

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:
PEDIATRIA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE DO RECEPTOR
DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMAL
EM TUMORES PEDIÁTRICOS DO
SISTEMA NERVOSO CENTRAL**

GISELE PEREIRA DE CARVALHO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre, Brasil 2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:
PEDIATRIA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE DO RECEPTOR
DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMAL
EM TUMORES PEDIÁTRICOS DO
SISTEMA NERVOSO CENTRAL**

GISELE PEREIRA DE CARVALHO

Prof. Orientador
Algemir Lunardi Brunetto

A apresentação desta dissertação é exigência do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Pediatria, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de mestre.

Porto Alegre, Brasil 2005

C331a Carvalho, Gisele Pereira de

Análise da expressão do gene do receptor do fator de crescimento epidermal em tumores pediátricos do sistema nervoso central. Gisele Pereira de Carvalho; orient. Algemir Lunardi Brunetto. Porto Alegre, 2005.

p.103. II

Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Pediatria.

Oncologia pediátrica. 2-Neoplasia cerebral. I-Brunetto, Algemir Lunardi. II- Título.

CDD 618.92992

Ruth Oliveira CRB10/501

**“Um problema só surge quando estão
presentes todas as condições para solucioná-lo”.**

Karl Marx

**Dedico meu mestrado e toda minha carreira
profissional á minha avó materna, quem tanto amo.**

In memórian

Olinda Caponi Camargo

Agradecimentos

Ao Dr. Algemir Brunetto, meu orientador, pelo fundamental estímulo à pesquisa em oncologia pediátrica. Por transmitir segurança e tranquilidade nos momentos mais difíceis, guiando-me da melhor forma possível. Por ter me ensinado que quando desejamos algo devemos investir todas as nossas forças para que realmente possa valer a pena.

Ao Dr. Jorge Bizzi e Dr. André Bedin pela disponibilidade e entusiasmo com que me receberam e pela preciosa contribuição, sem a qual eu não teria a oportunidade de concluir esse estudo.

Aos funcionários e ex-colegas do HCSA, Henrique (internação de convênios), Ricardo (arquivo médico), Celito (instrumentador da neurocirurgia), Dr. Júlio Lubianca (anestesiologista) e Enf^a Lana (Chefia de Enfermagem do HCSA).

Aos colegas Anna Cancela, Patrícia, Gabriella, Vanessa e Jonatan pelo apoio e incentivo.

Ao Dr. Marcelo Ferreira pela colaboração no estudo e pelo exemplo de dedicação aos nossos pacientes e à equipe de Oncologia Pediátrica do HCPA.

Ao amigo Márcio Nascimento pela disponibilidade em me auxiliar nas difíceis tarefas da área da computação.

Ao meu pai Gildo, quem amo tanto, pelo exemplo de coragem, determinação e positivismo com que encara a vida. Principalmente por estar sempre ao meu lado e por me carregar no colo em todos os momentos difíceis (e alguns nem tanto) da minha vida.

A minha mãe Tânia, minha melhor amiga e a quem tenho um amor incondicional, pela cumplicidade e apoio estando sempre ao meu lado.

A minha mana Lê e meu cunhado Leandro por serem atenciosos e por terem me proporcionado a oportunidade de realizar o que sempre sonhei. Por serem companheiros em todos os momentos e por me darem a certeza de que estão sempre de braços abertos para me receber.

A minha mana Tã, e ao meu cunhado Flávio, por terem me recebido com carinho sempre que precisei de ajuda. Agradeço pelo grande exemplo da minha irmã quando concluiu seu mestrado com nota 10, numa época em que eu nem acabara a graduação. Pelo seu esforço em analisar criticamente a construção deste estudo, ainda que em uma área um tanto diferente da sua.

A minha sobrinha amada, Flávia, por ter me mostrado desde seu nascimento o quanto podemos ser corajosos. Por me ensinar a cada dia que, não importa nosso tamanho ou o quanto conhecemos da vida, mas podemos ser extremamente especiais e ensinar para todos as lições da vida mesmo sendo calouros nesta escola.

A minha prima Patrícia, pelo carinho e disponibilidade com que sempre me recebeu e pelas conversas agradáveis que trocamos desde a adolescência.

Agradeço a minha avó materna, por ter me ensinado que na vida um dos mais valiosos investimentos é a nossa profissão. Que nunca devemos desistir, por mais dificuldades que se possa enfrentar ao longo dessa caminhada.

A Rosane da Pós-Graduação pelo carinho, interesse e paciência com que me recebeu nessa etapa final.

Ao Dr. Ernani Haas, meu melhor amigo, por me receber em todos os momentos difíceis, me auxiliando a fazer uma leitura compressível e real das circunstâncias da vida.

