de células bipolares compactadas com presença de fibras de Rosenthal e células soltas de estruturas multipolares com microcistos e corpos granulares (Louis et al., 2007). Proliferação vascular, proliferação celular, pleomorfismo, necrose não em paliçada e alguma atividade mitótica, ainda são consistentes com esse diagnóstico. Contudo, casos raros mostram alta atividade mitótica e necrose com formação em paliçada, que indicam comportamento de um tumor mais agressivo, sendo classificado como astrocitoma pilocítico anaplásico (Reifenberger & Collins, 2004).

Dessa maneira, segundo a OMS, os astrocitomas pilocíticos possuem um excelente prognóstico após ressecção cirúrgica (Louis et al., 2007).

A maioria desses tumores se desenvolve no cerebelo, e representam 10% dos astrocitomas cerebrais e 85% dos cerebelares (Louis et al., 2007; Reifenberger & Collins, 2004). Outras regiões típicas incluem estruturas como o nervo óptico e quiasma óptico, hipotálamo, tálamo, gânglios da base e tronco cerebral. Entretanto, astrocitomas pilocíticos também podem ser encontrados nos hemisférios cerebrais ou na medula espinhal. Macroscopicamente essas neoplasias apresentam-se como maleáveis, acizentadas e, freqüentemente, com lesões císticas (Reifenberger & Collins, 2004).

A Figura 4 ilustra um caso de astrocitoma pilocítico (AP) corado com hematoxilina-eosina (HE) em 2 aumentos diferentes (200 e 400x).

A



B

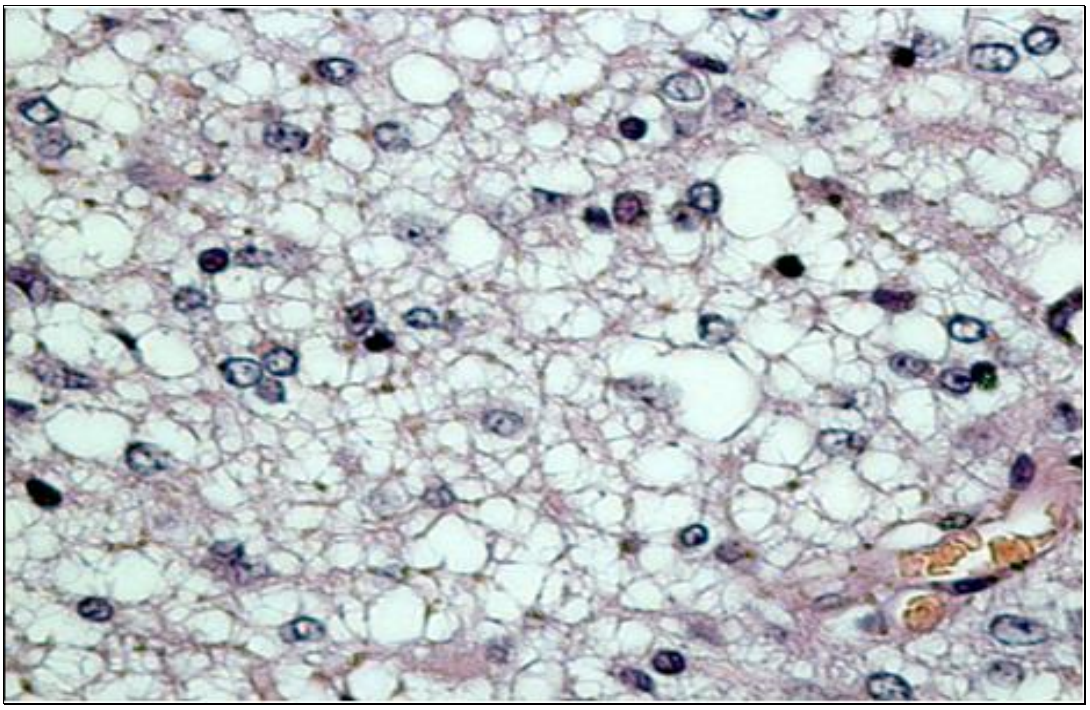


FIGURA 4. ***Microscopia óptica corada com Hematoxilina-eosina (HE) de um caso de astrocitoma pilocítico.*** **Em A aumento de 200x e em B aumento de 400x*.***

1.7.2 – Astrocitoma Difuso ou de Baixo Grau (grau II)

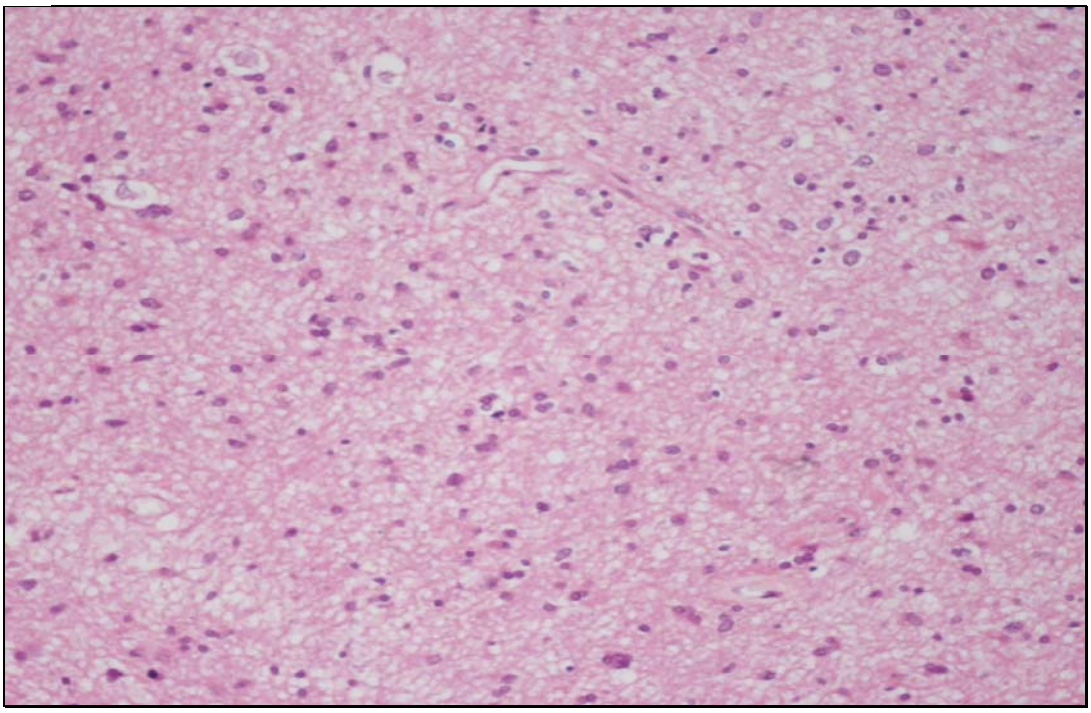
Os astrocitomas de baixo grau são predominantes no gênero masculino, afetam freqüentemente adultos jovens, com um pico na terceira década de vida, entre 30 e 40 anos (Louis et al., 2007).

Esses tumores representam de 10 a 15% de todos os tumores astrocíticos e podem estar localizados em qualquer região do SNC, mas preferencialmente nos hemisférios cerebrais, com uma infiltração difusa de estruturas adjacentes ao tumor (Louis et al., 2007). Após intervenção cirúrgica, a média de sobrevida é de cerca de 6 a 8 anos, embora haja uma variação individual, com alguns casos permanecendo latentes por vários anos e outros progredindo rapidamente para astrocitomas de maior grau de malignidade (Daumas-Duport et al., 1988).

De pacientes com recidiva tumoral de astrocitoma grau II, a segunda amostra cirúrgica freqüentemente mostra características de astrocitoma anaplásico, como hipercromasia, aumento de atipia nuclear, atividade mitótica, e, eventualmente, características de glioblastoma, como proliferação microvascular e/ou necrose. A progressão para a anaplasia é imprevisível, assim como o tempo que estas mudanças levam para ocorrer (Louis et al., 2007).

A Figura 5 ilustra um caso de astrocitoma grau II (AGII) corado com HE em 2 aumentos diferentes (200 e 400x).

A



B

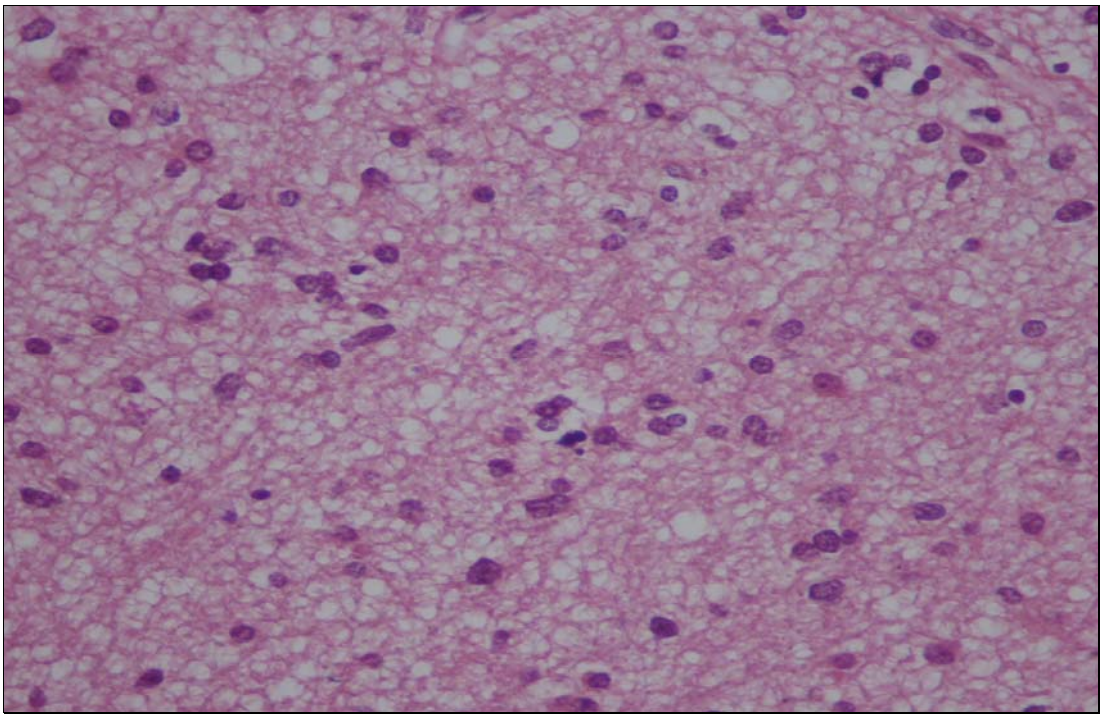


FIGURA 5. ***Microscopia óptica corada com HE de um caso de astrocitoma de baixo grau.*** **Em A aumento de 200x e em B aumento de 400x.**

1.7.3 – Astrocitoma Anaplásico (grau III)

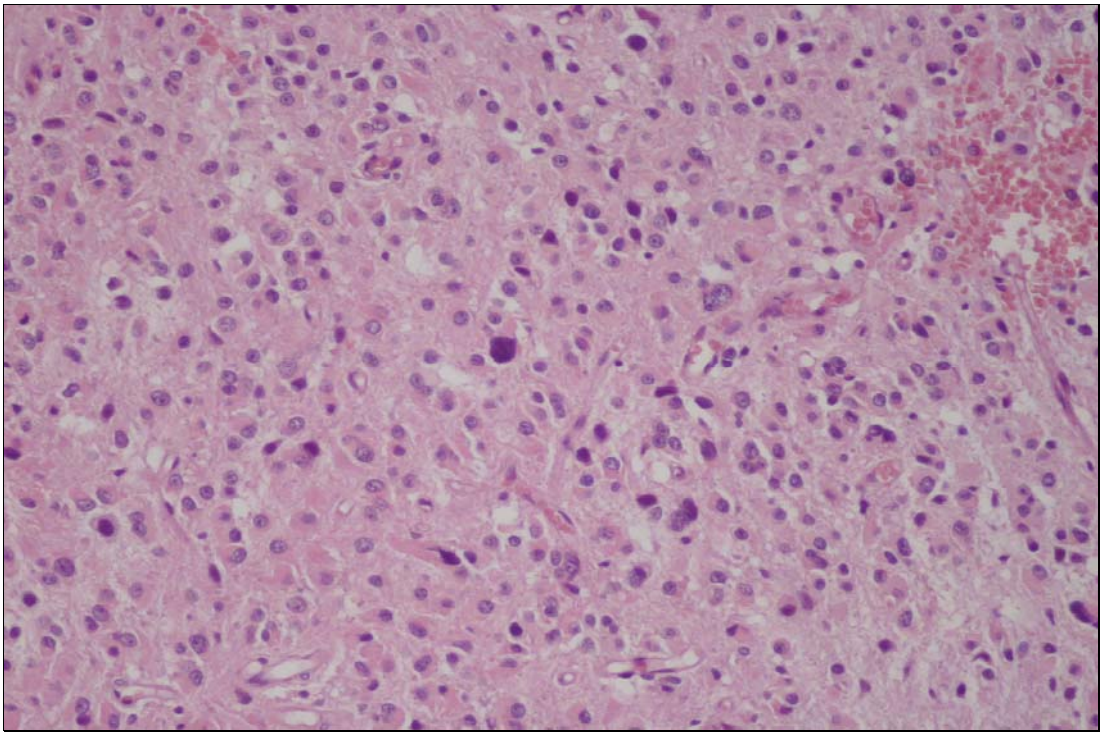
Os astrocitomas anaplásicos acometem preferencialmente homens adultos com idade média de 41 anos, são tumores infiltrativos com anaplasia focal ou dispersa e um grande potencial proliferativo. Sua localização é semelhante a dos astrocitomas de baixo grau, com preferência pelos hemisférios cerebrais (Louis et al., 2007).

Estes tumores se originam da progressão de um astrocitoma de baixo grau, e, em um intervalo médio de aproximadamente 2 anos, possuem uma tendência intrínseca a progredirem para glioblastomas, (Watanabe et al., 1997).

Assim, dos pontos de vista clínico, morfológico e genético, pode-se considerar que o astrocitoma anaplásico constitui um estágio intermediário na rota de progressão para um GBM. Devido a uma variação considerável no período de latência e a rapidez com que esses tumores progridem, há a necessidade de marcadores prognósticos adicionais.

A Figura 6 ilustra um caso de astrocitoma anaplásico (AA) corado com HE em 2 aumentos diferentes (200 e 400x).

A



B

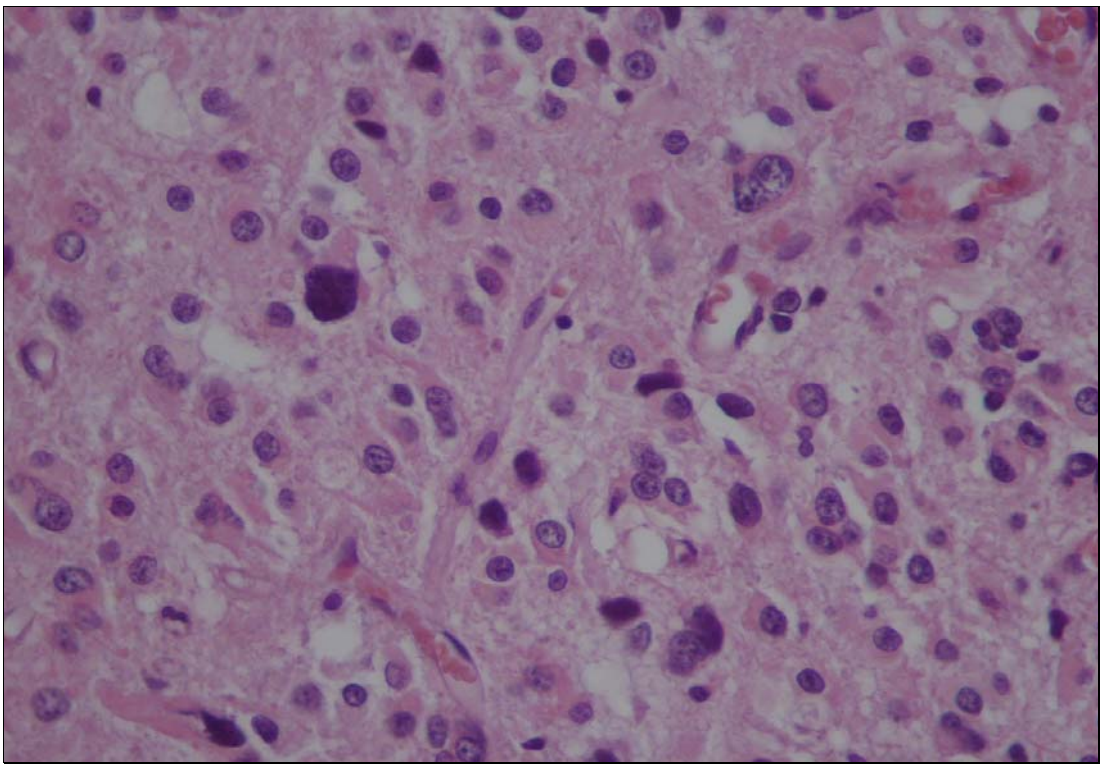


FIGURA 6. ***Microscopia óptica corada com HE de um caso de astrocitoma anaplásico.*** **Em A aumento de 200x e em B aumento de 400x.**

1.7.4 – Glioblastomas Multiforme (grau IV)

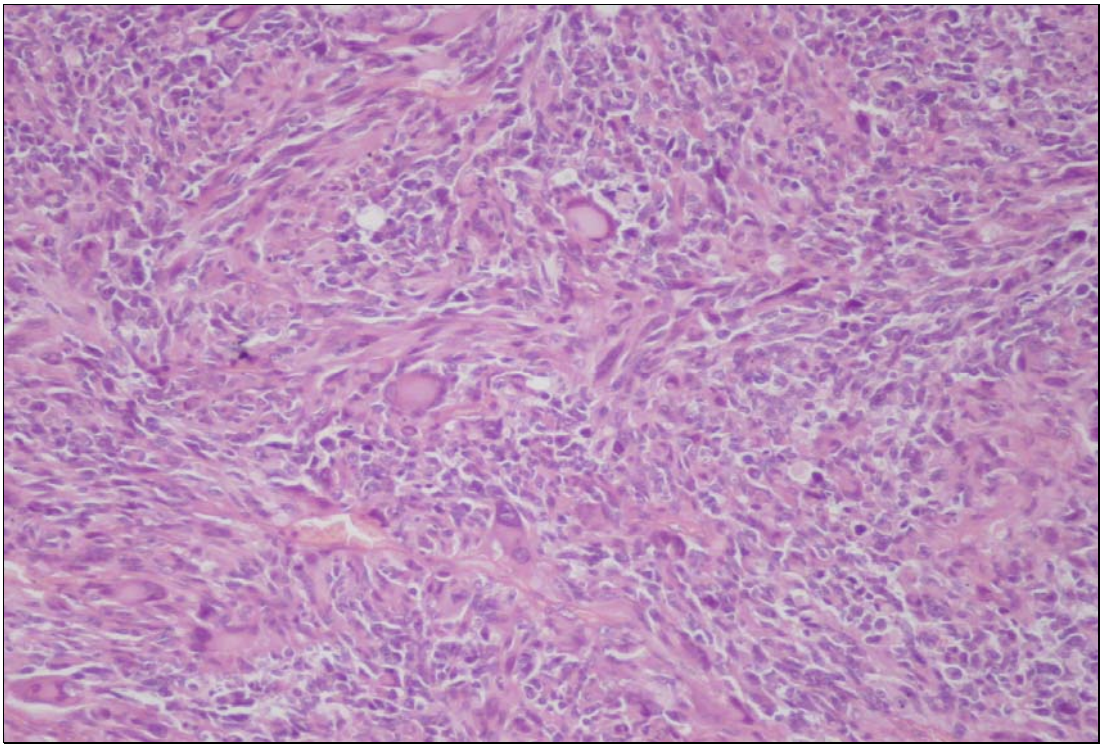
Os glioblastomas multiformes (GBMs), ou apenas denominados, glioblastomas, são os mais malignos dos tumores astrocíticos perfazendo cerca de 50% dos mesmos e de 20 a 25% do total das neoplasias intracranianas, tornando-os os tumores mais freqüentes do SNC (Surawicz et al., 1999). GBMs ocorrem mais freqüentemente na substância branca dos hemisférios cerebrais e podem se manifestar em qualquer idade, mas afetam preferencialmente homens adultos entre 45 e 70 anos de idade com incidência de aproximadamente 70% (Louis et al., 2007).

Os glioblastomas primários são mais freqüentes em pessoas com mais idade (idade média de 55 anos). Após uma história clínica muito curta, normalmente menos de 3 meses, estes tumores se manifestam de novo, ou seja, sem qualquer evidência clínica ou histopatológica da existência de uma lesão menos maligna anterior. Este tipo de glioblastoma parece ser resistente à radioterapia, com lesões altamente infiltrativas e, deste modo, tem um pior prognóstico (Kleihues & Ohgaki, 1999).

Os glioblastomas secundários se desenvolvem tipicamente em pacientes mais jovens (idade média de 45 anos), através da progressão 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. Os glioblastomas secundários ocorrem em pacientes com história clínica e biópsias seqüenciais de astrocitomas de menor grau (Kleihues & Ohgaki, 1999).

A Figura 7 ilustra um caso de glioblastoma (GBM) corado com HE em 2 aumentos diferentes (200 e 400x).

A



B

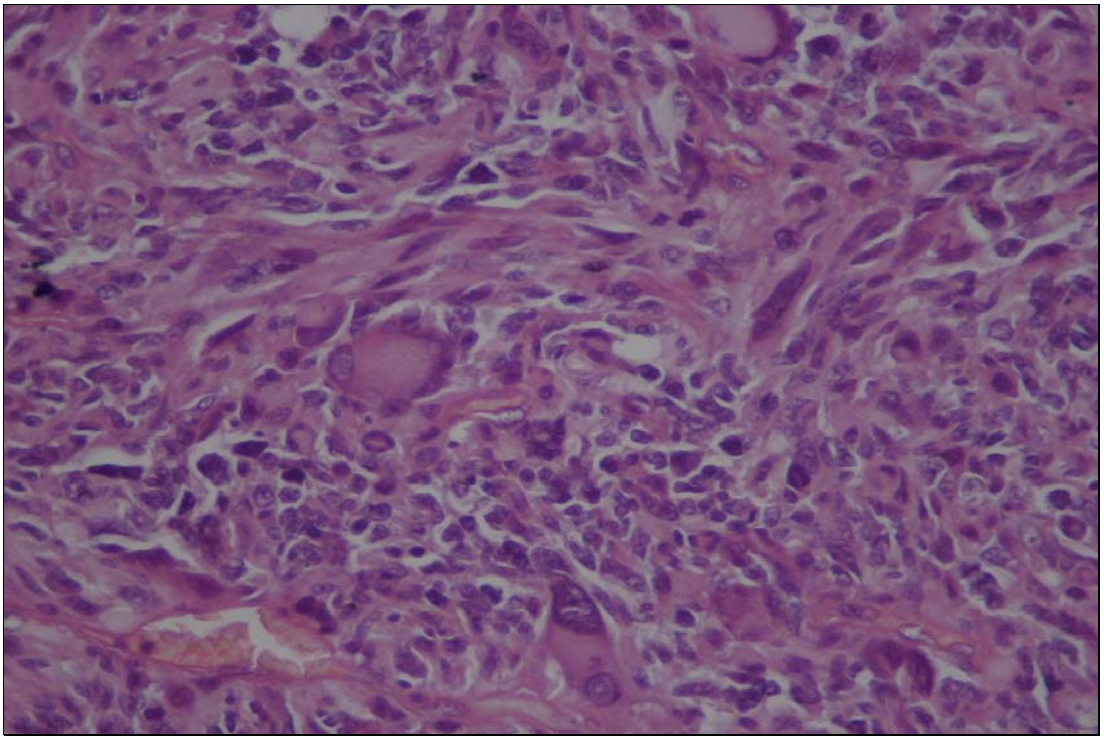


FIGURA 7. ***Microscopia óptica corada com HE de um caso de glioblastoma.*** **Em A aumento de 200x e em B aumento de 400x.**

Existem várias alterações na progressão de astrocitomas difusamente infiltrativos e há um número cada vez maior de evidências de que glioblastomas primários e secundários sejam distintos, uma vez que evoluem passando por aquisições cumulativas de múltiplas e diferentes alterações genéticas (Collins & James, 1993; Ohgaki et al, 1995; Von Deimling et al, 1995; Furnari et al., 1996; Ohgaki & Kleihues, 2007). Há o envolvimento de um grande número de oncogenes. Seus produtos aceleram o crescimento celular e estão tipicamente alterados por amplificação de genes, como o *EGFR* ou por mutações que os ativam. Além disto, há uma freqüente perda de heterozigosidade de várias porções dos cromossomos, incluindo 9p, 10q, 11p e 19q, o que significa perda de *locus* de possíveis genes supressores de tumor (Von Deimling et al., 1995; Ohgaki & Kleihues, 2007) (Figura 8).

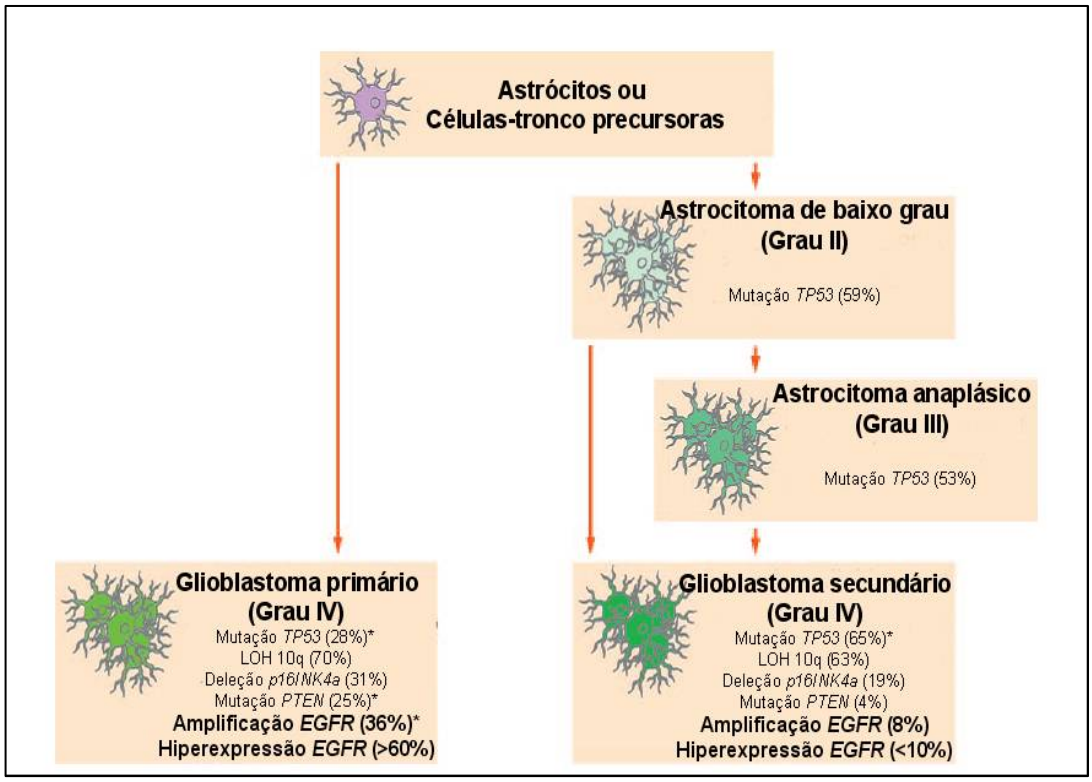


FIGURA 8. ***Vias de alterações genéticas mais comuns envolvidas na progressão de astrocitomas difusos (classificação de acordo com a OMS).*** O esquema mostra que o glioblastoma secundário se desenvolve a partir de um astrocitoma de baixo grau ou de um astrocitoma anaplásico, e glioblastoma primário se manifesta de novo, sem qualquer evidência clínica ou histopatólogica da existência de uma lesão menos maligna anterior. Existem várias alterações genéticas diferenciadas na progressão dos astrocitomas difusos e eventos como amplificação do gene EGFR e hiperexpressão estão presentes em aproximadamente 40 e 60%, respectivamente, em glioblastoma primário, sendo eventos raros na progressão de glioblastoma secundário. Esquema modificado de Ohgaki & Kleihues (2007).

1.8 – EGFR, IL13Rα2 e Câncer

A hiperexpressão do EGFR e/ou mutações ou deleções na seqüência do gene EGFR têm sido encontradas em aproximadamente 30% dos tumores primários humanos e têm sido associadas com o estágio da doença, prognóstico, sobrevida e resposta à quimioterapia. Esse aumento de expressão foi detectado em uma variedade imensa de tumores como câncer de mama, pulmão, bexiga, rim, ovário, próstata, esôfago, cólon, pâncreas, cabeça e pescoço e até mesmo em GBMs (McLendon et al., 2007; Grandis & Sok, 2004; Ware et al., 2003; Kitange et al., 2003; Maher et al., 2001).

Entre os mecanismos do aumento de expressão do EGFR estão a ativação da transcrição e a amplificação do gene. Sugere-se que a formação do câncer resulte da ativação constitutiva do receptor, ou ativação do receptor inapropriadamente prolongada, levando ao bloqueio por endocitose (Ware et al., 2003; Kitange et al., 2003; Maher et al., 2001).

Essa ativação constitutiva pode ser resultado da sinalização autócrina, da hiperexpressão do receptor, e até mesmo, de mutações. Interessantemente, estudos *in vitro*, sugerem que a hiperexpressão de EGFR por si só é insuficiente para causar a ativação do receptor, sendo necessário o acoplamento do ligante. Isto pode ser explicado pela coexpressão de um ligante, como TGF-α, com EGFR, freqüentemente encontrado em tumores primários. Estudos realizados em poucos pacientes com diferentes tipos de tumor sugerem que a coexpressão de EGFR e seus ligantes está associada a um pior prognóstico (Holbro & Hynes, 2004).

Em muitas linhagens de células humanas, a expressão de TGF-α possui uma forte correlação com a hiperexpressão de EGFR e, assim, o TGF-α parece agir de maneira autócrina, estimulando a proliferação dessas células via ativação de EGFR (Carpenter & Cohen, 1990).

Estudos prévios também relataram que linhagens celulares de gliomas humanos malignos expressam elevados níveis do receptor de IL-13, particularmente de IL-13Rα2 em GBM, que inibe a ativação de STAT6. Esta

inibição parece ser mediada pela interação física entre um curto domínio intracelular da IL-13Rα2 e o domínio citopasmático de IL-4Rα, que contém o sítio receptivo de STAT6. Portanto, IL-13Rα2 age como um inibidor da via de transdução de sinal dependente de IL-4 (Rahaman et al, 2002). Comparados a esses tumores, tecidos cerebrais não neoplásicos não apresentam este aumento no nível de expressão de IL-13Rα2 (Mintz et al., 2003; Kawakami et al., 2004; Joshi et al., 2008). No caso dos GBMs, a maioria deles (80%) apresenta aumento no nível de expressão desse receptor se comparado ao tecido cerebral não tumoral (Allen et al., 2008).

O receptor de IL-13 tem sido utilizado como alvo de terapia imunogênica. O grupo de Puri et al desenvolveu uma proteína de fusão recombinante composta de IL-13 e a forma mutante da citotoxina de *Pseudomonas* (IL13-PE38QQR ou IL-13-citotoxina). Esta parece ser altamente seletiva e potente em matar as células de GBM *in vitro*, enquanto células normais incluindo células imunes, células endoteliais e células cerebrais normais são poupadas do efeito citotóxico, decorrente da baixa expressão do receptor de IL-13 nestas células. A citotoxina IL-13 demonstrou também um efeito anti-tumoral nos modelos animais de xenograft, com boa tolerância e com mínimo de toxicidade para os órgãos vitais (Hussain et al, 2001; Hussain & Puri, 2003; Mintz et al., 2003; Kawakami et al, 2004; Wykosky et al., 2008).

Em contrapartida, Jarboe et al (2007) demonstra que na Fase III recentemente concluída, a IL13-PE38QQR apresenta-se de forma menos efetiva no prolongamento da sobrevida de pacientes com gliomas malignos. Uma das explicações para essa ocorrência pode estar no fato de que a fração de células que expressam IL-13Rα2 no tumor irá responder à IL13-PE38QQR, enquanto que as células que não expressam esse receptor dentro do tumor não responderão e, portanto, continuarão se proliferando.

Recentemente, Eguchi et al. (2006) desenvolveram um peptídeo análogo ao IL-13Rα2 capaz de induzir aumento da resposta antiglioma dos linfócitos T citotóxicos em gliomas malignos humanos. A partir desse estudo, muitos outros estão em andamento para o desenvolvimento de vacinas para uma imunoterapia baseada em peptídeos (Shimato et al., 2008; Xiaobing et al., 2007; Jiang et al., 2007), e até mesmo baseada em anticorpos, como demonstrou um outro estudo recente, *in vivo*, de estratégias de imunoterapia baseadas na proteína e no DNA, no intuito, ainda, de se erradicar resíduos microscópicos das células de astrocitomas de alto grau que inevitavelmente causam a recidiva da doença e morte (Mintz et al., 2008).

Além disso, IL-13Rα2 tem sido amplamente utilizando como terapia por vetores virais, como o recombinante do vírus do herpes simples (Zhou et al., 2005), o vetor adenoviral Ad5 (Ulasov et al., 2007) e com o vírus do sarampo (Allen et al., 2008).

1.9 – Coexpressão entre *EGFR* e *IL13Rα2*

Como nem todos os casos com EGFR hiperexpressos tanto em nível de RNAm como de proteína apresentam amplificação e/ou mutação de *EGFR*, devem ser considerados outros mecanismos regulatórios desse processo, como polimorfismos, coexpressão com seus ligantes (TGF-α) e até mesmo, a coexpressão com outros genes e/ou receptores de superfície celular relacionados ao processo de tumorigênese.

Liu et al. (2003 a) realizaram um estudo comparativo entre as expressões dos genes EGFR, IL13R, IL4R e TfR (receptor de transferrina) por imunofluorescência e verificaram que EGFR e IL13R apresentaram marcação positiva apenas nos tecidos tumorais (gliomas de alto grau), enquanto que IL4R e TfR apresentaram positividade em tecido não tumoral (endotélio cerebral normal e astrócitos normais). Além disso, 10 dos 38 pacientes estudados por estes autores mostraram coexpressão de EGFR e IL13R (Liu et al., 2003 a).

No final deste mesmo ano, esse mesmo grupo desenvolveu a combinação de proteínas de fusão do fator de crescimento epidérmico da toxina humana de difteria (DAB(389)EGF) e da citotoxina de *Pseudomonas* (IL13-PE38QQR). Este estudo permitiu sugerir um tratamento combinado de ambas as proteínas de fusão, devido ao seu poder apoptótico nas linhagens de células de GBM, se comparado com um tratamento para cada alvo em separado (Liu et al., 2003 b).

Recentemente, o grupo de Stish et al. (2008) desenvolveu a combinação da citotoxina IL-13 com uma forma truncada da toxina de difteria do fator de crescimento epidérmico (DT(390)). Essa combinação foi adicionada a uma mesma e única cadeia protéica, denominada DTEGF13, a qual tem elevado potencial apoptótico em linhagens de GBM (U87MG e U118MG), e em linhagens de carcinomas pulmonares (Calu-3). Dessa maneira, esse grupo propõe um novo agente terapêutico que reconhece simultaneamente EGFR e IL-13R, levando a uma bi-especificidade e uma maior eficácia contra células de GBM.

Com esse mesmo intuito, o grupo de Vallera et al. (2008) utilizou-se dessa mesma combinação bi-específica, em linhagens celulares de câncer pancreático (PANC-1 e MiaPaCa-2) e adenocarcinoma de pulmão (H2981-T3), complementado com um estudo funcional in vivo.

1.10 – Mecanismos para Ativação de EGFR Mediada pela Via de Transdução de Sinal em Gliomas

A ativação das vias de transdução de sinal em GBMs pela fosforilação de receptores da família ErbB é também influenciada por outros fatores. O complexo EGFR-TK (tirosinoquinase) apresenta papel chave em numerosos processos que afetam o crescimento e progressão tumoral, incluindo proliferação, dediferenciação, inibição da apoptose, invasibilidade e perda da dependência da adessão (Nair, 2005; Yarden, 2001).

A fosforilação dos resíduos de tirosinoquinase em EGFR funciona como domínio de ligação ao complexo Grb2/Sos, que então ativa a cascata

de sinalização Ras/Raf/MAPK, que influencia a proliferação, migração e diferenciação celular (Oksvold et al., 2002; Nair, 2005; Nicholas et al., 2006).

Membros da via MAPK têm sido associados com variadas funções dentro do proceso de tumorigênese, já que essa via é responsável pela regulação da proliferação, diferenciação, sobrevivência, angiogênese e metástases em vários tipos de tumores. Entretanto, a via MAPK não está necessariamente associada com a progressão maligna dos gliomas, pois também está presente em gliomas de baixo-grau (McLendon et al, 2007).

O recrutamento de uma outra via de sinalização, a da fosfotidilinositol 3-quinase (PI3K), resulta na inibição do mecanismo de apoptose nas células tumorais (Nair, 2005). A PI3K é uma enzima crítica na ativação da via Akt (Nicholas et al., 2006). AKT, também conhecida como proteína quinase B é um oncogene, não somente porque desempenha papel importante na sobrevivência da célula, mas também porque regula a proliferação, motilidade e expressão de fatores angiogênicos (McLendon et al, 2007).

A ativação de Akt ocorre como conseqüência da fosforilação mediada por PI3K da fosfatidilinositol 4,5-difosfato para a forma trifosfato, a fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato. PI3K também pode ser ativada por PDGFR (receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas). A via Akt então ativada inibe a apoptose enquanto promove a divisão celular (Nair, 2005; Nicholas et al., 2006). Em seguida, PTEN converte PI3,4,5-trifosfato em PI4,5-difosfato, inibindo a atividade de Akt (Nicholas *et al*., 2006). Enquanto PI3K e Akt são reguladores positivos da via, PTEN é um regulador negativo. (Belda-Iniesta et al., 2008). Dessa maneira, o gene PTEN é frequentemente deletado em glioblastomas, assim, a ativação da sinalização da via Akt é favorecida tornando-se constitutivamente ativa (Nicholas *et al*., 2006). Alterações nesse gene supressor de tumor, *PTEN*, como mutação e metilação, têm sido identificadas, em pelo menos, 60% dos GBMs (Koul, 2008).

As mutações *Ras* também levam a essa ativação constitutiva em muitos tumores, resultando em proliferação celular (Nicholas et al., 2006).

A representação da ativação dessas vias de sinalização intracelular através da interação de EGFR com seus ligantes, ou independente dessa interação, uma vez que pode ser encontrado na sua forma deletada EGFRvIII, onde está constitutivamente ativado, pode ser visualizado na figura abaixo (Figura 9).

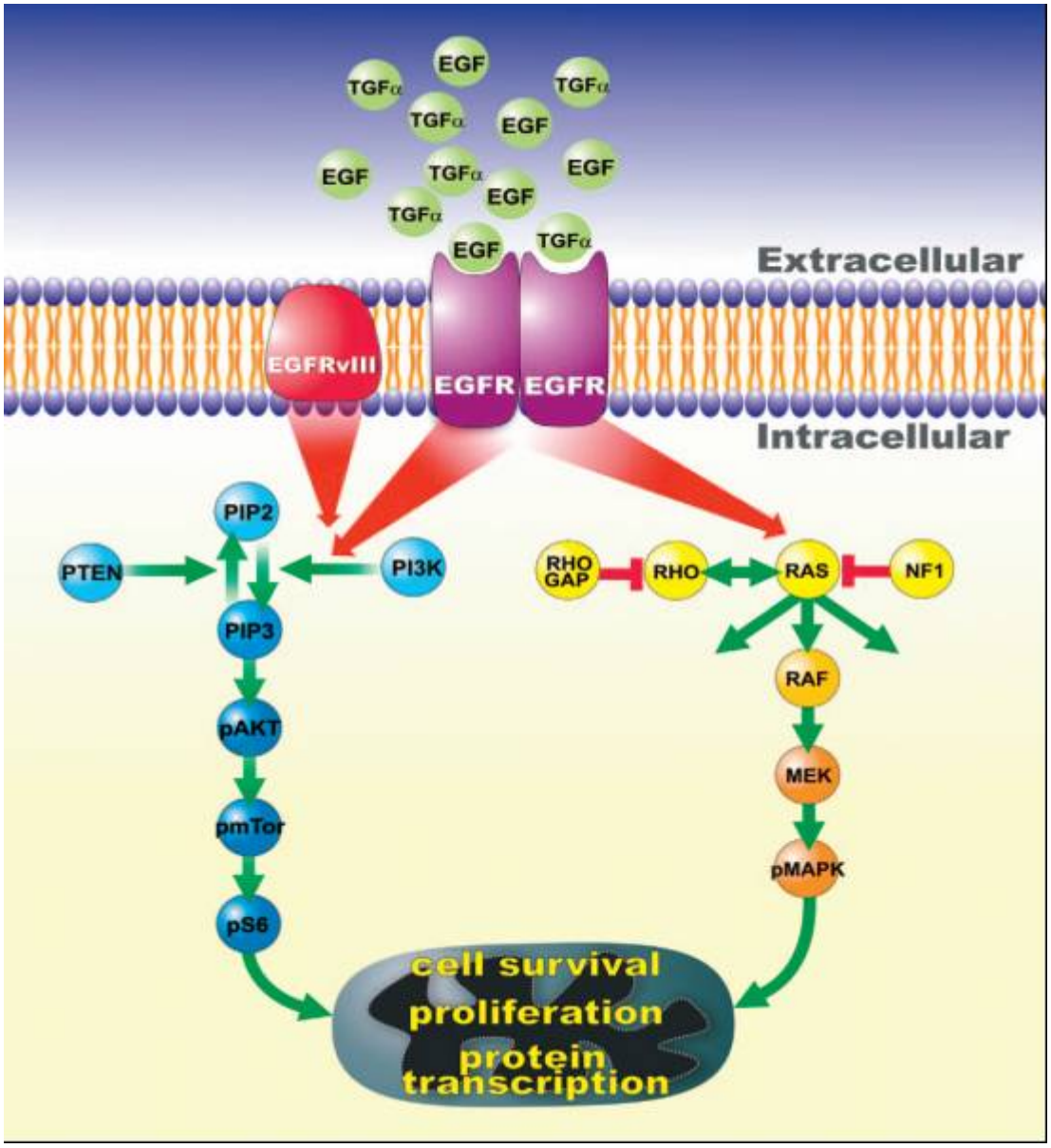


FIGURA 9: ***Mecanismos de ativação de EGFR pelas vias de transdução de sinal PI3K/Akt/PTEN e Ras/Raf/MAPK***. EGFR é ativado pela ligação com EGF ou TGFα em seu domínio extracelular, dimeriza-se, levando a sinalização intracelular através das vias de transdução de sinal representadas, promovendo sobrevivência da célula, proliferação e transcrição de proteínas. Em contrapartida, EGFRvIII, constitutivamente ativado, por si só, promove essa mesma sinalização e funções celulares (McLendon et al, 2007).