Agradeço à minha amiga e colega Luciane Pons Di Leone pelo incentivo e apoio que me deu desde o início do mestrado, dando seu exemplo de competência e dedicação à pesquisa clínica o que tanto me enriqueceu na profissão.

Aos pacientes e suas famílias pelo exemplo de luta e por estarem sempre dispostos a colaborarem, por acreditarem na ciência como alternativa para um tratamento cada vez melhor.

Agradecimento Especial

As Dras Adriana Brondani da Rocha e Sabrina Esteves de Matos Almeida pelo apoio, dedicação e contribuição científica não somente para realização deste trabalho, como também para minha carreira docente. Guardo uma profunda admiração por vocês, pelo exemplo de trabalho em equipe e principalmente pela capacidade criativa e intelectual que me auxiliou muito na construção desta dissertação. Agradeço de todo coração, com muito carinho por toda a atenção que vocês dedicaram a mim.

Sumário

1.	Introdução: Tumores do Sistema Nervoso Central.....	20
1.1	Classificação.....	20
1.2	Epidemiologia.....	26
1.3	Manifestações Clínicas.....	28
1.4	Tratamento.....	29
1.4.1	Cirurgia.....	30
1.4.2	Radioterapia.....	30
1.4.3	Quimioterapia.....	32
1.4.4	Uso de doses mielobláticas de quimioterapia	33
1.4.5	Tratamento Experimental.....	34
1.5	Alterações moleculares nas células tumorais.....	37
1.5.1	Receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR).....	41
1.5.1.1	EGFR na proliferação celular.....	44
1.5.1.2	EGFR na invasão tumoral.....	46
1.5.1.3	EGFR na resistência ao tratamento antineoplásico.....	48
2.	Justificativa.....	51
3.	Objetivos.....	52
4.	Pacientes e Métodos.....	53
4.1	Coleta das amostras de tumor.....	53
4.2	Coleta de dados Clínicos.....	54
4.3	Técnicas laboratoriais.....	55
4.3.1	Extração de RNA.....	55
4.3.2	Técnica de RT-PCR semi-quantitativo.....	55

4.3.3	Amplificação por PCR.....	57
4.3.4	Quantificação dos produtos de PCR.....	57
4.4	Análise Estatística.....	58
5.	Resultados.....	59
5.1	Caracterização da amostra.....	59
5.2	Dados demográficos.....	59
5.3	Procedimento cirúrgico.....	61
5.4	Análise da expressão do EGFR.....	65
5.5	Análise da sobrevida dos pacientes.....	67
6.	Discussão.....	70
7.	Conclusão.....	75
8.	Referências bibliográficas.....	76
9.	Anexos.....	100

Lista de Abreviaturas

BCNU	carmustina
° C	graus celsius
CCNU	lomustina
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i> - ácido desoxirribonucleico complementar
CDK	<i>cyclin-dependent kinase</i> - quinase ciclina dependente
CDKN2A	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i> - quinase ciclina dependente 2A
CDKI	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor</i>
COOH	terminação carboxila
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> - ácido desoxirribonucleico
DP	desvio padrão
EGF	<i>epidermal growth factor</i> - fator de crescimento epidermal
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i> – receptor do fator de crescimento epidermal
EGFRvIII	<i>mutant epidermal growth factor receptor</i> - versão mutada do receptor do fator de crescimento epidermal
ErbB	oncogene
F	frequência
FOSP	Fundação Oncocentro de São Paulo
GAPDH	gliceroldeído-3-fosfato desidrogenase
G1	fase G1 do ciclo celular
GPCR	<i>G protein-coupled receptor</i> – receptor conjugado a proteína G
GVC	ganciclovir
HB-EGF	<i>heparin-binding EGF-like growth factor</i>
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HCSA	Hospital da Criança Santo Antônio
HSV-tk	adenovírus herpes simplex
I ¹²⁵	iodo radioativo 125
IGF-I	<i>insulin-like growth factor I</i> - fator de crescimento semelhante a insulina I.
IGFR-I	<i>insulin-like growth factor receptor I</i> - receptor do fator de crescimento

	semelhante a insulina I
Kda	kilodaltons
MAPKs	<i>Mitogen-activated Protein Kinase</i>
MgCl ₂	cloreto de magnésio
MMPs	metaloproteinases de matriz
MMP-9	metaloproteinase tipo 9
MMP-3	metaloproteinase tipo 3
MMP-1	metaloproteinase tipo 1
PCR	<i>polymerase Chain Reaction</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i> - fator de crescimento derivado de plaquetas
PDGFR	<i>platelet-derived growth factor receptor</i> - receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas
pH	potencial hidrogeniônico
PI3	<i>phosphoinositide-3</i>
PI3-K	<i>phosphoinositide-3kinase</i>
PKC	<i>protein kinase C</i> - proteína quinase C
pmol	picomolar
PNET	tumor neuroectodérmico primitivo
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i> - análogo tensina-fosfatase
P53	proteína p53
QT	quimioterapia
Ras	proteína Ras
RT	radioterapia
RHC	Registro Hospitalar de Câncer
RM	ressonância magnética
RNA	<i>ribonucleotic acid</i> - ácido ribonucleico
RNAm	<i>messenger ribonucleotic acid</i> - ácido ribonucleico mensageiro
RT PCR	<i>reverse transcriptase polymerase chain reaction</i> - reação em cadeia polimerase transcriptase reversa
SEER	<i>Surveillance, Epidemiology and Results</i>
SG	Sobrevida Global

SNC	Sistema Nervoso Central
Src2	<i>Rous</i> sarcoma vírus 2
TC	tomografia computadorizada
TGF	<i>transforming growth factor</i> - fator de crescimento transformador
TGF- α	<i>transforming growth factor alpha</i> - fator de crescimento transformador α
TGF- β	<i>transforming growth factor beta</i> - fator de crescimento transformador β
TK	tirosina quinase
TMZ	temozolomida
TNF- α	<i>tumor necrose factor alpha</i> - fator de necrose tumoral α
U	unidades
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> - fator de crescimento endotelial vascular
WHO	<i>World Health Organization</i> - Organização Mundial da Saúde
μg	microgramas
μl	microlitros
13q14	banda 14 do braço longo do cromossomo 13
10q23	banda 23 do braço longo do cromossomo 10
10q	braço longo do cromossomo 10
N	número
KCl	cloreto de potássio
MM	milimolar
Taq	<i>termus aquaticus</i>
min.	minuto

Lista de Tabelas

TABELA 1: Classificação dos tumores do SNC – WHO.....	21
TABELA 2: Subclassificação dos tumores neuroepiteliais.....	22
TABELA 3: Distribuição percentual de tumores malignos do SNC de acordo com a idade e grupo histológico em todas as raças e ambos os sexos na população americana.....	26
TABELA 4: Incidência de tumores do SNC na infância, de acordo com a faixa etária e classificação histológica, no período de 2000-2002.....	27
TABELA 5: Efeitos da expressão do EGFR em células tumorais.....	44
TABELA 6: Seqüência de <i>primers</i> utilizados para obtenção dos cDNAs e na amplificação dos fragmentos.....	56
TABELA 7: Condições de PCR.....	57
TABELA 8: Grupos histológicos de tumores do SNC de acordo com a faixa etária:.....	60
TABELA 9: Frequência de grupos histológicos de tumores do SNC.....	61
TABELA 10: Distribuição das amostras de tecido tumoral de acordo com diagnóstico histológico, exames de neuroimagem, tratamento pós-operatório e desfecho clínico.....	63
TABELA 11: Subclassificação dos tumores astrocíticos e desfecho clínico.....	64
TABELA 12: Valores da expressão do gene do EGFR.....	66

Lista de Figuras

FIGURA 1: Mecanismo de ativação do EGFR.....	43
FIGURA 2: Avaliação do RNA total em gel agarose 1% de 17 pacientes.....	54
FIGURA 3: Gel representativo da expressão dos genes GAPDH e EGFR (amostra de craniofaringeoma).....	58
FIGURA 4: Sobrevida global dos pacientes.....	68
FIGURA 5: Comparação da sobrevida de pacientes com e sem hiperexpressão do gene do EGFR.....	69

Resumo

Introdução: Os tumores do Sistema Nervoso Central (SNC) constituem um grupo heterogêneo de neoplasias e representam o tumor sólido mais comum na infância e adolescência (DEANGELIS 2001). A tumorigênese é um processo de múltiplas etapas envolvendo alterações genéticas que levam a transformação progressiva de células normais para a formação de derivados altamente malignos (HANAHAN 2000). O receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) é um receptor transmembrana que atua num sistema de sinalização fundamental para a fisiologia normal da célula e na manutenção do estado tumorigênico (JORISSEM 2003). O EGFR e seus ligantes estão envolvidos em mais de 70% de todas as neoplasias (YARDEN 2001). Em vários tipos de tumores, incluindo os tumores cerebrais, o EGFR é expresso aproximadamente 100 vezes mais do que o número normal de receptores encontrados na superfície de células normais. A hiperexpressão do EGFR e do ErbB2, tem sido associada com neoplasias que apresentam um comportamento clínico mais agressivo (ALROY 1997).

Objetivos: Analisar a expressão do gene do *EGFR* em tumores primários do SNC.

Material e Método: Análise de 18 amostras de tumores primários do SNC em crianças de 01 a 14 anos de idade utilizando uma técnica semi-quantitativa de RT-PCR. A coleta das amostras foi feita no período de 2002 a 2004.