1.11 – Localização Nuclear da Família HER / ErbB

EGFR, bem como os demais membros da família HER/ErbB, têm sido detectados no núcleo de muitos tecidos e linhagens celulares e essa capacidade de translocação nuclear e a função fisiopatológica desse processo na tumorigênese ainda não está bem descrita atualmente (Lin et al., 2001; Nair, 2005; Hoshino et al., 2007). RTKs são predominantemente encontrados no núcleo de duas formas: ou como uma molécula intacta ou com seu domínio citoplasmático fragmentado (Nair, 2005).

Os receptores HER4 após sua ativação com seu ligante heregulina (neuregulinas) ou ativação via proteinoquinase C (PKC), apresenta uma clivagem subseqüente da metaloprotease pela secretase-gama que libera seu domínio intracelular da membrana, facilitando sua translocação para o núcleo (Ni et al., 2001; Carpenter, 2003). Assim como HER4, HER3 e EGFR que possuem heregulinas como ligantes, também se apresentam translocados no núcleo (Li et al., 1996; Offterdinger et al., 2002; Nair, 2005).

A região carboxi-terminal de EGFR contém um forte domínio de transativação, região rica em prolina, e liga-se a uma seqüência dependente de transcrição rica em AT (ATRS), incluindo o sítio promotor ciclina D1, proteína chave na mitogênese (Lin et al., 2001; Nair, 2005).

HER2/neu também apresenta função de transativação similar ao EGFR (Xie & Hung, 1994). Adicionalmente, FGFR, NGFR, PDGFR, fator de crescimento insulina-dependente, entre outros, também apresentam localização nuclear (Reilly & Maher, 2001; Carpenter, 2003).

Os RTKs também podem carregar outras moléculas como STAT 1 para dentro do núcleo e esses receptores associados a essas moléculas são funcionais no núcleo, ativando, desse modo, a trancrição de genes (McBride et al., 2000). Esses achados desafiam o dogma de que os RTKs estimulem vias mitogênicas somente pela sinalização na membrana plasmática ou nos endossomos (Carpenter, 2003).

Recentemente, Xu et al. (2009) demonstraram que a irradiação ultravioleta induz a translocação nuclear de EGFR em queratinócitos humanos.

1.12 – Hiperexpressão e Amplificação de *EGFR*

Em gliomas, a amplificação do gene EGFR é o mecanismo predominante para hiperexpressão da proteína correspondente, e estima-se que a freqüência da amplificação de *EGFR* por análises genéticas em astrocitomas varie de 37 a 58%. A amplificação está principalmente associada com GBMs e não associada com astrocitomas graus I, II e III (Kuan *et al*., 2001). Outros autores consideram ainda que a amplificação de *EGFR* é comum (30-40%) em GBMs primários e rara (5% em GBMs secundários), e em alguns astrocitomas anaplásicos (grau III), sendo esta amplificação associada a altos níveis de expressão do RNA mensageiro (RNAm) e da proteína (Nagane et al., 2001; Watanabe et al., 1997)

Mais de 90% dos tumores astrocíticos de alto grau expressam o antígeno EGFR, e a hiperexpressão associada com amplificação do gene encontra-se em mais de 50% dos glioblastomas (Kuan et al., 2001; Nicholas et al., 2006). A hipererexpressão da proteína sem amplificação do gene, contudo, tem sido reportada em 12-38% dos GBMs (Kuan et al., 2001).

Numa revisão mais recente de Ohagaki e Kleihues (2007) foi determinado que a amplificação de *EGFR* ocorre em 36% de GBMs primários e apenas em 8% de GBMs secundários, enquanto que a hiperexpressão de *EGFR* ocorre em mais de 60% nos GBMs primários e nos secundários, em menos de 10%, apenas. Adicionalmente, o grupo de Belda-Iniesta et al. (2008) reporta que além da expressão alterada de EGFR ocorrer em 60% dos casos de GBM, essa alteração ocorre também em 10% de astrocitomas grau III.

Um revisão mais detalhada dos estudos de expressão e amplificação de EGFR já reportados na literatura é apresentada na Tabela 3.

TABELA 3 – DADOS DA LITERATURA SOBRE ANÁLISE DA EXPRESSÃO E AMPLIFICAÇÃO DE *EGFR* EM TUMORES.

EGFR	**Gene/ Crom**	**Tipo de Tumor**	**N casos**	**Resultados**	**Referência**
Expressão	*ER, PR, HER2, CK5/6, CK14*	Cancer de mama invasivo	284	Critérios: Nielsen (ER-/HER2-/CK5/6+ e/ou EGFR+) = 15,5%; Kim (ER-/PR-/HER2-/CK5/6+ e/ou CK14+ e/ou EGFR+) = 14,8%; Triplo-negativo (ER-/PR-/HER-) = 43,3%; e Basal-CK (CK5/6+ e/ou CK14+) = 21,1%. Câncer de mama células tipo basal são mais propensas a apresentarem recorrência e pior evolução, e o critério diagnóstico imunohistoquímico apresentou diferença, sendo essencial um critério diagnóstico uniforme para futuros estudos neste tipo de tumor.	Liu et al., 2009
Expressão		Câncer colorretal	primários (1) = 94; nódulos metastáticos (2) = 49; metástases distantes (3) = 19	IHQ – Hipoexpressão - 0,1 e Hiperexpressão – 2,3: (1) – 18%; (2) – 24%; (3) – 21% hiperexprtessão EGFR. A expressão de EGFR pode estar discordante entre primários, nódulos e metátases em câncer colorretal. Hiperexpressão EGFR em linfonodos metastáticos parecem ser mais precisos quanto à sobrevida preditiva, se comparados com os outros 2 grupos.	Deng et al., 2009
Expressão	*HER2*	Carcinoma gástrico mucino (MGC) X Não mucinos	133	MGCs têm menor incidência de hiperexpressão protéica de HER2 e EGFR, bem como amplificação de HER2. Análise multivariada identificou hiperexpressão EGFR como fator associado a pior prognóstico (p=0,047). As características clínico-patológicas e moleculares de MGCs diferenciam-se das do NMGCs. Além disso, os resultados indicam que hiperexpressão EGFR e subtipo histológico pode ser útil para prever evolução clínica em pacientes com MGCs.	Choi et al., 2009

EGFR	Gene/ Crom	Tipo de Tumor	N casos	Resultados	Referência
Expressão	*p53*	Carcinoma células escamosas bexiga urinária	16 - média idade = 65,4 (de 41-77 anos)	Análise de expressão protéica por IHQ tanto de EGFR quanto de p53, sendo que todos os 16 casos apresentaram amrcação + para EGFR , e 11 deles apresentaram amrcação + para p53. Esse tipo tumoral frequentemente presente em estágio avançado está associado com hiperexpressão EGFR e p53.	Guo et al., 2009
Expressão	*HER2*	Carcinoma de bexiga	16	EGFR: expressão em 15 de 16 (3+, 9++ e 3+++) HER2: expressão em 3 (+) Sem coexpressão entre EGFR e HER2	Kaufman et al., 2008
Expressão Amplificação	*PTEN*	Osteosar-coma	28 –exp 27 - ampl	EGFR: expressão em 23 e 28 (82%) EGFR: amplificação: 4 de 27 (15%) e polissomia crom 7 em 12 de 7 (44%) PTEN: deleção em12 de 27	Freeman et al., 2008
Expressão RNAm	COX-2	Papiloma respiratório	Cultura primária do tumor	Ativação via EGFR → PI3K induz a hiperexpressão de COX-2.	Wu et al., 2005.
Expressão (RNAm x proteína)	Família ErbB	Gliomas e meningiomas	44 e 26 respecti-vamente	Hiperexpressão de *EGFR* em gliomas de alto grau e hipoexpressão ErbB2 e ErbB3; Hiperexpressão ErbB4 em gliomas de baixo grau. Maior expressão da proteína EGFR em gliomas de alto grau que nos de baixo grau (p=0,004); Expressão proteína ErbB2 em gliomas de alto grau e de poucos casos em ErbB3. Meningiomas com hiperexpressão de *EGFR,* ErbB2 e ErbB4, e em apenas um caso ErbB3. Hiperexpressão da proteína ErbB2 em meningiomas; Hiperexpressão da proteína EGFR leva ao decréscimo sobrevida astro e oligo grau II (p=0,04).	Andersson et al., 2004.

EGFR	Gene/ Crom	Tipo de Tumor	N casos	Resultados	Referência
Expressão Amplificação	*ErbB2*	Carcinoma gástrico	54	EGFR: amplificação em 4 casos (7%) e expressão em 7 (13%); ErbB2: amplificação e expressão em 6 casos (11%)	Kimura et al., 2004.
Expressão da proteína Amplificação repetição CA no intron 1		Câncer de mama	126 Japones es x 180 Alemães	Interação entre o comprimento da repetição CA no gene como fator de herança genética e a freqüência da amplificação como fator genético adquirido, sendo que ambos os fatores contribuem para a hiperexpressão de EGFR neste tipo de tumor.	Buerger et al., 2004.
Repetição CA no intron 1		Carcinoma mamário invasivo	222	4,7% repetição CA por FISH e 6,3% por QT-PCR; 17,3% hiperexpressão da proteína; 2,9% dos casos mostram tanto a amplificação do gene todo quanto a repetição CA; ≅ 20% dos casos com hiperexpressão mostram amplificação pela repetição CA e apenas 2,2% dos casos negativos na IHQ apresentaram amplificação; 13% dos hiperexpressos mostram amplificação por FISH e apenas 1,6% dos negativos para a IHQ apresentam amplificação; Dos hiperexpressos 4 (25%) mostraram ambas as amplificações.	Kersting et al., 2004.
2) Amplifi cação	1) Crom 10q; 3) *TP53* 4) *p16* 5) *PTEN*	GBM	715 Sobrevi da: 6m-2anos	1) 69%; 2) 34%; 3) e 4) 31%; 5) 24% 1+2/3/4/5 – menor sobrevida em GBM primário (95%) do que em secundário (5%), e este último, é caracterizado pela perda freqüente do crom 10q (63%), mutação em *TP53* (65%) e mutações no sítio CpG (56x30%, *p*=0,008)	Ohgaki et al., 2004.

EGFR	Gene/ Crom	Tipo de Tumor	N casos	Resultados	Referência
Amplificação	*TP53* *p16* crom 1p, 10q, 19q	GBM	60	Mutação *TP53* está significativamente associada com a idade. Interações da idade e mudanças genéticas em GBM sugerem que a tumorigênese desse tumor varie com a idade	Batchelor et al., 2004.
Amplificação Expressão	*TP53*	Gliomas pediátrico (≤17a)	28 de alto grau 12 grau II 9 grau III 7 grau IV	↑ da expressão com o ↑ grau do tumor (p<0,001); 2 casos grau IV intensa reatividade na membrana em 90% células tumorais em associação com a amplificação; 1 grau III com baixo nível de amplificação; 6 tumores com reação nuclear + para *TP53* e todos continham mutação para *TP53*; Nenhuma correlação foi observada em anormalidades com *TP53*, nem grau de malignidade, ou amplificação e hiperexpressão de *EGFR*	Gilbertson et al., 2003.
Expressão e Amplificação		Adenocarcinomas colorretal	36	31 de 20 mostraram hiperexpressão da proteína por IHQ e nenhuma amplificação de *EGFR*; Parece que a hiperexpressão da proteína ocorre via outro mecanismo que não a amplificação neste tipo de tumor, diferente de GBM	Layfield et al., 2003.
Amplificação	*TP53*	GBM	14	4 dos 6 casos com mutação em *TP53* apresentavam amplificação de *EGFR* em diferentes regiões; dos 8 casos sem mutações, 5 apresentavam amplificação em regiões bem difundidas; FISH sugere que a hiperexpressão EGFR, pode estar relacionada com a invasão tumoral	Okada et al., 2003.

EGFR	Gene/ Crom	Tipo de Tumor	N casos	Resultados	Referência
Expressão	*IL13R* *IL4R* *TfR*	Gliomas de alto grau	38: 30 GBM 8 AA X tecido normal	EGFR: 32 de 38 (84%) IL13R: 30 de 38 (79%) TfR: 25 de 38 (66%) IL4R: 17 de 38 (45%) Reatividade foi observada em tecido normal para IL4R e TfR; EGFR não foi detectado em tecido normal cerebral; 10 dos 38 casos mostraram expressão equivalente para EGFR e IL13R. Assim, alguns pacientes podem se beneficiar mais com uma terapia de fusão de proteínas, do que com uma única proteína	Liu et al., 2003 (a).
Amplificação	*PTEN* *p53* crom 7q 10q	Astro alto grau	174: 111 GBM 63 AA	Mutações em *PTEN*, amplificação *EGFR* e perda crom 10q é mais comum em GBM que em AA (p=0,033; p=0,001; p<0,001, respectivamente) e mutação em *p53* é mais comum em AA que em GBM (p<0,001). *PTEN* pode ser considerado fator prognóstico para AA e amplificação *EGFR* para pacientes acima de 60 anos com GBM	Smith et al., 2001.
Amplificação Expressão		Gliomas pediátricos de alto grau	27	80% dos casos estão hiperexpressos e apenas 2 casos com amplificação	Bredel et al., 1999.
Amplificação	*p53* crom 10	Astro alto grau	75: 12 AA 63 GBM	1) alteração *p53* sem perda crom 10 (13 meses; p=0,0058); 2) perda crom 10; 3) alteração *p53*+perda crom 10 (5,2 meses; p=0,0058); 4) perda crom 10 + amplificação *EGFR* (4 meses; p=0,0033) Sobrevida muito menor em 4 que em 1 (p=0,0075) e subtipos genéticos parecem ser importantes fatores prognósticos nesses tumores, enquanto que grau histológico parece ser menos importante.	Leenstra et al., 1998.

Astro=astrocitomas; GBM=glioblastomas; AA=astrocitoma anaplásico ou grau III; AII=astrocitoma de baixo grau ou grau II.

1.13 – Mutações em *EGFR*

Muitos tipos de mutações e/ou rearranjos do gene EGFR têm sido reportadas em glioblastomas, assim como a expressão de proteínas truncadas, e aproximadamente todos os casos com alterações apresentam amplificação do gene, o que representa um achado exclusivo neste tipo de neoplasia (Frederick et al., 2000; Nicholas et al., 2006).

Descreveu-se 5 (cinco) tipos de deleções como mostra a Tabela 4. A deleção do tipo EGFRvI apresenta sua região aminoterminal extensivamente truncada; EGFRvII possui uma deleção *in frame* de 83 aminoácidos no domínio IV da porção extracelular, correspondendo aos exons 14 e 15; EGFRvIII resulta da eliminação de um fragmento do DNA contendo os exons 2-7 do gene, causando uma deleção *in frame* de 801 pares de base; EGFRvIII/Δ12-13 além da perda dos exons 2-7, há perda dos exons 12 e 13; EGFRvIV e EGFRvV possuem deleções na porção intracelular, acarretando um receptor truncado no aminoácido 958 e perda dos aminoácidos 959-1030, respectivamente (Kuan et al., 2001).

As duplicações *in tandem* de exons específicos de *EGFR* ocorrem com baixa freqüência, assim como mutações missense da região juxtamembrana extracelular e as mutações desse tipo, ainda não são muito bem descritas (Nicholas et al., 2006).

A Figura 10 ilustra a forma deletada EGFRvIII que é o foco do prsente estudo.

TABELA 4 – DESCRIÇÃO DAS MUTAÇÕES DO GENE *EGFR* JÁ DESCRITAS EM GLIOMAS, COMPARANDO COM A FORMA SELVAGEM DESSE RECEPTOR.

Mutação	**Domínio**	**Receptores**	**Ativação dependente**	**Δ ou TD**	**Perda ou inserção de aa**	**Tamanho da proteína (kDa)**	**Freqüência em gliomas (%)**
		EGFRwt	+	Nenhuma	Nenhuma	170	
Deleções *in frame*	**Extracelular**	EGFRvI	–	N-terminal truncado	Perda 1-542 aa	145	NS
		EGFRvII	+	Δ exons 14-15	Perda 521-603 aa	150	15
		EGFRvIII	–	Δ exons 2-7	Perda 6-273 aa	145	60-70
		EGFRvIII/Δ 12-13	–	Δ exons 2-7 e 12-13	Perda 6-273 e 409-520 aa	125	NS
	Intracelular	EGFRvIV	+	Δ exons 25-27	Perda 959-1053 aa	167	NS
		EGFRvV	+	C-terminal truncado	Perda 959-1186 aa	105	15
Duplicações *in tandem*	**Extracelular**	EGFR.TDM /2-7	+	TD exons 2-7	Inserção 6-273 aa	180	NS
	Intracelular	EGFR.TDM /18-25	–	TD exons 18-25	Inserção 664-1014 aa	185	NS
		EGFR.TDM /18-26	–	TD exons 18-26	Inserção 664-1030 aa	190	NS

wt = wild-type (selvagem); Δ = deleção; TD = duplicação in tandem; aa = aminoácidos; NS = não significante

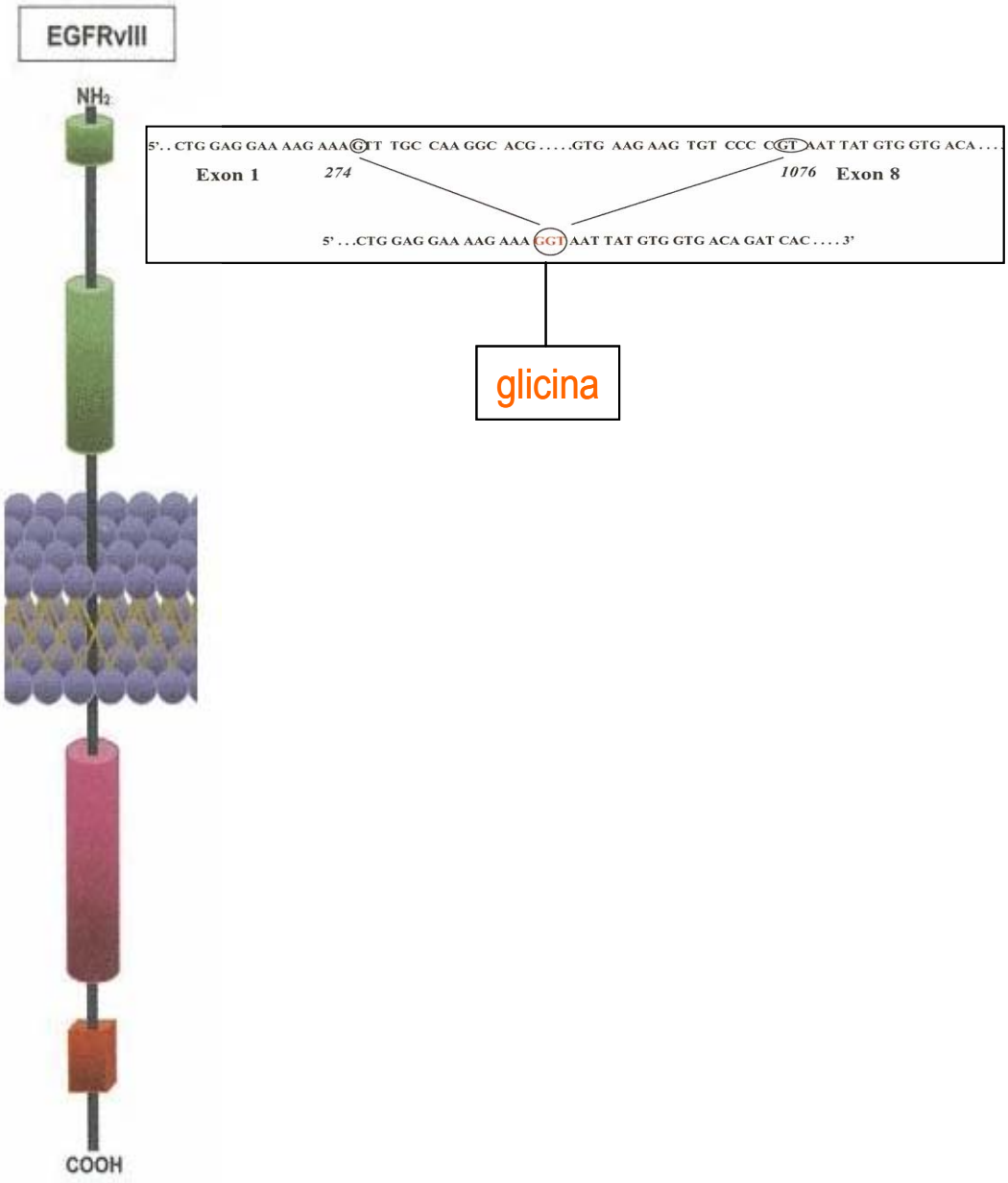


Figura 10. ***Representação linear da estrutura da proteína truncada EGFRvIII e a sua sequência de DNA complementar (cDNA) deletada, comparada com a sequência de cDNA de EGFRwt .*** Região amino-terminal (NH_2) extensivamente truncada com a perda de seus 267 aminoácidos (6-273), correspondentes aos exons 2-7 e a deleção das bases 275-1075, com perda de 881 pares de base e a formação de um códon novo GGT e um novo aminoácido, no momento em que um resíduo de glicina é inserido na junção entre os aminoácidos 5 e 274. Esquema modificado de Pedersen et al. (2001).

As mutações da porção intracelular de EGFR são mais comuns em outras neoplasias como o câncer de pulmão (Nicholas et al., 2006). As mutações no exon 19 são caracterizadas por deleções *in frame* dos aminoácidos 747-750 que perfazem 45% das mutações neste tipo de tumor; mutações no exon 21 resultam em substituições L858R que perfazem 40-45%; e o restante, 10% das mutações, envolvem os exons 18 (5%) e 20 (5%) (Sharma et al., 2007).

Todos esses exons fazem parte do domínio catalítico de tirosinoquinase e, quando apresentam estas mutações, a atividade de ATP fica reduzida. É o que ocorre quando células tumorais apresentam uma deleção no exon 20, um segundo sítio de mutação conhecido como T790M (Sharma et al., 2007).

1.14 – A Mutação Mais Comum em Gliomas: EGFRvIII

Mais da metade dos casos de GBMs com amplificação do receptor é acompanhado de mutações. O receptor mutante resulta de rearranjos do gene com deleções internas (Ekstrand et al., 1992).

A maioria contém deleções específicas de exons que codificam a porção do domínio extracelular da molécula de EGFR, que se acopla ao ligante, levando a ativação das cascatas de sinalização (Pedersen et al., 2001; Kuan et al., 2001).

O rearranjo mais comum resulta na forma truncada chamada EGFRvIII, delta EGFR ou ainda de2-7EGFR (Kleihues & Cavanee, 2000; Kuan et al., 2001; Shinojima et al., 2003). Esse mutante perde uma porção do seu domínio extracelular, justamente a porção que se acopla ao ligante. Resulta da eliminação dos exons 2-7 do gene, causando uma deleção in frame de 801 pares de base, o que corresponde aos nucleotídeos 275-1075 e aos aminoácidos 6-273, resultando numa proteína truncada de 145 kDa. Assim sendo, os exons 1 ao 8 são ligados através da inserção de um resíduo de glicina (GGT) (Pedersen et al., 2001). Essa junção cria uma nova

conformação terciária do domínio extracelular, mas mantém os demais domínios (transmembrânico e intracelular) intactos (Nicholas et al., 2006).

Embora o receptor mutante seja incapaz de se ligar ao EGF ou ao TGF-α, e, presumivelmente a qualquer outro ligante, ele está constitutivamente ativo e moléculas alvos pertencentes às vias de transdução de sinal agem na ausência de um sítio de ligação. Essas moléculas alvo incluem aquelas mediadoras das vias Akt (enzima PI3K), e Ras (enzima GTP), e ambas conferem uma vantagem no crescimento das células que expressam EGFRvIII. In vitro, células de GBMs expressando EGFRvIII possuem elevada expressão de metaloproteinases em sua matriz e de outros componentes da matriz extracelular, comparando-se com células que não expressam esse receptor mutante. Esse achado suporta a hipótese de que EGFRvIII apresenta papel importante na invasibilidade das células tumorais (Nicholas et al., 2006).

Os dados da literatura pertinentes a mutação do EGFR associados aos estudos de expresssão e amplificação deste gene estão apresentados na Tabela 5.

TABELA 5 – DADOS DA LITERATURA SOBRE ANÁLISE DE MUTAÇÕES EM EGFR ISOLADAS OU EM CONJUNTO COM A ANÁLISE DA EXPRESSÃO E AMPLIFICAÇÃO DE *EGFR* EM TUMORES.

EGFR	**Tipo de Tumor**	**N casos**	**Resultados**	**Referência**
Mutações	NSCLC	101 primários (1) pareados com metástases linfonodos (2)	(1) – 30 de 101 – 29,7% e (2) – 28 de 101 – 27,7% de mutação em EGFR. 12 casos discordantes nas mutações: 11 desses casos são tumores primários e apenas 1 deles é metástase de linfonodo (sequencimento direto); 17 casos discordantes (análise heteroduplex): 10 deles são primários e os 7 restantes são metástases de linfonodo. Sendo assim, uma considerável proporção de NSCLC mostrou-se discrepante nas mutações entre tumores primários e metástases de linfonodo, sugerindo uma heterogeneidade tumoral a nível molecular durante o processo de metástase.	Park et al., 2009
Expressão EGFRvIII Amplificação	GBM	59 (FFPE)	EGFRvIII detectado em 16 de 59 casos (27%) Todos esses 16 caos também apresentaram amplificação	Yoshimoto et al., 2008
EGFRvIII e outras mutações	Câncer de bexiga	75 casos 11 linhagens celulares	Nenhuma mutação encontrada em nenhum dos casos – Mutações no domínio quinásico e a deleção EGFRvIII é rara neste tipo de tumor	Villares et al., 2007
Expressão EGFRvIII Amplificação	Câncer de pulmão	252	EGFRvIII encontrada em apenas 8 de 252 casos. Todos os pacientes eram do gênero masculino, fumantes e 7 eram carcinomas de células escamosas, contra 1 adenocarcinoma. Amplificação maior nos casos com a deleção EGFRvIII se comparados com as outras mutações encontradas no domínio quinásico (60 de 252).	Sasaki et al., 2007
Mutações EGFR e amplificação	Metás-tases cerebrais	18	3 melanomas malignos; 6 carcinomas pulmão; 3 de mama; 2 de ovário; e 1 cólon, 1 fígado, 1 bexiga; 1 carcinoma indiferenciado.Encontradas 2 mutações no exon 19 (deleção 18pb) presentes no carcinoma de fígado e pulmão. Amplificação encontrada em 3 tipos de tumores.	Franco-Hernandez et al., 2007

NSCLC =Carcinoma células não escamosas de pulmão

EGFR	Tipo de Tumor	N casos	Resultados	Referência
Expressão do RNAm amplificação alterações na seqüência do gene	Gliomas astrocíticos	86: 44 GBM 21 AA 21 AII	34 casos com amplificação 18 casos: 11 hiper e 3 hipoexpressas 10 casos com deleção EGFRvIII e 1 deles também com forma truncada C-958, e outro com duplicação dos exons 18-25; Ao todo 14 casos foram encontrados alterações na seqüência e estrutura do gene, incluindo 7 mutações novas	Arjona et al., 2005.
EGFRvIII	Câncer de mama Linhagens celulares	170 55, respectivamente	Não foi detectada expressão EGFRvIII, exceto as células transfectadas e controle (GBM), o que sugere EGFRvIII ser extremamente raro em câncer de mama	Rae et al., 2004.
EGFRvIII	Gliomas (BaF/3)		Aumento da sobrevivência das células BaF/3 quando há coexpressão de EGFRwt e EGFRvIII, sugerindo que EGFRvIII pode diretamente ativar EGFRwt	Luwor et al., 2004.
Amplificação Deleção EGFRvIII/ Expressão cav-1	GBM (U87MG)		Cav-1 tem papel importante na tumorigênese glial	Abulrob et al., 2004.
Deleção EGFRvIII/ Amplificação Expressão	GBM	30	20 dos 30 (67%) casos são hiperexpressos e 8 deles (27%) apresentaram a deleção; Amplificação em 18 dos 30 casos (60%), sendo que esses 18 também eram hiperexpressos (90%)	Biernat et al., 2004.

EGFR	Tipo de Tumor	N casos	Resultados	Referência
Expressão EGFRwt EGFRvIII Amplificação	GBM	87	Amplificação de 40 dos 87 casos (46%), sendo que 39 deles são hiperexpressos (*p*=0,0001); EGFRwt hiperexpresso em 27 dos 40 casos (67,5%) com amplificação (*p*<0,0001); EGFRvIII hiperexpresso em 18 dos 40 casos (45%) com amplificação e em 4 dos 47 casos (8,5%) sem amplificação (p<0,0001); 8 casos (20%) com amplificação e hiperexpressão EGFR não manifesta hiperexpressão EGFRwt e EGFRvIII, indicando que eles expressam outro tipo de EGFR	Shinojima et al., 2003.
Deleções EGFRvII, EGFRvIII EGFRvV Amplificação	GBM	66	22 casos com amplificação (50%) e desses, 17 foram detectadas alterações genéticas 48 casos amplificados no total, 16 mostraram múltiplas alterações (33%) e em 1 caso foram encontradas múltiplas alterações em um único transcrito	Frederick et al., 2000.
Deleção EGFRvIII Amplificação	GBM (U87MG)		A expressão de ambas as formas (EGFRwt e EGFRvIII) no tecido em cultura U87MG (*in vitro*) não alterou o crescimento celular. Em contrapartida, quando implantados em camundongos nude, houve aumento da tumorigênese (*in vivo*)	Nishikawa et al., 1994.
Deleção EGFRvIII Amplificação	GBM	70	21 de 32 casos com amplificação possuíam a deleção EGFRvIII e nenhuma alteração genética foi encontrada nos casos sem amplificação	Ekstrand et al., 1992.

Astro=astrocitomas; GBM=glioblastomas; AA=astrocitoma anaplásico ou grau III; AII=astrocitoma de baixo grau ou grau II.

1.15 – Terapêutica

Membros da família ErbB têm sido estudados como possíveis alvos de intervenções terapêuticas. As estratégias visam a interferência no sítio de ligação; a redução da atividade quinásica; a interferência de elementos regulatórios chaves nas vias de transdução de sinal; utilização de anticorpos como vetores de toxinas alvo para proteínas da família ErbB (Figura 11); e o uso de mutantes selecionados expressando EGFR como antígenos para gerar vacinas (Nicholas et al., 2006).

Anticorpos que agem contra o ligante de EGFR, TGF-α, têm sido avaliados em linhagens celulares de gliomas humanos, e têm mostrado uma inibição de crescimento. Contudo, devido EGFRvIII ser independente de ligante, cada uma dessas estratégias, aplicadas isoladamente, mostra apenas um modesto benefício (Nicholas et al., 2006).

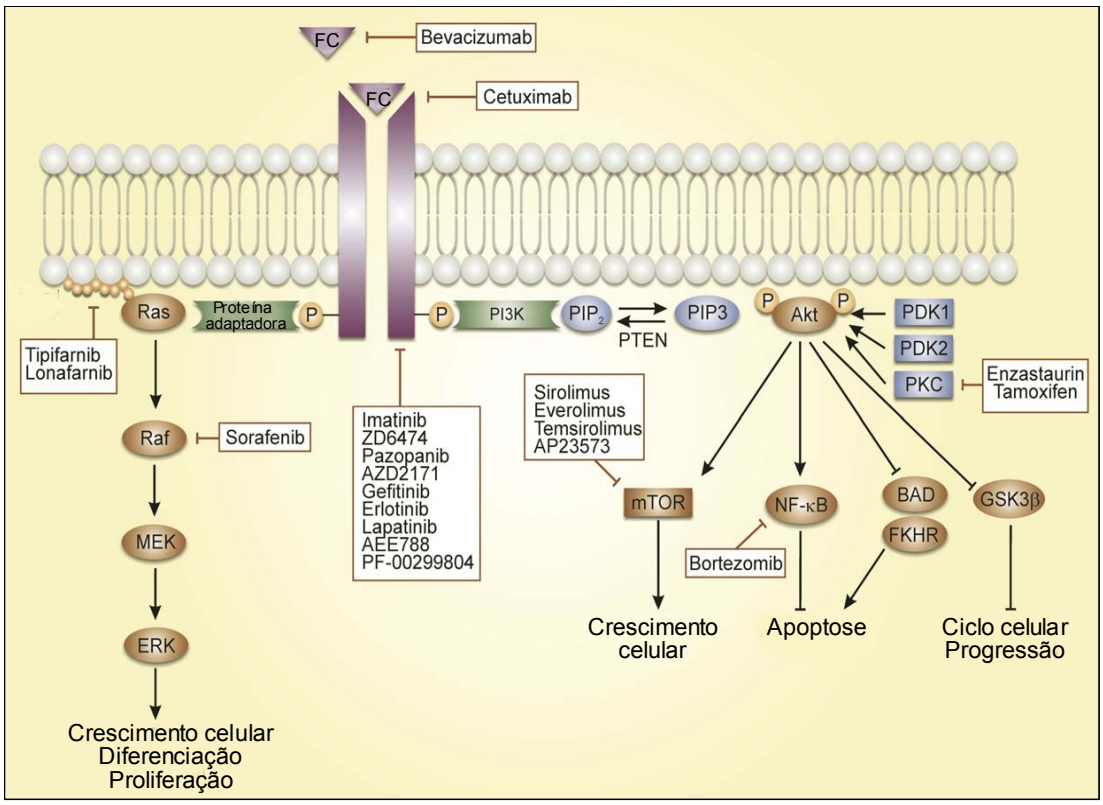


FIGURA 11. ***Sinalização de sobrevivência em gliomas malignos.*** Ativação de fatores de crescimento (FC) induzindo a ativação das vias *downstream* Ras/MAPK e PI3K/Akt. Várias funções pró-sobrevivência são então iniciadas, como proliferação celular, efeito anti-apoptótico, crescimento celular e diferenciação. Alvos terapêuticos atuais e seus sítios de ação estão também ilustrados. Esquema modificado de Wong et al. (2007).

1.15.1 – Anticorpos Monoclonais para Terapia do Câncer

Anticorpos monoclonais impedem a ativação dependente de ligante e a sinalização intracelular pelo bloqueio do domínio extracelular do receptor (Halatsch et al., 2005; Wong et al., 2007).

Os mecanismos de ação dos anticorpos monoclonais podem ser divididos em duas categorias: direta e indireta. A primeira, a ação direta, pode ser subcategorizada em três modos de ação: a) o bloqueio de função das moléculas sinalizadoras ou dos receptores. Isso ocorre por bloqueio do sítio de ligação, inibindo a progressão do ciclo celular ou sistema de reparo do DNA, reduzindo a progressão da angiogênese, ou aumento da internalização dos receptores ou ainda, reduzindo a clivagem proteolítica dos receptores; b) indução da apoptose; c) e o uso de anticorpos conjugados com toxinas, radioisótopos, citocinas (Imai & Takaoka, 2006).

A segunda ação, indireta, é mediada pelo sistema imune através da eliminação das células tumorais por imunoglobulinas, incluindo CDC (*complement-dependent cytotoxicity*) e ADCC (*antibody-dependent-cellular cytotoxicity*) (Imai & Takaoka, 2006).

1.15.2 – Agentes de Pequenas Moléculas para Terapia do Câncer

Pequenas moléculas inibidoras de quinases competem com adenosina trifosfato (ATP) no sítio de tirosinoquinase do domínio intracelular do receptor, inibindo a atividade quinásica. Esse processo pode ser reversível ou irreversível, e os inibidores podem ser desenvolvidos para bloquear um ou mais receptores da família HER/ErbB. Inibindo a atividade intrínsica de tirosinoquinase, impede-se a fosforilação do receptor, interrompendo, assim, a cascata de sinalização intracelular, resultando em efeitos celulares (Halatsch et al., 2005; Wong et al., 2007).

Múltiplos inibidores de tirosinoquinase (TKIs) da família de receptores HER/ErbB têm sido desenvolvidos e testados pela atividade contra tumores, incluindo gliomas malignos (Nicholas et al., 2006; Wong et al., 2007).

1.15.3 – Comparando Anticorpos Monoclonais (mAbs) e Inibidores de Tirosinoquinase (TKIs)

Contrária a ação dos anticorpos monoclonais, as pequenas moléculas podem ser translocadas através da membrana plasmática e interagir com o domínio citoplasmático dos receptores de superfície celular e com as moléculas de sinalização intracelular. Assim, os anticorpos monoclonais anti-EGFR e inibidores de tirosinoquinase EGFR, têm como alvo domínios distintos de EGFR: o domínio extracelular com o sítio de ligação e o domínio intracelular com o sítio de fosforilação de tirosinoquinase, respectivamente (Imai & Takaoka, 2006).

O desenvolvimento da terapia com anticorpos requer um processo complexo com elevado custo monetário se comparado com os inibidores de pequenas moléculas. Adicionalmente, a administração dos anticorpos, por ser mais invasiva (intravenosa), é menos conveniente, em contraste à administração via oral dos inibidores de pequenas moléculas (Imai & Takaoka, 2006).

Os anticorpos monoclonais e inibidores de pequenas moléculas diferem em muitas propriedades farmacológias. Os anticorpos monoclonais anti-EGFR são proteínas enormes (por volta de 150 kDa), enquanto que os inibidores de pequenas moléculas são bem menores (por volta de 500 Da). Conseqüentemente, o peso molecular enorme dos anticorpos monoclonais é provavelmente a causa de sua ineficiência em atravessar a barreira hemato-encefálica (Imai & Takaoka, 2006). Para uma droga atravessar a barreira hemato-encefálica em uma concentração significativa, sua massa molecular deve estar entre 400-500 Da e deve ser altamente lipossolúvel (Wong et al., 2007).

De acordo com a Agência Reguladora Norte-Americana, a *Food and Drug Administration* (FDA), a meia-vida de um anticorpo monoclonal, como o cetuximab é de 3,1 - 7,8 dias, que permite o uso de uma dose semanal. Em contrapartida, os inibidores de pequenas moléculas, o gefitinib, apresenta

meia-vida de aproximadamente 48 horas, ou erlotinib, de aproximadamente 36 horas, o que demanda administração diária (Imai & Takaoka, 2006).

A vantagem da terapia com anticorpo monoclonal no tratamento contra o câncer depende da sua capacidade de se ligar aos antígenos expressos na superfície das células tumorais com alta especificidade e seletividade. A afinidade antígeno-anticorpo está também associada com sua potência biológica (Carter, 2006 apud Imai & Takaoka, 2006).

Além disso, é presumível que anticorpos monoclonais podem ser mais efetivos contra células cancerosas circulantes, do que contra tumores sólidos, possivelmente pela sua baixa habilidade de penetração em tecidos e tumores sólidos. Por isso, há alta aprovação e sucesso dos anticorpos monoclonais para neoplasias hematológicas. Entretanto, somente três anticorpos monoclonais foram aprovados pela FDA para o tratamento de tumores sólidos. Muitos dos agentes de pequenas moléculas aprovados pela FDA são mais frequentemente utilizados em tumores sólidos, enquanto somente dois deles, são indicados contra tumores hematológicos (Imai & Takaoka, 2006).

Algumas dessas características vantajosas e desvantajosas de ambas as terapias podem ser visualizadas na Tabela 6.

TABELA 6 – VANTAGENS E DESVANTAGENS NO TRATAMENTO COM TKIs E mAbs EM TUMORES

Droga	TKIs	mAbs
Mecanismos de ação	Domínio intracelular: sítio de fosforilação tirosinaquinase	Domínio extracelular: sítio de ligação
Administração	Via oral	Intravenosa
Tempo meia-vida	Curto: 36-48 horas	Longo: 3-8 dias
Habilidade de penetração	Alta – contato com a porção intracelular	Baixa – sem contato com a porção intracelular
Especificidade	Baixa	Alta

TKIs (*tyrosine kinase inhibitors*) = inibidores de tirosinoquinase
mAbs (*monoclonal antibodies*) = anticorpos monoclonais

1.16 – EGFRvIII e Resposta aos Tratamentos

Um pequeno subgrupo de pacientes com câncer de pulmão (10%) apresentou uma boa resposta a inibidores de tirosinoquinase, e mutações no domínio quinásico de EGFR têm sido relacionados com a resposta a esses inibidores. Não é sabido, entretanto, se essas mutações afetam a resposta em outros tipos de tumores (Mellinghoff et al., 2005).

Contudo, a infreqüência dessas mutações no domínio quinásico de EGFR em GBMs impede uma melhor resposta a inibidores de tirosinoquinase neste tipo de tumor. GBM freqüentemente expressa EGFRvIII, uma deleção genômica que deixa o receptor constitutivamente ativo. Esta variante de EGFR ativa forte e persistentemente a via PI3K, levando a informação constante de sobrevivência, proliferação e motilidade celulares. Por promover uma dependência crônica na via PI3K, a presença de EGFRvIII permite a abordagem terapêutica dos glioblastomas através dos inibidores de tirosinoquinase. A perda de PTEN, uma proteína supressora de tumor, que inibe a via PI3K, é comum em glioblastomas. Dessa forma, a coexpressão de EGFRvIII e PTEN pode estar associada a resposta aos inibidores de tirosinoquinase (Mellinghoff et al., 2005).

Conseqüentemente são necessárias doses mais altas de gefitinib para inibir a fosforilação e eventos sinalizadores de EGFRvIII. Complementarmente, baixos níveis da droga parecem conferir uma vantagem no crescimento de células com hiperexpressão de EGFRvIII. Erlotinib mostra apenas uma modesta eficácia em camundongos apresentando EGFRvIII em células de câncer de pulmão (Ji et al., 2006 apud Nicholas et al., 2006). O tratamento com erlotinib resulta em diminuição total de EGFRvIII e níveis de fosforilação de EGFR. Respostas mais robustas foram obtidas com o inibidor irreversível EGFR/HER2 HKI-272 (Nicholas et al., 2006).

Como EGFRvIII é constitutivamente ativo, ele é resistente a degradação, permitindo sua atividade prolongada na superfície das células cancerosas. A resistência a essa geração de inibidores de tirosinoquinase

pode ser explicada, em parte, por esse efeito (Learn et al., 2004; Liu et al., 2003a).

EGFRvIII vem sendo usado como antígeno em vacinas para GBM. Pacientes com GBM diagnosticados precocemente receberam injeções de uma vacina EGFRvIII a cada duas semanas durante oito semanas e então, mensalmente, até uma evidência da redução da progressão do tumor. O estudo ainda está em andamento e os resultados estão pendentes (The Preston Robert Tisch Brain Tumor Center apud Nicholas et al., 2006).

1.17 – Outras Modalidades de Tratamento

1.17.1 – Anticorpos Monoclonais (mAbs)

A engenharia genética tem tornado possível o desenho de anticorpos monoclonais camundongo-humano quiméricos, dentre eles o anti-CD20 rituximab (Rituxan), que tem revolucionado o tratamento de linfomas (Maloney et al., 1997 apud Imai & Takaoka, 2006). Um anticorpo humanizado tem fornecido novas perspectivas para o tratamento do câncer de mama. O anticorpo monoclonal Trastuzumab (Herceptina) foi o primeiro clinicamente aprovado contra um membro da família ErbB (ErbB2) para o tratamento de pacientes com câncer de mama metastático com um aumento no número de cópias de ErbB2 (Carter et al., 1992 apud Imai & Takaoka, 2006). Outro anti-ErbB2, pertuzumab (Omnitarg) está em fase II de avaliação, e parece ser mais efetivo contra tumores insensíveis ao trastuzumab que não possuem amplificação de ErbB2 (Krejsa et al., 2006 apud Imai & Takaoka, 2006).

Nicholas e colaboradores (2006) desenvolveram outro anticorpo monoclonal camundongo-humano quimérico contra ErbB2, o CH401, que tem se mostrado mais efetivo que o Trastuzumab. Dessa forma, pode-se dividir os anticorpos monoclonais com alvo terapêutico em ErbB2 de acordo com três estratégias distintas: 1) contra o bloqueio de sinal incluindo interferência com os ligantes e receptor (Trastuzumab); 2) inibição da

dimerização do receptor (Pertuzumab); 3) indução de apoptose (CH401) (Imai & Takaoka, 2006).

Outro anticorpo monoclonal, o Bevacizumab (Avastin) é o principal agente desenvolvido contra a proteína pro-angiogênica secretada, vascular endothelial growth factor (VEGF), e este tratamento, combinado com quimioterapia com 5-fluorouracil (5-FU) acarreta uma melhora na sobrevida de pacientes com câncer colorretal metastático (Dancey & Sausville, 2003 apud Imai & Takaoka, 2006).

Cetuximab (também conhecido como C225; Erbitux) é um anticorpo monoclonal isotipo-IgG1 quimérico que se liga ao EGFR com alta afinidade (Baselga, 2001 e Goldberg, 2005 apud Imai & Takaoka, 2006). Além de impedir a interação ligante-receptor, existem evidências de que esse anticorpo estimula a internalização de EGFR. A eficiência de Cetuximab tem sido demonstrada in vitro e in vivo, resultando na inibição do crescimento, indução de apoptose, bloqueio da angiogênese, impedimento da formação de metastização e aumento da sensibilidade a agentes quimioterápicos (Holbro & Hynes, 2004). Foi aprovado em 2004 pelo FDA para o tratamento do câncer colorretal (Combs et al., 2006 apud Nicholas et al., 2006).

O anticorpo Panitumumab (ABX-EGF) foi desenvolvido como um anticorpo monoclonal isotipo-IgG2 contra EGFR, em fase III randomizada de avaliação recente, tem mostrado que a monoterapia com este anticorpo aumenta a sobrevida de pacientes com câncer colorretal metastático (Gibson et al., 2006 apud Imai & Takaoka, 2006).

Resultados da fase I/II de avaliação clínica com anticorpos contra EGFR em gliomas malignos têm sido descritos pelo Centro Molecular de Imunologia de Havana, em Cuba. Vinte e nove pacientes com glioma maligno diagnosticado precocemente receberam infusões semanais do anticorpo monoclonal humanizado (h-R3) que tem ação direta contra o domínio extracelular de EGFR. Dezesseis desses pacientes tinham glioblastoma e, até o momento da publicação desses dados (dezembro de 2006), a sobrevida média dos mesmos foi de 17,47 meses (Ramos et al., 2006 apud Nicholas et al., 2006).

Outra fase de avaliação em desenvolvimento combinará radioterapia por temozolamida e C225; anticorpo este que se liga a ambos, EGFR selvagem (wild-type EGFR; EGFRwt) e EGFRvIII (Combs et al., 2006 apud Nicholas et al., 2006). Assim, ele pode ser utilizado em pacientes com tumores que expressam apenas o receptor selvagem (Nicholas et al., 2006).

1.17.2 – Inibidores de Tirosinoquinase (TKIs)

Imatinib (Glivec) foi a primeira TKI a ser desenvolvida com sucesso, que inativa a atividade quinásica da proteína em fusão BCR-ABL em pacientes com leucemia mielóide crônica com cromossomo-Filadélfia positivo (Druker, 2002 e 2004 e O'Dwyer et al., 2003 apud Imai & Takaoka, 2006).

Em gliomas, a melhor experiência com TKIs resultou na utilização de inibidores de tirosinoquinase reversíveis, o erlotinib (OSI-774, Tacerva) e o gefitinib (ZD1839, Iressa). Ambos aprovados pela FDA em pacientes com câncer de pulmão avançado, NSCLC (*non-small-cell lung cancer*) que não responderam a quimioterapia citotóxica. Tumores sensíveis que apresentam deleções *in-frame* específicas ou substituições de aminoácidos permitem que essas drogas atinjam o domínio do sítio de ATP dentro de EGFR. Em contrapartida, gliomas sem mutações no domínio quinásico de EGFR estão associados com uma melhor resposta aos TKIs (Raizer, 2005 e Mendelsohn & Baselga, 2006 apud Nicholas et al., 2006).

Gefitinib e erlotinib são eficazes contra células que expressam EGFR em NSCLC e HNSCC (*head and neck squamous-cell carcinoma*). A fase II dos estudos desses agentes têm demonstrado a eficácia dos mesmos com ou sem a quimioterapia convencional em HNSCC, e muitas avaliações da fase III de gefitinib ainda estão em andamento. Erlotinib em combinação com um antimetabólico, gemcitabine, foi também aprovado para o tratamento de câncer pancreático avançado (Chai & Grandis, 2006 apud Imai & Takaoka, 2006).

A respeito desses achados, gefitinib e erlotinib têm sido avaliados pela sua eficácia e segurança no tratamento de gliomas malignos

recorrentes de diagnóstico prévio, utilizando ambos isoladamente ou em combinação com radio e quimioterapia (Raizer, 2005 apud Nicholas et al., 2006).

A Tabela 7 sumariza uma revisão de algumas publicações a respeito do uso de anticorpos e/ou inibidores de tirosinoquinase em tumores em geral, e seus respectivos resultados.

TABELA 7 – DADOS DA LITERATURA SOBRE O TRATAMENTO COM ANTICORPOS MONOCLONAIS E INIBIDORES DE PEQUENAS MOLÉCULAS EM TUMORES.

Terapia	Drogas	Tipo de Tumor	Resultados	Referência
TKIs	**Gefitinib**	18 linhagens Celulares SCCHN	Neste tipo de tumor, mutações no domínio intracelular de EGFR não são freqüentes e para verificar a resposta de gefitinib neses tumores, foram analisadas a expressão e amplificação de EGFR, além da análise de expressão de HER2, HER3, MET, E-caderina, receptor quinase de mama, anfiregulina e fosforilação do receptor 1 do fator de crescimento tipo insulina. A hiperexpressão de EGFR e múltiplos receptores de superfície celular podem estar associados com a sensibilidade ao gefitinib e essas diferenças entre esses achados e a literatura esclarecem que biomarcadores de resposta são dependentes do tipo de tumor e linhagens celulares.	Rogers et al., 2009
		SCCHN	Gefitinib + Celecoxib = inibição do crescimento tumoral.	Zhang et al., 2005.
		Carcinoma mamário	gefitinib + AG490 = maior potência em destruir células tumorais.	Lo et al., 2005.
		Carcinoma mamário	gefitinib + LY294002 = aumento em 31% a apoptose.	She et al., 2005.
		Câncer de pulmão	Dos 68 casos, 17 apresentaram mutações para *EGFR* e desses, 16 (94,1%) apresentaram resposta ao tratamento em contraste com 6 dos 51 selvagens (p<0,0001).	Taron et al., 2005.
		Câncer de pulmão (NSCLC)	Redução em ≥ 50% do tumor após 2 meses de tratamento. *In vitro*: tratamento com 100mM da droga em linhagem H3255 inibiu completamente a fosforilação de EGFR	Paez et al., 2004.

SCCHN =Carcinoma escamoso de cabeça e pescoço; NSCLC = Carcinoma não escamoso de pulmão

Terapia	Drogas	Tipo de Tumor	Resultados	Referência
TKIs	**Gefitinib**	Gliomas (GBM, AA, AII, oligo anaplásico)	Nenhuma mutação nos exons 19-21 foi encontrada em nenhum dos 95 gliomas, sugerindo que a biologia de *EGFR* nesses tumores difere da do câncer de pulmão e por isso, há resistência ao tratamento.	Marie et al., 2005.
		Linhagens celulares de GBM e fibroblastos	As linhagens expressam tanto a forma selvagem de EGFR (wtEGFR) quanto a mutada (EGFRvIII) e receberam tratamento com gifitinib. Com 24h, wtEGFR apresentou inibição do sítio de fosforilação, enquanto em EGFRvIII se manteve ativo. Após 3 dias, EGFRvIII começou a ter sua fosforilação diminuída. Contudo, após 7 dias de tratamento, células com EGFRvIII não tiveram seu crescimento totalmente inibido, pois a via AKT não é afetada sem a diminuição da fosforilação, a síntese de DNA não cessou e, em elevadas [ ] de gefitinib, essas células adquiriram um aumento na sua capacidade invasiva.	Learn et al., 2004
		Modelo e glioma *in vitro*	Em conjunto com uma anilinoquinazolina sintética com alta especificidade para EGFR, gefitinib ou ZD1839 (IRESSA) apresentaram um significativo efeito na supressão do crescimento tumoral. Contudo, a habilidade de certas células tumorais manterem sua sinalização via AKT e ERK mesmo com o uso desses inibidores, pode-se representar um mecanismo de resistência potencial pelo qual a célula tumoral venha a escapar da atividade antiproliferativa dessa nova classe de drogas.	Li et al., 2003

Terapia	Drogas	Tipo de Tumor	Resultados	Referência
TKIs	**Erlotinib**	Câncer de pulmão	Sabe-se que a resistência ao TKI para EGFR em câncer de pulmão tem associação com a mutação T790M de EGFR ou a amplificação de MET. Foi observado perda homozigótica de PTEN em células dependentes e independentes de EGFR, sendo que em células dependentes a perda de PTEN, mas sem a associação com a forma mutante de EGFR, contribui para a resistência ao erlotinib.	Sos et al., 2009
		Câncer de pulmão	Resposta, mas não aumento da sobrevida – análise univariada: p=0,02 para hiperexpressão de *EGFR* e p=0,008 para amplificação *EGFR*. Análise multivariada sem significância estatística.	Tsao et al., 2005.
		Gliomas	Melhor resposta em pacientes com GBM, aumento de expressão e amplificação de *EGFR*, e diminuição do nível de fosforilação Akt.	Cappuzzo, F., 2005.
		Gliomas	Resposta ao TKI em 8 dos 41 pacientes com GBM, aumento de expressão e amplificação *EGFR* e baixo nível de PKB/Akt fosforilado. Redução de até 50% área tumoral.	Haas-Kogan et al., 2005.

Terapia	Drogas	Tipo de Tumor	Resultados	Referência
TKIs	**Gefitinib e Erlotinib**	GBM	26 (7 responderam e 19 não responderam ao tratamento) dos 49, nenhuma mutação no domínio quinásico foi encontrada; nenhum dos 13 casos com perda de PTEN apresentou resposta ao trata-mento e 7 dos 13 casos sem perda, tiveram resposta (p=0,005); foi verificada que a coexpressão de EGFRvIII e PTEN está significativamente associada com a resposta clínica (p<0,001). Assim, a coexpressão de EGFRvIII e PTEN in vitro, sensibiliza as células U87MG ao erlotinib.	Mellinghof et al., 2005.
		Câncer de cabeça e pescoço (n=30) + 12 linhagens + Câncer colorretal (n=19)	Células com < número de repetições CA tinham hiperexpressão e são mais sensíveis ao erlotinib; modificação fenotípica por silenciamento da expressão de EGFR induz resistência à droga; Comparação da região CASSR entre tecido normal e os 30 casos de câncer de cabeça e pescoço, verificou-se que essa região manteve-se intacta, sugerindo que a mesma não está relacionada com a tumorigenêse; os 19 pacientes com câncer colorretal apresentaram < freqüência da repetição CA, e desenvolveram toxicidade na pele após uso de gefitinib.	Amador et al., 2004.
	NSC-154829	2 linhagens de GBM isogênicas (com e sem expressão EGFRvIII)	O crescimento *in vitro* dessas células foi monitorado por fluorescência, bem como o efeito provocado nas mesmas com a adição de diversos tipos de inibidores NSC em meio de cultura. Esse inibidor em específico, NSC-154829, diminuiu o crescimento de diferentes linhagens celulares de GBM que expressavam EGFRvIII, mas permitiram o crescimento normal das células controle. Neste estudo foi demonstrado que esse componente aumenta a apoptose nas células com EGFRvIII, e moderadamente afeta a expressão de p21, independete de qualquer mudança nos níveis de p53 ou na fosforilação via AKT. Dessa maneira, esse inibidor pode estar próximo de ser uma droga anti-GBM em potencial, embora seus mecanismos moleculares não estão muito claros.	Trembath et al., 2007
	SU11274 AG148	Linhagem celular de GBM (U87MG)	Neste estudo foram identificados 99 sítios de fosforilação em 69 proteínas, incluindo 8 sítios em EGFRvIII. Para se determinar o nível de expressão de EGFRvIII foi utilizada a análise FACS e para identificar e quantificar foi utilizada espectometria de massa (MS). Este estudo sugeriu que a combinação do inibidor de c-Met (SU11274) com de EGFR (AG148) ou com a cisplatina (quimioterápico), pode representar uma terapia alternativa para aqueles pacientes com quimio-resistência por expressarem a forma deletada EGFRvIII em suas células de GBM.	Huang et al., 2007

Terapia	Drogas	Tipo de Tumor	Resultados	Referência
mAbs	**Matuzumab**	NSCLC	Anticorpo monoclonal com efeito antitumoral potente, entretanto, em alguns pacientes não há resposta a essa terapia conjunta ao paclitaxel (Fase I desse estudo). Dessa maneira, se buscou verificar fatores preditivos de resposta a terapia de matuzumab+/-paclitaxel. Dos 23 pacientes, 1 apresentou resposta completa (CR), 3 apresentaram resposta parcial (PR) e 10, doença estável (SD). Nenhum dos pacientes do grupo de resposta apresentou nível baixo de expressão de EGFR, ou seja, todos os casos que apresentaram resposta ao tratamento tinham aumento de expressão de EGFR, sendo que os 44% dos casos que não resposderam ao tratamento não tinham aumento de expressão de EGFR. Além disso, entre os pacientes com mutação (ganho de função) na terapia primária KRAS, os mesmos apresentaram falha e/ou pouca resposta à terapia.	Schittenhelm et al., 2009
	Anticorpos 806 e 528	Linhagem U87MG derivada de modelo xenográfico de glioma expressando variante de EGFR, EGFRvIII	A eficácia do tratamento com esses mAbs correlaciona-se com o número de cópias de EGFR na membrana. Equanto as células que expressam EGFRvIII com sítio quinásico ativo respondem bem a terapia, aquelas que não possuem esse sítio ativo, não respondem. Como U87 co-expressa wtEGFR e EGFRvIII foi verificada a eficácia desses mAbs em modelos xenográficos NR-6, que somente expressam a forma EGFRvIII. Equanto o mAb 806 provocou atividade antitumoral nessas células, o 528 não foi eficaz, o que demonstra sua ação antitumoral dependente das interações entre wtEGFR/EGFRvIII. E por fim, o rompimento do sítio Src em U87 foi drasticamente aumentado pela eficiência do 806. Assim, o uso eficaz desses mAbs específicos, depende da identificação de tumores com EGFR ativado. E uma combinação de inibidores de EGFR e Src pode vir a ser uma estratégia terapêutica efetiva em gliomas.	Johns et al., 2007

Terapia	Drogas	Tipo de Tumor	Resultados	Referência
mAbs	**Cetuximab**	Câncer cólon-retal (DiFi5) anticorpo este, já aprovado pela FDA neste tipo de tumor)	Cetuximab induz apoptose em células DiFi5 parentais que hiperexpressam EGFR. Nas DiFi5 resistentes a cetuximab, foi demonstrado níveis mais baixos da proteína EGFR, além de um aumento na associação EGFR/Cbl, aumento na ubiquitinação de EGFR e nível elevado de fosforilação no sítio Src-Y416. Assim, células tumorias de cólon-retal podem desenvolver resistência ao cetuximab por alterações nos níveis de EGFR através da promoção da ubiquitinação da sinalização intracelular mediada pela quinase Src para suprir a dependência de EGFR no crescimento e sobrevivência celular.	Lu et al., 2007
	Anticorpo 2F8	Carcinoma mamário	Bloqueia o crescimento tumoral (Bloqueia o sítio de ligação ao receptor / ativa resposta imune –ADCC).	Lammerts Van Bueren et al., 2006.

Estes estudos recentes apontam a direção das futuras opções terapêuticas em câncer, salientando a importância da análise de expressão molecular, protéica e das alterações mutacionais que envolvem estes candidatos, em particular, os genes EGFR e IL-13Rα2, para a selecão de pacientes em uma terapia sob medida, e até mesmo, para uma co-terapia bi-específica com ambos os receptores abordados neste trabalho.

2. OBJETIVOS

2 – OBJETIVOS

Este estudo tem como objetivos:

- Analisar e correlacionar os resultados com os dados clínicos dos pacientes:

  1. **EGFR**

     - Expressão gênica
     - Amplificação do gene
     - Presença da deleção EGFRvIII
     - Expressão protéica

  2. **IL-13Rα2**

     - Expressão gênica

- Analisar a coexpressão de *EGFR* e *IL-13Rα2*

3. PACIENTES E MÉTODOS

3 – PACIENTES E MÉTODOS

3.1 – Pacientes

Amostras de tecido tumoral foram coletadas durante procedimento cirúrgico pelo grupo de Tumores Encefálicos e Metástases da Divisão de Clínica Neurocirúrgica do Instituto Central do Departamento de Neurologia do Hospital das Clínicas, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP). As amostras de tecido não tumoral (NT) foram coletadas do lobo temporal de pacientes com epilepsia (17 casos), durante procedimento cirúrgico realizado pelo grupo de Epilepsia, enquanto as amostras de tecido tumoral são provenientes de pacientes incluídos no Projeto Genoma Clínico. Estas amostras foram diagnosticadas histopatologicamente como astrocitomas, num total de 145 casos: 22 astrocitomas pilocíticos (AP), 22 astrocitomas de baixo grau (AGII), 17 astrocitomas anaplásicos (AA), e 84 glioblastomas multiformes (GBM) (Tabela 8).

Amostras de tecidos incluídas em parafina foram obtidas da Divisão de Anatomia Patológica do Departamento de Patologia do HC-FMUSP.

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para análise de Projetos de Pesquisa da Diretoria Clínica do HC-FMUP (Protocolo de Pesquisa N° 851-05, Anexo 7). Todos os pacientes foram informados da natureza do projeto de pesquisa e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 8).

TABELA 8: CASUÍSTICA DE ACORDO COM O GRAU DE ASTROCITOMA (OMS).

Histopatologia	N° de casos
AP	22
AGII	22
AA	17
GBM	84
NT	17
Total	**162**

3.2 – Extração de DNA de Tecido Tumoral

O tecido tumoral foi congelado em nitrogênio líquido e pesado. Para cada 0,1 g de tecido foram adicionados 1000 µL de tampão de lise (NaCl 150 mM, EDTA 25 mM em pH 8,0), 20 µL de proteinase K (10 mg/mL) e 20 µL de SDS 10%. A mistura foi incubada a 37ºC por uma noite. Posteriormente, foi feita uma centrifugação por 15 min a 14.000 rpm. Foram adicionados para cada 500 µL de sobrenadante, 250 µL de fenol pH 8,0 e 250 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). Após centrifugação de 5 min a 14.000 rpm, foi removido o sobrenadante ao qual foi adicionado 500 µL de clorofórmio e novamente centrifugado. Ao sobrenadante foram adicionados 40 µL de NaCl 0,4 M e 1000 µL de etanol absoluto gelado, homogeneizado e mantido a -20ºC por uma noite ou mais. O precipitado foi obtido após centrifugação de 15 min a 14.000 rpm, seco e ressuspenso em 50 µL de água MilliQ. Em seguida, foram adicionados a esta solução 25 µL de NH_4Ac 7,5 M e 300 µL de etanol absoluto gelado, e centrifugado por 5 min a 14.000 rpm. O precipitado foi lavado com 1000 µL de etanol 70%, seco em temperatura ambiente e ressuspenso em tampão TE-4. As concentrações das amostras de DNA foram determinadas através de leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 260/280 nm no aparelho *ND-1000 Spectrophotometer* (NanoDrop Technologies, Inc), em que se considerou satisfatório razões que variavam de 1,8 a 2,0. As amostras-mãe foram diluídas para concentração de 100 ng/µL e armazenadas a 4ºC até a utilização.

3.3 – Extração de RNA

Os tecidos foram analisados em um corte de 4µm por coloração com hematoxilina e eosina a fim de se verificar a qualidade do tecido. Porções de tecidos não tumorais foram dissecados previamente à extração de RNA. O RNA total foi extraído com Mini Kit RNeasy (Qiagen Inc, Hilden, Germany). A qualidade das amostras foi verificada através de corrida eletroforética em gel

denaturante de agarose e as concentrações das mesmas foram determinadas através de leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 260/280 nm no aparelho *ND-1000 Spectrophotometer* (NanoDrop Technologies, Inc), em que se considerou satisfatório razões que variavam de 1,8 a 2,0. As amostras-mãe foram estocadas a -70ºC e uma alíquota foi utilizada para a transcrição reversa.

3.4 – Síntese da Primeira Fita de DNA Complementar (cDNA)

Para cada 7,0 µL (2 µg) de RNA a ser reversamente transcrito, acrescentou-se 0,2 µL de DNase (10 U/µL), 0,3 µL de água MilliQ, 2,0 µL do tampão de síntese 5X (*First Strand Buffer*; Invitrogen) e 0,5 µL de inibidor de RNase (*RNaseOUT*, Invitrogen). Este produto foi incubado por 10 min a temperatura de 37°C e por 5 min a temperatura de 75°C.

A seguir, foram adicionados a cada amostra 0,09 µL de *Random Primers* (3 µg/µL; Invitrogen), 0,5 µL de Oligo dT (0,5 µg/µL, Invitrogen), 1,0 µL de solução com mistura de dNTPs (10 mM; Invitrogen) e 0,41 µL de água MilliQ. Em seguida, as amostras foram incubadas por mais 10 min a temperatura de 75°C.

Ao final deste processo, as amostras foram imediatamente resfriadas (etapa realizada no gelo) e foram acrescentados a cada amostra 2,0 µL do tampão de síntese 5X (*First Strand Buffer*; Invitrogen), 1,0 µL de DTT 0,1 M (Invitrogen), 0,5 µL do inibidor de RNase, 3,5 µL de água MilliQ e 1,0 de transcriptase reversa (*SuperScript III Reverse Transcriptase* 200U/µL; Invitrogen). As amostras foram levemente homogeneizadas e novamente incubadas por 5 min a temperatura de 25°C, 60 min a 50°C e 15 min a 70°C.

Após esta etapa, as amostras foram diluídas em TE-4 e armazenadas em - 20°C.

3.5 – Seleção dos *Primers*

A seleção de todos os *primers* do estudo obedeceu aos seguintes critérios: temperatura de anelamento semelhante (60°C), produtos de PCR de tamanho inferior a 200 kb, concentração de G/C entre 40-60%, e a presença de no máximo dois nucleotídeos C e/ou G na extremidade 3'.

Todos os *primers* foram sintetizados pela IDT (*Integrated DNA Technologies*, Inc, Coraville, IA) e utilizados numa concentração final de 10 pmol/μL para a reação de RT-PCR; 0,8 pmol/μL para a análise da expressão, e amplificação, e 3,2 pmol/μL para a análise da deleção do gene EGFR. Para a análise da expressão do gene *IL-13Rα2* foi utilizado o *primer* numa concentração de 1,6 pmol/μL.

3.6 – Deleção EGFRvIII por Reação em Cadeia de Polimerase Transcrição Reversa (RT-PCR)

A presença da deleção EGFRvIII foi verificada através da técnica de RT-PCR.

Primeiramente, foi desenhado um par de *primers* nas regiões que flanqueiam o final do exon 1 (*sense*) e a junção dos exons 8 e 9 (*antisense*). Na ausência da deleção EGFRvIII, o fragmento amplificado foi de 954 pb, enquanto que na presença da mesma, o fragmento amplificado foi de 153 pb. Para confirmar a presença da deleção nas amostras com amplificação da banda menor de 153 pb, novas reações de PCR foram realizadas com dois pares de *primers:* um específico para a forma selvagem utilizando-se a seqüência *sense* do anterior e o *antisense* flanqueando a junção entre os exons 3 e 4 com 364 pb, e outro específico para a forma truncada, utilizando-se o *antisense* do primeiro par e o *sense* flanqueando a junção entre os exons 1 e 8, exatamente na deleção, com 140 pb (Figura 12).

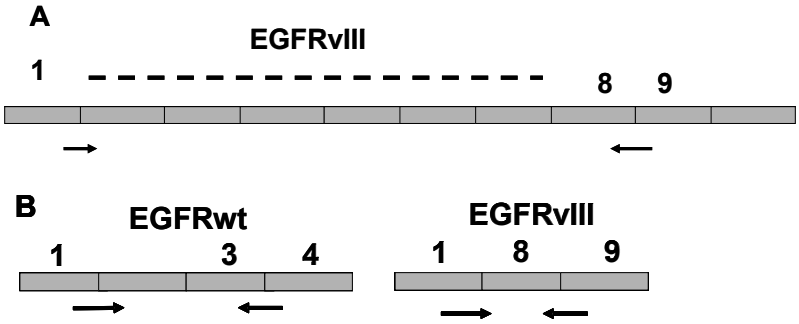


FIGURA 12. ***Figura esquemática do desenho de*** **primers** ***para a reação de RT-PCR.*** **A:** par de *primers* geral para a deleção EGFRvIII. **B:** pares de *primers* específicos para as formas selvagem (EGFRwt) e deletada (EGFRvIII). Os números indicam os exons escolhidos para o desenho e as setas indicam as junções dos mesmos.

As seqüências *sense* e *antisense* dos *primers* utilizados nas reações de RT-PCR e os parâmetros de amplificação constam na Tabela 9.

As reações de PCR foram realizadas utilizando-se 2 µL de cDNA, amostras aliquotadas em concentrações de 50 a 100 ng/µL, em tampão Tris-HCl 10 mM (pH 9,0), KCl 50 mM, contendo 2 mM de $MgCl_2$, mistura de dNTPs a 2,5 mM, 10 pmol de cada *primer* e 1 unidade de enzima Tth (Biotools, Madri, Espanha), em volume final de 20 µL.

As reações de PCR foram realizadas no termociclador (PTC – 200, *MJ Research Peltier Termal Cycler, Watertown*, EUA) e consistiram de uma denaturação inicial de 94ºC durante 5 min, seguida por 35 ciclos de denaturação por 30 s a 94ºC, anelamento de 30 s a uma temperatura de 58ºC e uma extensão por 60 s a 72ºC. Por fim, foi realizada uma extensão final por 10 min a 72ºC. A reação foi mantida a 4º até sua análise por eletroforese em gel de agarose 2%.

Os produtos de PCR foram analisados quanto à eficiência da reação e tamanhos dos produtos esperados em eletroforese em gel de agarose 2% em uma corrida efetuada em tampão TAE 1X, e corados em brometo de etídio.

TABELA 9 – SEQÜÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS, TAMANHO DO PRODUTO DE PCR, TEMPERATURA DE ANELAMENTO E NÚMERO DE CICLOS UTILIZADOS NA REAÇÃO DE RT-PCR.

Gene	Região	Seqüência (5'-3')	Fragmento (pb)	Anelamento (°C)	Ciclos
EGFR deleção	[1] Exon 1 Exons 8-9	F: GGCTCTGGAGGAAAAGAAAG R: CCTATTCCGTTACACACTTTG	153/954	58	35
	[2] Exon 1 Exons 3-4	F: GGCTCTGGAGGAAAAGAAAG R: CAGGATTTCCTGTAAATTTCT	364	58	35
	[3] Exons 1-8 Exons 8-9	F: AAGAAAGGTAATTATGTGGT R: CCTATTCCGTTACACACTTTG	140	58	35

[1]Par de *primers* geral para verificar a presença da deleção de *EGFR*
[2]Par de *primers* específico para verificar a forma selvagem de *EGFR*
[3]Par de *primers* específico para verificar a forma deletada de *EGFR*

3.7 – Deleção EGFRvIII, expressão e amplificação de *EGFR* e expressão de *IL-13Rα2* por Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real (RQ-PCR)

A deleção do gene *EGFR* foi novamente analisada e reconfirmada (apenas em astrocitomas graus III e IV), assim como, a análise de sua amplificação e do nível de expressão de seu RNAm, através da técnica de PCR em tempo real baseada na emissão de fluorescência do SYBR Green I. Foi utilizado o cálculo da média entre dois genes de referência endógena: *HPRT (*gene da fosforibosiltransferase guanina e hipoxantina*, hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase gene*) e *Gusβ* (gene da beta-glucoronidase*, beta-glucoronidase gene*). Todas as reações foram realizadas no aparelho de PCR em Tempo Real *ABI 7500* (Applied Biosystems).

A reação de RQ-PCR realizada para a confirmação da deleção EGFRvIII utilizou o mesmo par de *primers* descrito por Rae et al. (2004), com um produto de 352 pb. A sequência de nucleotídeos pode ser verificada na Tabela 10.

A seleção dos genes controles ou de referência endógena foi realizada segundo os critérios que incluem: níveis de expressão semelhantes em diferentes tipos celulares, ausência de comprometimento do gene com ciclo celular ou ativação celular, estabilidade comparável aos demais genes do

estudo. Os genes HPRT e Gusβ foram considerados apropriados por apresentarem baixa variabilidade de expressão e não apresentarem pseudogenes.

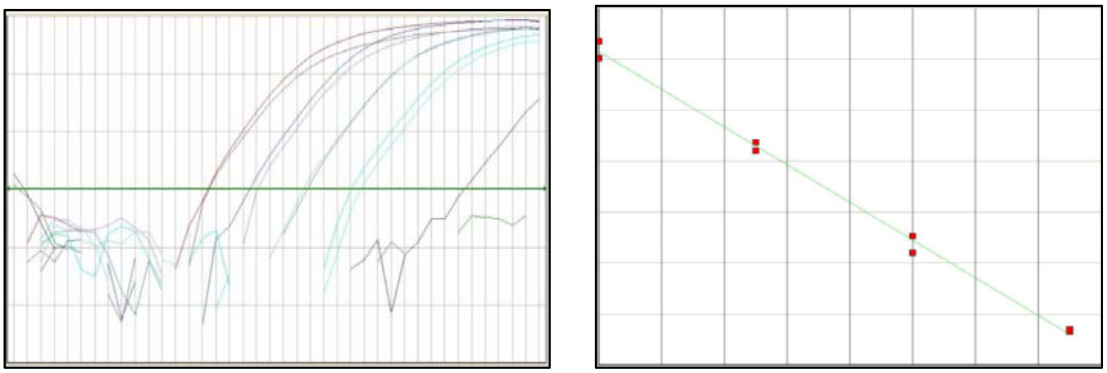
O gene HPRT teve sua seqüência de nucleotídeos desenhada em regiões que flanqueiam os exons 2 (*sense*) e 3 (*antisense*), constituindo um produto de PCR de 118 pb. O gene Gusβ teve sua seqüência de nucleotídeos desenhada em regiões que flanqueiam os exons 11 (*sense*) e 12 (*antisense*), constituindo um produto de PCR de 101 pb.

A seqüência de nucleotídeos do gene EGFR selecionada para estudo flanqueia parte do exon 27 até a região do exon 28 (*primers* de junção exon-exon) constituindo um produto de PCR de 123 pb.

A seqüência de nucleotídeos do gene IL-13Rα2 selecionada para estudo flanqueia os exons 8 (*sense)* e 9 *(antisense)*, constituindo um produto de PCR de 120 pb.

As reações de PCR foram analisadas quanto à sua eficiência de amplificação e também foram realizadas curvas com diluições seriadas de um *pool* de cDNA de GBM para os genes alvos e para os genes normalizadores, bem como a realização das curvas padrão dos mesmos. A Figura 13A mostra as curvas com as diluições seriadas de *EGFR* e *HPRT* e a Figura 13B mostra as curvas padrão dos mesmos, com seus respectivos cáculos de eficiência.

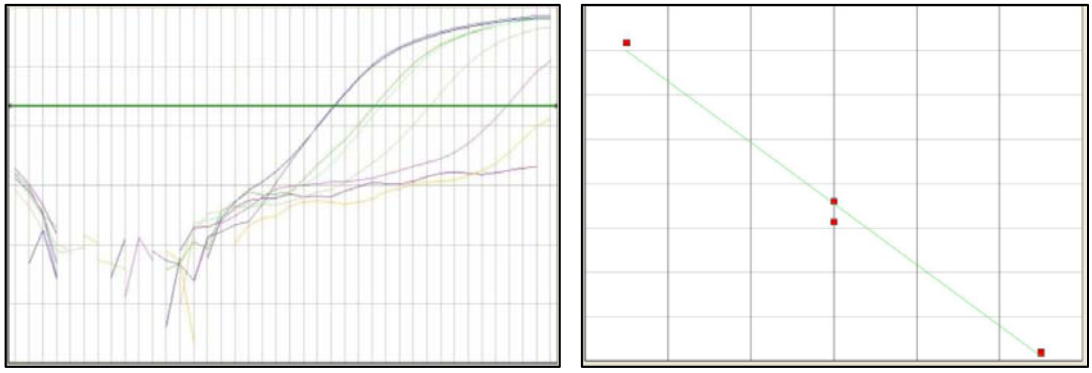
A **B**



EGFR

Slope: -3,69
R^2: 0,996
Eficiência: 0,866

A **B**



HPRT

Slope: -3,45
R^2: 0,993
Eficiência: 0,949

FIGURA 13. ***Determinação das eficiências de amplificação de RQ-PCR dos genes EGFR e HPRT, um dos 2 genes de referência endógena.*** As reações de amplificação com diluições seriadas de um *pool* de cDNA de GBM (A) foram analisadas para o cálculo de eficiência de amplificação através da curva padrão (B). A otimização para o gene *IL-13Rα2* ocorreu da mesma forma (não demonstrado em figura).

O gene beta hemoglobina (HBb), descrito como um gene de cópia simples (Kersting et al., 2004) foi utilizado como normalizador para a análise da amplificação do gene EGFR. Os *primers* para o gene HBb foram desenhados na região do exon 2, constituindo um produto de 95 pb, numa concentração de 2,4 pmol/μL, e os *primers* para o gene EGFR foram desenhados no íntron 1 com um produto de 92 pb.

As sequências *sense* e *antisense* dos *primers* utilizados nas reações de RQ-PCR e os parâmetros de amplificação constam na Tabela 10.

As reações foram preparadas utilizando-se *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), contendo SYBR Green dye, *AmpliTaq Gold DNA Polimerase*, dNTPs (com dUTP), referência passiva e tampão otimizado. O preparo e armazenamento foram realizados segundo as instruções do fabricante, exceto pelo volume final de cada reação de 12 µL. Para cada reação foram utilizados 6 µL de *Power SYBR Green PCR Master Mix*, 3 µL de cada *primer* e 3 µL de cDNA (diluído 1:56).

Os parâmetros do aparelho foram ajustados para um pré-aquecimento a 50°C por 5 min, denaturação inicial a 95°C por 10 min (necessário para ativação da *AmpliTaq Gold DNA Polymerase*) e 40 ciclos de 95°C por 15 s (desnaturação) e 60°C por 60 s (anelamento dos *primers* e extensão). Ao final de todas as reações, foram analisadas as curvas de dissociação com temperaturas crescentes a fim de se verificar a amplificação de um único produto. As condições da reação foram idênticas às utilizadas para construção das curvas de calibração.

Cada reação foi realizada em duplicata e, para cada gene do estudo, foram amplificadas em paralelo as amostras controles sem cDNA. Todas as reações de PCR consideradas para análise apresentaram eficiência igual ou superior a 95%.

TABELA 10 – SEQÜÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS, TAMANHO DO PRODUTO DE PCR, TEMPERATURA DE ANELAMENTO, NÚMERO DE CICLOS, E CONCENTRAÇÃO FINAL UTILIZADOS NA REAÇÃO DE RQ-PCR.

Gene	Região	Seqüência (5'-3')	Fragmento (pb)	Anelamento (°C)	Ciclos	[ ] (nM)
EGFR[1]	Exon 1 Exon 8	F: GAGTCGGGCTCTGGAGGAAAAG R: CCACAGGCTCGGACGCAC	352	60	40	800
EGFR[2]	Exon 27 Exon 28	F: TGCAGCGATACAGCTCAGACCC R: TTTGGGAACGGACTGGTTTATG	123	60	40	200
HPRT	Exon 2 Exon 3	F: TGAGGATTTGGAAAGGGTGT R: GAGCACACAGAGGGCTACAA	118	60	40	200
GUSb	Exon 11 Exon 12	F: GAAAATACGTGGTTGGAGAGCTCATT R: CCGAGTGAAGATCCCCTTTTTA	101	60	40	400
IL-13RA2	Exon 8 Exon 9	F: TTGCGTAAGCCAAACACCTA R: TGAACATTTGGCCATGACTG	120	60	40	400
EGFR[3]	Intron 1 Intron 1	F: GCCGGTCCTGTTAGTCAGGT R: ATGCTTTGGTGGTGCTCTGA	92	60	40	200
HBb	Exon 2 Exon 2	F: GTGAAGGCTCATGGCAAGA R: AGCTCACTCAGTGTGGCAAAG	95	60	40	600

[1]Par de *primers* para análise da deleção de *EGFR*
[2]Par de *primers* para análise da expressão de *EGFR*
[3]Par de *primers* para análise da amplificação de *EGFR*

3.8 – Análise dos dados de amplificação de *EGFR* e expressão dos genes EGFR e IL-13Rα2

Para a análise dos dados de amplificação foi realizado o cálculo ΔCt = Ct *HBb* – Ct *EGFR* e valores ≤ 2.0 foram considerados sem amplificação e valores > 2.0 foram considerados com amplificação (Figuras 14 e 15).

A análise dos dados de expressão foi realizada através da quantificação relativa da expressão gênica em relação às amostras calibradoras. A amplificação do produto único foi confirmada através da análise das curvas de dissociação do produto amplificado. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose para confirmar o tamanho do produto de PCR esperado.

A normalização foi realizada através da média de amostras de tecido cerebral não tumoral. Para E = 100 $\pm$ 10%, o cálculo de expressão relativa foi realizado segundo Livak & Schmittgen (2001).