Resultados: A amostra foi composta por: um astrocitoma grau I, três astrocitomas grau III, três astrocitomas grau IV, três carcinomas de plexo coróide, 1 craniofaringeoma, três ependimomas, um tumor neuroectodérmico primitivo e três meduloblastomas. 33% da amostra apresentou hiperexpressão de *EGFR*. Ao analisar-se os resultados de expressão do *EGFR* nas amostras de astrocitomas verificou-se um aumento na expressão do *EGFR* para os tumores de grau IV, com exceção de uma amostra que apresentou um índice baixo de 0.13 RNAm. Para as demais amostras de astrocitoma grau 3 a expressão do *EGFR* foi baixa e os pacientes apresentaram sobrevida com doença, uma vez que não foi possível realizar ressecção cirúrgica total.

Conclusão: Ainda que este estudo forneça dados de uma população bastante heterogênea é possível evidenciar diferenças nítidas de expressão do *EGFR* entre as diversas histologias que compreendem os tumores pediátrico do SNC. Tais resultados sugerem um importante papel do *EGFR* nos tumores cerebrais da infância e encorajam a continuidade de investigações que elucidem a real aplicabilidade deste fator de crescimento como marcador prognóstico e alvo terapêutico.

Palavras chave: tumores do SNC, oncologia pediátrica, EGFR

Summary

The tumors of the Central Nervous System (CNS) constitute the heterogeneous group of neoplasm and represent the solid tumor more common on childhood and adolescence. The tumorigenesis is a process of many steps including genetics changes resulting in a progressive transformation of the normal cells in malignant cells. The epidermal growth factor receptor (EGFR) is a transmembran receptor that acts on the important signalization system of the physiologic normal cell and maintains the tumorigenesis status. It occur in many tumor types, including brain tumors. The EGFR is expressed about 100 times more on the surface of cancerous cells than on surface of normal cells. The overexpression of EGFR and ErbB2 in cancerous cells, have been associated with a more agressive outcome.

Objective: to analyse the EGFR gene expression on primary tumors of CNS.

Methods: Analysis of the 18 samples of the primary CNS tumors in pediatric patients by semi-quantitative RT-PCR assay. The samples were collect between the years of 2002 and 2004.

Results: We analyzed one astrocytoma grade I, three astrocytomas grade II, three astrocytomas grade IV, three plexus choroideus tumors, one craniopharyngioma, three ependymomas, one primitive neuroectoderm tumor and three medulloblastomas. Thirty-three per cent of the samples showed overexpression of the EGFR gene. When analyzing only the astrocytomas, we found the highest expression of the EGFR gene in the grade IV tumors, with the exception of one sample that showed a low index of 0.13 mRNA. The expression of the EGFR gene in the grade III astrocytomas was low.

Conclusion: Despite the right heterogeneous population evaluated, it was possible to find clear differences of the EGFR gene expression between the various histologies of pediatric CNS tumors and among astrocytomas stages III and IV. These results suggest an important role of the EGFR gene in the development of pediatric CNS tumors. It is important to encourage new studies to elucidate the real applicability of the EGFR as a prognostic factor and as potential therapeutic target.

Word-Key: tumors of the Central Nervous System, pediatric oncology, EGFR

1. Introdução: Tumores do Sistema Nervoso Central

1.1 Classificação

Os tumores do Sistema Nervoso Central (SNC) constituem um grupo heterogêneo de neoplasias e representam o tumor sólido mais comum na infância e adolescência com uma incidência anual de 33 casos em cada 1.000.000 de crianças (DEANGELIS, 2001). São classificados de acordo com o tipo histológico, no entanto, a localização e extensão da doença são importantes características que influenciam no tratamento e definição do prognóstico. Atualmente técnicas de imunohistoquímica, citogenética e biologia molecular têm sido incorporadas para obter um diagnóstico mais preciso, bem como para alocação de pacientes e grupos de risco de recidiva.

Aproximadamente 50% dos casos são de tumores de localização infratentorial, principalmente no cerebelo e quarto ventrículo e incluem meduloblastoma (tumor neuroectodérmico primitivo), astrocitoma cerebelar (usualmente pilocítico mas também fibrilar e alto grau), ependimoma (de baixo grau ou anaplásico) e os tumores de tronco cerebral. Os tumores supratentoriais incluem todos os tumores com origem na região selar e supraselar, no cérebro ou no diencéfalo. Os mais freqüentes são tumores de células germinativas, astrocitomas de baixo grau, gliomas de alto grau (astrocitoma anaplásico e glioblastoma multiforme), tumor neuroectodérmico primitivo, ependimoma, oligodendroglioma (baixo e alto graus), tumores do plexo coróide (papiloma e carcinoma), tumores da pineal, meningioma e outros menos freqüentes. Os tumores do cordão espinal representam menos de 2% dos tumores do SNC. Dois terços deles tem origem intramedular como astrocitomas de baixo grau ou gangliogliomas. Outros tumores incluem ependimomas, gliomas de alto grau e menos freqüentemente os tumores neuroectodérmicos

primitivos (PNET). A classificação dos tumores do cordão espinhal é feita de acordo com as características histopatológicas do tumor e não difere daquelas utilizadas para os tumores primários do SNC.