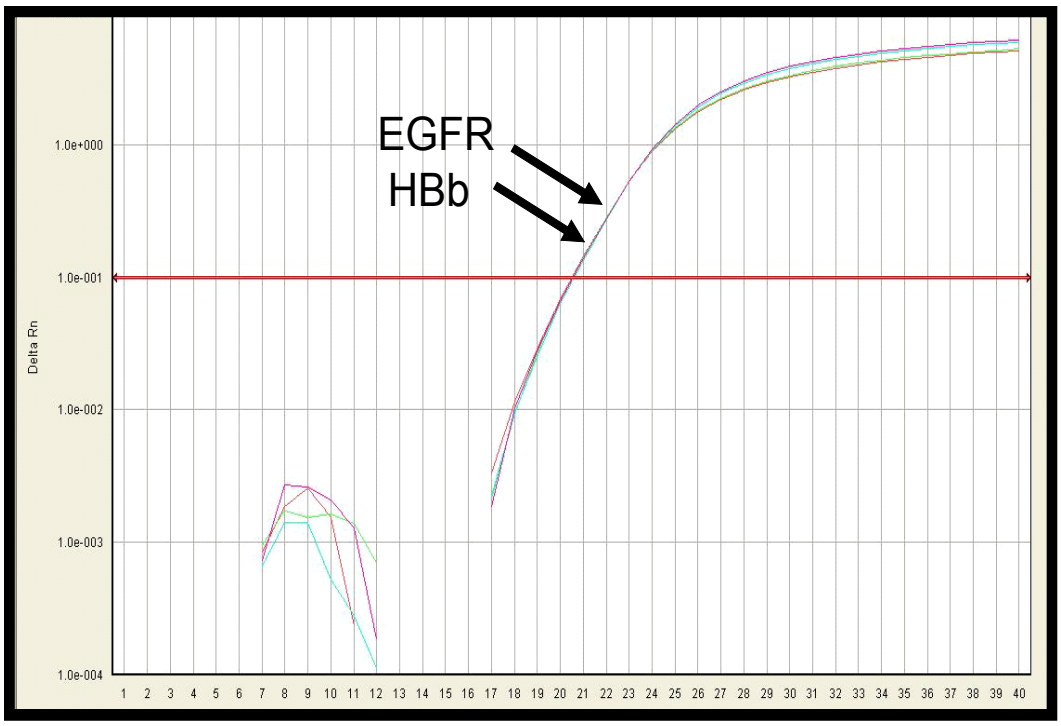


FIGURA 14. ***Curva de amplificação de*** **EGFR** ***em relação ao gene HBb.*** Este caso foi considerado sem amplificação (≤ 2.0 Ct).

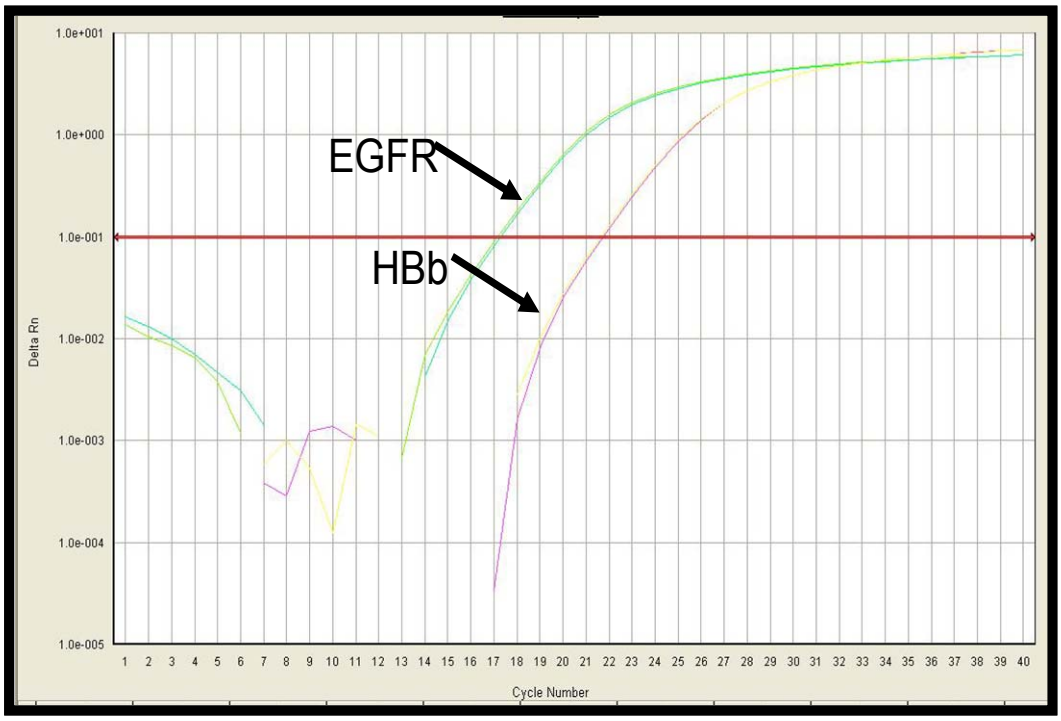


FIGURA 15. ***Curva de amplificação de*** **EGFR** ***em relação ao gene HBb,*** Este caso foi considerado com amplificação (> 2.0 Ct).

3.9 – Análise e Interpretação da Curva de Dissociação (*Melting Curve*)

Uma vez que a técnica de SYBR Green I não permite distinguir entre produtos amplificados por diferentes materiais genéticos, uma importante medida de controle de qualidade é a verificação de uma mesma temperatura de dissociação (ou *melting*) em todas as amostras. A temperatura de dissociação depende da composição de bases nitrogenadas e do tamanho do produto amplificado. Desta forma, todos os produtos de PCR de um *primer* em específico devem apresentar uma mesma temperatura de dissociação. Caso isto não aconteça, algum dos seguintes eventos pode ter ocorrido: contaminação, formação de *primer-dimer* (dímeros de *primers*), *mispriming* (pareamento em regiões não homólogas) ou outros artefatos.

Após a amplificação da PCR em tempo real, programou-se o aparelho para realizar uma curva de dissociação. Nesta fase, a temperatura da reação é elevada e o aparelho capta a mudança na emissão de fluorescência. No ponto de dissociação, as duas cadeias de cDNA irão se separar e a fluorescência irá diminuir gradativamente. O *software* do aparelho fornece um gráfico que confronta a mudança de fluorescência emitida com a temperatura (Figura 16).

As amostras que apresentaram curvas de dissociação com temperaturas diferentes e/ou apresentaram mais de um ponto de dissociação em uma mesma amostra foram desconsideradas e repetidas.

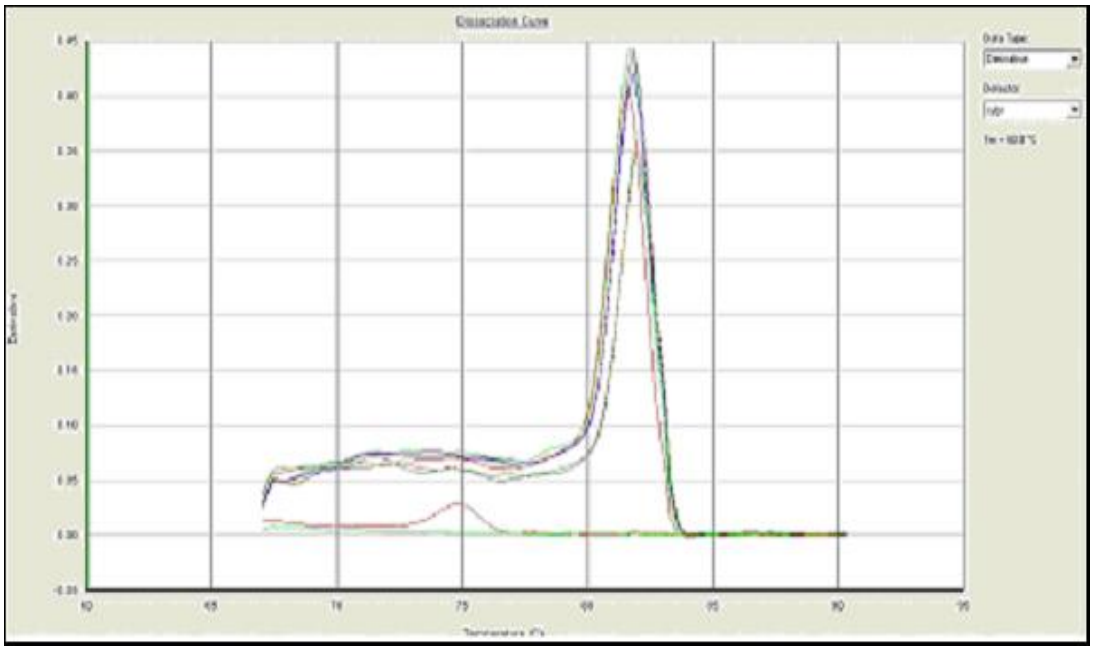


FIGURA 16. ***Curva de dissociação de RQ-PCR do gene* EGFR *para a análise de sua expressão em astrocitomas.*** No final de cada reação realizada a temperatura foi aumentada gradativamente para a determinação da curva de *melting*. A curva mostra derivada fluorescência nas reações com picos únicos dos produtos de PCR. O mesmo foi feito para o gene *IL-13Rα2* (não demonstrado em figura).

3.10 – Imunohistoquímica (IHQ)

Foi realizada desparafinização dos cortes de 4 µm de espessura, em lâminas previamente tratadas com 3-aminopropyl-triethoxy silane (Sigma, A-3648, EUA), e deixadas por 24 horas em estufa 60°C. As lâminas foram incubadas com xilol a 60°C por 20 min, seguido de outra incubação com xilol à temperatura ambiente por 20 min. Em seguida, foi realizada a hidratação dos cortes em concentrações de etanol a 100% com 3 banhos de 30 s cada, etanol a 95%, 80% e 70% por 30 s cada, lavando-os, em seguida, em água corrente e água destilada.

A recuperação antigênica foi realizada mediante incubação das lâminas em solução de tripsina porcina tipo II – (Sigma T-8128) 60 mg% e cloreto de cálcio 134 mg% em PBS (pH 7,8) por 20 min a 37°C, seguida de lavagens em água corrente e água destilada.

O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com peróxido de hidrogênio (H_2O_2 20Vol) em 3% em metanol, com três trocas de 10 min cada, lavagens em água corrente e água destilada e a lavagem com solução salina tamponada com fosfatos (PBS) 10 mM (pH 7,4) por 5 min.

A reação aqui efetuada segue os princípios propostos por Hsu et al. (1981), adaptado às nossas condições laboratoriais:

Incubação das lâminas com anticorpo primário anti-EGFR clone 31G7 (Zymed) (Marquez et al., 2004) em tampão PBS contendo soro-albumina bovina (BSA) (SIGMA, A9647, EUA) 1,0% e NaN_3 (Inlab, São Paulo) 0,1%, diluído em título previamente estabelecido de 1:50, durante 30 min a 37°C, e durante 18 horas, a 4°C, em câmara úmida.

Em seguida, as lâminas foram lavadas em tampão PBS com 3 trocas de 3 a 5 min cada e incubação com anticorpo secundário biotinilado, anticorpo de coelho e camundongo anti-Ig, na diluição de 1:200, durante 30 min, a 37°C.

Novamente foram realizadas lavagens das lâminas em tampão PBS com 3 trocas a 5 min e incubação com o complexo Streptavidina-Biotina-Peroxidase (cód. K0492, Dako, EUA), na diluição de 1:200, durante 30 min, a 37°C.

A revelação foi realizada com solução de substrato cromogênico contendo diaminobenzidina (Sigma, D-5637, EUA) a 0,06%, peróxido de hidrogênio a 0,06%, dimetilsulfóxido (DMSO) (Labsynth) a 1% em PBS, em banho de 5 min, em câmara escura, a 37°C.

Foi realizada a contra-coloração com hematoxilina de Harris e a desidratação dos cortes em banhos de concentrações crescentes de etanol, diafanização em banhos de xilol, e montagem das lâminas em Entellan (Merck, 1.07961, Alemanha) com lamínula.

Os controles utilizados na reação de imunohistoquímica compreenderam um controle positivo de caso sabidamente positivo e um controle negativo com incubação em PBS e eliminação do anticorpo primário.

3.11 – Análise por microscopia óptica

Foram realizadas análises da expressão da proteína obtida por imunohistoquímica de forma semiquantitativa (percentagem de estruturas marcadas) para a marcação citoplasmática e qualitativa (intensidade da reação) para a marcação nuclear, por dois observadores independentes (POC e SKNM), através das seguintes codificações:

- Análise semiquantitativa:

-: negativo

+: até 25% de estruturas marcadas

++: de 26 a 50% de estruturas marcadas

+++: de 51 a 75% de estruturas marcadas

++++: mais que 75% de estruturas marcadas

- Análise qualitativa:

+: fraca

++: média

+++: forte

3.12 – Análise Estatística

O teste qui-quadrado (χ^2) foi utilizado para avaliar as associações entre os dados dos pacientes: gênero, idade ao diagnóstico (> 45 anos e ≤ 45 anos), situação (*status*: vivo ou óbito) e grau de malignidade do tumor, com os dados moleculares de níveis de expressão relativa de *IL13Rα2* e *EGFR*, amplificação e deleção do gene EGFR, e expressão da sua proteína por IHQ. A sobrevida foi calculada da data da cirurgia até a data do óbito. A curva de Kaplan Meier de sobrevida foi analisada utilizando-se o teste *log rank.* A coexpressão entre os genes IL13Rα2 e EGFR foi realizada através do cálculo estatístico não paramétrico correlação de Spearman. Esses cálculos estatísticos foram realizados segundo o programa STATA versão 7 (STATA Corp., College Station, TX, USA), SPSS versão 10.0 (SPSS, Chicago, IL) e GraphPad Prism4.

4. RESULTADOS

4 – RESULTADOS

4.1 – Deleção

Foi realizada a análise da forma truncada de EGFR (EGFRvIII) por RT-PCR em 95 amostras de tumor (10 AP; 19 AGII; 14 AA; e 52 GBM). Em 15 casos (1 caso AA e 14 GBM) identificou-se a banda deletada. Foi realizada uma nova reação de PCR com os *primers* específicos para a forma selvagem e para a forma truncada como mostrado nas Figuras 17 e 18 para a confirmação da deleção. O produto de PCR foi visualizado em gel de eletroforese em somente 38 casos, todos GBMs. Em 15 destes (39,5%) observou-se a banda de EGFRvIII juntamente com a banda da forma selvagem (para cada caso foi corrida uma reação com os dois pares de *primers* separadamente) demonstrando que todos os casos apresentaram a deleção em heterozigose.

Como a identificação dos produtos de PCR em gel de agarose 2% corado por brometo de etídio não foi possível em todos os casos, os produtos dessa reação foram corridos novamente em gel de poliacrilamida 8% e corados pela prata.

Além disso, foi realizada a reação de PCR em Tempo Real, pela sua maior sensibilidade, em casuística ampliada, apenas nos casos de astrocitomas grau III e GBM, e foi observada a exclusividade dessa deleção em GBM. Desta forma, através da confirmação em dois métodos distintos foi possível detectar um total de 19 de 84 (22,6%) casos deletados (Figura 19), todos GBM. Os casos com a deleção EGFRvIII, não apresentaram tempo de sobrevida diferente daqueles sem a deleção, embora os casos sem a deleção apresentassem uma tendência à sobrevida maior, segundo a análise da curva de sobrevida Kaplan Meier e teste *log rank* (p = 0,103) (Figura 20).

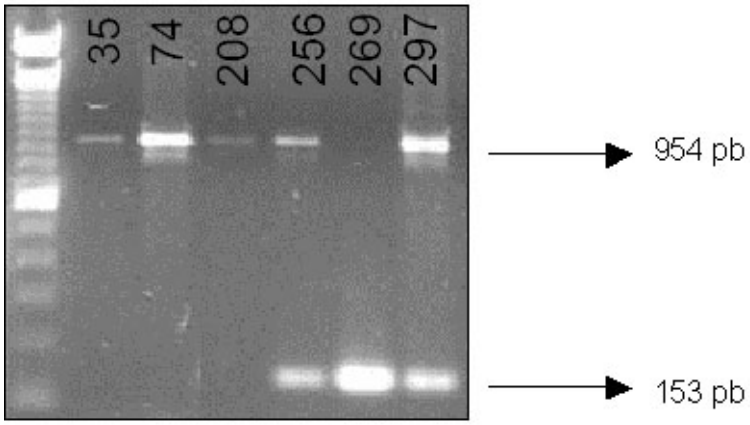


FIGURA 17. ***Produtos de amplificação de RT-PCR com par de*** **primer** ***geral de*** **EGFR** ***em GBM.*** 1 caso homozigoto para a deleção (269) apresentando apenas a banda correspondente a um tamanho de fragmento de 153pb; 3 casos sem deleção (35, 74 e 208) apresentando apenas a banda correspondente a um tamanho de fragmento de 954pb; e 2 casos heterozigotos para deleção (256 e 297) apresentando ambas as bandas. O marcador de tamanho de fragmento utilizado foi de 100pb.

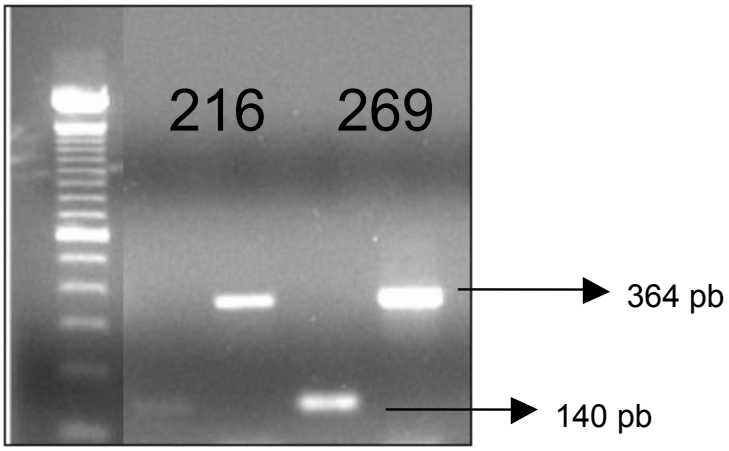


FIGURA 18. ***Produtos de amplificação de RT-PCR com pares de*** **primers** ***específicos de*** **EGFR** ***em GBM.*** 2 casos corridos de forma pareada para a confirmação da deleção: ambos apresentaram as duas bandas, a selvagem e a deletada, correspondendo a um tamanho de fragmento de 364 e 140pb, respectivamente, significando que não houve nenhum caso homozigoto para a deleção. O marcador de tamanho de fragmento utilizado foi de 100pb.

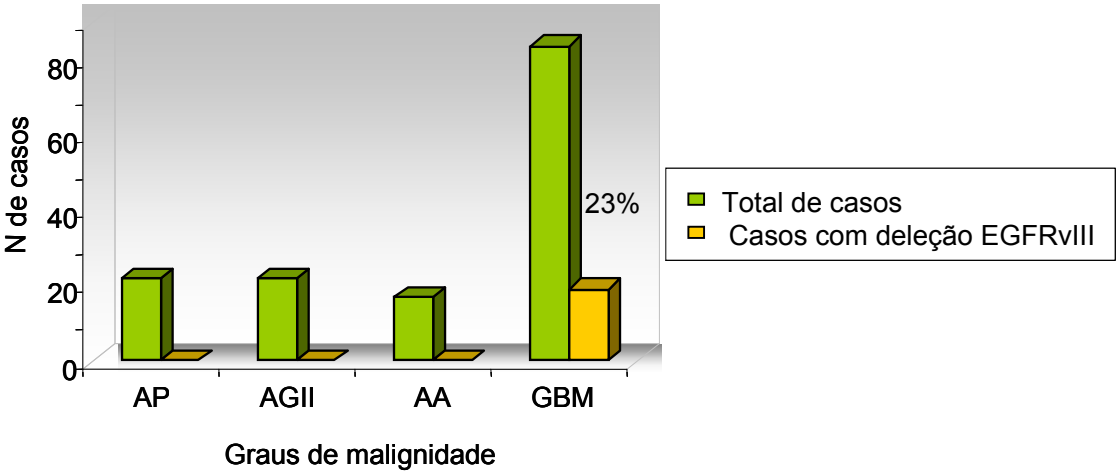


FIGURA 19. ***Gráfico demonstrando o número de casos com a deleção EGFRvIII exclusiva em GBMs*** *(barras amarelas)* ***em relação ao número total de casos*** *(barras verdes)* ***para cada grau de astrocitoma (AP-GBM).*** AP = astrocitoma pilocítico; AGII = astrocitoma grau II; AA = astrocitoma anaplásico; GBM = glioblastoma multiforme.

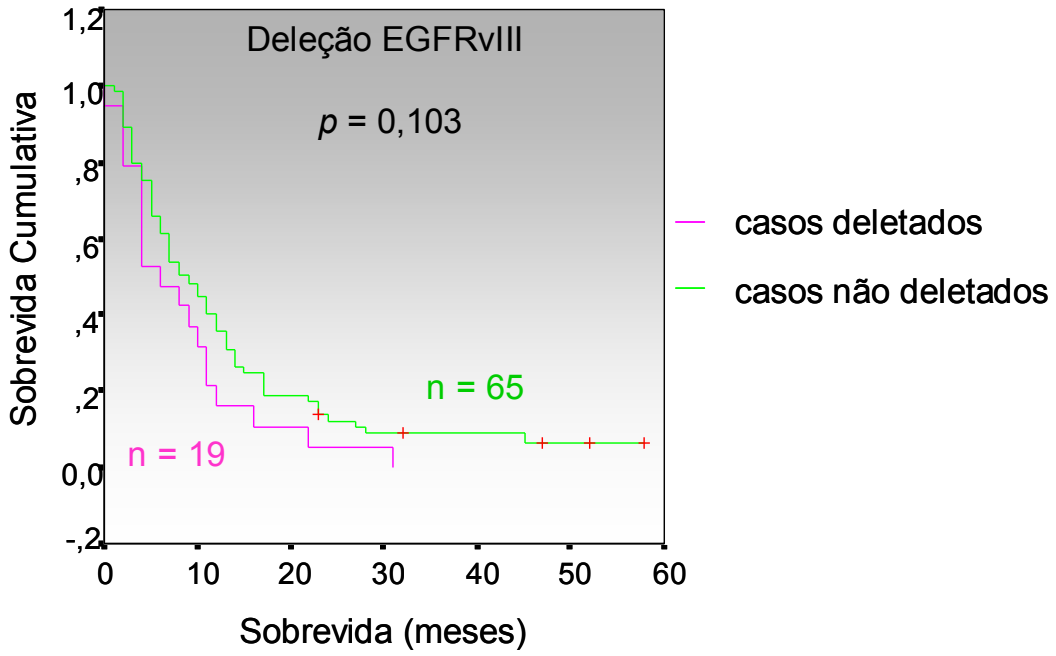


FIGURA 20. ***Curva de sobrevida entre casos de GBM com e sem a deleção EGFRvIII.*** Curva de Kaplan Meier e cálculo de *log rank*.

4.2 – Amplificação

Foi realizada a análise da amplificação do gene EGFR por RQ-PCR em 145 amostras de tumor e destes, 29 (20%) apresentaram amplificação, correspondendo a 1 de 22 (4,5%) casos AP, 1 de 22 (4,5%) AGII, 1 de 17 (5,9%) AA e 26 de 84 (30,9%) GBM (Figura 21).

Foi calculada a curva de Kaplan Meier de sobrevida para os casos de GBM sem e com amplificação e não se observou diferença estatisticamente significativa (p = 0,672) (Figura 22), embora os pacientes com amplificação no gene apresentassem uma tendência à menor sobrevida.

Ainda com relação aos casos com amplificação de *EGFR*, foi construída uma curva de sobrevida (Kaplan Meier) entre estes e os casos que apresentaram amplificação e a deleção EGFRvIII concomitantemente. Assim sendo, foi observado que houve uma diminuição significativa da sobrevida dos pacientes que apresentaram simultaneamente a amplificação e a forma mutante EGFRvIII, se comparados aos pacientes que apresentaram somente a amplificação do gene (p = 0,041). A média e mediana de sobrevida do grupo que apresentou ambas as alterações foram ambas de 8 meses, e as do grupo com somente a amplificação foram 19 e 11 meses, respectivamente, indicando uma média de sobrevida de 8 meses para o primeiro grupo contra 1 ano e 7 meses do segundo (Figura 23).

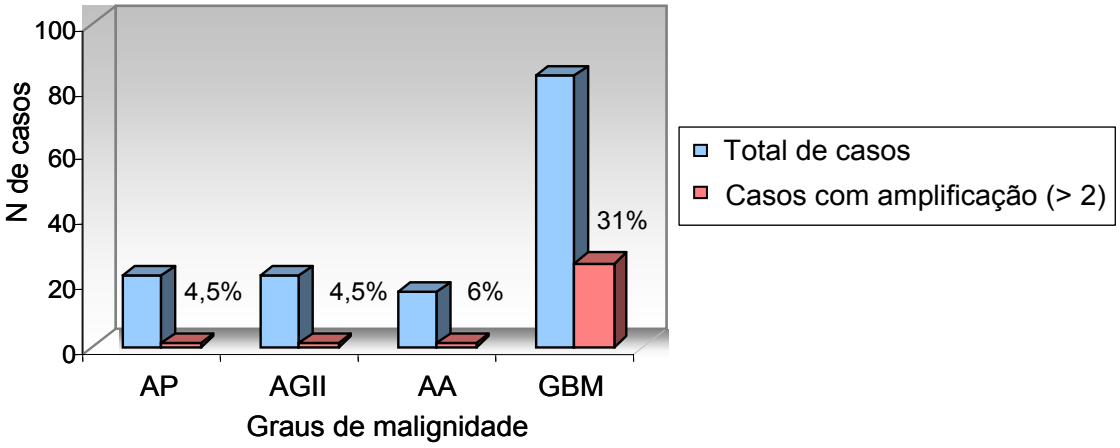


FIGURA 21. ***Gráfico demonstrando o número de casos com amplificação do gene EGFR*** *(barras rosas)* ***em relação ao número total de casos*** *(barras azuis)* ***para cada grau de astrocitoma (AP-GBM).*** AP = astrocitoma pilocítico; AGII = astrocitoma grau II; AA = astrocitoma anaplásico; GBM = glioblastoma multiforme.

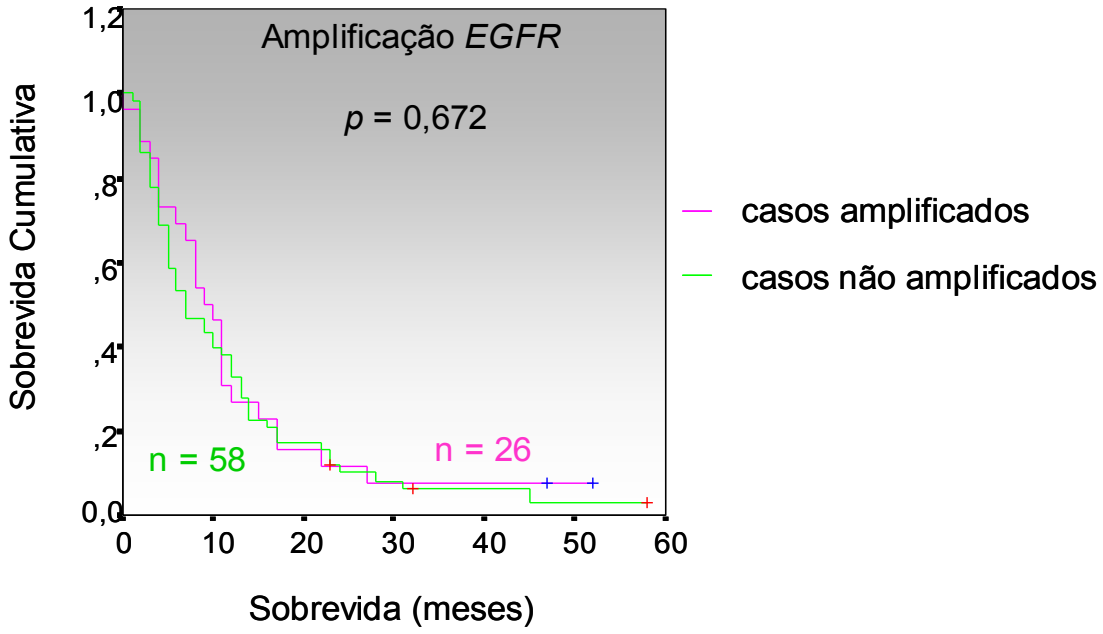


FIGURA 22. ***Curva de sobrevida entre casos de GBM com e sem amplificação de* EGFR.** Curva de Kaplan Meier e cálculo de *log rank*.

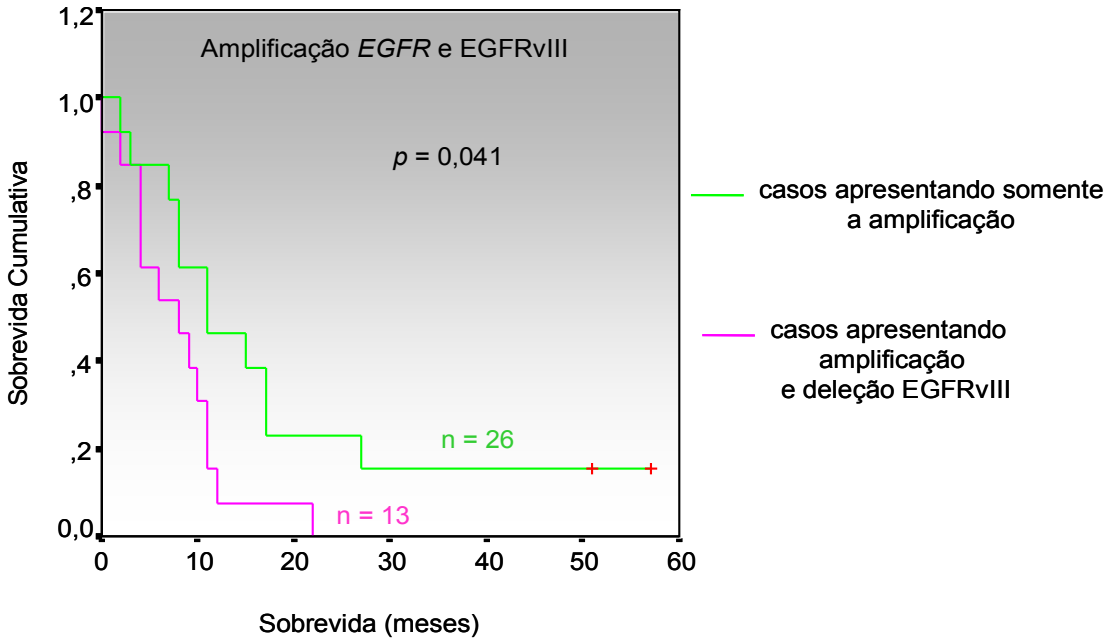


FIGURA 23. ***Curva de sobrevida entre casos de GBM com apenas a amplificação de* EGFR *e casos de GBM apresentando a amplificação de* EGFR *e a deleção EGFRvIII concomitantemente.*** Curva de Kaplan Meier e cálculo de *log rank*.

4.3 – Expressão do RNA Mensageiro (RNAm)

4.3.1 – Expressão Relativa do Gene EGFR

Foi analisada a expressão de *EGFR* por RQ-PCR em 145 amostras de tumor. As reações de PCR foram analisadas quanto à sua eficiência de amplificação. Para se determinar o aumento nos níveis de expressão do seu RNAm foi calculado o valor da mediana dos valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ entre os casos de GBM, que corresponde ao valor 7,50. Dessa maneira, considerou-se valores < 7,50 como hipoexpressos e valores ≥ 7,50 como hiperexpressos para *EGFR*.

Foi detectada a hiperexpressão do gene em 88 casos no total (60,7%), correspondendo a 14 de 22 (63,6%) casos AP, 17 de 22 (77,3%) de AGII, 15 de 17 (88,2%) de AA e 42 de 84 (50%) de GBM (Figura 24).

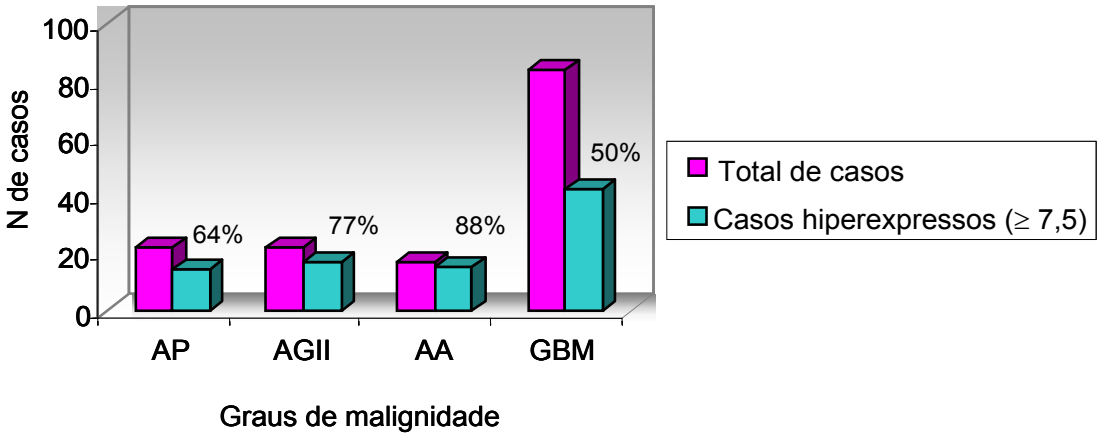


FIGURA 24. ***Gráfico demonstrando o número de casos com aumento de expressão do gene EGFR*** *(valores ≥ 7,50) (barras azuis)* ***em relação ao número total de casos*** *(barras rosas)* ***para cada grau de astrocitoma (AP-GBM).*** AP = astrocitoma pilocítico; AGII = astrocitoma grau II; AA = astrocitoma anaplásico; GBM = glioblastoma multiforme.

A Figura 25 mostra a expressão relativa de *EGFR* nos astrocitomas de diferentes graus de malignidade. Há uma visível dispersão e um notável aumento da expressão de *EGFR* em todos os graus de astrocitomas. Entretanto, observa-se que a média da hiperexpressão nos astrocitomas difusos é maior que nos casos de astrocitomas pilocíticos.

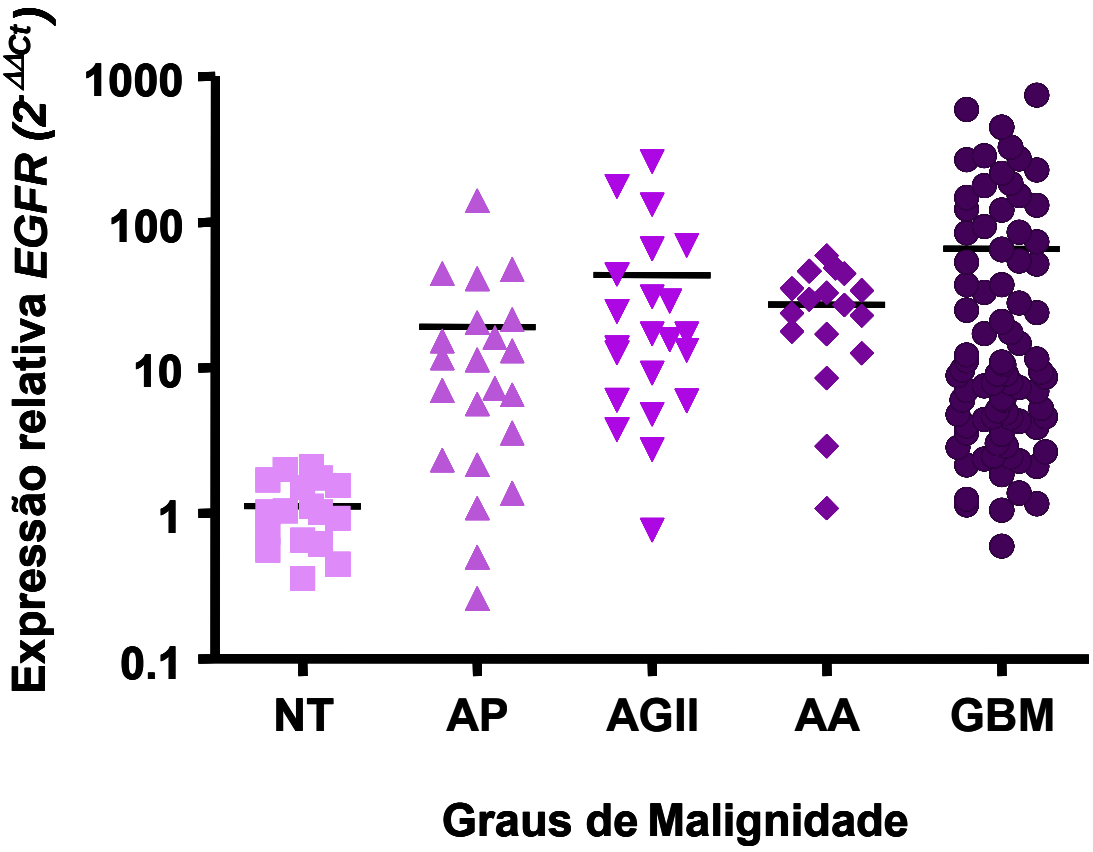


FIGURA 25. ***Gráfico de expressão relativa do gene EGFR em todos os graus de astrocitomas em relação ao tecido não tumoral.*** Há uma visível dispersão da expressão de *EGFR* em todos os graus. A média da expressão, representada pela barra horizontal em cada grupo, está maior nos astrocitomas difusamente infiltrativo que nos astrocitomas pilocíticos, sugerindo um aumento da expressão gênica com relação ao aumento da malignidade. NT = não tumoral; AP = astrocitoma pilocítico; AGII = astrocitoma grau II; AA = astrocitoma anaplásico; GBM = Glioblastoma multiforme.

Foi realizada a análise estatística e de sobrevida dos pacientes com GBM que apresentaram ou não hiperexpressão do gene. Entretanto, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada (p = 0,901) (Figura 26).

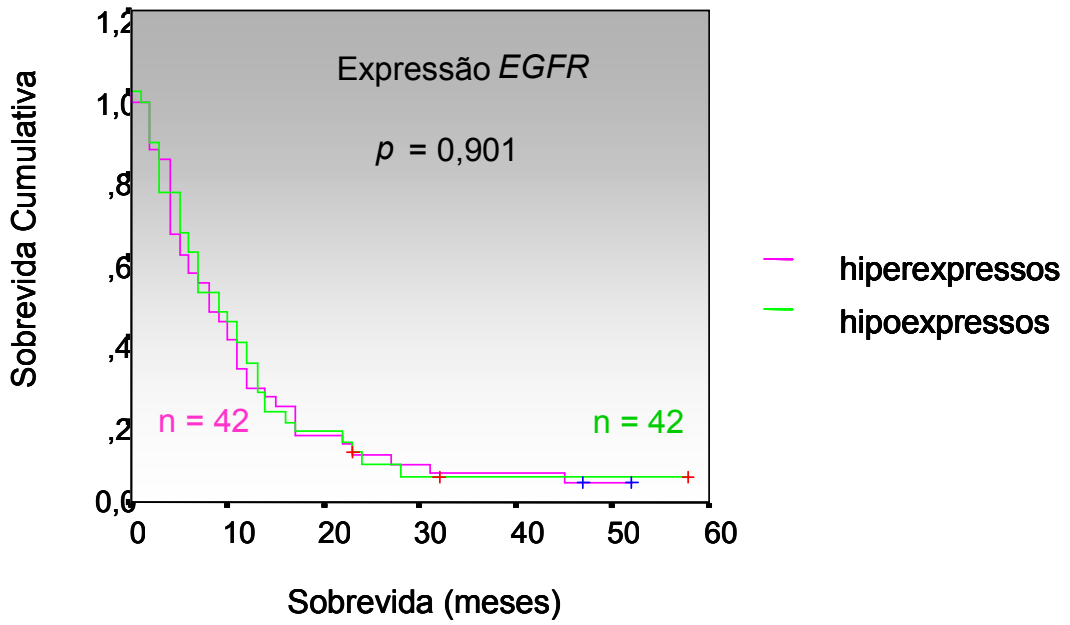


FIGURA 26. ***Curva de sobrevida entre casos de GBM com e sem aumento de expressão do gene EGFR.*** O valor estabelecido para os casos de GBM que apresentaram ou não aumento da expressão de *EGFR* foi segundo o valor da mediana dos mesmos = 7,50. Curva realizada por Kaplan Meier e aplicado cálculo de *log rank*.

4.3.2 – Expressão Relativa do Gene IL-13Rα2

Foi analisada a expressão de *IL-13Rα2* por RQ-PCR em 145 amostras de tumor. As reações de PCR foram analisadas quanto à sua eficiência de amplificação. Para se determinar o aumento nos níveis de expressão do seu mRNA foi calculado o valor da mediana dos valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ entre os casos de GBM, que corresponde ao valor 4,41. Dessa maneira, considerou-se valores < 4,41 como hipoexpressos e valores ≥ 4,41 como hiperexpressos para *IL-13Rα2*.

Foi detectada a hiperexpressão do gene em 62 casos no total (42,8%), correspondendo a 13 de 22 (59%) casos AP, 4 de 22 (18,2%) AGII, 5 de 17 (29,4%) de AA e 40 de 84 (47,6%) de GBM (Figura 27).

É importante salientar a ausência de expressão de *IL-13Rα2* em 2 casos AP (9%), 8 AGII (36%), 7 AA (41%) e 3 GBM (3,6%), totalizando 20 casos da casuística (14%) (Anexo 4).

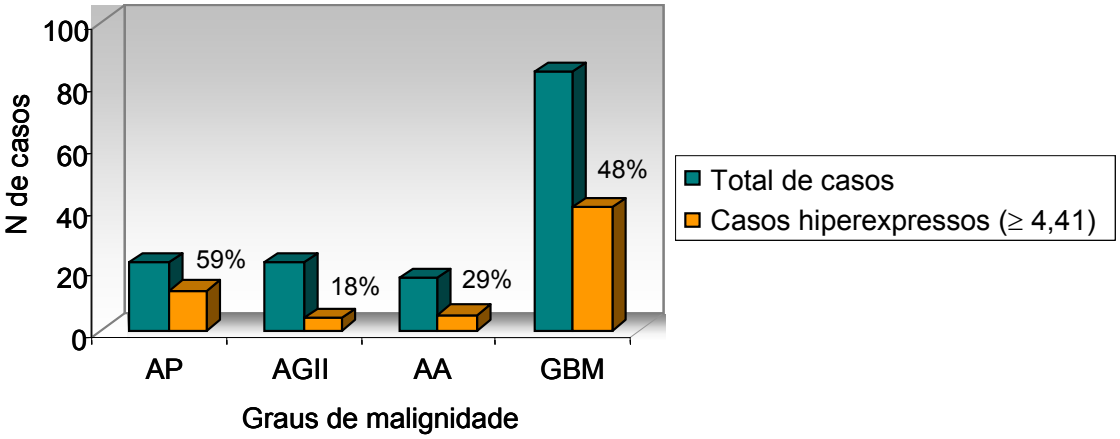


FIGURA 27. ***Gráfico demonstrando o número de casos com expressão do gene IL-13Rα2*** *(valores ≥ 4,41) (barras alaranjadas)* ***em relação ao número total de casos*** *(barras verdes)* ***para cada grau de astrocitoma (AP-GBM).*** AP = astrocitoma pilocítico; AGII = astrocitoma grau II; AA = astrocitoma anaplásico; GBM = glioblastoma multiforme.

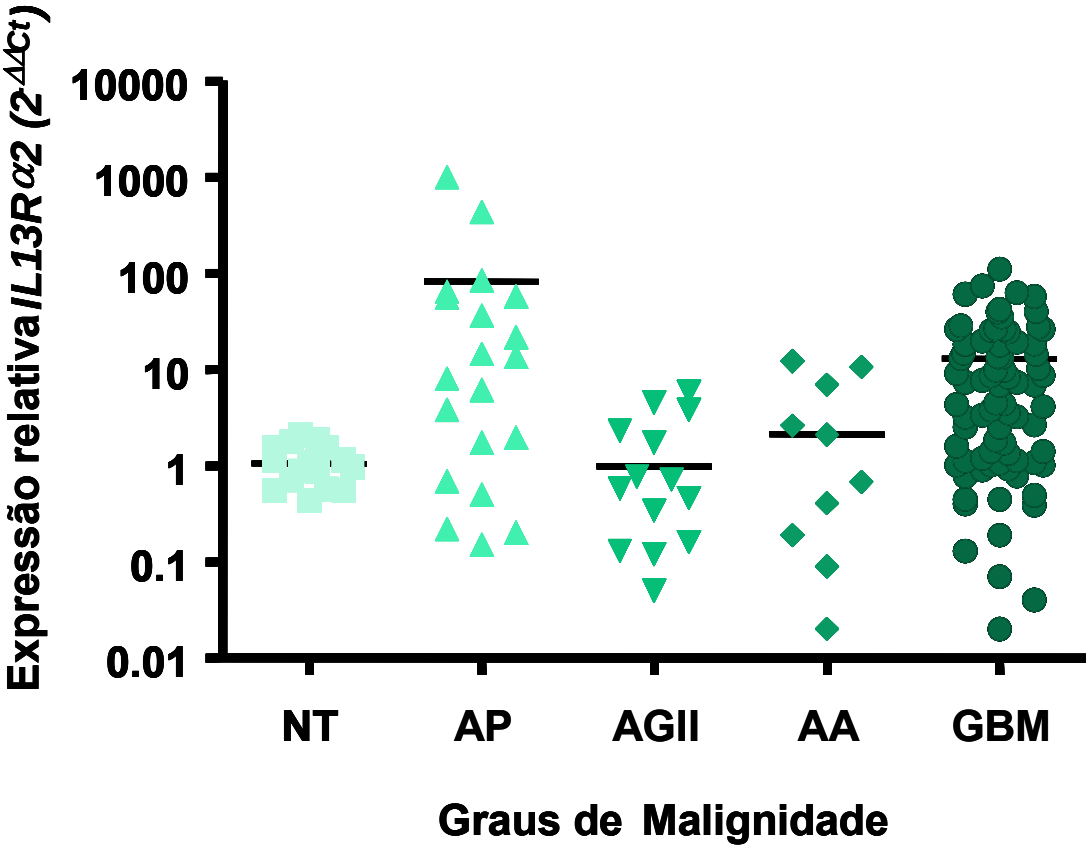


FIGURA 28. ***Gráfico de expressão relativa do gene IL-13Rα2 em todos os graus de astrocitomas em relação ao tecido não tumoral.*** Há uma visível dispersão da expressão de *IL-13Rα2* em todos os graus de astrocitomas e um aumento gradativo da expressão de AGII a GBM. A média da expressão, representada pela barra horizontal em cada grupo, surpreendentemente, está maior nos astrocitomas de grau I, do que nos astrocitomas difusamente infiltrativos.

A Figura 28 mostra a expressão relativa de *IL-13Rα2* nos astrocitomas de diferentes graus de malignidade. Há uma dispersão notável em todos os graus de astrocitomas e interessantemente, é observado um aumento gradativo da expressão desse gene de AGII a GBM. Entretanto, observa-se que a média da expressão nos casos AGII é semelhante à média da expressão dos casos não tumorais, do tecido calibrador. Em contraste, obervamos também uma hiperexpressão surpreendente nos astrocitomas pilocíticos.

Foi realizada a análise estatística e de sobrevida dos pacientes com GBM que apresentaram ou não hiperexpressão do gene em questão. Entretanto, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada (p = 0,964) (Figura 29).

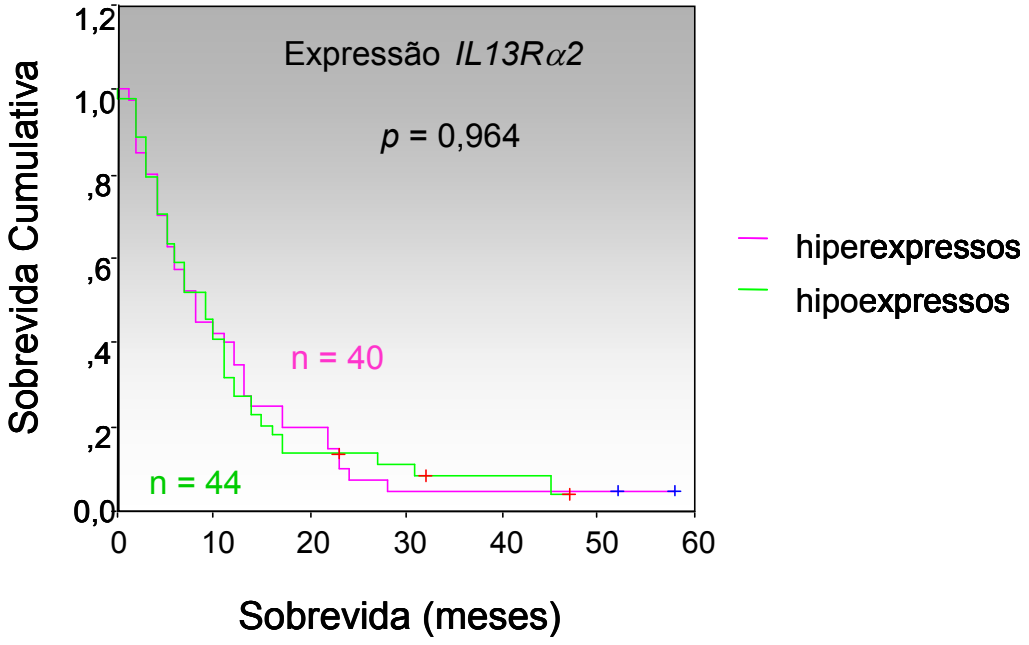


FIGURA 29. ***Curva de sobrevida entre casos de GBM com e sem aumento de expressão do gene IL13Rα2.*** O valor estabelecido para os casos de GBM que apresentaram ou não aumento da expressão de *IL13RA2* foi segundo o valor da mediana dos mesmos = 4,41. Curva realizada por Kaplan Meier e aplicado cálculo de *log rank*.

4.4 – Expressão da Proteína EGFR

O aumento da expressão da proteína EGFR foi analisada por imunohistoquímica com anticorpo que reconhece ambas as formas, a selvagem (EGFRwt) e a deletada (EGFRvIII). Foi observado um acúmulo citoplasmático em 74 das 145 amostras de tumor (51%), correspondendo a 8 de 22 (36,7%) casos AP, 12 de 22 (54,5%) AGII, 8 de 17 (47,1%) AA e 46 de 84 (54,8%) GBM (Figura 30).

Dentre os casos de GBM foi analisada a sobrevida dos pacientes através da construção da curva de sobrevida Kaplan Meier, entretanto o cálculo *log rank* não demonstrou significância estatística (p = 0,948) (Figura 31).

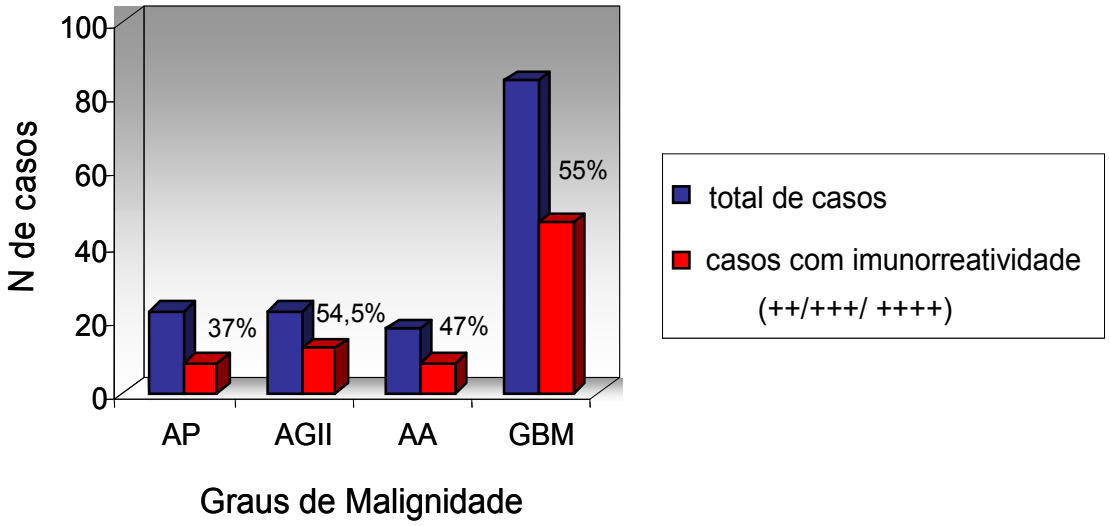


FIGURA 30. ***Gráfico demonstrando o número de casos com expressão da proteína EGFR*** *(barras vermelhas)* ***com relação ao número total de casos*** *(barras azuis)*: casos com positividade ++, +++, ++++ na imunorreatividade (análise semiquantitativa) para cada grau de astrocitoma (AP-GBM). AP = astrocitoma pilocítico; AGII = astrocitoma grau II; AA = astrocitoma anaplásico; GBM = Glioblastoma multiforme.

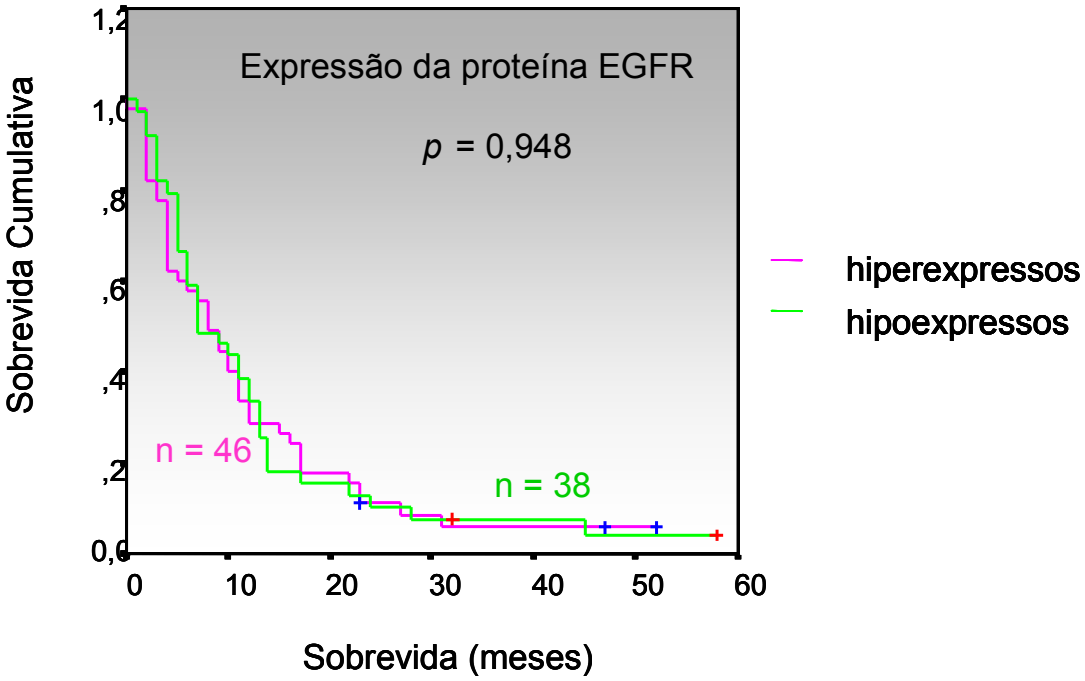


FIGURA 31. ***Curva de sobrevida entre casos de GBM com e sem aumento de expressão da proteína EGFR.*** Curva realizada por Kaplan Meier e aplicado cálculo de *log rank*.

Todos os casos positivos apresentaram forte reação na maioria das células tumorais, embora a intensidade da reação tenha variado entre as células. As análises de IHQ positiva de EGFR mostraram marcação citoplasmática (Figura 32), e em alguns casos, associados à marcação nuclear (Figura 33). As células endoteliais predominantemente em formação glomerular, com múltiplas camadas, apresentaram reação negativa ao EGFR.

A marcação positiva com acúmulo nuclear foi encontrada somente nos casos de astrocitomas difusamente infiltrativos. Essa marcação nuclear foi observada em 22 casos (15,2%), sendo que 2 casos AGII apresentaram uma marcação denominada média, 2 casos AA, apresentaram um com marcação fraca e o outro com forte, e dos 18 casos de GBM, 5 apresentaram marcação fraca, 7 média e 6 com marcação forte (Figura 34).

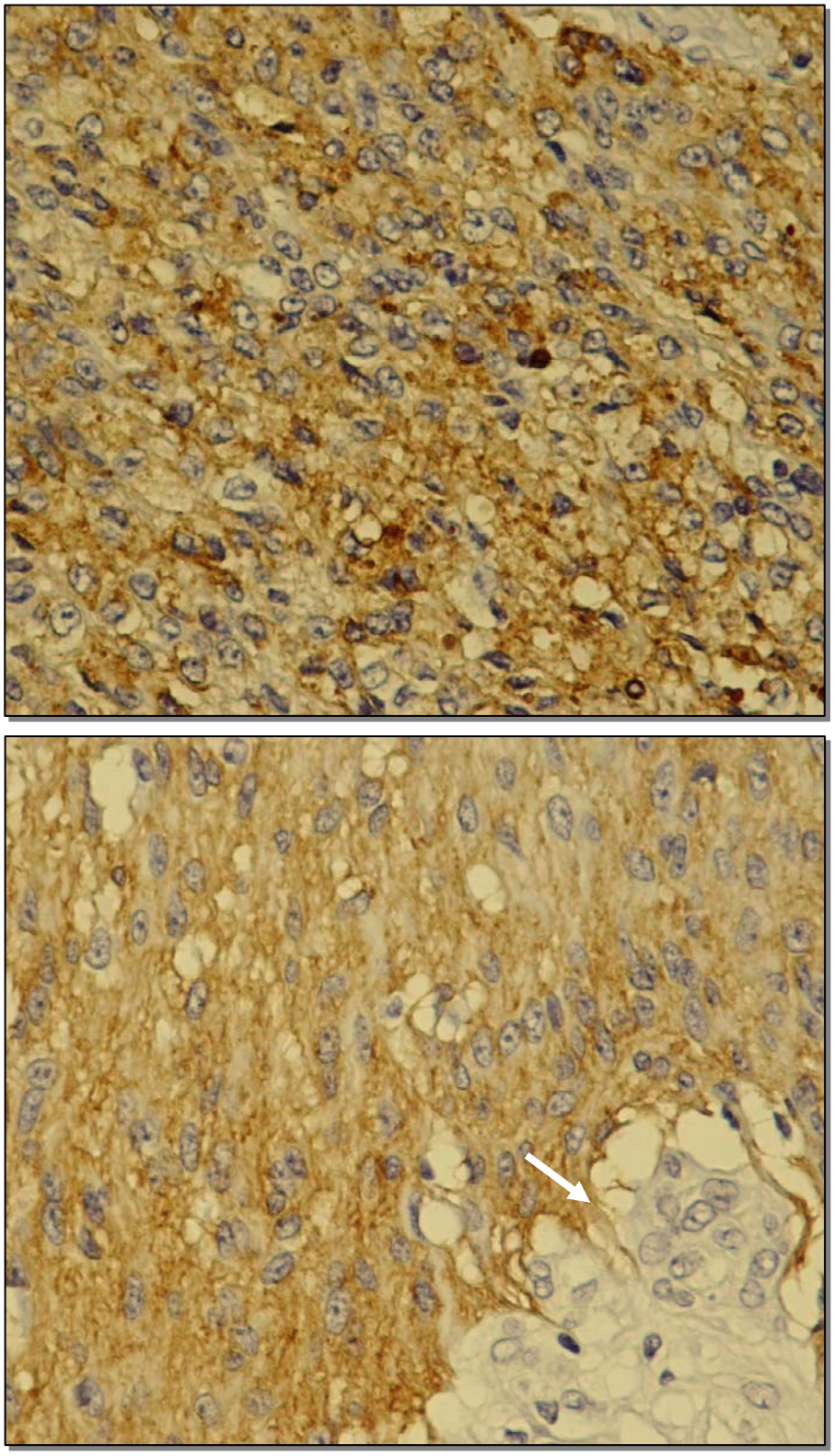


FIGURA 32. ***Fotomicroscopia óptica de imunohistoquímica de EGFR do caso 194 de GBM.*** Demonstra um acúmulo citoplasmático positivo para EGFR, sem acúmulo nuclear, num aumento de 200x (A) e no aumento maior de 400x (B). Observa-se a reação negativa de IHQ para as células endoteliais (*) (anticorpo utilizado: clone 31G7, Zymed).

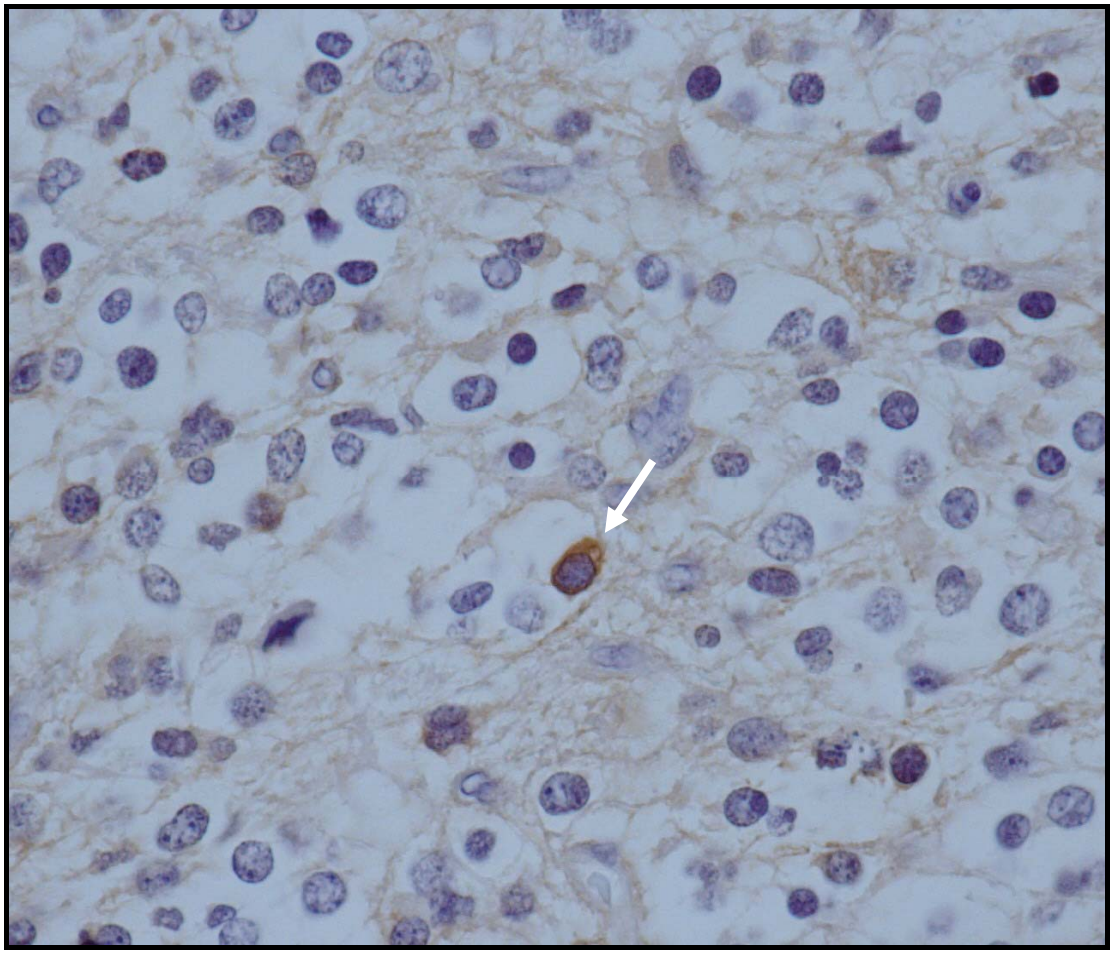


FIGURA 33. ***Fotomicroscopia óptica de imunohistoquímica de EGFR do caso 1162 de GBM.*** Demonstra um acúmulo citoplasmático positivo para EGFR, destacando-se um acúmulo nuclear, num aumento de 400x (anticorpo utilizado: clone 31G7, Zymed).

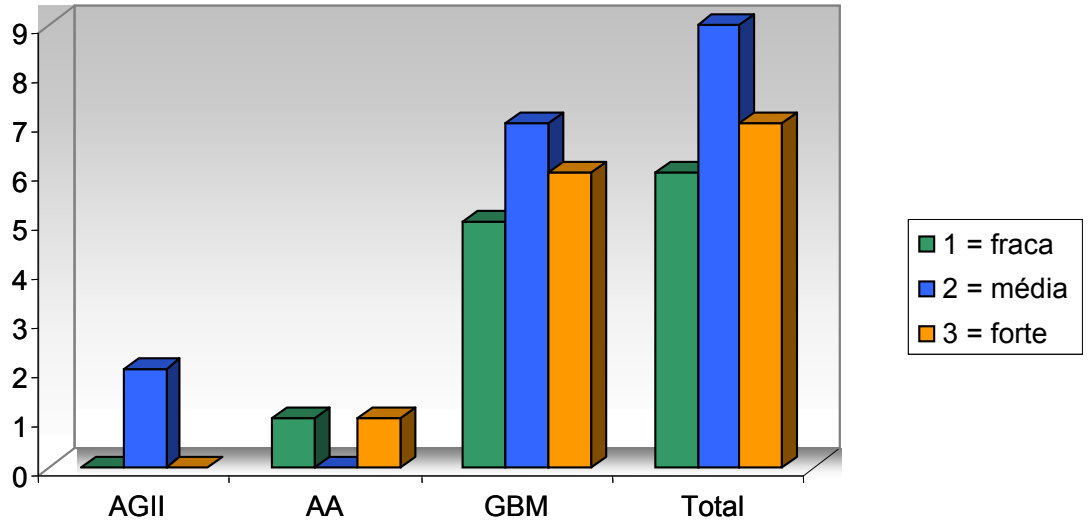


FIGURA 34. ***Gráfico de barras mostrando o número de casos com marcação nuclear de acordo com a análise qualitativa realizada na leitura de IHQ.*** Análise varia de 1-3, com suas respectivas cores, como mostra a legenda ao lado da figura).

4.5 – Análises de *EGFR*: Associações com as Características Histopatológicas, Situação do Paciente, Gênero e Idade

Em nosso estudo, a hiperexpressão do gene e da proteína foi encontrada em todos os graus, resultando num total de 88 casos (61%) para a expressão gênica e 74 casos (51%) para a expressão da proteína, sendo que o aumento de expressão está relacionado com o aumento da malignidade (p = 0,001). A correlação entre ambas as expressões foi de 78,1% (57 = 7 AP, 9 AGII, 8 AA e 33 GBM) e foi estatisticamente significante (p = 0,001). Em contrapartida, quando a análise de expressão gênica foi associada com os dados demográficos de gênero e idade ao diagnóstico (≤ 45 e > 45 anos) e situação atual do paciente (*status*: vivo ou óbito) não houve correlação estatisticamente significativa entre os achados. Todos os dados analisados estão apresentados na Tabela 11.

Adicionalmente, a amplificação de *EGFR* que foi encontrada em 29 casos (18%), também apresentou significância estatística com a expressão do gene (p = 0,001) como pode ser observado na Tabela 11.

A Tabela 12 demonstra os casos que apresentaram amplificação de *EGFR* e a associação dos mesmos com a expressão da proteína, idade ao diagnóstico (≤ 45 anos e > 45 anos), gênero, situação atual do paciente, bem como o critério histopatológico do tumor. Os resultados foram estatisticamente significantes em todas as associações (p < 0,001), exceto com relação ao gênero.

TABELA 11 – EXPRESSÃO DE *EGFR* DE COM RELAÇÃO AO GÊNERO, IDADE, *STATUS*, CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS, IMUNOHISTOQUÍMICA E AMPLIFICAÇÃO DE EGFR EM ASTROCITOMAS.

		Expressão *EGFR*			
Características	Total Pacientes (%)	hiper[1]	hipo [2]	%	*p* (valor)
Gênero					
Fem	61 (37,6)	31	30	50,8	0,487
Masc	101 (62,3)	57	44	56,4	
Idade ao diagnóstico (anos)					
≤ 45	93 (57,4)	52	41	55,9	0,637
> 45	69 (42,6)	36	33	52,2	
status					
vivo	71 (43,8)	37	34	52,1	0,618
morto	91 (56,2)	51	40	56	
Histopatologia[3]					
tecido não tumoral	17 (10,5)	0	17	0,0	
astrocitoma pilocítico	22 (13,6)	14	8	63,6	
astrocitoma de baixo grau	22 (13,6)	17	5	77,3	*0,001*
astrocitoma anaplásico	17 (10,5)	15	2	88,2	
glioblastoma multiforme	84 (51,8)	42	42	50	
IHQ EGFR [4]					
negativa	89 (55)	31	58	34,8	*0,001*
positiva	73 (45)	57	16	78,1	
Amplificação EGFR					
negativa	133 (82,1)	60	73	45,1	*0,001*
positiva	29 (17,9)	28	1	96,5	
Total dos casos	162 (100)	88	74	54,3	

[1]Hiperexpressão *EGFR* de acordo com a mediana dos casos de GBM (≥ 9,10).
[2]Hipoexpressão *EGFR* de acordo com a mediana dos casos de GBM (< 9,10).
[3]De acordo com a classificação OMS de tumores.
[4]Imunohistoquímica para EGFR: negativa = 0 ou < 24% de células marcadas; e positiva: >25% de células marcadas.
[5]Amplificação para *EGFR*: negativa ≤ 2 Ct e positiva > 2 Ct.

TABELA 12 – AMPLIFICAÇÃO DO GENE *EGFR* DE ACORDO COM GÊNERO, IDADE, *STATUS*, CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS E EXPRESSÃO DA PROTEÍNA.

		Amplificação *EGFR*			
Características	Total Pacientes (%)	presente	ausente	%	*p* (valor)
Gênero					
Fem	61 (37,6)	10	51	16,4	0,697
Masc	101 (62,3)	19	82	18,8	
Idade ao diagnóstico (anos)					
≤ 45	93 (57,4)	8	85	8,6	*<0,001*
> 45	69 (42,6)	21	48	30,4	
status					
vivo	71 (43,8)	4	67	5,6	*<0,001*
morto	91 (56,2)	25	66	27,5	
Histopatologia[3]					
tecido não tumoral	17 (10,5)	0	17	0	
astrocitoma pilocítico	22 (13,6)	1	21	4,5	
astrocitoma de baixo grau	22 (13,6)	1	21	4,5	*<0,001*
astrocitoma anaplásico	17 (10,5)	1	16	5,9	
glioblastoma multiforme	84 (51,8)	26	58	30,9	
IHQ EGFR [1]					
negativa	88 (54,3)	6	82	6,8	*<0,001*
positiva	74 (45,7)	23	51	31,1	
Total dos casos	162 (100)	29	133	17,9	

[1]De acordo com a classificação OMS de tumores.
[2]Imunohistoquímica para EGFR: negativa = 0 ou < 24% de células marcadas; e positiva: >25% de células marcadas.

A deleção EGFRvIII foi encontrada em 19% do total de 101 casos de astrocitomas de maior grau de malignidade analisados (17 AA e 84 GBM), sendo que a presença da deleção foi exclusivamente encontrada nos casos de GBM (18 de 84, 23%). Esses resultados foram estatisticamente significantes em todas as associações realizadas, exceto com relação ao gênero e idade ao diagnóstico. São elas: situação do paciente, sendo p = 0,030, expressão gênica, sendo p = 0,001, e amplificação do gene e expressão da proteína, sendo p < 0,001, conforme pode ser observado na Tabela 13.

A correlação entre os casos deletados que apresentaram hiperexpressão do gene foi de 89,5% (17 de 19 casos), ou seja, apenas 2

casos deletados não apresentaram hiperexpressão gênica, mas um deles (caso 1162) apresentou aumento de expressão da proteína e, o outro (caso 216) apresentou amplificação do gene. Da mesma maneira, os casos deletados que apresentaram simultaneamente aumento de expressão da proteína foram 16 (84%) (Tabela 13).

TABELA 13 – DELEÇÃO DE *EGFR* DE ACORDO COM GÊNERO, IDADE, *STATUS*, EXPRESSÃO E AMPLIFICAÇÃO DO GENE E EXPRESSÃO DA PROTEÍNA EM AA e GBM.

		Deleção *EGFR*			
	Pacientes (%)	presente	ausente	%	*p* (valor)
Gênero					
Fem	61 (37,6)	7	54	11,5	0,824
Masc	101 (62,3)	12	89	11,9	
Idade ao diagnóstico (anos)					
≤ 45	35 (34,6)	5	30	14,3	0,397
> 45	66 (65,3)	14	52	21,2	
status					
vivo	17 (16,8)	0	17	0,0	*0,030*
morto	84 (83,2)	19	65	22,6	
Expressão *EGFR*					
hipo[1]	44 (43,6)	2	42	4,5	*0,001*
hiper[2]	57 (56,4)	17	40	29,8	
Amplificação EGFR [3]					
negativa	74 (73,3)	6	68	8,1	*<0,001*
positiva	27 (26,7)	13	14	48,1	
IHQ EGFR [4]					
negativa	47 (46,5)	2	45	4,3	*<0,001*
positiva	54 (53,5)	17	37	31,5	
Total dos casos	101 (100)	19	82	18,8	

[1]Hiperexpressão *EGFR* de acordo com a mediana dos casos de GBM (≥ 9,1)
[2]Hipoexpressão *EGFR* de acordo com a mediana dos casos de GBM (< 9,1)
[3]Amplificação para *EGFR*: negativa ≤ 2 Ct e positiva > 2 Ct.
[4]Imunohistoquímica para EGFR: negativa = 0 ou < 24% de células marcadas; e positiva: >25% de células marcadas.

Em relação aos 29 casos que apresentaram amplificação de *EGFR*, foi observado que 28 casos apresentaram simultaneamente hiperexpressão do gene (96,5%) (Tabela 11), bem como 23 casos (79,3%) apresentaram hiperexpressão da proteína (Tabela 12) e 13 casos (44,8%) apresentaram a deleção EGFRvIII (Tabela 13).

Com relação aos casos de GBM, dos 26 casos com amplificação de *EGFR*, 25 casos apresentaram hiperexpressão do gene (96%) e 21 (81%) deles apresentaram aumento da expressão da proteína. Ainda com relação aos GBMs, dos 17 casos (17 de 19 deletados) que apresentaram deleção e simultaneamente a hiperexpressão do gene (89,5%), em 16 deles (94%) observou-se um aumento de expressão da proteína, e em 13 (76,5%) foi observado a amplificação do gene, ou seja, 50% dos casos de GBM com amplificação de *EGFR* (total de 26 casos amplificados), apresentaram simultaneamente a deleção EGFRvIII.

Adicionalmente, 11 casos de GBM apresentaram simultaneamente aumento de expressão do gene e proteína, amplificação e deleção, com uma média de expressão do gene aproximada a 200 no cálculo $2^{-\Delta\Delta Ct}$, uma média de amplificação aproximada a 24 no cálculo $2\Delta Ct$, e na análise semiquantitativa para expressão da proteína, todos esses casos receberam quantificação ≥ 3 (Tabela 14).

Todos esses 11 casos de GBM, bem como todos os casos que apresentaram a forma deletada, apresentaram uma média de idade ao diagnóstico de 56 anos, uma média de sobrevida menor que 1 ano (8 meses), e a média de sobrevida de todos os 19 casos que apresentaram a deleção foi de 8,5 meses (Tabela 14). Em contrapartida, todos os casos ainda vivos de GBM, que corresponde a apenas 5 casos, possuem uma sobrevida elevada, de quase 5 anos (média de 55 meses) (última atualização feita em junho de 2009).

TABELA 14 – OS 11 CASOS DE GBM QUE APRESENTARAM SIMULTANEAMENTE EXPRESSÃO E AMPLIFICAÇÃO DE *EGFR*, EXPRESSÃO DA PROTEÍNA E A DELEÇÃO EGFRvIII, COM IDADE AO DIAGNÓSTICO E SOBREVIDA.

Casos	Idade ao Diagnóstico	Sobrevida (meses)	Expressão gene	Amplificação	Expressão Proteína	EGFRvIII
194	71	22	123,28	28,25	4	presente
256	41	2	24,95	2,60	3	presente
269	65	0	218,31	20,25	3	presente
297	78	11	274,14	23,83	4	presente
435	34	12	11,03	19,43	3	presente
496	57	8	148,94	14,57	4	presente
881	49	4	269,84	21,33	4	presente
1003	68	4	330,40	52,53	3	presente
1123	53	11	121,21	19,36	4	presente
1133	52	9	230,01	49,69	3	presente
1243	47	10	451,94	11,75	4	presente
médias	**56**	**8**	**200,37**	**23,97**	**≥3**	**---**

Expressão do gene: valores $2^{-\Delta\Delta Ct}$
Amplificação do gene: ΔCt = Ct *HBb* – Ct *EGFR*
Expressão da proteína: negativa = 0 ou < 24% de células marcadas; e positiva: >25% de células marcadas.

A Tabela 15 mostra esses 5 casos com idade ao diagnóstico, sobrevida (calculados desde a data da cirurgia até junho/2009) e todos os resultados das análises de EGFR realizados. Pode-se observar que 2 casos (724 e 854) apresentaram aumento da expressão do gene e da proteína, bem como amplificação de *EGFR*, entretanto, a média de cada uma dessas análises foi menor (157,57 para a expressão e 10,32 para a amplificação) que a média dessas mesmas análises dos casos que já morreram demonstrados na Tabela 14 (200,37 para a expressão e 23,97 para a amplificação). Ao mesmo tempo, se calcularmos as médias de expressão e amplificação apenas de ambos os casos, os valores serão maiores (388,33 para a expressão e 24,06 para amplificação). Assim, o aumento de expressão, tanto do gene quanto da proteína, a presença da amplificação, não podem ser considerados fatores prognósticos, mas podem nos auxiliar na explicação dos mecanismos moleculares de *EGFR* que podem influenciar no processo de tumorigênese, na malignidade e na progressão dos astrocitomas.

Dessa maneira, pode-se afirmar que a presença da deleção EGFRvIII em GBM pode ser um importante fator prognóstico.

TABELA 15 – OS 5 CASOS DE GBM AINDA VIVOS JUNTAMENTE COM AS ANÁLISES REALIZADAS PARA A VERIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO E AMPLIFICAÇÃO DE *EGFR*, EXPRESSÃO DA PROTEÍNA E PRESENÇA DA DELEÇÃO EGFRvIII.

Casos	Idade ao Diagnóstico	Seguimento: jun/09 (meses)	Expressão gene	Amplificação	Expressão Proteína	EGFRvIII
592	40	68	2,30	0,90	0	ausente
724	62	62	178,36	8,85	3	ausente
854	46	55	598,30	39,26	4	ausente
1074	32	51	4,56	1,24	0	ausente
1205	69	37	4,32	1,37	3	ausente
médias	**49,8**	**54,6**	**157,57**	**10,32**	---	---

Expressão do gene: valores $2^{-\Delta\Delta Ct}$
Amplificação do gene: ΔCt = Ct *HBb* – Ct *EGFR*
Expressão da proteína: negativa = 0 ou < 24% de células marcadas; e positiva: >25% de células marcadas.

Ainda com relação aos casos de GBM, estes foram divididos em dois grupos quanto à expressão do gene:

I) os 35 menos expressos (hipoexpressos);

II) os 35 mais expressos (hiperexpressos).

Em seguida, esses resultados foram analisados juntamente com os resultados da análise da expressão da proteína (Figura 35).

Foi possível observar que o grupo dos 35 hiperexpressos apresentou simultaneamente aumento significativo da expressão da proteína de acordo com a leitura qualitativa de IHQ (3-4), se comparado com a leitura 0 e 1, em que se predomina o grupo dos 35 hipoexpressos. A leitura 2 apresenta-se como intermediária, não apresentando uma diferença significativa entre os dois grupos.

E por fim, considerando-se o limite superior dos casos não tumorais (2,67) para o estabelecimento de hiper e hipoexpressão do gene EGFR, foi obtido um total de 116 de 145 casos (80%), sendo 16 AP (73%), 21 AGII (95%), 16 AA (94%) e 63 GBMs (75%), demonstrando ainda assim aumento de expressão de *EGFR* em todos os graus de astrocitomas, inclusive em AP.

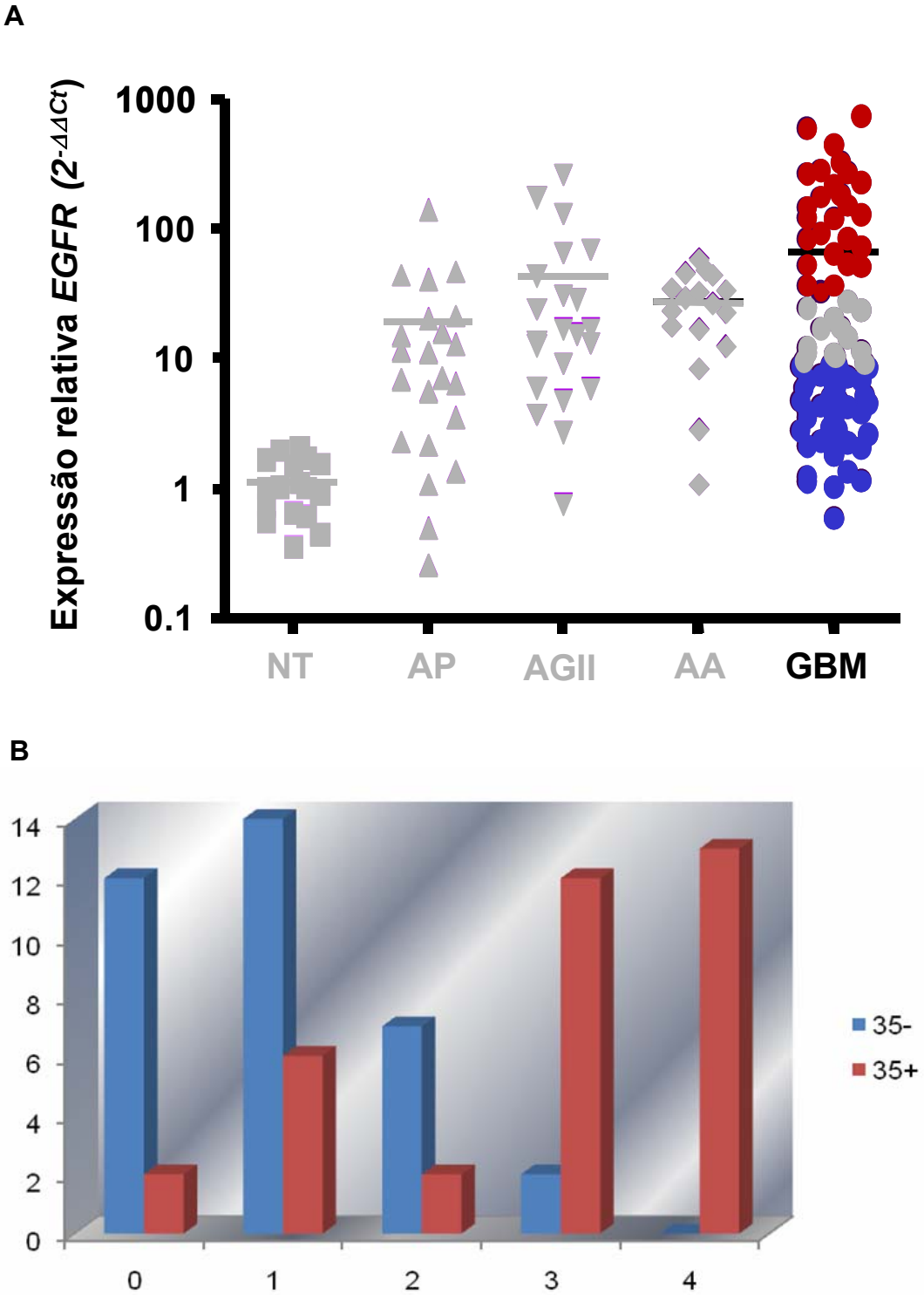


FIGURA 35. ***Gráfico de correlação entre a expressão do RNAm e da proteína.*** Em A é demonstrado o gráfico de expressão relativa de *EGFR* com destaque nos 35 casos hiperexpressos (acima) e nos 35 casos hipoexpressos (abaixo). Em B, esses casos são apresentados num gráfico de barras juntamente com a análise da expressão da proteína por imunohistoquímica: negativa = 0 ou < 24% de células marcadas (0-1); e positiva: >25% de células marcadas (2-4).