Outra classificação frequentemente utilizada é a da Organização Mundial de Saúde - *World Health Organization* (WHO) (KLEIHUES, et al 2002) que foi definida a partir de um consenso entre neuropatologistas em conferência internacional em 1999. Os tumores do SNC foram classificados em nove categorias (tabela 1) sendo a primeira categoria os Tumores de Tecido Neuroepitelial (tumores primários do SNC) os quais representam uma proporção significativa das neoplasias intracranianas. Essas mesmas neoplasias estão também classificadas em subtipos diferentes de tumores, de acordo com a tabela 2.

TABELA 1: Classificação dos tumores do SNC.

<ol style="list-style-type: none">1. Tumores de tecido neuroepitelial2. Tumores de nervo medular e cranial3. Tumores de meninges4. Neoplasias hematopoiéticas5. Tumores de células germinativas6. Lesões císticas e lesões semelhantes a tumores7. Tumores pituitários8. Tumores de outras localizações originados de tumores regionais9. Tumores metastáticos

Referência: KLEIHUES, et al 2002

TABELA 2: Subclassificação dos tumores neuroepiteliais.

<p>Tumores Neuroepiteliais</p> <p>Tumores Astrocíticos Astrocitoma Pilocítico Astrocitoma Baixo Grau Astrocitoma Anaplásico Glioblastoma Multiforme Xantroastrocitoma Pleomórfico Astrocitoma Subependimal de Células Gigantes</p> <p>Tumores Oligodendrogliais Oligodendroglioma Oligodendroglioma Anaplásico</p> <p>Tumores Ependimais Ependimoma Ependimoma Anaplásico Ependimoma Mixopapilar Subependimoma</p> <p>Gliomas Mistos Oligoastrocitoma Misto Oligoastrocitoma Anaplásico</p> <p>Tumores de Plexo Coróide Papiloma de Plexo Coróide Carcinoma de Plexo Coróide</p> <p>Tumores Neurogliais Misto e Neuronal Gangliocitoma, Ganglioglioma Tumor Neuroepitelial Embrioblástico</p> <p>Tumores Pineais Pinealoma, Pinealoblastoma</p> <p>Tumores Embrionais Neuroblastoma Retinoblastoma Tumor Neuroectodérmico Primitivo (PNET): meduloblastoma; PNET espinhal e cerebral (supratentorial)</p>

Apesar das diversas tentativas de uniformizar a nomenclatura dos tumores do SNC, pode ocorrer dificuldade, especialmente para o não especialista, já que existem diferentes nomenclaturas para designar a mesma doença. Por esta razão é importante acrescentar algumas considerações que permitem melhor entender a terminologia utilizada para os tumores do SNC na infância.

DAUMAS-DUPORT e colaboradores (1988) subclassificaram os astrocitomas em graus que variam de I a IV de acordo com a presença ou não de atipia nuclear, grau de mitose, proliferação endotelial e/ou necrose. O grau I não apresenta nenhum desses critérios; grau II apresenta pelo menos 01 critério; grau III apresenta 02 critérios e o grau IV apresenta no mínimo os três últimos critérios descritos.

Dos tumores originados do tecido neuroepitelial os tumores astrocíticos são os mais frequentes em Pediatria, e destes, em particular os astrocitomas pilocíticos, também conhecidos como astrocitomas grau I. Estão tipicamente localizados no cerebelo ou nervo óptico, são raramente invasivos e não apresentam tendência de progredirem a anaplasia. O prognóstico é relativamente favorável, particularmente nos casos de ressecção completa (POLLACK, 1994; DEUTSCH, 1990), o que difere de pacientes adultos com uma média de sobrevida de 05 anos (BAUMAN, et al 1999; ROCHA, 2002) onde a maioria dos pacientes morrem por progressão dessa doença para glioma maligno de alto grau (BAUMAN, et al 1999).

Os astrocitomas de baixo grau, também classificados como astrocitomas grau II localizam-se predominantemente em hemisférios cerebrais. O tecido apresenta celularidade baixa e pleomorfismo mínimo. No entanto, tem tendência à infiltração difusa envolvendo o parênquima cerebral. Os astrocitomas anaplásicos também classificados como grau III apresentam menor celularidade e áreas de mitose diminuída quando comparados aos

glioblastomas multiformes. Localizam-se predominantemente em hemisférios cerebrais. Os glioblastomas multiformes ou astrocitomas grau IV, apresentam alto índice de proliferação celular e anaplasia. Estão localizados na região frontotemporal e também nos lobos parietais (POLLACK, 1994).