A Figura 36 é um resumo de todas as análises de EGFR: expressão (RNAm e proteína), deleção e amplificação, realizadas para todos os graus de astrocitomas.

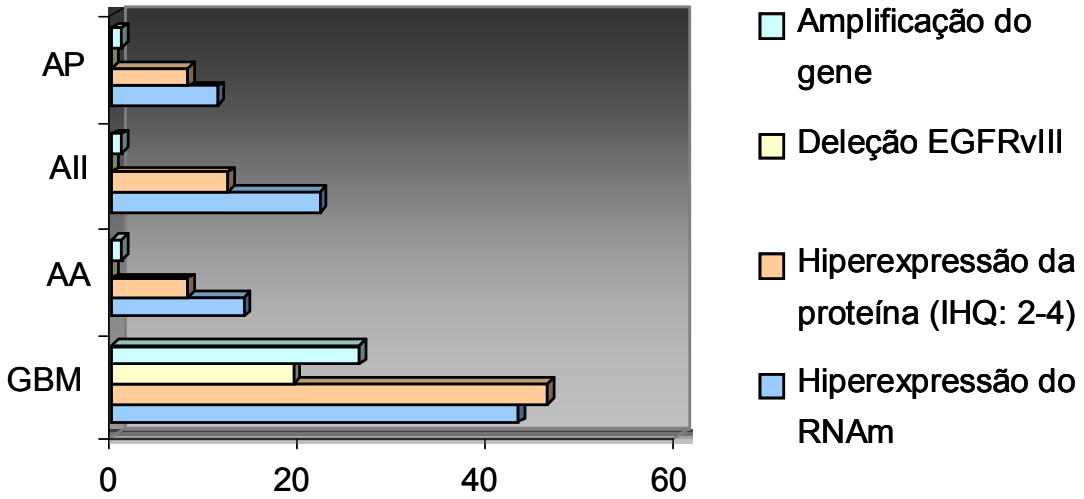


FIGURA 36. ***Gráfico de análise global de EGFR para todos os graus de astrocitomas.*** O gráfico representa todas as análises de EGFR realizadas neste estudo: análise da expressão do RNAm, considerando-se hiperexpressos valores ≥ 9,1 (mediana dos GBM) e da proteína, considerando positividade entre 2-4 (> 25% de estruturas marcadas), análise da deleção EGFRvIII e da amplificação do gene, em todos os graus de astrocitomas.

4.6 – Expressão de *IL13Rα2*: Associações com as Características Histopatológicas, Situação do Paciente, Gênero e Idade

A análise da expressão de *IL13Rα2* foi associada com os dados demográficos de gênero e idade ao diagnóstico quando subdividido em 2 grupos: ≤ 45 anos e > 45 anos, situação atual do paciente (*status*: vivo ou óbito) e critérios histológicos. Houve correlação estatisticamente significativa somente com esta última associação (p = 0,001), conforme pode ser observado na Tabela 16.

TABELA 16 – EXPRESSÃO DE *IL13Rα2* DE ACORDO COM GÊNERO, IDADE, *STATUS*, E CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS EM ASTROCITOMAS.

		Expressão *IL13RA2*			
Características	Total Pacientes (%)	hiper[1]	hipo [2]	%	*p* (valor)
Gênero					
Fem	61 (37,65)	21	40	34,4	0,168
Masc	101 (62,35)	41	60	40,6	
Idade ao diagnóstico (anos)					
≤ 45	93 (57,4)	34	59	36,5	0,153
> 45	69 (42,6)	28	41	40,6	
status					
vivo	71 (43,8)	21	50	29,6	0,122
morto	91 (56,2)	41	50	45	
Histopatologia[3]					
tecido não tumoral	17 (10,5)	0	17	0	
astrocitoma pilocítico	22 (13,6)	13	9	59,1	
astrocitoma de baixo grau	22 (13,6)	4	18	18,2	*0,001*
astrocitoma anaplásico	17 (10,5)	5	12	29,4	
glioblastoma multiforme	84 (51,85)	40	44	47,6	
Total dos casos	162 (100)	62	100	38,3	

[1]Hiperexpressão *IL13Rα2* de acordo com a mediana dos casos de GBM (≥ 4,41).
[2]Hipoexpressão *IL13Rα2* de acordo com a mediana dos casos de GBM (< 4,41).
[3]De acordo com a classificação OMS de tumores.

4.7 – Coexpressão: *EGFR* e *IL13Rα2*

O total de casos que apresentaram aumento das expressões de ambos os genes foi de 24,8% (36 de 145), sendo 7 casos AP, 4 AGII, 5 AA e 20 GBMs.

Para a análise de coexpressão dos genes EGFR e IL13Rα2, foi realizado um teste estatístico não paramétrico, a correlação de Spearman. Para cada grau de astrocitoma foram correlacionados os valores da expressão relativa de ambos os genes. Não foi encontrada significância estatística em nenhum dos graus de astrocitomas ($p > 0,05$), ou seja, não foi detectada coexpressão desses genes para essa amostragem.

A Figura 37 mostra os gráficos realizados por essa análise para cada grau de astrocitoma.

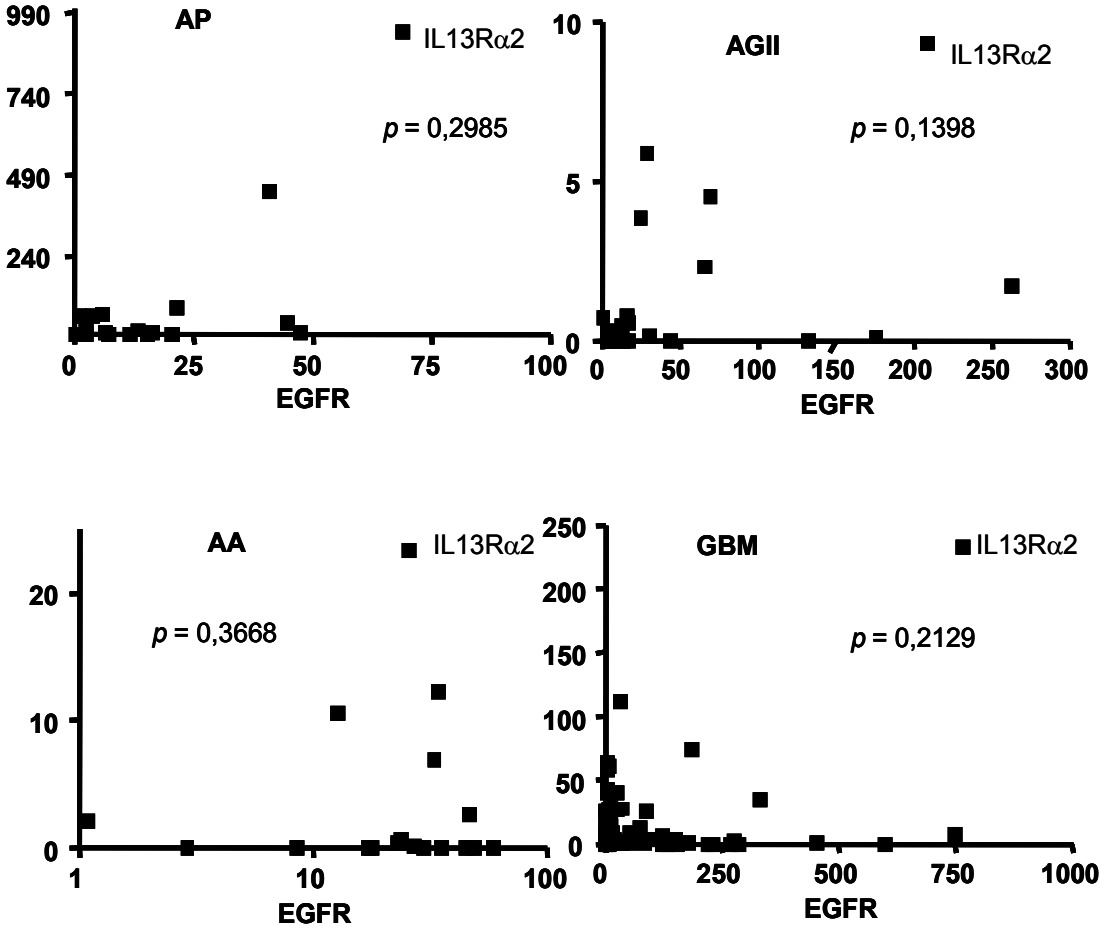


FIGURA 37. ***Gráficos da análise de coexpressão entre os genes EGFR e IL13Rα2 para cada grau de astrocitoma pela correlação de Spearman.*** Nenhuma diferença estatística foi encontrada.

Da mesma maneira que para a expressão de *EGFR*, foi considerado o limite superior dos casos não tumorais (2,06) para o estabelecimento de hiper e hipoexpressão do gene IL13Rα2, obtendo-se um total de 76 de 145 casos (52%), sendo 14 AP (64%), 5 AGII (23%), 5 AA (29%) e 52 GBMs (62%), demonstrando ainda assim aumento de expressão de *IL13Rα2* em todos os graus de astrocitomas, inclusive em AP.

5. DISCUSSÃO

5 – DISCUSSÃO

O presente estudo pode ser considerado o primeiro a realizar uma análise molecular de *EGFR* e seu produto e correlacioná-las com os dados clínicos de pacientes em todos os graus de astrocitomas (AP-GBM). Adicionalmente, este trabalho correlacionou os dados de expressão gênica de EGFR com os de expressão gênica de IL13Rα2, ambos receptores de superfície, e bem descritos como hiperexpressos em um vasto espectro de tumores, incluindo os astrocitomas, e em particular, os GBMs.

Dessa maneira, este estudo contribui para um melhor entendimento do papel das alterações moleculares de *EGFR* e de seu produto, juntamente com a expressão gênica de IL13Rα2, na malignidade e progressão dos astrocitomas.

5.1 – EGFRvIII em Tumores

A análise da mutação mais comum em GBMs, a forma deletada EGFRvIII, foi realizada em todos os graus por RT-PCR, mas apenas nos astrocitomas de alto grau (III-IV) por RQ-PCR. Segundo Rae et al. (2004), a expressão da forma EGFRvIII não foi detectada em câncer de mama primário tanto por RT-PCR quanto por RQ-PCR, exceto em células transfectadas e em GBMs, confirmando que esta mutação de EGFR é rara em certos tumores, mas muito comum em GBM. Ekstrand et al. (1992) e Frederick et al. (2000) realizaram análises de diversas mutações e frequência de *EGFR* em GBM. Os primeiros demonstraram que metade dos casos possuíam a forma EGFRvIII e, os demais, distribuídos em mutações no domínio citoplasmático. Da mesma maneira, o segundo grupo demonstrou que a forma EGFRvIII perfaz 67% da frequência das mutações em GBMs e a forma truncada na porção carboxi-terminal 958 e a deleção dos aminoácidos 521-603, perfazem 15% cada uma delas.

5.2 – EGFRvIII em GBMs e Diminuição da Sobrevida

No presente estudo a análise da presença da deleção foi realizada por RT-PCR, mas como esse método não é muito sensível, já que há uma preferência na amplificação de produtos de tamanhos menores, os casos com deleções foram confirmados por RQ-PCR. A maioria dos trabalhos utiliza-se de imunohistoquímica para verificar a presença da deleção, método este, não tão sensível como RQ-PCR. Apesar de diferentes metodologias os resultados são concordantes: 23% do total de GBMs (19/84) da presente casuística apresenta a deleção EGFRvIII, assim como demonstraram Biernat et al. (2004), em que 67% (20/30) dos casos de GBMs apresentaram positividade para a forma selvagem de EGFR, ou seja, houve expressão da proteína selvagem, e desses casos, (8/30) 27% apresentaram também a positividade para EGFRvIII.

Isso pode ser explicado pelo fato da maior parte da casuística dos estudos citados, inclusive o presente, ser constituída por GMBs primários, nos quais a deleção EGFRvIII é mais rara se comparada com os GBMs secundários (Biernat et al., 2004). Dessa maneira, o fato desse tipo de mutação ser considerada comum em GBMs se comparados com outros tipos de tumores, a freqüência dessa mutação pode variar, dependendo dos casos serem primários ou secundários.

A forma deletada EGFRvIII confere um aumento na tumorigênese e, consequentemente, um pior prognóstico (Nishikawa et al., 1994), como pode ser observado na curva de sobrevida (Kaplan Meier) construída para os pacientes com GBM que apresentaram ou não essa deleção, mostrando uma grande tendência dos pacientes com deleção apresentarem uma menor sobrevida.

5.3 – Correlação da Presença da Forma EGFRvIII com a Amplificação de *EGFR*

A mutação EGFRvIII está frequentemente associada com a amplificação de *EGFR* (Ekstrand et al., 1992; Nishikawa et al., 1994; Frederick et al., 2000; Shinojima et al., 2003; Albulrob et al., 2004). De 50% dos casos amplificados, 40-50% deles apresentam a forma deletada EGFRvIII (Bredel et al., 1999). No presente estudo esta correlação foi estatisticamente significativa ($p < 0,001$), ou seja, dos 27 casos de astrocitomas de alto grau amplificados (1 AA e 26 GBMs), 13 apresentaram a deleção (48%), o que é condizente com a literatura. Interessantemente a associação dos casos amplificados que apresentram esta deleção, resultou numa diminuição da sobrevida dos pacientes com GBM ($p = 0,041$), ressaltando que a presença da deleção, juntamente com a amplificação gênica, podem ser consideradas instrumentos de indicação importante de pior prognóstico.

Em contrapartida, dos 19 casos deletados, 6 (31,6%) não apresentaram amplificação, um dado discordante de Ekstrand et al. (1992), que descreveram que nenhuma alteração genética foi detectada nos casos sem amplificação. Além disso, a amplificação é mais comum em GBMs primários, enquanto que a deleção EGFRvIII é mais rara dentro desse grupo de GBMs (Biernat et al., 2004). De qualquer maneira, esses 6 casos deletados e não amplificados, apresentaram com aumento de expressão tanto nos níveis de RNAm e/ou nos níveis de proteína.

5.4 – Correlação da Amplificação de *EGFR* com os Dados Clínicos

No presente estudo foi detectada a amplificação em pelo menos 1 caso em cada grau de astrocitoma, inclusive no grau I ou AP. Scrideli et al. (2007) realizaram estudos moleculares de *EGFR* e outros genes com relação a todos os graus de astrocitomas, entretanto, existem poucos estudos na literatura neste sentido, envolvendo a progressão e malignidade desses tumores. Com relação à amplificação de *EGFR*, alguns grupos estudaram em astrocitomas difusos (AGII-GBM) (Gilbertson et al., 2003; Arjona et al., 2005), outros, em astrocitomas de alto grau (AA-GBM) (Leenstra et al., 1998; Bredel et al., 1999; Smith et al., 2001), mas a maioria dos grupos analisaram apenas GBMs (Okada et al., 2003; Batchelor et al.,2004; Ohgaki et al.,2004). A análise de amplificação de *EGFR* foi realizada juntamente com as análises da presença da deleção EGFRvIII (Ekstrand et al., 1992; Nishikawa et al., 1994; Frederick et al., 2000; Albulrob et al., 2004) e do aumento no nível de expressão, tanto do gene quanto da proteína (Shinojima et al., 2003; Biernat et al., 2004; Kimura et al., 2004).

Na literatura, o estudo da amplificação de *EGFR* é realizado comparativamente com outras análises de alterações em outros genes (*p53, p16, PTEN*) (Leenstra et al., 1998; Smith et al., 2001; Das et al., 2002; Okada et al., 2003; Gilbertson et al., 2003; Batchelor et al., 2004; Ohgaki et al., 2004; Mellinghoff et al., 2005; Mellinghoff et al., 2007); e/ou regiões cromossômicas (1p, ↑7, 10q, 19q) (Leenstra et al., 1998; Smith et al., 2001; Batchelor et al., 2004) bastante descritos no envolvimento com câncer.

GBMs primários são caracterizados pela alta incidência da amplificação do gene EGFR e baixa incidência de mutação no gene p53 (Leenstra et al., 1998; Smith et al., 2001; Das et al., 2002; Gilbertson et al., 2003; Okada et al., 2003; Batchelor et al., 2004; Ohgaki et al., 2004).

Amplificação de *EGFR* ocorre usualmente em GBM com perda do braço longo do cromossomo 10, ganho do cromossomo 7 e deleção nos genes p16 e PTEN, sendo que, a deleção desse último influencia na

resposta a terapia com inibidores de tirosinoquinase, já que é um regulador negativo na ativação de EGFR (Leenstra et al., 1998; Smith et al., 2001; Ohgaki et al., 2004; Batchelor et al., 2004; Mellinghoff et al., 2005; Mellinghoff et al., 2007). O estudo dessas variáveis genéticas demonstra que a presença de pelo menos 2 (duas) delas leva a um pior prognóstico e, conseqüentemente, a uma menor sobrevida. Batchelor et al. (2004) compararam algumas dessas alterações com a idade em pacientes com GBMs e foi sugerido que a tumorigênese desse tipo de tumor varia conforme a idade. No presente estudo, com relação à idade ao diagnóstico (≤ 45 e > 45 anos), o mecanismo de amplificação de *EGFR* apresentou uma significância estatística ($p < 0,001$).

Em contrapartida, foi verificado que dos 29 casos com amplificação de *EGFR* (média de amplificação = 20,34) 18 são do gênero masculino e 11 são do gênero feminino e a média da idade desses pacientes é de aproximadamente 53 anos, sendo que 25 deles têm idade maior que 35 anos, condizente com o trabalho de Ohgaki et al. (2004) que apresentou uma média de idade de 60 anos e não detecção de amplificação de *EGFR* em pacientes com menos de 35 anos. Em nosso estudo, 4 pacientes (1 caso AA e 3 GBMs) apresentaram amplificação com idade inferior a 35 anos, entretanto, a média de idade desses pacientes não se mostra muito inferior a 35 anos (31,25).

Apesar de a amplificação estar mais presente nos homens, mesmo porque a incidência desses tumores no gênero masculino é preponderante, é nas mulheres que os níveis de amplificação se apresentaram mais elevados que nos homens, apresentando uma média dos valores de amplificação de 25,89 para 16,95, respectivamente.

5.5 – Correlação da Amplificação e Expressão do RNA mensageiro e da Proteína

GBM está freqüentemente envolvido com a amplificação e alteração no gene EGFR, resultando em hiperexpressão da forma selvagem (EGFRwt) e de variadas mutações, incluindo a mais comum, a EGFRvIII (Shinojima et al., 2003). Assim, a amplificação no gene EGFR acarreta na hiperexpressão do mesmo e/ou de seu produto. Estes dados explicam os resultados do presente estudo, no qual 28 (1 AP, 1 AGII, 1 AA e 25 GBM) casos apresentaram simultaneamente hiperexpressão do gene (96,5%), dos quais 22 casos (1 AP e 21 GBM) apresentaram positividade na análise da proteína por IHQ (78,6%) e 13 casos (46,4%), somente GBMs, apresentaram a deleção EGFRvIII.

Estes resultados estão de acordo com os dados de Shinojima et al. (2003) que apresentaram 40 (40/87) casos com amplificação e desses, 39 (97,5%) apresentaram positividade na IHQ para a forma EGFRwt. Complementarmente, dos 47 casos restantes sem amplificação, 46 não apresentavam hiperexpressão. Esse grupo ainda realizou estudo por IHQ da forma deletada EGFRvIII que apresentou 45% de marcação positiva, uma percentagem relativamente alta, bem como a encontrada na forma selvagem, demonstrando uma provável inespecificidade do anticorpo utilizado (Shinojima et al., 2003), se comparada com os resultados segundo anticorpo utilizado neste estudo, que reconhece ambas as formas: selvagem e a deletada EGFRvIII. A marcação foi positiva em 51% dos casos (74/145), sendo que 57 desses casos também apresentaram hiperexpressão do RNAm demonstrando uma correlação estatisticamente significativa (p = 0,001).

A hiperexpressão do gene EGFR foi verificada de forma acentuada tanto nos astrocitomas difusamente infiltrativos como nos astrocitomas pilocítico, que se apresentram 64% hiperexpressos (14/22). Esses resultados não corroboram os de Andersson et al. (2004) que analisaram a

expressão da família ErbB em gliomas de baixo e alto graus e em meningiomas, e verificaram que houve um aumento na expressão do gene EGFR somente nos casos de gliomas de alto grau. Além disso, esses autores detectaram que a expressão da proteína analisada por IHQ apresentou significativo aumento nos gliomas de alto grau se comparado com os de baixo grau (p = 0,004), diferente dos resultados aqui apresentados, que verificaram um aumento significativo (p = 0,001) tanto no gene como na proteína EGFR em todos os graus de astrocitomas, inclusive nos de baixo grau.

Um estudo recente (Guillaudeau et al., 2009) também demonstrou aumento de expressão da proteína somente em casos amplificados de GBM e oligodendroglioma grau III (1/3 de 35 casos no total da casuística) e não nos astrocitomas de baixo grau, inclusive AP. Esses resultados discrepantes podem estar relacionados com o número total de casos analisados pelos grupos, já que 44 (27 astrocitomas: 2 grau I, 6 grau II, 4 grau III e 15 GBM; e 17 oligodendrogliomas) casos de gliomas em Andersson et al. (2004) e 35 casos de gliomas, incluindo astrocitomas I-IV e oligodendrogliomas II e III, em Guillaudeau et al. (2009) é bem menor que a casuística do presente estudo que contém 145 casos, valorizando assim, nossos achados.

Adicionalmente, é importante ressaltar a respeito dos nossos resultados, a presença de marcação nuclear em 15% dos casos de astrocitomas difusamente infiltrativos, com uma sobrevida média de 8 meses, indicando uma possível relação com a progressão tumoral. De qualquer maneira, a abordagem deste tema ainda é muito controversa na literatura, por não ser muito bem claro como esse mecanismo deva ocorrer. Entretanto, recentemente têm sido reportados alguns estudos que demonstraram que a estimulação de EGFR na membrana, ocasiona sua translocação para o núcleo, envolvendo-o diretamente na regulação da transcrição de genes (Xu et al., 2009). Segundo Lin et al (2001) em um estudo *in vivo*, essa regulação da transcrição dá-se pela associação de EGFR com a região promotora da ciclina D1 no núcleo da célula.

5.6 – Correlação da Expressão de EGFR, EGFRvIII e os Dados Clínicos

A hiperexpressão do gene EGFR foi observada em 17 dos 19 casos com a deleção EGFRvIII, demonstrando uma correlação estatisticamente significativa (p = 0,001). Arjona et al. (2005) demonstraram que de 11 casos (2 AA, 6 GBMs primários e 3 GBMs secundários) com hiperexpressão do gene, 10 deles (exceto 1 GBM secundário) apresentaram a deleção EGFRvIII, sendo que 2 casos de GBMs primários também apresentaram uma forma truncada C-958 e uma duplicação dos exons 18-25. Dessa mesma maneira houve um aumento do nível de expressão da proteína, e também demonstrou uma correlação estatisticamente significativa (p < 0,001).

Adicionalmente, não houve correlação significativa da expressão do RNAm com gênero e idade ao diagnóstico, mas houve em relação ao critério histopatológico de malignidade dos astrocitomas (p < 0,001), apesar do número de casos em cada um dos graus de astrocitomas variar, sendo mais freqüente os casos de GBM. Da mesma maneira, Gilbertson et al. (2003) também encontraram significância estatística no aumento da expressão com a progressão da malignidade nos astrocitomas (p < 0,001).

Como nem todos os casos hiperexpressos tanto em nível de RNAm como de proteína apresentaram amplificação e/ou mutação, devem ser considerados outros mecanismos regulatórios desse processo, analogamente ao que ocorre em outros tumores, como é o caso dos carcinomas mamários e adenocarcinomas coloretais.

5.7 – Outros Mecanismos Regulatórios da Hiperexpressão de EGFR

Kersting et al. (2004) estudaram 222 casos de carcinoma mamário e verificaram que amplificação do gene EGFR nesses tumores explica apenas 12,5% dos casos hiperexpressos e que a repetição CA do intron 1 ocorre em

18,7%, como demonstrado por Buerger et al. (2004), que observaram correlação entre a hiperexpressão de EGFR e esse polimorfismo em câncer de mama. Como a presença da mutação EGFRvIII é extremamente rara em câncer de mama, esse mecanismo também não pode explicar a hiperexpressão de EGFR, como foi verificado por Rae et al. (2004). E em adenocarcinomas coloretais, Layfield et al. (2003), verificaram que a hiperexpressão da proteína EGFR ocorre por outro mecanismo que não pela amplificação do gene. Em contrapartida, Kimura et al. (2004), realizaram um estudo com carcinomas gástricos e puderam observar a amplificação de *EGFR* e c-erbB2 por hibridização *in situ* (FISH), confirmando a correlação com a hiperexpressão destas proteínas.

Previamente nosso grupo realizou um estudo (Barbosa et al., 2008) sobre a associação do polimorfismo c.2073A>T de *EGFR* com o seu aumento de expressão, não havendo significância estatística entre este tipo de polimorfismo e a hiperexpressão gênica.

Hsieh e Moasser (2007) realizaram um estudo com outro membro da família HER, o HER-3 para tentar explicar a sensibilidade e resistência a algumas drogas terapêuticas tendo como alvos o EGFR e o HER-2. Como o sítio de tirosinoquinase em HER-3 é inativo, o mesmo não é um alvo terapêutico para inibidores de pequenas moléculas (TKIs). Entretanto este membro possui uma forte evidência no processo de tumorigênese e essa função pode estar relacionada a resistência a essas drogas em outros membros da família HER, como EGFR e HER-2.

Outro mecanismo que pode explicar a hiperexpressão de *EGFR* é a sua coexpressão com outros genes relacionados ao processo de tumorigênese. Um estudo de coexpressão foi realizado por Scrideli et al. (2007) que estudaram os genes EGFR / IGFBP-2 / HIF-2A em todos os graus de astrocitomas por RQ-PCR. Foi observado que a coexpressão desses genes está fortemente associada com gliomas de alto grau e com a diminuição da sobrevida desses pacientes (p = 0,009; p = 0,002; p = 0,008, respectivamente).

Interessantemente, estudos *in vitro*, sugerem que a hiperexpressão de EGFR por si só é insuficiente para causar a ativação do receptor, sendo necessário o acoplamento do ligante. Isto pode ser explicado pela coexpressão de um ligante, o TGF-α, com EGFR, freqüentemente encontrado em tumores primários. Estudos realizados em poucos pacientes com diferentes tipos de tumor sugerem que a coexpressão de EGFR e seus ligantes está associada a um pior prognóstico (Holbro & Hynes, 2004). Além disso, em muitas linhagens de células humanas, a expressão de TGF-α possui uma forte correlação com a hiperexpressão de EGFR estimulando assim, a proliferação dessas células (Carpenter & Cohen, 1990).

5.8 – Coexpressão de *EGFR* e *IL13Rα2*

Um número considerável de alvos terapêuticos em tumores tem sido extensivamente explorado. Por terem sido identificados e por estarem hiperexpressos em gliomas, e mais especificamente em GBMs, *EGFR* e *IL13Rα2* são considerados fortes candidatos como futuras opções terapêuticas (Kikuchi, 2005).

Liu et al. (2003 a) realizaram um estudo comparativo entre as expressões dos genes EGFR, IL13R e verificaram que 26 dos 38 (8 AA e 30 GBMs) pacientes (6 AA e 20 GBM, 68,4%) mostraram coexpressão entre esses genes. Diferentemente, nossos achados não demonstraram coexpressão de ambos os genes, sendo que o total de casos de astrocitomas de alto grau (25 de 101 casos) com aumento das expressões de ambos os genes foi bem menor, 24,75%.

Mais recentemente, os estudos envolvendo a coexpressão de *EGFR* e *IL13Rα2* estão mais direcionados a estudos funcionais *in vitro* e *in vivo*, como os estudos de Stish *et al* (2008) e Vallera et al (2008) com implicações terapêuticas, anteriormente já citados no presente trabalho. E até mesmo o grupo de Liu (2003 b) utilizou proteínas de fusão tanto para IL13Rα2

(IL13PE38QQR) quanto para EGFR (DAB(389)EGFR) e as testaram em 14 linhagens celulares de gliomas humanos. Entretanto, a marcação positiva heterogêna da expressão dessas proteínas visualizadas em todas as células, impossibilitou a morte por completo dessas células. Contudo, esse estudo sugeriu que ambas as proteínas de fusão possuem um efeito antitumoral significativo em gliomas, e que a combinação das mesmas numa terapia intracranial de gliomas malignos poderia melhorar o índice terapêutico desses pacientes.

Adicionalmente, é importante salientar a respeito da hiperexpressão encontrada em astrocitomas pilocíticos desta casuística de *n* muito significativo, se comparado a outros estudos realizados, tanto para o gene EGFR (64%) quanto para, e principalmente, o da IL13Rα2 (59%). Uma especulação para esse achado seria o fato do gene da IL13Rα2 estar relacionado com o sistema de defesa e imunológico nos humanos. Dessa maneira, o grupo de Huang (2005) selecionou 1176 genes que distinguem o astrocitoma pilocítico do astrocitoma grau II e oligodendrogliomas, sendo que 75 desses genes estão relacionados com o sistema imune e 69 estão relacionados com adesão, migração celular e angiogênese. Outro estudo que verificou a expressão gênica e protéica desse receptor em tumores pediátricos encontrou hiperexpressão gênica em AP (23 de 29 casos) de 88,5% e 42 dos 48 total de casos com esse aumento de expressão, apresentaram uma marcação positiva em células tumorais ≥ 50% (Kawakami et al., 2004).

Estudos recentes em gliomas tronco-encefálicos pediátricos demonstraram hiperexpressão do receptor α2 de IL-13, por imunohistoquímica, ressaltando a utilização desse gene como alvo terapêutico neste tipo de tumor (Joshi et al., 2008; Okada et al., 2008), e ainda, na utilização como tratamento alternativo em pacientes com astrocitoma pilocítico que não tiveram ressecção total do tumor (Kawakami et al., 2001; Kawakami et al., 2004).

Assim, estes estudos, juntamente com este presente, sugerem que os perfis de expressão gênica dos astrocitomas pilocíticos diferem

significativamente dos perfis de gliomas infiltrativos de baixo grau, e o comportamento benigno deste tipo de astrocitoma deve estar relacionado com a regulação de genes associados ao sitema de defesa imunológico e a resposta à terapia.

Recentemente, outro estudo de genes candidatos para se comparar perfil transcricional entre AA (n = 6) e GBM (n = 9) foi realizado por micrroarray, demonstrando que os níveis de expressão do gene IL13Rα2, um dos 2 genes de interesse selecionados neste estudo variavam muito entre os astrocitomas de alto grau. O nível de expressão em AA era diferencialmente maior que o encontrado em GBM, achado este confirmado por PCR em tempo real (Bozinov et al., 2008). Essa diferença nos níveis de expressão pode ser explicado por outro estudo *in vivo* realizado por Kawakami et al (2001), que demonstraram inibição da malignidade em neoplasias de mama e pâncreas em camundongos imunodeficientes, o que pode explicar o aumento de expressão do gene IL13Rα2 como sendo um dos mecanismos utilizados pelas células tumorais para reduzir sua própria proliferação através dos efeitos inibitórios de IL-13.

Em nosso estudo, contrário aos estudos anteriores citados, houve diferença entre os casos hiperexpressos para *IL13Rα2* em AA (29%) e GBM (48%). Além disso, levando-se em conta o gráfico de expressão relativa de *IL13Rα2*, a média dos GBMs está acima da média dos casos AA no gráfico (Figura 28). Entretanto, o número de casos com ausência de expressão desse gene foi significativo, 20 de 145 (14%) (Anexo 4).

Por fim, como o gene EGFR está envolvido em diversos processos celulares e, conseqüentemente em diversas vias de transdução de sinal, é importante enfatizar que a análise da amplificação, expressão gênica e protéica, e análise de alterações mutacionais, bem como a análise de coexpressão com o gene IL13Rα2, ou até mesmo com outros genes e/ou proteínas, possibilitará um melhor entendimento da formação e progressão dos astrocitomas e o papel de *EGFR* e *IL13Rα2* nesses tumores, podendo beneficiar muitos pacientes em futuras opções terapêuticas.

6. CONCLUSÕES

6 – CONCLUSÕES

1. EGFR

- Observou-se a hiperexpressão gênica com aumento progressivo em paralelo ao aumento da malignidade entre os astrocitomas difusamente infiltrativos, havendo associação da expressão gênica com a malignidade (p = 0,001). A expressão gênica foi igualmente elevada em astrocitomas pilocíticos.
- A amplificação do gene foi observada em maior freqüência nos GBMs, embora não exclusiva, e sua presença associada a idade > 45 anos, foi significativa, bem como o impacto negativo no tempo de sobrevida (p < 0,001).
- A presença da deleção EGFRvIII foi exclusiva em GBMs (23%), com impacto negativo no tempo de sobrevida (p = 0,03), sendo um fator preditivo de mau prognóstico.
- Observou-se a expressão protéica aumentada em todos os graus de astrocitomas (51%).
- As associações da expressão gênica com a amplificação e com a expressão protéica foram significativas (p = 0,001).
- A associação da deleção EGFRvIII com a expressão gênica foi significativa (p = 0,001), bem como as associações da deleção com a expressão protéica e amplificação (p < 0,001).

2. IL13Rα2

- Observou-se hiperexpressão gênica em padrão similar ao EGFR entre os astrocitomas difusamente infiltrativos (p = 0,001) e

hiperexpressão significativamente frequente nos astrocitomas pilocíticos (59%).

- Embora a freqüência de hiperexpressão de *EGFR* e *IL13Rα2* seja elevada entre os astrocitomas, não se observou coexpressão, sugerindo vias de ativação independentes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abulrob A, Giuseppin S, Andrade MF, McDermid A, Moreno M, Stanimirovic D. Interactions of EGFR and caveolin-1 in human glioblastoma cells: evidence that tyrosine phosphorylation regulates EGFR association with caveolae. *Oncogene.* 2004;23:6967-79.

Allen C, Paraskevakou G, Iankov I, Giannini C, Schroeder M, Sarkaria J, Schroeder M, Puri RK, Russell SJ, Galanis E. Interleukin-13 displaying retargeted oncolytic measles virus strains have significant activity against gliomas with improved specificity. *Mol Ther*. 2008;16:1556-64.

Amador ML, Oppenheimer D, Perea S, Maitra A, Cusati G, Iacobuzio-Donahu C, Baker SD, Ashfaq R, Takimoto C, Forastiere A, Hidalgo M. An epidermal growth factor receptor intron 1 polymorphism mediates response to epidermal growth factor receptor inhibitors. *Cancer Res.* 2004;64:9139-43.

Andersson 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.

Arjona D, Bello MJ, Alonso ME, Aminoso C, Isla A, De Campos JM, Sarasa JL, Gutierrez M, Villalobo A, Rey JA. Molecular analysis of the EGFR gene in astrocytic gliomas: mRNA expression, quantitative-PCR analysis of non-homogeneous gene amplification and DNA sequence alterations. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2005; 31:384-94.

Arteaga CL. Epidermal growth factor receptor dependence in human tumors: more than just expression? *Oncologist*. 2002;7(Suppl 4):31-9.

Barbosa KC, Oba-Shinjo SM, Uno M, Carvalho PO, Rosemberg S, Aguiar PH, Carlotti CG, Malheiros SM, Toledo S, Lotufo P, Marie SK. Association of EGFR c.2073A>T polymorphism with decreased risk of diffusely infiltrating astrocytoma in a Brazilian case-control study. *Int J Biol Markers*. 2008;23:140-6.

Baselga, J. The EGFR as a target for anticancer therapy--focus on cetuximab. *EurJ Cancer*. 2001; 37(Suppl 4):S16-22.

Batchelor TT, Betensky RA, Esposito JM, Pham LD, Dorfman MV, Piscatelli N, Jhung S, Rhee D, Louis DN. Age-dependent prognostic effects of genetic alterations in glioblastoma. *Clin Cancer Res*. 2004;10(1 Pt 1):228-33.

Belda-Iniesta C, de Castro Carpeño J, Sereno M, González-Barón M, Perona R. Epidermal growth factor receptor and glioblastoma multiforme: molecular basis for a new approach. *Clin Transl Oncol*. 2008;10:73-7.

Biernat W, Huang H, Yokoo H, Kleihues P, Ohgaki H. Predominant expression of mutant EGFR (EGFRvIII) is rare in primary glioblastomas. *Brain Pathol*. 2004;14:131-6.

Bredel M, Pollack IF, Hamilton RL, James CD. Epidermal growth factor receptor expression and gene amplification in high-grade non-brainstem gliomas of childhood. *Clin Cancer Res.* 1999;5:1786-92.

Bozinov O, Köhler S, Samans B, Benes L, Miller D, Ritter M, Sure U, Bertalanffy H. Candidate genes for the progression of malignant gliomas

identified by microarray analysis. *Neurosurg Rev.* 2008;31:83-9; discussion 89-90.

Buerger H, Packeisen J, Boecker A, Tidow N, Kersting C, Bielawski K, Isola J, Yatabe Y, Nakachi K, Boecker W, Brandt B. Allelic length of a CA dinucleotide repeat in the egfr gene correlates with the frequency of amplifications of this sequence--first results of an inter-ethnic breast cancer study. *J Pathol.* 2004; 203:545-50.

Cappuzzo F. Erlotinib in gliomas: should selection be based on EGFR and Akt analyses. *J Natl Cancer Inst.* 2005; 97:868-9.

Carpenter G. Nuclear localization and possible functions of receptor tyrosine kinases. *Curr Opin Cell Biol.* 2003;15:143-8.

Carpenter G, Cohen S.J Epidermal growth factor. *Biol Chem*. 1990; 265:7709-12.

Carraway KL, Weber JL, Unger MJ, Ledesma J, Yu N, Gassmann M, Lai C. Neuregulin-2, a new ligand of ErbB3/ErbB4-receptor tyrosine kinases. *Nature.* 1997;387(6632):512-6.

Carter P, Presta L, Gorman CM, Ridgway JB, Henner D, Wong WL, Rowland AM, Kotts C, Carver ME, Shepard HM. Humanization of an anti-p185 HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*.1992; 89:4285-9.

Carter PJ. Potent antibody therapeutics by design. *Nat Rev Immunol*. 2006; 6:343-57.

Chai RL, Grandis JR. Advances in molecular diagnostics and therapeutics in head and neck cancer. *Curr Treat Options Oncol*. 2006;7:3-11.

Chang H, Riese DJ, Gilbert W, Stern DF, McMahan UJ. Ligands for ErbB-family receptors encoded by a neuregulin-like gene. *Nature*. 1997; 387(6632):509-12.

Choi JS, Kim MA, Lee HE, Lee HS, Kim WH. Mucinous gastric carcinomas: clinicopathologic and molecular analyses. *Cancer.* 2009; May.

Ciardello F, Tortora G. Epidermal growth factor receptor (EGF) 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; 39:1348-54.

Collins VP, James CD. Gene and chromosomal alterations associated with the development of human gliomas. *FASEB J.* 1993;7:926-30.

Combs SE, Heeger S, Haselmann R, Edler L, Debus J, Schulz-Ertner D. Treatment of primary glioblastoma multiforme with cetuximab, radiotherapy and temozolomide (GERT)--phase I/II trial: study protocol. *BMC Cancer*. 2006; 6:133.

Dancey J, Sausville EA. Issues and progress with protein kinase inhibitors for cancer treatment. *Nat Rev Drug Discov.* 2003;2:296-313.

Das A, Tan W, Teo J Smith DR. Glioblastoma multiforme in an Asian population: evidence for a distinct genetic pathway. *J Neuro-Oncol.* 2002; 60:117-25.

Daumas-Duport C, Scheithauer BW, Chodkiewicz JP, Laws ER Jr, Vedrenne C. Dysembryoplastic neuroepithelial tumor: a surgically curable tumor of young patients with intractable partial seizures. Report of thirty-nine cases. *Neurosurgery*. 1988;:545-6.

Deng Y, Kurland BF, Wang J, Bi J, Li W, Rao S, Lan P, Lin T, Lin E. High epidermal growth factor receptor expression in metastatic colorectal cancer lymph nodes may be more prognostic of poor survival than in primary tumor. *Am J Clin Oncol.* 2009; May 15.

Druker BJ. STI571 (Gleevec) as a paradigm for cancer therapy. *Trends Mol Med*. 2002;8(4 Suppl):S14-8.

Druker BJ. Imatinib as a paradigm of targeted therapies. *Adv Cancer Res*. 2004;91:1-30.