Os ependimomas são comuns em crianças e adolescentes. Desenvolvem-se na parte interna dos ventrículos, sendo o 4º ventrículo a localização preferencial. Em torno de 6% dos ependimomas são infratentoriais e 40% são supratentoriais, podendo ser classificados como sendo de baixo e alto grau (LEVIN, et al 2001). Compreendem 6% dos gliomas e cerca de 85% são de baixo grau (KLEIHUES e CAVENEE, 2000).

Outro grupo de tumores que acometem preferivelmente o sistema ventricular são os tumores de plexo coróide. Constituem cerca de 1% a 4% de todas as neoplasias intracranianas na infância. Sete por cento ocorrem nos primeiros anos de vida (PACKER, et al. 1992; PENCALET, 1998). São na maioria das vezes benignos e tratados somente com cirurgia, motivos pelo qual o prognóstico irá depender do grau de ressecção. Nos casos de ressecção subtotal, a radioterapia é freqüentemente utilizada sendo que a quimioterapia não tem papel importante para o tratamento dessas lesões (BERGER, et al, 1998).

Os oligodendrogliomas são tumores mais comuns em adultos jovens. Ocorrem usualmente no cérebro com crescimento lento e normalmente não infiltram pelo tecido cerebral. Esses tumores compreendem 4.6% dos gliomas (PRADOS, et al. 1998; DEANGELIS, 2001).

Outras neoplasias intracranianas originadas de células gliais são aquelas localizadas no tronco cerebral, as quais geralmente compreendem 10% de todos os tumores pediátricos do SNC; sob a forma de gliomas intrínscos e difusos (KLEIHUES e CAVENEE, 2000). Estão associadas a um prognóstico desfavorável pela impossibilidade de ressecção

cirúrgica.

Os meduloblastomas são tumores de origem ectodérmica, mas não derivam de células gliais e sim de neurônios imaturos presentes na fase do desenvolvimento do cerebelo. Estão classificados entre os chamados tumores neuroectodérmicos primitivos (PNET), representam aproximadamente 20% de todos os tumores primários do SNC em pediatria e originam-se exclusivamente do cerebelo (tumores de fossa posterior) (POLLACK, et al. 1994). Apesar de aparentemente bem delimitado o tumor é altamente infiltrativo e apresenta forte tendência a disseminação para neuro-eixo. A maioria dos casos de meduloblastoma ocorre na primeira década de vida e o pico de incidência está entre os três e quatro anos de idade (GURNEY, et al. 1999).

Considerado uma variação do PNET, o pinealoblastoma representa aproximadamente 50% dos tumores do parênquima pineal. Possuem alta celularidade com freqüentes áreas de necrose e mitose (STROTHER, et al. 2002). Os tumores da região pineal compreendem 0.4 a 2% de todos os tumores primários do SNC na infância. Dos tumores de células germinativas, 2/3 ocorrem na região pineal; sendo que 1/3 ocorre na região supraselar (JAKACKI, et al. 1995). Geralmente não são passíveis de ressecção completa mas tendem a ser sensíveis ao tratamento quimio e radioterápicos (PACKER, et al. 1984).

Os craniofaringeomas são tumores que representam cerca de 6% a 9% de todas as neoplasias primárias do SNC na infância. Essas lesões apresentam uma distribuição bimodal com o primeiro pico durante a infância dos oito aos dez anos de idade e o segundo pico após os 40 anos de idade (POLLACK, et al. 1994). São lesões predominantemente supraselares que se originam de células parafaringeais. Normalmente são compostos por células benignas com tecido bem diferenciado; no entanto, podem ter curso clínico maligno

dependendo da localização e propensão infiltrativa ao redor de estruturas nobres do cérebro o que torna a ressecção completa difícil. Aproximadamente 50% das crianças com craniofaringeoma apresentam hipertensão intracraniana como resultado da obstrução do terceiro ventrículo (KLEIHUES, et al. 2000).

1.2 Epidemiologia

Os tumores do sistema nervoso central representam 17% de todas as doenças malignas da infância. Conforme ressaltado anteriormente, constituem a segunda neoplasia mais freqüente. Nos Estados Unidos aproximadamente 2.200 crianças e adolescentes até 20 anos de idade são diagnosticados anualmente com tumor cerebral, sendo mais de 90% destes, tumores primários do SNC. A incidência dos tumores do SNC na infância está descrita na tabela 3, de acordo com a classificação histológica e idade (RIES, et al. 1999).

Tabela 3: Distribuição percentual de tumores malignos do SNC de acordo com idade e grupo histológico em todas as raças e ambos os sexos na população americana.

Neoplasias	Faixa Etária	
	< 15 anos (crianças)	> 20 anos (adultos)
Astrocitoma	49.7%	52.1%
Tumor Neuroectodérmico Primitivo	22.9%	20.8%
Outros gliomas: oligodendroglioma, tumor de tronco cerebral.	15.4%	15.5%
Ependimoma	9.3%	8.6%
Outros Tumores SNC	2.7%	3.0%
Total	100	100

Referência: *Surveillance, Epidemiology and End Results, 1975-95.*

Embora no Brasil não exista um registro de doenças malignas da infância de base populacional, existem dados epidemiológicos a nível regional e de registros hospitalares. O Registro Hospitalar de Câncer do Estado de São Paulo (FOSP – Fundação Oncocentro de São Paulo), apresenta incidência de tumores do SNC na infância no período de 2000-2002, conforme descrito na tabela 4. Embora os dados apresentados pela FOSP tenham intervalo de idade diferente dos dados apresentados na tabela americana (tabela 3), é possível observar a semelhança na incidência dos tumores de acordo com a classificação histológica, onde os astrocitomas e PNETs estão entre os tumores cerebrais mais frequentes na infância.

Tabela 4: Incidência de tumores do SNC na infância, de acordo com a faixa etária e classificação histológica, no período de 2000-2002.

Diagnósticos	Faixa Etária						
	< 1ano	1 a 4	5 a 8	9 a 12	13 a 18	Total	%
Ependimoma	03	21	04	07	07	42	11.6
Astrocitoma	05	44	40	35	36	160	44.2
PNET	06	25	31	26	18	106	29.3
Outros gliomas	00	12	04	05	05	26	07.2
Outras Neoplasias intracaneanas	02	06	06	04	10	28	07.7
TOTAL	16	108	85	77	76	362	100.0

Referência: FOSP- Fundação Oncocentro de São Paulo.

De modo geral, a incidência de tumores do SNC é maior em crianças jovens menores de oito anos de idade do que em crianças mais velhas e adolescentes. Esta prevalência é fortemente atribuída ao predomínio de tumores neuroectodérmicos primitivos (meduloblastomas), gliomas de tronco cerebral e ependimomas, com ocorrência predominante antes dos 10 anos de idade. A incidência de tumores do SNC é maior em crianças do sexo masculino do que em crianças do sexo feminino, isso devido à predominância de crianças do sexo masculino com PNET e ependimomas. A incidência em crianças de raça branca é maior do que em crianças negras (RIES, et al. 1999).

1.3 Manifestações clínicas

Os tumores intracraniais produzem sintomas relacionados ao efeito de massa (e aumento da pressão intracraniana) e/ou ao edema causado pela infiltração e destruição do tecido normal (LOUIS e CAVENEE, 2001).

Os pacientes apresentam sintomas focais e generalizados dependendo do tamanho e localização da lesão. Geralmente os sinais e sintomas incluem cefaléia, náuseas/vômitos e alteração do nível de consciência, refletindo a presença de aumento da pressão intracraniana. Esses sinais e sintomas são mais tardios em lactentes até o sexto mês de vida, pois a fontanela e sutura da calota craniana não estão totalmente fechadas permitindo que ocorra um ajuste temporário do tumor com o tecido normal (STROTHER, et al. 2002).

Nos casos dos tumores supratentoriais, os sinais e sintomas variam desde hipertensão intracraniana, papiledema de fundo de olho, até convulsões generalizadas. Tumores que envolvem o hipotálamo podem causar sinais de dificuldade visual ou motora. E alguns casos pode causar distúrbios endocrinológicos como diabetes insípido (ROUSSEAU, et al. 1994).

1.4 Tratamento

O tratamento de crianças e adolescentes com tumores do SNC representa um verdadeiro desafio em oncologia pediátrica. Embora uma série de avanços nos últimos anos tenha beneficiado crianças e adolescentes com câncer, muitos deles não se aplicam aos tumores do SNC. Várias características peculiares dos tumores do SNC os tornam diferentes de outras doenças malignas da infância e algumas delas podem contribuir para sua relativa resistência ao tratamento convencional do câncer. Para se obter resultados satisfatórios há necessidade de esforços coordenados de especialistas pediátricos com experiência, como neurocirurgião, neurologista, neuropatologista, radioterapeuta, oncologista e profissionais das áreas de reabilitação, endocrinologia e psicologia.

As modalidades de tratamento empregadas nestes pacientes incluem cirurgia, radioterapia e quimioterapia. O tratamento primário destes tumores é através de cirurgia, ou da associação com radioterapia e/ou quimioterapia, dependendo do tipo histológico, grau de ressecabilidade cirúrgica, localização do tumor e idade do paciente (STROTHER, et al. 2002). Com o tratamento moderno, os índices de sobrevivência de crianças e adolescentes com tumores do SNC são superiores a 50%. O tratamento destes pacientes deve ser individualizado, preferencialmente seguindo modelos de estudos cooperativos, com o objetivo de oferecer os melhores índices de cura e minimizar os efeitos tardios do tratamento.