Eguchi J, Hatano M, Nishimura F, Zhu X, Dusak JE, Sato H, Pollack IF, Storkus WJ, Okada H. Identification of interleukin-13 receptor alpha2 peptide analogues capable of inducing improved antiglioma CTL responses. *Cancer Res.* 2006;66:5883-91.

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/or C-terminal tails. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89:4309-13.

Franco-Hernandez C, Martinez-Glez V, Arjona D, de Campos JM, Isla A, Gutierrez M, Vaquero J, Rey JA. EGFR sequence variations and real-time quantitative polymerase chain reaction analysis of gene dosage in brain metastases of solid tumors. *Cancer Genet Cytogenet.* 2007;173:63-7.

Frederick L, Wang X, Eley G, James CD. Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas. *Cancer Res.* 2000; 60:1383-7.

Freeman SS, Allen SW, Ganti R, Wu J, Ma J, Su X, Neale G, Dome JS, Daw NC, Khoury JD. Copy number gains in EGFR and copy number losses in PTEN are common events in osteosarcoma tumors. *Cancer.*2008;113:1453-61.

Furnari FB, Huang HJ, Cavenee WK. Molecular biology of malignant degeneration of astrocytoma. *Pediatr Neurosurg*, 1996;24:41-9.

Gibson TB, Ranganathan A, Grothey A. Randomized phase III trial results of panitumumab, a fully human anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody, in metastatic colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer.* 2006;6:29-31.

Gilbertson RJ, Hill DA, Hernan R, Kocak M, Geyer R, Olson J, Gajjar A, Rush L, Hamilton RL, Finkelstein SD, Pollack IF. ERBB1 is amplified and overexpressed in high-grade diffusely infiltrative pediatric brain stem glioma. *Clin Cancer Res.* 2003;9(10 Pt 1):3620-4.

Goldberg RM. Cetuximab. *Nat Rev Drug Discov*. 2005; May Suppl:S10-1.

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

Grünwald V, Hidalgo M. Developing inhibitors of the epidermal growth factor receptor for cancer treatment. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95:851-67.

Gullick WJ. Type I growth factor receptors: current status and future work. *Biochem Soc Symp*. 1998;63:193-8.

Guillaudeau A, Durand K, Pommepuy I, Robert S, Chaunavel A, Lacorre S, DeArmas R, Bourtoumieux S, El Demery M, Moreau JJ, Labrousse F. Determination of EGFR status in gliomas: usefulness of immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2009;17:220-6.

Guo CC, Gomez E, Tamboli P, Bondaruk JE, Kamat A, Bassett R, Dinney CP, Czerniak BA. Squamous cell carcinoma of the urinary bladder: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 16 cases. *Hum Pathol*, 2009; May.

Haas-Kogan DA, Prados MD, Tihan T, Eberhard DA, Jelluma N, Arvold ND, Baumber R, Lamborn KR, Kapadia A, Malec M, Berger MS, Stokoe D. Epidermal growth factor receptor, protein kinase B/Akt, and glioma response to erlotinib. *J Natl Cancer Inst.* 2005;97:880-7.

Halatsch ME, Schmidt U, Behnke-Mursch J, Unterberg A, Wirtz CR. Epidermal growth factor receptor inhibition for the treatment of glioblastoma multiforme and other malignant brain tumours. *Cancer Treat Rev.* 2006;32:74-89.

Haley J, Whittle N, Bennet P, Kinchington D, Ullrich A, Waterfield M. The human EGF receptor gene: structure of the 110 kb locus and identification of sequences regulating its transcription. *Oncogene Res*. 1987;1:375-96.

Han J, Yang L, Puri RK. Analisis of target genes induced by IL-13 cytotoxin in human glioblastoma cells. *J Neuro-oncol.* 2005;72:35-46.

Harari D, Tzahar E, Romano J, Shelly M, Pierce JH, Andrews GC, Yarden Y. Neuregulin-4: a novel growth factor that acts through the ErbB-4 receptor tyrosine kinase. *Oncogene*, 1999;8:2681-9.

Hershey GKK. IL-13 receptors and signaling pathways: na evolving web. *J Allergy Clin Immunol.* 2003; 111:677-90.

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

Hoshino M, Fukui H, Ono Y, Sekikawa A, Ichikawa K, Tomita S, Imai Y, Imura J, Hiraishi H, Fujimori T. Nuclear expression of phosphorylated EGFR is associated with poor prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Pathobiology.* 2007; 74:15-21.

Hsieh AC, Moasser MM. Targeting HER proteins in cancer therapy and the role of the non-target HER3. *Br J Cancer.* 2007;20;97:453-7.

Hsu, SM; Raine, L; Fanger, H. Use of Avidin-Biotin Peroxidase Complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedure. *J Histochem Cytochem*. 1981;29:.577-80.

Huang H, Hara A, Homma T, Yonekawa Y, Ohgaki H. Altered expression of immune defense genes in pilocytic astrocytomas. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2005; 64:891-901.

Huang PH, Mukasa A, Bonavia R, Flynn RA, Brewer ZE, Cavenee WK, Furnari FB, White FM. Quantitative analysis of EGFRvIII cellular signaling networks reveals a combinatorial therapeutic strategy for glioblastoma. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007; 104:12867-72.

Husain SR, Joshi BH, Puri RK. Interleukin-13 receptor as a unique target for anti-glioblastoma therapy. *Int J Cancer.* 2001; 92:168-75.

Husain SR, Puri RK. Interleukin-13 receptor-directed cytotoxin for malignan glioma therapy: from bench to bedside. *J Neuro-oncol.* 2003;65:37-48.

Imai K; Takaoka A. Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006;6:714-27.

Jarboe JS, Johnson KR, Choi Y, Lonser RR, Park JK. Expression of interleukin-13 receptor alpha2 in glioblastoma multiforme: implications for targeted therapies. *Cancer Res.* 2007;67:7983-6.

Ji H, Zhao X, Yuza Y, Shimamura T, Li D, Protopopov A, Jung BL, McNamara K, Xia H, Glatt KA, Thomas RK, Sasaki H, Horner JW, Eck M, Mitchell A, Sun Y, Al-Hashem R, Bronson RT, Rabindran SK, Discafani CM, Maher E, Shapiro GI, Meyerson M, Wong KK. Epidermal growth factor receptor variant III mutations in lung tumorigenesis and sensitivity to tyrosine kinase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:7817-22.

Jiang X, Lu X, Liu R, Zhang F, Zhao H. HLA Tetramer Based Artificial Antigen-Presenting Cells Efficiently Stimulate CTLs Specific for Malignant Glioma. *Clin Cancer Res*. 2007;13:7329-34.

Johns TG, Perera RM, Vernes SC, Vitali AA, Cao DX, Cavenee WK, Scott AM, Furnari FB. The efficacy of epidermal growth factor receptor-specific antibodies against glioma xenografts is influenced by receptor levels, activation status, and heterodimerization. *Clin Cancer Res*. 2007;13:1911-25.

Joshi BH, Puri RA, Leland P, Varricchio F, Gupta G, Kocak M, Gilbertson RJ, Puri RK, US Pediatric Brain Tumor Consortium. Identification of interleukin-13 receptor alpha2 chain overexpression in situ in high-grade diffusely infiltrative pediatric brainstem glioma. *Neuro Oncol*. 2008;10:265-74.

Kaufman M, Mehrotra B, Limaye S, White S, Fuchs A, Lebowicz Y, Nissel-Horowitz S, Thomas A. EGFR expression in gallbladder carcinoma in North America. *Int J Med Sci*. 2008;22;285-91.

Kawakami K, Kawakami M, Snoy PJ, Husain SR, Puri RK. In vivo overexpression of IL-13 receptor alpha2 chain inhibits tumorigenicity of human breast and pancreatic tumors in immunodeficient mice. *J Exp Med*. 2001; 194:1743-54.

Kawakami M, Kawakami K, Takahashi S, Abe M, Puri RK. Analysis of interleukin-13 receptor α2 expression in human pediatric brain tumors. *Cancer.,* 2004;101:1036-42.

Kersting C, Tidow N, Schmidt H, Liedtke C, Neumann J, Boecker W, van Diest PJ, Brandt B, Buerger H. Gene dosage PCR and fluorescence in situ hybridization reveal low frequency of egfr amplifications despite protein overexpression in invasive breast carcinoma. *Lab Invest.* 2004;84:582-7.

Kikuchi T. Novel immunotherapeutic approach. *Gan To Kagaku Ryoho.* 2005; 32:453-7.

Kimura M, Tsuda H, Morita D, Ichikura T, Ogata S, Aida S, Yoshizumi Y, Maehara T, Mochizuki H, Matsubara O. A proposal for diagnostically meaningful criteria to classify increased epidermal growth factor receptor and c-erbB-2 gene copy numbers in gastric carcinoma, based on

correlation of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemical measurements. *Virchows Arch.* 2004;445:255-62.

Kitange GJ, Templeton KL, Jenkins RB. Recent advances in the molecular genetics of primary gliomas. *Cur Opin Oncol.* 2003; 5:197-203.

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

Kleihues P, Cavanee WK. Astrocytic tumors. In: IARC Press. *Pathology and Genetic of tumors of the nervous system*. France; 2000. p.14-15.

Koul D. PTEN signaling pathways in glioblastoma. *Cancer Biol Ther*. 2008; 7:1321-5.

Krejsa C, Rogge M, Sadee W. Protein therapeutics: new applications for pharmacogenetics. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5:507-21

Kuan CT, Wikstrand CJ, Bigner DD. EGF mutant receptor vIII as a molecular target in cancer therapy. *Endocrine-Rel Cancer*. 2001;8:83-96.

Lammerts van Bueren JJ, Bleeker WK, Bøgh HO, Houtkamp M, Schuurman J, van de Winkel JG, Parren PW. Effect of target dynamics on pharmacokinetics of a novel therapeutic antibody against the epidermal growth factor receptor: implications for the mechanisms of action. *Cancer Res*. 2006;66:7630-8.

Layfield LJ; Bernard PS; Goldstein NS. Color multiplex polymerase chain reaction for quantitative analysis of epidermal growth factor receptor genes in colorectal adenocarcinoma. *J Surg Oncol.* 2003;83:227-31.

Learn CA, Hartzell TL, Wikstrand CJ, Archer GE, Rich JN, Friedman AH, Friedman HS, Bigner DD, Sampson JH. Resistance to tyrosine kinase inhibition by mutant epidermal growth factor receptor variant III contributes to the neoplastic phenotype of glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res..*2004; 10:3216-24.

Leenstra S, Oskam NT, Bijleveld EH, Bosch DA, Troost D. Hulsebos TJM. Genetic sub-types of human malignant astrocytoma correlate with survival. *Int J Cancer (Pred. Oncol.).* 1998;79:159-65.

Li B, Chang CM, Yuan M, McKenna WG, Shu HK. Resistance to small molecule inhibitors of epidermal growth factor receptor in malignant gliomas. *Cancer Res.* 2003;63:7443-50.

Li W, Park JW, Nuijens A, Sliwkowski MX, Keller GA. Heregulin is rapidly translocated to the nucleus and its transport is correlated with c-myc induction in breast cancer cells. *Oncogene*. 1996;12:2473-7.

Lin SY, Makino K, Xia W, Matin A, Wen Y, Kwong KY, Bourguignon L, Hung MC. Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat Cell Biol.* 2001;3:802-8.

Liu H, Fan QH, Zhang ZH, Li X, Yu HP, Liu GZ, Meng FQ. Roles of immunohistochemistry in prognostic assessment of basal-like breast cancer. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi.* 2009;38:23-8.

Liu TF, Tatter SB, Willingham MC, Yang M, Hu JJ, Frankel AE. Growth factor receptor expression varies among high-grade gliomas and normal brain: epidermal growth factor receptor has excellent properties for interstitial fusion protein therapy. *Mol Cancer Ther*. 2003 (a);2:783-7.

Liu TF, Willingham MC, Tatter SB, Cohen KA, Lowe AC, Thorburn A, Frankel AE. Diphtheria toxin-epidermal growth factor fusion protein and Pseudomonas exotoxin-interleukin 13 fusion protein exert synergistic toxicity against human glioblastoma multiforme cells. *Bioconjug Chem*. 2003 (b);14:1107-14.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2000; 25:402-8.

Lo HW, Hsu SC, Ali-Seyed M, Gunduz M, Xia W, Wei Y, Bartholomeusz G, Shih JY, Hung MC. Nuclear interaction of EGFR and STAT3 in the activation of the iNOS/NO pathway. *Cancer Cell.* 2005;7:575-89.

Lodish H, Berk A, Zipursky LS, Matsudaira,P, Baltimore D, Darnell J. *Biologia celular e molecular*. 4ed. São Paulo; 2001.

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

Lu Y, Li X, Liang K, Luwor R, Siddik ZH, Mills GB, Mendelsohn J, Fan Z. Epidermal growth factor receptor (EGFR) ubiquitination as a mechanism of acquired resistance escaping treatment by the anti-EGFR monoclonal antibody cetuximab. *Cancer Res*. 2007; 67:8240-7.

Luwor RB, Zhu HJ, Walker F, Vitali AA, Perera RM, Burgess AW, Scott AM, Johns TG. The tumor-specific de2-7 epidermal growth factor receptor (EGFR) promotes cells survival and heterodimerizes with the wild-type EGFR. *Oncogene*. 2004;23:6095-104.

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;15:1311-33.

Maloney DG, Grillo-López AJ, White CA, Bodkin D, Schilder RJ, Neidhart JA, Janakiraman N, Foon KA, Liles TM, Dallaire BK, Wey K, Royston I, Davis T, Levy R. IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*.1997; 90:2188-95.

Marie Y, Carpentier AF, Omuro AM, Sanson M, Thillet J, Hoang-Xuan K, Delattre JY. EGFR tyrosine kinase domain mutations in human gliomas. *Neurology*. 2005; 64:1444-5.

Marquez A, Wu R, Zhao J, Shi Z. Evaluation of epidermal growth factor receptor (EGFR) by chromogenic in situ hybridization (CISH) and immunohistochemistry (IHC) in archival gliomas using bright-field microscopy. *Diagn Mol Pathol*. 2004;13:1-8.

McLendon RE, Turner K, Perkinson K, Rich J. Second messenger systems in human gliomas. *Arch Pathol Lab Med.* 2007;131:1585-90.

McBride KM, McDonald C, Reich NC. Nuclear export signal located within theDNA-binding domain of the STAT1transcription factor. *EMBO J*. 2000; 19:6196-206.

Mellinghoff IK, Wang MY, Vivanco I, Haas-Kogan DA, Zhu S, Dia EQ, Lu KV, Yoshimoto K, Huang JH, Chute DJ, Riggs BL, Horvath S, Liau LM, Cavenee WK, Rao PN, Beroukhim R, Peck TC, Lee JC, Sellers WR, Stokoe D, Prados M, Cloughesy TF, Sawyers CL, Mischel PS. Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors. *N Engl J Med*.2005; 353:2012-24.

Mellinghoff IK, Cloughesy TF, Mischel PS. PTEN-mediated resistance to epidermal growth factor receptor kinase inhibitors. *Clin Cancer Res*. 2007;13(Pt 1):378-81.

Mendelsohn J, Baselga J*. Epidermal growth factor receptor targeting in cancer. Semin Oncol*. 2006; 33:369-85.

Monteiro GT, Koifman S. Brain tumors mortality in Brazil, 1980-1998, *Cad. Saúde Pública.* 2003;19:1139-1151.

Mintz A, Gibo DM, Madhankumar AB, Debinski W. Molecular targeting with recombinant cytotoxins of interleukin-13 receptor alpha2-expressing glioma. *J Neuroonco.* 2003;64:117-23.

Mintz A, Gibo DM, Madhankumar AB, Cladel NM, Christensen ND, Debinski W. Protein- and DNA-based active immunotherapy targeting interleukin-13 receptor alpha2. *Cancer Biother Radiopharm*. 2008;23:581-9.

Murata T, Obiri NI, Debinski W, Puri RK. Structure of IL-13 receptor: analysis of subunit composition in cancer and immune cells. *Biochem Biophys Res Commun.*1997;238:90-4.

Nagane M, Lin H, Cavenee WK, Huang HJ. Aberrant receptor signaling in human malignant gliomas: mechanisms and therapeutic implications. *Cancer Lett.* 2001;162 (Suppl):S17-S21.

Nair, P. Epidermal growth factor receptor family and its role in cancer progression. *Curr Sci.* 2005;88: 6.

Naoum, PC. Avanços tecnológicos em hematologia laboratorial. *Rev Bras Hematol. Hemoter*. 2001;23 no.2 .

Ni CY, Murphy MP, Golde TE, Carpenter G. gamma-Secretase cleavage and nuclear localization of ErbB-4 receptor tyrosine kinase. *Science.* 2001; 294:2179-81.

Nicholas MK, Lukas RV, Jafri NF, Faoro L, Salgia R. Epidermal growth factor receptor – mediated signal transduction in the development and therapy of gliomas. *Clin Cancer Res.* 2006;12:24.

Nishikawa R, Ji XD, Harmon RC, Lazar CS, Gill GN, Cavenee WK, Huang HJ. A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91:7727-31.

Normanno N, De Luca A, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello MR, Carotenuto A, De Feo G, Caponigro F, Salomon DS. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene*. 2006;366:2-16.

Offterdinger M, Schöfer C, Weipoltshammer K, Grunt TW. c-erbB-3: a nuclear protein in mammary epithelial cells. *J Cell Biol*. 2002;157:929-39.

Ohgaki H, Schäuble B, zur Hausen A, von Ammon K, Kleihues P. Genetic alterations associated with the evolution and progression of astrocytic brain tumours. *Virchows Arch*. 1995; 427:113-8.

Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, Burkhard C, Schüler D, Probst-Hensch NM, Maiorka PC, Baeza N, Pisani P, Yonekawa Y, Yasargil MG, Lütolf UM, Kleihues P. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res*. 2004;64:6892-9.

Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol.* 2007;170:1445-53.

Okada H, Low KL, Kohanbash G, McDonald HA, Hamilton RL, Pollack IF. Expression of glioma-associated antigens in pediatric brain stem and non-brain stem gliomas. *J Neurooncol.* 2008;88:245-50.

Okada Y, Hurwitz EE, Esposito JM, Brower MA, Nutt CL, Louis DN. Selection pressures of TP53 mutation and microenvironmental location influence epidermal growth factor receptor gene amplification in human glioblastomas. *Cancer Res*. 2003;63:413-6.

Oksvold MP, Huitfeldt HS, Østvold AC, Skarpen E. UV induces tyrosine kinase-independent internalisation and endosome arrest of the EGF receptor. *J Cell Sci*. 2002;115(Pt 4):793-803.

Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J.* 2000; 19:3159-67.

O'Dwyer ME, Mauro MJ, Druker BJ. STI571 as a target therapy for CML. *Cancer Invest*. 2003;21:429-38.

Paez JG, Jänne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, Herman P, Kaye FJ, Lindeman N, Boggon TJ, Naoki K, Sasaki H, Fujii Y, Eck MJ, Sellers WR, Johnson BE, Meyerson M. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science.* 2004;304:1497-500.

Park S, Holmes-Tisch AJ, Cho EY, Shim YM, Kim J, Kim HS, Lee J, Park YH, Ahn JS, Park K, Jänne PA, Ahn MJ. Discordance of molecular biomarkers associated with epidermal growth factor receptor pathway between primary tumors and lymph node metastasis in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2009;4:809-15.

Pedersen MW, Meltron M, Damstrup L, Poulsen HS. The type III epidermal growth receptor mutation: Biological significance and potential target for anti-cancer therapy. *Annf Oncol.* 2001;12:745-60.

Rae JM, Scheys JO, Clark KM, Chadwick RB, Kiefer MC, Lippman ME. EGFR and EGFRvIII expression in primary breast cancer and cell lines. *Breast Cancer Res Treat*. 2004;87:87-95.

Rahaman SO, Sharma P, Harbor PC, Aman MJ, Vogelbaum MA, Haque SJ. IL-13R(alpha)2, a decoy receptor for IL-13 acts as an inhibitor of IL-4-dependent signal transduction in glioblastoma cells. *Cancer Res*. 2002;15;62:1103-9.

Raizer JJ. HER1/EGFR tyrosine kinase inhibitors for the treatment of glioblastoma multiforme. *J Neurooncol*. 2005;74:77-86.

Ramos TC, Figueredo J, Catala M, González S, Selva JC, Cruz TM, Toledo C, Silva S, Pestano Y, Ramos M, Leonard I, Torres O, Marinello P, Pérez R, Lage A. Treatment of high-grade glioma patients with the humanized anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) antibody h-R3: report from a phase I/II trial. *Cancer Biol Ther*. 2006; 5:375-9.

Reifenberger G, Collins VP. Pathology and molecular genetics of astrocytic gliomas. *J Mol Med*. 2004;82:56-670.

Reilly JF, Maher PA. Importin beta-mediated nuclear import of fibroblast growth factor receptor: role in cell proliferation. *J Cell Biol*. 2001;152:1307-12.

Riese DJ; Stern DF. Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. *Bioessays.* 1998;20:41-8.

Rogers SJ, Box C, Chambers P, Barbachano Y, Nutting CM, Rhŷs-Evans P, Workman P, Harrington KJ, Eccles SA. Determinants of response to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibition in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Pathol*, 2009;218:122-30.

Roskoski RJ. The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer. *Biocheml Biophys Res Comm.* 2004; 319:1-11.

Sasaki H, Kawano O, Endo K, Yukiue H, Yano M, Fujii Y. EGFRvIII mutation in lung cancer correlates with increased EGFR copy number.*Oncol Rep.* 2007; 17:319-23.

Schittenhelm MM, Kollmannsberger C, Oechsle K, Harlow A, Morich J, Honecker F, Kurek R, Störkel S, Kanz L, Corless CL, Wong KK, Bokemeyer C, Heinrich MC. Molecular determinants of response to matuzumab in combination with paclitaxel for patients with advanced non-small cell lung cancer. *Mol Cancer Ther.* 2009;8:481-9.

Scrideli CA, Carlotti CG Jr, Mata JF, Neder L, Machado HR, Oba-Sinjo SM, Rosemberg S, Marie SK, Tone LG. Prognostic significance of co-overexpression of the EGFR/IGFBP-2/HIF-2A genes in astrocytomas. *J Neurooncol.* 2007;83:233-9.

Sellers WR, Meyerson M. EGFR gene mutations: a call for global x global views of cancer. *J Nat Cancer Inst.* 2005;97:326-8.

Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer.* 2007;7:169-81.

She QB, Solit DB, Ye Q, O'Reilly KE, Lobo J, Rosen N. The BAD protein integrates survival signaling by EGFR/MAPK and PI3K/Akt kinase pathways in PTEN-deficient tumor cells. *Cancer Cell*. 2005; 8:287-97.

Shimato S, Natsume A, Wakabayashi T, Tsujimura K, Nakahara N, Ishii J, Ito M, Akatsuka Y, Kuzushima K, Yoshida J. Identification of a human leukocyte antigen-A24-restricted T-cell epitope derived from interleukin-13 receptor alpha2 chain, a glioma-associated antigen. *J Neurosurg*. 2008;109:117-22.

Shinojima N, Tada K, Shiraishi S, Kamiryo T, Kochi M, Nakamura H, Makino K Saya H, Hirano H, Kuratsu J, Oka K, Ishimau Y, Ushio Y. Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblatoma multiforme. *Cancer Res.* 2003;63:6962-70.

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; 93:1246-56.

Stish BJ, Oh S, Vallera DA. Anti-glioblastoma effect of a recombinant bispecific cytotoxin cotargeting human IL-13 and EGF receptors in a mouse xenograft model. *J Neurooncol.* 2008;87:51-61.

Sos ML, Koker M, Weir BA, Heynck S, Rabinovsky R, Zander T, Seeger JM, Weiss J, Fischer F, Frommolt P, Michel K, Peifer M, Mermel C, Girard L, Peyton M, Gazdar AF, Minna JD, Garraway LA, Kashkar H, Pao W, Meyerson M, Thomas RK. PTEN loss contributes to erlotinib resistance in EGFR-mutant lung cancer by activation of Akt and EGFR. *Cancer Res*. 2009;69:3256-61.

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 :14-25.

Taron M, Ichinose Y, Rosell R, Mok T, Massuti B, Zamora L, Mate JL, Manegold C, Ono M, Queralt C, Jahan T, Sanchez JJ, Sanchez-Ronco M, Hsue V, Jablons D, Sanchez JM, Moran T. Activating mutations in the tyrosine kinase domain of the epidermal growth factor receptor are associated with improved survival in gefitinib-treated chemorefractory lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res*. 2005;11:5878-85.

Thompson JP, Debinski W. Mutants of interleukin 13 with altered reactivity toward interleukin 13 receptors. *J Biol Chem.*1999;15;274:29944-50.

Trembath DG, Lal A, Kroll DJ, Oberlies NH, Riggins GJ. A novel small molecule that selectively inhibits glioblastoma cells expressing EGFRvIII. *Mol Cancer.* 2007;16;6:30.

Tsao MS, Sakurada A, Cutz JC, Zhu CQ, Kamel-Reid S, Squire J, Lorimer I, Zhang T, Liu N, Daneshmand M, Marrano P, da Cunha Santos G, Lagarde A, Richardson F, Seymour L, Whitehead M, Ding K, Pater J, Shepherd FA. Erlotinib in lung cancer - molecular and clinical predictors of outcome. *N Engl J Med*. 2005; 353:133-44.

Ulasov IV, Tyler MA, Han Y, Glasgow JN, Lesniak MS. Novel recombinant adenoviral vector that targets the interleukin-13 receptor alpha2 chain permits effective gene transfer to malignant glioma. *Hum Gene Ther*. 2007;18:118-29.

Ullrich A, Coussens L, Hayflick JS, Dull TJ, Gray A, Tam AW, Lee J, Yarden Y, Libermann TA, Schlessinger J. Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature*. 1984;309(5967):418-25.

Vallera DA, Stish BJ, Shu Y, Chen H, Saluja A, Buchsbaum DJ, Vickers SM Genetically designing a more potent antipancreatic cancer agent by

simultaneously co-targeting human IL13 and EGF receptors in a mouse xenograft model. *Gut.* 2008;57:634-41.

Villares GJ, Zigler M, Blehm K, Bogdan C, McConkey D, Colin D, Bar-Eli M. Targeting EGFR in bladder cancer. *World J Urol.* 2007; 25:573-9.

Von Deimling A, Louis DN, Wiestler OD. Molecular pathways in the formation of gliomas. *Glia*, 1995; 5:328-38.

Ware ML, Berger MS, Binder DK. Molecular biology of glioma tumorigenesis. *Histol Histopathol.* 2003;18:207-16.

Watanabe K, Tachibana O, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Role of gemistocytes in astrocytoma progression. *Lab Invest.* 1997;76:277-84.

Wykosky J, Gibo DM, Stanton C, Debinski W. Interleukin-13 receptor alpha 2, EphA2, and Fos-related antigen 1 as molecular denominators of high-grade astrocytomas and specific targets for combinatorial therapy. *Clin Cancer Res.* 2008;14:199-208.

Wong ML, Kaye AH, Hovens CM.Targeting malignant glioma survival signalling to improve clinical outcomes. *J Clin Neurosci*. 2007;14:301-8.

Woodburn JR. The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy. *Pharmacol Ther.* 1999;82:241-50.

Wu R, Abramson AL, Shikowitz MJ, Dannenberg AJ, Steinberg BM. Epidermal growth factor-induced cyclooxygenase-2 expression is mediated through phosphatidylinositol-3 kinase, not mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase, in recurrent respiratory papillomas. *Clin Cancer Res*, 2005;11:6155-61.

Yarden Y. The EGFR family and its ligands in human cancer: signaling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer.* 2001; 37(Suppl):S3-S8.

Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001;2:127-37.

Yoshimoto K, Dang J, Zhu S, Nathanson D, Huang T, Dumont R, Seligson DB, Yong WH, Xiong Z, Rao N, Winther H, Chakravarti A, Bigner DD, Mellinghoff IK, Horvath S, Cavenee WK, Cloughesy TF, Mischel PS. Development of a real-time RT-PCR assay for detecting EGFRvIII in glioblastoma samples. *Clin Cancer Res*. 2008;14:488-93.

Xiaobing J, Xiaoling L, Ruen L, Fangcheng Z, Hongyang Z. Induction of cytotoxic T-lymphocytes specific for malignant glioma by HLA dimer-based artificial antigen-presenting cells. *Cancer Biother Radiopharm*. 2007;22:826-35.

Xie Y, Hung MC.Nuclear localization of p185neu tyrosine kinase and its association with transcriptional transactivation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;203:1589-98.

Xu Y, Shao Y, Zhou J, Voorhees JJ, Fisher GJ. Ultraviolet irradiation-induces epidermal growth factor receptor (EGFR) nuclear translocation in human keratinocytes. *J Cell Biochem.* 2009 May 4.

Zhang D, Sliwkowski MX, Mark M, Frantz G, Akita R, Sun Y, Hillan K, Crowley C, Brush J, Godowski PJ. Neuregulin-3 (NRG3): a novel neural tissue-enriched protein that binds and activates ErbB4. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94:9562-7.

Zhang X, Chen ZG, Choe MS, Lin Y, Sun SY, Wieand HS, Shin HJ, Chen A, Khuri FR, Shin DM. Tumor growth inhibition by simultaneously blocking epidermal growth factor receptor and cyclooxygenase-2 in a xenograft model. *Clin Cancer Res*. 2005;11:6261-9.

Zhou G, Roizman B. Characterization of a recombinant herpes simplex virus 1 designed to enter cells via the IL13Ralpha2 receptor of malignant glioma cells. *J Virol*. 2005;79:5272-7.

8. ANEXOS

8 – ANEXOS

As tabelas mostram os casos incluídos neste estudo.

Anexo 1: Dados de identificação (caso, nome, número, gênero e idade ao diagnóstico), registro do Hospital de Clínicas (Registro-HC), número do projeto a qual pertence (Projeto Genoma: AS3) e número do anátomo-patológico, dos casos de tecido não tumoral (normais), de astrocitoma pilocítico (AP), astrocitoma grau II (AGII), astrocitoma anaplásico (AA), e de glioblastoma multiforme, (GBM).

Anexo 2: Identificação (caso e número), data de nascimento, data de cirurgia e data de óbito dos casos normais, AP, AGII, AA e GBM.

Anexo 3: Identificação (caso e número) tempos de seguimento e de sobrevida calculados até junho de 2009 dos casos normais, AA, AGII, AA e GBM.

Anexo 4: Identificação (caso e número) e dados de expressão gênica (valores $2^{-\Delta\Delta Ct}$) dos genes normalizadores (números dos Cts e respectivas médias) e dos genes alvos: *IL13Rα2* e *EGFR* dos casos normais, AP, AGII, AA e GBM.

Anexo 5: Identificação (caso e número), valores da amplificação de *EGFR* ($2\Delta Ct$) e dados da expressão protéica dos casos normais, AP, AGII, AA e GBM.

Anexo 6: Identificação (caso e número) e dados da deleção EGFRvIII por RT-PCR e RQ-PCR nos casos de tecido não tumoral (normais) e astrocitomas.

ANEXO 1

Diagnóstico	Caso	Número	AS3	Nome	Sexo	Idade*	Registro HC	No. do Anátomo Patológico
normal	1	108	N	MMP	M	31a	7044114J	48-6846-3
	2	167	N	EA	M	39a	3288025F	50-4808-7
	3	173	N	MIM	F	44a	3055143A	50-5645-4
	4	179	N	ED	F	39a	7041451D	nc
	5	189	N	RLG	F	35a	3013021C	nc
	6	196	N	IG	F	44a	3170702G	51-1374-1
	7	226	N	PST	M	38a	2995897G	51-7832-0
	8	232	N	FPB	M	28a	2920291E	51-9509-8
	9	245	N	GVA	M	25a	2859949E	52-1343-6
	10	263	N	MML	M	27a	2835024G	52-6323-9
	11	312	N	MCL	F	41a	3189719A	53-6502-3
	12	330	N	JMR	M	32a	2374932H	54-1685-0
	13	714	N	VLPM	F	56a	13602383F	62-2100-9
	14	755	N	SVSB	F	39a	7048016-C	63-0783-3
	15	805	N	SAD	F	37a	7047635-A	64-1342-0
	16	861	N	RM	M	35a	13561850G	65-3324-8
	17	969	N	GC	F	34a	7047021-J	nc
AP	18	185	N	APF	M	24a	13522266H	50-8257-9
	19	335	N	MI	F	34a	2568552A	54-2626-0
	20	352	N	JRS	M	35a	13578917K	54-6383-1
	21	363	N	RFCO	M	13a	6063214G	54-9952-6
	22	421	N	IAPV	F	16a	13473553G	56-4821-1
	23	436	N	WGG	M	18a	13570687I	56-8949-0
	24	463	N	SEM	F	16a	13449456G	57-3638-2
	25	495	N	ASJM	F	8a	13492358C	58-1515-0
	26	501	N	RJB	M	32a	13491797C	58-2590-3
	27	570	N	KBRP	F	8a	13594605C	59-5895-4
	28	594	N	JCFS	M	18a	3367062G	59-9510-8
	29	601	N	JJS	M	21a	1359908G	60-0984-0
	30	828	N	WHO	M	16a	77071554A	64-8111-6
	31	878	N	JBS	F	18a	13658238-D	65-6608-1
	32	889	N	WAD	F	43a	13661866-B	65-9211-2
	33	892	N	RAR	M	14a	13665259-F	65-9601-0
	34	932	N	JSO	M	17a	13672526-D	66-7407-0
	35	946	N	PRTS	M	9a	3206638-A	66-9467-5
	36	995	N	JTAN	M	22a	13685104-G	68-3495-7
	37	1044	N	LRR	M	8a	13610605-I	69-6825-2
	38	1049	N	AOS	F	14a	13708589-J	69-8645-5
	39	1058	N	RLS	M	22a	77077345-C	70-0849-0
AGII	40	55	89	MAP	F	36a	2623330D	46-6343-8
	41	76	14	ML	M	27a	3361902H	47-3260-0
	42	101	10	JNO	F	23a	7047105H	48-3300-7
	43	118	2	AMC	F	45a	13546582F	49-1687-5
	44	239	40	JRA	M	56a	13548901E	52-0559-0
	45	250	39	MBC	F	30a	13562412F	52-2827-1
	46	254	38	MGSJ	F	24a	13572670I	52-3726-2
	47	267	1	AMM	M	43a	13574538G	52-7365-0
	48	328	15	CHR	M	39a	77063187A	54-0842-3
	49	341	14	ML	M	28a	3361902H	54-4295-8
	50	346	16	RTP	M	23a	77062139H	54-5126-4
	51	392	22	ARVA	F	38a	3233880E	55-7686-5
	52	412	1	AMM	M	44a	13574538G	56-2912-8
	53	452	62	MRS	M	41a	77062882E	57-1922-4
	54	453	60	JOJ	M	28a	3144835K	57-1958-5
	55	467	63	MAM	F	41a	13484936E	57-4432-6
	56	490	52	NNS	M	35a	13491090E	58-0272-5
	57	577	78	RNN	F	35a	13592815B	59-6637-0
	58	715	88	AOE	F	27a	13622992A	62-2613-2
	59	806	93	ESM	M	39a	13643283-C	64-1370-6
	60	999	115	JWMS	M	25a	13683439-B	68-4581-1
	61	1095	127	JPS	M	32a	13722519-E	71-3078-3
AA	62	34	53	MGCJ	M	18a	3324020-E	45-7850-3
	63	73	51	MCV	F	25a	7042702A	47-2162-4
	64	233	41	OAA	F	58a	13567029I	51-9554-3
	65	249	3	AC	M	32a	3259481K	52-2586-8
	66	338	11	LKH	F	37a	13580020H	54-3528-5
	67	347	17	WCS	M	15a	13579476I	54-5552-9
	68	360	18	ICVK	F	32a	77063981H	54-9361-7
	69	366	8	GPJ	M	37a	13452901C	55-0872-0
	70	410	67	AAS	M	30a	13472055H	56-2773-7
	71	428	92	FCRN	M	58a	13454723D	56-6174-9
	72	478	64	ASM	M	39a	77066277G	57-6718-0
	73	514	73	LFF	M	37a	13498164D	58-5446-6
	74	734	100	JRS	M	31a	3246130E	62-7221-5
	75	905	38	MGSJ	F	27a	13572670-I	66-1379-9
	76	981	N	VGCJ	M	21a	6045626-J	67-8719-3
	77	1033	121	ANS	F	29a	77060584-C	69-3015-8
	78	1036	120	MDDT	F	46a	13702355-F	69-3029-8

AS3 = Cadastro do Projeto Genoma Clínico
N = Não faz parte do Projeto Genoma Clínico
* ao diagnóstico (a = anos)
nc = nada consta

ANEXO 1 (CONTINUAÇÃO)

Diagnóstico	Caso	Número	AS3	Nome	Sexo	Idade*	Registro HC	No. do Anátomo Patológico
GBM	79	35	12	MPS	M	53a	3324020-E	45-7850-3
	80	74	50	UC	M	74a	7045824G	47-2426-7
	81	175	49	MTC	F	56a	3316801G	50-6045-1
	82	194	48	OB	M	71a	77060472A	51-0694-0
	83	204	47	BL	F	70a	2837573G	51-3734-9
	84	208	45	EFC	M	62a	2869282K	51-4351-9
	85	216	44	MRC	F	67a	2189934K	51-6207-6
	86	256	7	CDS	M	41a	13572856A	52-4509-5
	87	269	43	ELAD	F	65a	13574725E	52-7569-5
	88	274	42	BCJ	F	47a	77062152I	52-8714-6
	89	297	4	MCE	F	78a	13445637B	53-3674-0
	90	317	32	MJO	F	71a	2357547B	53-7898-2
	91	356	30	JS	M	74a	5163770G	54-7434-5
	92	370	29	WAS	M	45a	13581612B	55-1404-5
	93	384	13	CSS	M	45a	1356103K	55-5488-8
	94	391	9	IPP	F	54a	13581546D	55-7112-0
	95	397	20	MCS	F	58a	2995994F	55-8650-0
	96	427	25	AJS	F	51a	3200846K	56-5920-5
	97	435	19	JCPS	M	34a	13473986A	56-8004-2
	98	442	27	MSS	M	68a	13473990D	56-9206-7
	99	450	54	CMT	F	61a	13481051K	57-1498-2
	100	458	55	MAA	M	62a	13482791J	57-2532-1
	101	485	57	ASS	M	67a	13489242I	57-8817-0
	102	496	58	SASC	F	57a	3009732B	58-1738-2
	103	498	61	GP	F	17a	3346247F	58-1946-6
	104	503	72	JRF	M	63a	13470665B	58-3233-0
	105	510	71	VRS	M	56a	3335161J	58-4389-8
	106	522	69	MFC	M	48a	13498664F	58-6616-2
	107	524	56	ZFR	F	59a	13499574B	58-6807-6
	108	547	75	AA	M	71a	13590219J	59-1211-3
	109	573	70	EM	M	50a	3337216F	59-6190-4
	110	592	74	MRKMB	F	40a	13599910A	59-9328-8
	111	629	79	JLS	M	64a	13605568F	60-6149-4
	112	632	77	VAP	F	41a	13607484I	60-6580-5
	113	638	13	VFC	M	55a	13607484I	60-6580-5
	114	640	85	LPS	F	58a	44104649F	60-7753-6
	115	642	59	NDT	M	42a	13608382J	60-7749-8
	116	663	82	AFP	M	66a	3011915I	61-2537-9
	117	684	81	ADM	F	56a	13616873G	61-7187-7
	118	687	84	LZ	M	45a	13619180I	61-7615-1
	119	698	83	ERL	M	58a	13621334B	61-9020-0
	120	724	68	ACF	F	62a	13625792E	62-4884-5
	121	743	80	JPP	M	52a	2173677-K	62-8701-8
	122	750	86	NR	M	51a	13613008-D	62-9711-0
	123	792	N	IS	M	35a	44106871-I	63-8599-0
	124	795	N	JCN	M	28a	13640608-J	63-9408-6
	125	852	97	AG	M	60a	13654470A	65-2002-2
	126	854	90	GFS	M	46a	13655653B	65-2828-7
	127	875	94	IS	M	35a	44106871-I	65-5776-7
	128	879	103	AM	M	61a	3024155-H	65-7270-7
	129	881	95	JBF	M	49a	13661416-K	65-7715-6
	130	884	97	ILR	F	52a	13663130-B	65-8286-9
	131	891	98	FD	M	57a	13664358-H	65-9493-0
	132	901	102	GMS	M	16a	13665181-J	66-0382-3
	133	903	117	GSS	M	55a	13666243-J	66-0989-9
	134	925	105	PMO	M	40a	13672566-C	66-5405-5
	135	930	104	ASA	M	26a	13572505-G	66-6758-9
	136	1002	108	MMC	M	40a	13693256-A	68-5149-5
	137	1003	109	DGS	F	68a	13694933-J	68-5148-7
	138	1007	117	MGSJ	F	28a	13572670-I	68-6084-2
	139	1009	112	MAPL	F	38a	13680596-I	68-6226-8
	140	1074	118	ILO	M	32a	13714223-E	70-4471-2
	141	1077	111	VAP	F	41a	13607484-I	70-6006-8
	142	1084	122	AJ	M	54a	13718609-B	70-9092-7
	143	1091	124	WJGS	M	55a	13625572-H	71-1551-2
	144	1103	137	AJ	M	54a	13718609-B	71-5874-2
	145	1118	130	APS	F	61a	13731814-H	72-2757-4
	146	1122	123	AF	M	68a	55441508-G	72-4276-0
	147	1123	131	EFS	M	53a	13732747-F	72-4527-0
	148	1124	134	AE	M	63a	13732923-H	72-5103-3
	149	1133	135	FCC	M	52a	55302090-A	72-8168-4
	150	1144	133	SRS	M	76a	13740714-K	73-1961-4
	151	1161	136	GFS	M	39a	13743659-F	2006-3702
	152	1162	138	MES	F	68a	13743549-A	2006-4376
	153	1169	139	VMSB	F	56a	13746356-E	2006-5805
	154	1190	141	ESB	F	58a	13756119-E	2006-17398
	155	1194	144	ASA	M	26a	13572505-G	2006-18928
	156	1199	142	FRN	M	30a	13716278-H	2006-21506
	157	1205	143	OLAN	M	69a	13749545-H	2006-23080
	158	1212	107	FRN	M	31a	13716278-H	2007-0539
	159	1232	N	FBS	M	58a	13770362-G	2007-6934
	160	1237	145	APN	M	59a	890319629-I	2007-7960
	161	1243	N	VCT	M	47a	13773467-E	2007-10145
	162	1250	146	MFL	M	63a	13774296-K	2007-13001

AS3 = Cadastro do Projeto Genoma Clínico
N = Não faz parte do Projeto Genoma Clínico
* ao diagnóstico (a = anos)

ANEXO 2

Diagnóstico	Caso	Número	Data de Nascimento	Data de Cirurgia	Data de Óbito
normal	1	108	08/05/70	28/06/01	
	2	167	31/03/62	17/10/01	
	3	173	04/10/57	24/10/01	
	4	179	21/03/62	31/10/01	
	5	189	15/06/66	21/11/01	
	6	196	15/08/57	05/12/01	
	7	226	25/06/63	31/01/02	
	8	232	08/10/73	14/02/02	
	9	245	25/06/76	28/02/02	
	10	263	10/12/74	04/04/02	
	11	312	18/05/61	13/06/02	
	12	330	14/02/70	23/07/02	
	13	714	04/06/47	18/03/04	
	14	755	14/07/64	19/05/04	
	15	805	14/10/66	04/08/04	
	16	861	01/04/69	03/11/04	
	17	969	28/02/71	05/05/05	
AP	18	185	11/10/77	12/11/01	
	19	335	15/11/67	30/07/02	
	20	352	28/09/66	23/08/02	
	21	363	20/04/89	18/09/02	
	22	421	09/03/86	15/01/03	
	23	436	09/01/85	10/02/03	
	24	463	07/07/86	21/03/03	
	25	495	16/10/94	21/05/03	
	26	501	18/03/71	28/05/03	
	27	570	05/04/95	01/09/03	
	28	594	13/06/85	24/09/03	
	29	601	26/07/82	06/10/03	
	30	828	21/06/88	23/09/04	
	31	878	02/11/86	29/11/04	
	32	889	27/05/61	17/12/04	
	33	892	01/01/90	22/12/04	
	34	932	13/04/87	07/03/05	
	35	946	06/11/95	23/03/05	
	36	995	14/01/83	02/07/05	
	37	1044	28/10/96	05/10/05	
	38	1049	18/09/91	19/10/05	
	39	1058	07/02/83	04/11/05	
AGII	40	55	21/03/64	02/01/01	
	41	76	04/12/73	23/03/01	04/12/05
	42	101	25/10/77	04/06/01	
	43	118	02/08/55	23/07/01	30/07/03
	44	239	25/07/45	22/02/02	
	45	250	25/08/71	11/03/02	
	46	254	18/06/77	15/03/02	
	47	267	13/09/58	01/04/02	
	48	328	18/04/63	17/07/02	
	49	341	04/12/73	09/08/02	04/12/05
	50	346	03/06/79	15/08/02	
	51	392	09/05/64	11/11/02	
	52	412	13/09/58	20/12/02	
	53	452	15/11/61	10/03/03	
	54	453	23/12/74	11/03/03	
	55	467	25/10/61	27/03/03	06/09/06
	56	490	20/06/67	13/05/03	01/08/06
	57	577	08/10/67	05/09/03	
	58	715	26/10/76	22/03/04	10/01/05
	59	806	08/02/65	05/08/04	
	60	999	19/08/79	12/07/05	
	61	1095	08/12/73	10/02/06	
AA	62	34	06/09/82	20/11/00	
	63	73	08/04/76	16/03/01	19/03/07
	64	233	12/07/43	15/02/02	16/03/03
	65	249	27/12/69	08/03/02	21/10/02
	66	338	21/01/65	05/08/02	14/10/03
	67	347	20/04/87	19/08/02	
	68	360	04/07/70	13/09/02	
	69	366	25/08/65	23/09/02	
	70	410	04/08/73	19/12/02	
	71	428	04/10/80	24/01/03	
	72	478	12/11/66	11/04/03	12/01/05
	73	514	10/11/65	16/06/03	
	74	734	14/07/72	27/04/04	
	75	905	18/06/77	14/01/05	
	76	981	08/02/84	01/06/05	
	77	1033	02/06/76	08/09/05	
	78	1036	19/07/59	10/09/05	12/12/05

ANEXO 2 (CONTINUAÇÃO)

Diagnóstico	Caso	Número	Data de Nascimento	Data de Cirurgia	Data de Óbito
GBM	79	35	25/11/47	24/11/00	15/09/04
	80	74	25/10/26	19/03/01	29/08/02
	81	175	07/04/45	26/10/01	31/03/02
	82	194	29/05/30	30/11/01	01/10/03
	83	204	01/01/30	21/12/01	06/08/02
	84	208	09/08/39	04/01/02	24/07/02
	85	216	02/10/34	18/01/02	10/06/02
	86	256	25/11/60	21/03/02	14/06/02
	87	269	28/02/37	12/04/02	18/04/02
	88	274	20/12/54	19/04/02	27/09/03
	89	297	14/06/23	23/05/02	02/05/03
	90	317	22/12/30	24/06/02	15/09/02
	91	356	17/06/28	30/08/02	23/08/03
	92	370	12/07/57	27/09/02	04/11/03
	93	384	27/04/57	25/10/02	14/03/03
	94	391	16/03/48	07/11/02	06/12/03
	95	397	08/12/43	20/11/02	30/04/03
	96	427	11/11/51	23/01/03	13/07/03
	97	435	11/04/68	07/02/03	05/02/04
	98	442	12/05/34	17/02/03	18/06/03
	99	450	26/08/41	06/03/03	13/05/04
	100	458	23/04/42	16/03/03	15/07/03
	101	485	18/02/36	01/05/03	30/11/03
	102	496	30/10/45	22/05/03	25/01/04
	103	498	06/02/86	23/05/03	15/10/03
	104	503	17/07/39	02/06/03	25/08/03
	105	510	11/10/46	10/06/03	28/05/05
	106	522	20/05/55	27/06/03	20/07/05
	107	524	05/11/43	30/06/03	11/03/04
	108	547	15/08/31	31/07/03	15/09/04
	109	573	14/11/52	03/09/03	04/06/04
	110	592	01/10/62	24/09/03	
	111	629	25/06/38	11/11/03	15/01/05
	112	632	15/08/62	13/11/03	23/03/06
	113	638	15/08/62	13/11/03	28/01/04
	114	640	12/12/44	21/11/03	13/05/04
	115	642	14/04/62	21/11/03	04/05/05
	116	663	11/12/37	05/12/03	06/08/04
	117	684	15/12/47	12/02/04	18/05/04
	118	687	07/03/58	16/02/04	28/12/04
	119	698	25/09/45	27/02/04	15/12/04
	120	724	01/02/42	08/04/04	
	121	743	09/06/52	06/05/04	16/07/04
	122	750	23/09/52	13/05/04	25/11/04
	123	792	21/12/69	16/07/04	14/01/05
	124	795	15/06/76	22/08/04	18/07/05
	125	852	19/08/44	22/10/04	05/12/05
	126	854	17/06/58	27/10/04	
	127	875	21/12/69	23/11/04	14/01/05
	128	879	27/07/43	02/12/04	18/03/05
	129	881	25/01/55	07/12/04	22/04/05
	130	884	15/01/52	10/12/04	08/04/07
	131	891	25/10/47	21/12/04	28/01/06
	132	901	07/11/88	05/01/05	12/03/05
	133	903	08/02/45	11/01/05	29/11/06
	134	925	08/09/64	25/02/05	22/03/06
	135	930	01/10/78	03/03/05	10/10/07
	136	1002	29/01/65	15/07/05	04/10/05
	137	1003	25/03/37	17/07/05	30/11/05
	138	1007	18/06/77	22/07/05	18/11/05
	139	1009	25/10/66	25/07/05	12/03/06
	140	1074	25/07/73	03/12/05	
	141	1077	15/08/62	14/12/05	23/03/06
	142	1084	18/04/51	13/01/06	07/07/06
	143	1091	05/09/49	03/02/06	09/01/07
	144	1103	18/04/51	03/03/06	07/07/06
	145	1118	10/07/59	18/04/06	21/06/06
	146	1122	26/07/37	01/05/06	01/10/06
	147	1123	29/10/53	02/05/06	21/04/07
	148	1124	19/03/43	05/05/06	20/09/06
	149	1133	28/12/53	26/05/06	26/02/07
	150	1144	15/08/29	25/06/06	07/09/06
	151	1161	13/01/67	26/07/06	08/11/07
	152	1162	20/05/38	31/07/06	26/12/07
	153	1169	13/03/50	09/08/06	05/01/08
	154	1190	16/09/48	24/10/06	24/12/07
	155	1194	01/10/78	03/11/06	10/10/07
	156	1199	06/11/75	24/11/06	14/02/07
	157	1205	13/12/36	05/12/06	
	158	1212	06/11/75	05/01/07	14/02/07
	159	1232	07/04/48	16/02/07	29/02/08
	160	1237	18/05/47	27/02/07	13/10/07
	161	1243	22/09/59	13/03/07	15/01/08
	162	1250	11/01/44	30/03/07	06/11/07

ANEXO 3

Diagnóstico	Caso	Número	Tempo de Seguimento*	Tempo de Sobrevida*
normal	1	108	7a 11m	
	2	167	7a 7m	
	3	173	7a 7m	
	4	179	7a 7m	
	5	189	7a 6m	
	6	196	7a 6m	
	7	226	7a 4m	
	8	232	7a 3m	
	9	245	7a 3m	
	10	263	7a 2m	
	11	312	6a 11m	
	12	330	6a 10m	
	13	714	5a 2m	
	14	755	5a 0m	
	15	805	4a 10m	
	16	861	4a 7m	
	17	969	4a 1m	
AP	18	185	7a 7m	
	19	335	6a 10m	
	20	352	6a 9m	
	21	363	6a 9m	
	22	421	6a 5m	
	23	436	6a 4m	
	24	463	6a 3m	
	25	495	5a 13m	
	26	501	5a 12m	
	27	570	6a 5m	
	28	594	5a 8m	
	29	601	5a 8m	
	30	828	4a 8m	
	31	878	4a 6m	
	32	889	4a 6m	
	33	892	4a 6m	
	34	932	4a 3m	
	35	946	4a 2m	
	36	995	3a 11m	
	37	1044	3a 8m	
	38	1049	3a 8m	
	39	1058	3a 7m	
AGII	40	55	8a 5m	
	41	76		4a 8m
	42	101	8a	
	43	118		2a 0m
	44	239	7a 4m	
	45	250	7a 3m	
	46	254	7a 3m	
	47	267	7a 2m	
	48	328	6a 11m	
	49	341		3a 3m
	50	346	6a 10m	
	51	392	6a 7m	
	52	412	6a 6m	
	53	452	6a 3m	
	54	453	6a 3m	
	55	467		3a 5m
	56	490		3a 2m
	57	577	5a 9m	
	58	715		0a 9m
	59	806	4a 10m	
	60	999	3a 11m	
	61	1095	3a 4m	
AA	62	34	8a 7m	
	63	73		6a 0m
	64	233		1a 1m
	65	249		0a 7m
	66	338		1a 2m
	67	347	6a 10m	
	68	360	6a 9m	
	69	366	6a 8m	
	70	410	6a 6m	
	71	428	6a 4m	
	72	478		1a 9m
	73	514	6a	
	74	734	5a 1m	
	75	905	4a 5m	
	76	981	4a	
	77	1033	3a 9m	
	78	1036		0a 3m

a = anos / m = meses

*última atualização - jun/2009

ANEXO 3 (CONTINUAÇÃO)

Diagnóstico	Caso	Número	Tempo de Seguimento*	Tempo de Sobrevida*
GBM	79	35		3a 9m
	80	74		1a 5m
	81	175		0a 5m
	82	194		1a 10m
	83	204		0a 7m
	84	208		0a 6m
	85	216		0a 4m
	86	256		0a 2m
	87	269		0a 0m
	88	274		1a 5m
	89	297		0a 11m
	90	317		0a 2m
	91	356		0a 11m
	92	370		1a 1m
	93	384		0a 4m
	94	391		1a 0m
	95	397		5m
	96	427		0a 5m
	97	435		0a 11m
	98	442		0a 4m
	99	450		1a 2m
	100	458		0a 3m
	101	485		0a 6m
	102	496		0a 8m
	103	498		0a 4m
	104	503		0a 2m
	105	510		1a 11m
	106	522		2a 0m
	107	524		0a 8m
	108	547		1a 1m
	109	573		0a 9m
	110	592	5a 9m	
	111	629		1a 2m
	112	632		2a 4m
	113	638		0a 2m
	114	640		0a 5m
	115	642		1a 5m
	116	663		0a 7m
	117	684		0a 3m
	118	687		0a 10m
	119	698		0a 9m
	120	724	5a 2m	
	121	743		0a 2m
	122	750		0a 6m
	123	792		0a 5m
	124	795		0a 11m
	125	852		1a 1m
	126	854	4a 7m	
	127	875		0a 1m
	128	879		0a 3m
	129	881		0a 4m
	130	884		2a 3m
	131	891		0a 7m
	132	901		0a 2m
	133	903		1a 10m
	134	925		1a 0m
	135	930		2a 7m
	136	1002		0a 2m
	137	1003		0a 4m
	138	1007		0a 3m
	139	1009		0a 7m
	140	1074	4a 3m	
	141	1077		0a 3m
	142	1084		0a 5m
	143	1091		1a 11m
	144	1103		0a 4m
	145	1118		0a 2m
	146	1122		0a 5m
	147	1123		0a 11m
	148	1124		0a 4m
	149	1133		0a 9m
	150	1144		0a 2m
	151	1161		1a 3m
	152	1162		1a 4m
	153	1169		1a 4m
	154	1190		1a 2m
	155	1194		0a 11m
	156	1199		0a 3m
	157	1205	3a 1m	
	158	1212		0a 1m
	159	1232		1a 0m
	160	1237		0a 7m
	161	1243		0a 10m
	162	1250		0a 7m

a = anos / m = meses

*última atualização - jun/2009

ANEXO 4

			Cts Genes Normalizadores		Média	Expressão Gênica (RQ-PCR)*	
Diagnóstico	Caso	Número	*HPRT*	*GUSB*	Média Cts	*IL13RA2*	*EGFR*
normal	1	108	22,58	24,30	23,44	0,55	0,54
	2	167	21,84	24,59	23,21	0,00	0,66
	3	173	24,51	26,33	25,42	0,60	2,18
	4	179	21,55	22,65	22,10	1,43	0,41
	5	189	23,15	25,23	24,19	0,70	1,03
	6	196	24,49	25,74	25,11	1,60	0,79
	7	226	22,06	24,46	23,26	1,01	1,57
	8	232	22,80	24,81	23,80	1,58	0,32
	9	245	23,73	25,38	24,55	0,71	0,83
	10	263	27,10	28,28	27,69	0,50	0,59
	11	312	23,52	25,57	24,54	2,06	1,01
	12	330	23,29	25,40	24,35	1,37	1,55
	13	714	23,44	24,96	24,20	1,32	1,30
	14	755	21,70	24,04	22,87	1,31	1,95
	15	805	22,11	24,70	23,40	1,37	2,67
	16	861	21,92	24,22	23,07	0,51	0,86
	17	969	22,34	24,73	23,54	0,99	1,73
AP	18	185	26,21	25,18	25,70	1,38	94,02
	19	335	25,04	23,31	24,17	2,38	15,94
	20	352	26,89	24,95	25,92	58,54	16,85
	21	363	26,12	23,93	25,02	0,17	1,22
	22	421	28,18	25,51	26,85	28,67	0,66
	23	436	27,57	25,86	26,71	0,36	12,73
	24	463	25,86	24,14	25,00	58,94	1,39
	25	495	25,58	23,94	24,76	54,14	0,21
	26	501	24,32	24,00	24,16	6,24	5,76
	27	570	26,47	24,79	25,63	0,30	27,47
	28	594	24,73	23,99	24,36	0,00	28,69
	29	601	26,12	25,26	25,69	0,96	22,35
	30	828	26,25	24,06	25,15	996,86	11,20
	31	878	25,18	23,47	24,32	16,46	2,62
	32	889	26,07	24,45	25,26	1,93	2,57
	33	892	25,75	24,17	24,96	5,67	5,31
	34	932	26,11	24,44	25,27	0,00	9,83
	35	946	25,12	23,36	24,24	85,55	21,67
	36	995	25,24	25,32	25,28	525,03	167,71
	37	1044	26,55	26,46	26,50	49,48	9,43
	38	1049	24,67	24,50	24,58	11,34	21,52
	39	1058	26,24	24,32	25,28	22,61	69,18
AGII	40	55	25,59	24,16	24,88	1,08	19,16
	41	76	26,87	25,39	26,13	0,24	89,25
	42	101	27,39	24,62	26,00	0,00	140,30
	43	118	29,01	27,95	28,48	0,00	21,07
	44	239	27,12	24,85	25,99	0,00	124,06
	45	250	25,50	26,45	25,97	0,42	7,37
	46	254	27,36	26,10	26,73	0,09	27,23
	47	267	25,35	25,78	25,56	0,64	39,39
	48	328	23,99	26,70	25,34	0,00	0,44
	49	341	26,60	25,26	25,93	0,00	4,73
	50	346	25,55	24,73	25,14	0,91	4,47
	51	392	25,48	26,15	25,81	0,78	6,49
	52	412	29,10	26,62	27,86	0,00	19,03
	53	452	26,54	24,95	25,74	5,75	20,50
	54	453	28,95	27,37	28,16	10,77	478,49
	55	467	24,59	24,85	24,72	0,21	23,30
	56	490	26,50	24,49	25,49	0,00	298,14
	57	577	26,94	24,90	25,92	4,60	48,67
	58	715	27,78	27,34	27,56	6,99	14,32
	59	806	28,62	28,24	28,43	0,00	223,22
	60	999	25,38	24,98	25,18	0,17	7,61
	61	1095	27,13	25,66	26,39	3,04	53,63
AA	62	34	26,58	26,75	26,66	5,29	85,77
	63	73	27,31	25,435	26,37	0,19	75,97
	64	233	26,33	25,71	26,02	0,03	19,66
	65	249	24,81	23,61	24,21	9,07	41,35
	66	338	28,29	26,645	27,47	0,00	54,94
	67	347	30,37	28,2	29,29	0,00	2,81
	68	360	26,07	27,135	26,60	0,88	95,99
	69	366	27,30	24,635	25,97	1,71	74,54
	70	410	26,17	25,215	25,69	0,29	25,37
	71	428	27,20	25,405	26,30	0,00	23,22
	72	478	23,83	23,155	23,49	5,89	27,90
	73	514	25,88	23,92	24,90	12,01	22,24
	74	734	28,20	25,985	27,09	0,00	0,92
	75	905	25,42	24,85	25,13	0,00	10,83
	76	981	29,24	26,805	28,02	5,27	93,53
	77	1033	27,09	26,15	26,62	0,00	104,14
	78	1036	29,22	27,34	28,28	0,00	28,10

*Hiperexpressão EGFR e IL13Rα2 = $\geq$ mediana GBMs

RQ-PCR = PCR em Tempo Real Semi-Quantitaitvo

ANEXO 4 (CONTINUAÇÃO)

			Cts Genes Normalizadores		Média	Expressão Gênica (RQ-PCR)*	
Diagnóstico	Caso	Número	*HPRT*	*GUSB*	Média Cts	*IL13RA2*	*EGFR*
GBM	79	35	24,39	22,82	23,60	0,86	6,87
	80	74	26,43	21,54	23,98	20,80	605,66
	81	175	26,48	23,86	25,17	2,67	1,48
	82	194	25,36	22,72	24,04	6,15	102,88
	83	204	24,90	23,10	24,00	18,40	4,47
	84	208	26,07	23,93	25,00	0,37	2,26
	85	216	27,18	25,56	26,37	0,78	7,41
	86	256	26,01	24,09	25,05	10,86	20,75
	87	269	26,19	23,23	24,71	0,47	209,00
	88	274	25,57	23,46	24,51	1,02	169,47
	89	297	24,74	22,15	23,44	1,98	290,49
	90	317	23,76	24,64	24,20	1,11	5,69
	91	356	25,46	23,98	24,72	0,94	8,15
	92	370	25,78	22,90	24,34	15,60	5,25
	93	384	25,04	23,10	24,07	17,10	34,41
	94	391	25,94	23,94	24,94	2,36	2,15
	95	397	24,97	23,64	24,30	26,33	1,54
	96	427	25,30	24,00	24,65	11,03	5,67
	97	435	25,73	23,36	24,54	2,10	693,31
	98	442	24,83	22,22	23,52	0,80	10,89
	99	450	25,29	23,43	24,36	39,02	4,66
	100	458	25,36	23,36	24,36	0,04	7,74
	101	485	24,76	22,87	23,82	40,54	11,23
	102	496	25,24	25,74	25,49	25,97	194,33
	103	498	23,77	22,35	23,06	0,91	123,41
	104	503	25,15	23,61	24,38	8,41	5,98
	105	510	24,30	22,35	23,32	4,27	3,14
	106	522	25,36	21,94	23,65	34,99	3,42
	107	524	24,69	22,80	23,74	6,61	23,79
	108	547	26,21	25,11	25,66	5,98	2,34
	109	573	29,43	27,40	28,41	0,67	5,12
	110	592	29,69	27,32	28,50	18,43	2,32
	111	629	26,62	24,22	25,42	0,74	0,81
	112	632	24,28	23,14	23,71	7,69	3,56
	113	638	26,38	23,42	24,90	0,96	3,31
	114	640	26,47	25,84	26,16	0,00	9,38
	115	642	25,49	23,39	24,44	1,65	11,85
	116	663	31,16	28,25	29,70	3,46	2,42
	117	684	24,74	22,69	23,71	21,54	47,09
	118	687	25,59	23,91	24,75	23,61	6,36
	119	698	23,59	22,33	22,96	0,88	2,08
	120	724	25,77	23,50	24,63	30,35	201,88
	121	743	27,65	25,39	26,52	9,79	11,43
	122	750	25,30	22,38	23,84	22,57	112,58
	123	792	25,78	24,25	25,01	4,55	1,18
	124	795	27,12	24,22	25,67	21,84	65,91
	125	852	26,62	23,71	25,16	12,85	1,08
	126	854	26,60	24,24	25,42	3,89	657,05
	127	875	26,30	24,06	25,18	19,28	2,10
	128	879	23,13	21,63	22,38	12,22	7,39
	129	881	27,07	25,47	26,27	8,49	262,26
	130	884	25,51	23,24	24,37	3,76	45,56
	131	891	24,22	23,16	23,69	2,85	0,68
	132	901	26,36	24,72	25,54	0,91	32,67
	133	903	26,72	24,22	25,47	27,31	2,38
	134	925	27,39	25,06	26,22	25,83	20,32
	135	930	26,92	26,08	26,50	0,53	76,90
	136	1002	26,18	23,13	24,65	61,55	2,42
	137	1003	25,65	24,51	25,08	27,12	318,43
	138	1007	22,86	23,27	23,07	0,42	25,99
	139	1009	24,03	22,23	23,13	4,65	2,44
	140	1074	25,25	23,32	24,28	2,34	3,30
	141	1077	25,69	21,55	23,62	1,03	4,76
	142	1084	26,89	25,32	26,10	3,68	5,99
	143	1091	24,16	20,53	22,34	14,36	78,11
	144	1103	25,45	23,49	24,47	1,38	81,28
	145	1118	28,41	26,35	27,38	34,33	19,36
	146	1122	24,48	22,90	23,69	2,46	4,82
	147	1123	25,86	23,37	24,61	0,00	129,77
	148	1124	24,75	24,51	24,63	6,78	51,26
	149	1133	25,90	23,41	24,66	0,17	302,30
	150	1144	23,49	24,15	23,82	5,77	31,94
	151	1161	24,64	22,82	23,73	0,09	370,25
	152	1162	24,80	24,27	24,53	2,25	5,77
	153	1169	24,37	22,50	23,43	61,55	2,21
	154	1190	23,87	22,26	23,06	0,33	7,59
	155	1194	28,72	25,60	27,16	0,00	4,48
	156	1199	30,16	27,56	28,86	0,00	1,29
	157	1205	29,91	27,31	28,61	1,41	2,45
	158	1212	25,08	23,38	24,23	0,21	19,70
	159	1232	23,43	21,75	22,59	32,25	0,96
	160	1237	23,90	23,13	23,51	0,81	0,92
	161	1243	25,03	23,50	24,26	0,02	504,03
	162	1250	24,01	22,93	23,47	6,84	78,92

*Hiperexpressão EGFR e IL13Rα2 = $\geq$ mediana GBMs

RQ-PCR = PCR em Tempo Real Semi-Quantitaitvo

ANEXO 5

			Amplificação (RQ-PCR)*	Expressão da proteína EGFR (IHQ)**		
Diagnóstico	Caso	Número	Amplificação *EGFR*	qualitativa	quantitativa	marcação nuclear***
normal	1	108	0,52	1	0	0
	2	167	0,64	1	0	0
	3	173	0,49	1	0	0
	4	179	1,10	NR	NR	0
	5	189	1,16	NR	NR	0
	6	196	1,24	NR	NR	0
	7	226	0,78	1	0	0
	8	232	1,60	NR	NR	0
	9	245	1,44	0	0	0
	10	263	0,26	NR	NR	0
	11	312	0,84	NR	NR	0
	12	330	0,55	1	0	0
	13	714	0,94	NR	NR	0
	14	755	1,02	NR	NR	0
	15	805	0,89	NR	NR	0
	16	861	0,87	NR	NR	0
	17	969	0,81	NR	NR	0
AP	18	185	0,77	2	2	0
	19	335	0,93	2	2	0
	20	352	6,36	3	4	0
	21	363	0,69	0	0	0
	22	421	0,27	0	0	0
	23	436	0,29	2	1	0
	24	463	1,14	0	0	0
	25	495	0,29	0	0	0
	26	501	0,56	0	0	0
	27	570	0,28	1	2	0
	28	594	0,00	2	4	0
	29	601	1,20	2	4	0
	30	828	1,06	0	0	0
	31	878	1,50	0	0	0
	32	889	1,00	0	0	0
	33	892	0,89	2	3	0
	34	932	1,02	0	0	0
	35	946	0,39	0	0	0
	36	995	0,61	1	1	0
	37	1044	1,00	0	0	0
	38	1049	0,84	0	0	0
	39	1058	1,13	2	2	0
AGII	40	55	0,00	0	0	0
	41	76	0,91	0	0	0
	42	101	1,15	2	4	0
	43	118	0,00	0	0	0
	44	239	0,86	2	1	0
	45	250	0,97	2	1	0
	46	254	0,46	0	0	0
	47	267	0,73	3	3	0
	48	328	0,76	2	3	0
	49	341	1,11	1	1	0
	50	346	0,00	1	2	0
	51	392	0,88	2	3	0
	52	412	1,31	1	2	0
	53	452	0,34	1	3	0
	54	453	1,10	1	2	0
	55	467	0,48	3	4	0
	56	490	0,00	3	4	0
	57	577	4,17	1	3	0
	58	715	1,15	0	0	0
	59	806	0,72	1	3	0
	60	999	1,15	1	1	2
	61	1095	1,54	1	1	2
AA	62	34	0,72	1	2	0
	63	73	0,86	1	2	0
	64	233	1,19	1	1	0
	65	249	4,71	1	1	0
	66	338	0,99	2	2	0
	67	347	0,00	0	0	0
	68	360	0,67	0	0	0
	69	366	0,98	1	2	0
	70	410	1,19	3	3	0
	71	428	1,13	3	3	0
	72	478	1,11	0	0	0
	73	514	1,41	1	2	0
	74	734	0,85	0	0	0
	75	905	0,25	1	1	0
	76	981	0,88	0	0	0
	77	1033	0,93	2	3	3
	78	1036	1,59	1	1	1

*Amplificação *EGFR* = 2ΔCt(ctHBb-ctEGFR) >2
RQ-PCR = PCR em Tempo Real Semi-Quantitaitvo
IHQ = Imunoistoquímica
**avaliação semiquantitativa: negativa = 0 ou 1 (< 24% de células marcadas) e positiva = 2-4 (>25% de células marcadas)
***avaliação qualitativa: 1 = fraca; 2 = média; 3 = forte
NR = Não realizado

ANEXO 5 (CONTINUAÇÃO)

			Amplificação (RQ-PCR)*	Expressão da proteína EGFR (IHQ)**		
Diagnóstico	Caso	Número	Amplificação *EGFR*	qualitativa	quantitativa	marcação nuclear***
GBM	79	35	0,00	1	1	0
	80	74	40,64	3	4	0
	81	175	0,00	0	0	0
	82	194	28,25	3	4	0
	83	204	0,73	0	0	0
	84	208	0,91	2	2	0
	85	216	4,35	2	1	0
	86	256	2,60	3	3	0
	87	269	20,25	3	3	0
	88	274	106,50	3	4	0
	89	297	23,83	3	4	0
	90	317	0,92	1	2	0
	91	356	8,97	0	0	0
	92	370	1,04	0	0	0
	93	384	1,51	3	3	0
	94	391	0,96	1	1	0
	95	397	0,46	1	1	0
	96	427	0,99	1	2	0
	97	435	19,43	3	3	0
	98	442	0,00	1	2	0
	99	450	0,94	3	1	0
	100	458	3,03	2	1	0
	101	485	1,45	0	0	0
	102	496	14,57	3	4	0
	103	498	0,36	2	3	0
	104	503	0,00	1	2	0
	105	510	1,84	2	3	0
	106	522	1,29	0	0	0
	107	524	4,08	3	4	0
	108	547	0,00	2	1	0
	109	573	1,34	1	2	0
	110	592	0,90	0	0	0
	111	629	0,00	1	1	0
	112	632	1,90	0	0	0
	113	638	1,43	2	1	0
	114	640	0,71	1	1	0
	115	642	1,20	2	3	0
	116	663	1,29	1	1	0
	117	684	0,91	3	3	0
	118	687	0,00	3	2	0
	119	698	1,33	0	0	0
	120	724	8,85	3	3	2
	121	743	9,85	2	3	1
	122	750	4,30	1	1	0
	123	792	0,00	0	0	0
	124	795	7,65	3	4	0
	125	852	0,58	0	0	0
	126	854	39,26	3	4	0
	127	875	1,94	0	0	0
	128	879	0,00	1	1	0
	129	881	21,33	3	4	0
	130	884	42,67	3	4	0
	131	891	0,58	0	0	0
	132	901	0,00	1	1	0
	133	903	1,26	1	1	0
	134	925	1,24	2	3	0
	135	930	1,02	3	4	0
	136	1002	1,72	3	2	1
	137	1003	52,53	3	3	2
	138	1007	1,91	2	1	0
	139	1009	0,79	1	1	0
	140	1074	1,24	0	0	0
	141	1077	0,02	1	3	1
	142	1084	0,49	1	1	0
	143	1091	1,95	2	3	1
	144	1103	1,89	2	2	0
	145	1118	1,60	3	4	3
	146	1122	0,00	1	1	0
	147	1123	19,36	3	4	3
	148	1124	0,20	3	4	0
	149	1133	49,69	3	3	2
	150	1144	1,33	2	4	3
	151	1161	14,77	3	3	3
	152	1162	1,25	1	2	2
	153	1169	1,06	0	0	0
	154	1190	1,24	1	1	2
	155	1194	1,55	2	1	2
	156	1199	1,99	2	1	0
	157	1205	1,37	3	3	2
	158	1212	3,01	0	0	0
	159	1232	1,42	0	0	0
	160	1237	1,57	1	2	1
	161	1243	11,75	3	4	3
	162	1250	16,56	3	4	3

*Amplificação *EGFR* = 2ΔCt(ctHBb-ctEGFR) >2

RQ-PCR = PCR em Tempo Real Semi-Quantitaitvo

IHQ = Imunoistoquímica

**avaliação semiquantitativa: negativa = 0 ou 1 (< 24% de células marcadas) e positiva = 2-4 (>25% de células marcadas)

***avaliação qualitativa: 1 = fraca; 2 = média; 3 = forte

ANEXO 6

			Deleção de *EGFR* (RT-PCR)		Deleção de *EGFR* (RQ-PCR)
Diagnóstico	Caso	Número	EGFRvIII	WT	EGFRvIII
normal	1	108	n.a.	n.a.	NR
	2	167	n.a.	n.a.	NR
	3	173	n.a.	n.a.	NR
	4	179	NR	NR	NR
	5	189	NR	NR	NR
	6	196	NR	NR	NR
	7	226	n.a.	n.a.	NR
	8	232	NR	NR	NR
	9	245	n.a.	n.a.	NR
	10	263	NR	NR	NR
	11	312	n.a.	n.a.	NR
	12	330	n.a.	n.a.	NR
	13	714	NR	NR	NR
	14	755	NR	NR	NR
	15	805	NR	NR	NR
	16	861	NR	NR	NR
	17	969	NR	NR	NR
AP	18	185	n.a.	n.a.	NR
	19	335	n.a.	n.a.	NR
	20	352	n.a.	n.a.	NR
	21	363	n.a.	n.a.	NR
	22	421	n.a.	n.a.	NR
	23	436	n.a.	n.a.	NR
	24	463	n.a.	n.a.	NR
	25	495	n.a.	n.a.	NR
	26	501	n.a.	n.a.	NR
	27	570	n.a.	n.a.	NR
	28	594	n.a.	n.a.	NR
	29	601	n.a.	n.a.	NR
	30	828	NR	NR	NR
	31	878	n.a.	n.a.	NR
	32	889	n.a.	n.a.	NR
	33	892	NR	NR	NR
	34	932	n.a.	n.a.	NR
	35	946	NR	NR	NR
	36	995	NR	NR	NR
	37	1044	NR	NR	NR
	38	1049	NR	NR	NR
	39	1058	NR	NR	NR
AGII	40	55	n.a.	n.a.	NR
	41	76	NR	NR	NR
	42	101	n.a.	n.a.	NR
	43	118	n.a.	n.a.	NR
	44	239	n.a.	n.a.	NR
	45	250	n.a.	n.a.	NR
	46	254	n.a.	n.a.	NR
	47	267	n.a.	n.a.	NR
	48	328	n.a.	n.a.	NR
	49	341	n.a.	n.a.	NR
	50	346	n.a.	n.a.	NR
	51	392	n.a.	n.a.	NR
	52	412	n.a.	n.a.	NR
	53	452	n.a.	n.a.	NR
	54	453	n.a.	n.a.	NR
	55	467	n.a.	n.a.	NR
	56	490	n.a.	n.a.	NR
	57	577	n.a.	n.a.	NR
	58	715	n.a.	n.a.	NR
	59	806	n.a.	n.a.	NR
	60	999	NR	NR	NR
	61	1095	NR	NR	NR
AA	62	34	n.a.	n.a.	n.a.
	63	73	n.a.	n.a.	NR
	64	233	n.a.	n.a.	n.a.
	65	249	n.a.	n.a.	n.a.
	66	338	n.a.	n.a.	n.a.
	67	347	n.a.	n.a.	n.a.
	68	360	n.a.	n.a.	n.a.
	69	366	n.a.	n.a.	n.a.
	70	410	n.a.	n.a.	n.a.
	71	428	n.a.	n.a.	n.a.
	72	478	n.a.	n.a.	n.a.
	73	514	n.a.	n.a.	n.a.
	74	734	n.a.	n.a.	n.a.
	75	905		+	n.a.
	76	981	NR	NR	n.a.
	77	1033	NR	NR	n.a.
	78	1036	NR	NR	n.a.

RT-PCR = Transcriptase Reversa PCR

RQ-PCR = PCR em Tempo Real Semi-Quantitaitvo

n.a. = não houve amplificação

NR = análise não realizada

ANEXO 6 (CONTINUAÇÃO)

			Deleção de *EGFR* (RT-PCR)		Deleção de *EGFR* (RQ-PCR)
Diagnóstico	Caso	Número	EGFRvIII	WT	EGFRvIII
GBM	79	35		+	n.a.
	80	74		+	n.a.
	81	175		n.a.	n.a.
	82	194		+	+
	83	204		+	n.a.
	84	208		+	n.a.
	85	216	+	+	+
	86	256	+	+	+
	87	269		+	+
	88	274		+	n.a.
	89	297	+	+	+
	90	317		+	n.a.
	91	356		+	n.a.
	92	370		+	n.a.
	93	384		+	n.a.
	94	391		+	n.a.
	95	397		+	n.a.
	96	427		+	n.a.
	97	435		+	+
	98	442		+	n.a.
	99	450		+	n.a.
	100	458		+	n.a.
	101	485		+	n.a.
	102	496	+	+	+
	103	498	+	+	+
	104	503		+	n.a.
	105	510		+	n.a.
	106	522		+	n.a.
	107	524		+	n.a.
	108	547		+	n.a.
	109	573		n.a.	n.a.
	110	592		+	n.a.
	111	629		+	n.a.
	112	632		+	n.a.
	113	638		+	n.a.
	114	640		+	n.a.
	115	642		+	n.a.
	116	663		+	n.a.
	117	684		+	n.a.
	118	687		+	n.a.
	119	698		+	n.a.
	120	724		+	n.a.
	121	743		+	n.a.
	122	750	+	+	+
	123	792		+	n.a.
	124	795		+	n.a.
	125	852		+	n.a.
	126	854		+	n.a.
	127	875		+	n.a.
	128	879		+	n.a.
	129	881	+	+	+
	130	884		+	n.a.
	131	891		+	n.a.
	132	901		+	+
	133	903		+	n.a.
	134	925		+	n.a.
	135	930		+	+
	136	1002	NR	NR	n.a.
	137	1003	NR	NR	+
	138	1007	NR	NR	n.a.
	139	1009	NR	NR	n.a.
	140	1074	NR	NR	n.a.
	141	1077	NR	NR	n.a.
	142	1084	NR	NR	n.a.
	143	1091	NR	NR	n.a.
	144	1103	NR	NR	+
	145	1118	NR	NR	n.a.
	146	1122	NR	NR	n.a.
	147	1123	NR	NR	+
	148	1124	NR	NR	n.a.
	149	1133	NR	NR	+
	150	1144	NR	NR	+
	151	1161	NR	NR	n.a.
	152	1162	NR	NR	+
	153	1169	NR	NR	n.a.
	154	1190	NR	NR	n.a.
	155	1194	NR	NR	n.a.
	156	1199	NR	NR	n.a.
	157	1205	NR	NR	n.a.
	158	1212	NR	NR	n.a.
	159	1232	NR	NR	n.a.
	160	1237	NR	NR	n.a.
	161	1243	NR	NR	+
	162	1250	NR	NR	n.a.

RT-PCR = Transcriptase Reversa PCR
RQ-PCR = PCR em Tempo Real Semi-Quantitaitvo
n.a. = não houve amplificação
NR = análise não realizada

A

Anexo 7: Termo de Aprovação pelo Comitê de Ética do Projeto em estudo.

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

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 08.02.06, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **851/05**, intitulado: **"Análise da expressão de EGFR em astrocitomas."** 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. Priscila Oliveira de Carvalho**

CAPPesq, 08 de fevereiro de 2006.

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

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Rua Ovídio Pires de Campos. 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP
Fone: 011 - 30696442 fax : 011 - 3069 6492 - e-mail : cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq@hcnet.usp.br

Anexo 8: Termo de consentimento livre e esclarecido.

Termo de Consentimento Pós-Informado

Você está sendo admitido(a) neste hospital para tratamento de doença do sistema nervoso central. Como parte de seu tratamento, você será submetido a um exame de sangue e cirurgia na qual se retirará um fragmento de seu cérebro onde está o tumor. Este sangue e o material obtido do cérebro são utilizados em exames clínicos laboratoriais, necessários para um diagnóstico definitivo. Nestes exames sempre há sobra de material que se toma sem utilidade.

Para obter um maior conhecimento clínico e científico das doenças do sistema nervoso central, o corpo clínico deste hospital (médicos e pesquisadores) desenvolve pesquisa clínica científica. Através desta 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.

Este material restante, que não seria utilizado para o diagnóstico será congelado e posteriormente utilizado para pesquisa científica. O uso deste material não implicará riscos adicionais para você, 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.

Todo material colhido e usado nesta pesquisa será identificado no laboratório por código formado por números e letras e, portanto, sua privacidade será preservada. A eventual inclusão dos resultados em publicação científica será feita de modo a manter o anonimato do paciente.

Concordando com o uso deste material, do modo descrito, é necessário esclarecer que você não terá benefícios ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. Se você concordar em permitir o uso deste material para pesquisa, sua decisão não influenciará, de nenhum modo, o seu tratamento.

Você receberá uma cópia deste documento e o original será arquivado em seu prontuário.

Caso você tenha questões a fazer sobre este acordo ou alguma dúvida que não tenha sido esclarecida pelo seu médico, por gentileza, entre em contato com a Comissão de Ética.

Assinatura do(a) paciente ou Responsável Legal: _____

Nome do(a) paciente: _____
RG do Prontuário Médico: _____
Médico Responsável: _____

LABORATÓRIO DE INVESTIGAÇÕES EM NEUROLOGIA
Fones: 3061-4036 / 3061-7471 / 3062-0620 - Célia