1.4.1 Cirurgia

A abordagem terapêutica inicial de tumores do SNC é a abordagem cirúrgica visando a ressecção tumoral. Em tumores volumosos ou localizados em estruturas vitais a remoção total do tumor torna-se inviável, nestes casos a biópsia pode ser informativa e auxiliar na definição terapêutica posterior (FREEMAN e FARMER, 1998).

Vários estudos mostram que a ressecção cirúrgica tem impacto na possibilidade de sobrevida de pacientes com tumores cerebrais, particularmente os ependimomas (NAZAR, et al. 1990; ROUSSEAU, et al. 1994; POLLACK, et al. 1995a; HORN, et al. 1992), gliomas de alto grau (CAMPBELL, et al. 1996; WISOFF, 1998) meduloblastoma (ALBRIGHT, et al. 1995), gliomas de baixo grau (POLLACK, et al. 1995b) e neoplasias de plexo coróide (BERGER, et al. 1998). No entanto, a maior limitação para conseguir ressecção cirúrgica ampla tem sido o risco de morbidade imediata ou a longo prazo, principalmente para tumores localizados em regiões funcionais críticas (STROTHER, et al. 2002).

1.4.2 Radioterapia

A radioterapia (RT) é um tratamento loco-regional realizado através da emissão de radiações ionizantes nas áreas de envolvimento tumoral. Tal modalidade terapêutica é frequentemente utilizada em tumores do SNC e tem por objetivo destruir as células tumorais, reduzir o risco de recidiva local (STROTHER, et al. 2002), prevenir disseminação de células malignas ao longo do neuro-eixo. Representa uma opção de tratamento local que está indicada para tumores irresssecáveis ou quando a ressecção cirúrgica é incompleta (HODGSON, et al. 2001).

A radiação danifica o material genético da célula tumoral evitando o crescimento e proliferação (JENKIN, et al. 1995). Por atuar diretamente no mecanismo de divisão celular a radioterapia é bastante eficaz em células neoplásicas; no entanto as células normais, particularmente em pacientes pediátricos jovens, também estão em processo de reprodução e divisão o que torna a utilização de radioterapia craniana quase proibitiva em crianças menores de 03 anos de idade (DOBBING e SMART 1974), devido aos efeitos adversos no crescimento e desenvolvimento neurológico do paciente (PACKER, et al. 1989; JONSOHN, et al. 1994; PACKER, et al. 2002).

A eficácia da radioterapia é variável de acordo com o tipo histológico do tumor. Tradicionalmente os tumores de tronco cerebral são tratados com radioterapia em virtude da impossibilidade de ressecção cirúrgica. A radiação fracionada tende a ser preferencial por lesar menos as células sadias em relação às células tumorais. Quando é administrada mais de uma fração ao dia, a radioterapia é considerada hiperfracionada. Essa modalidade terapêutica oferece a oportunidade de escalonar a dose de radiação sem aumentar o risco de dano aos tecidos normais, uma vez que o intervalo de seis a oito horas permite que as células normais se recuperem, ao contrário das células malignas (STROTHER, et al. 2002).

A resposta do tecido cerebral à radiação é classificada em três tipos: a) reações agudas, que ocorrem durante o tratamento; b) reações subagudas, que ocorrem em poucas semanas até dois a três meses após término do tratamento; e c) reações tardias que podem aparecer após vários meses ou anos do término do tratamento (LEIBEL e SHELINE, 1991). Tanto as complicações precoces quanto às tardias advindas da radioterapia podem incluir a formação de edema, dano em oligodendrócitos, retardo na síntese de mielinização e dano no endotélio ocasionando necrose (STROTHER, et al. 2002). Os sintomas clínicos incluem crises convulsivas e alterações neuropsicológicas de graus variados. Tais complicações

podem surgir vários anos após término do tratamento como resultado de lesão direta nos vasos sanguíneos cerebrais, a qual poderá causar danos neurológicos irreparáveis (LEIBEL, et al. 1987; COSTELLO, et al. 2004).

1.4.3 Quimioterapia

Os tumores do SNC tendem a ser infiltrativos localmente e por isto um número expressivo de pacientes tem recorrência no sítio primário após tratamento local com cirurgia e/ou radioterapia. Por esta razão tem crescido em importância o uso de tratamento sistêmico com agentes antineoplásicos. O tratamento quimioterápico, entretanto, tem a limitação óbvia de utilizar agentes antineoplásicos que, para atuar no tecido tumoral, necessitam penetrar através da barreira hematoliquórica, a qual influencia profundamente na penetração das drogas no sistema nervoso central. Por exemplo, as drogas procarbazona, lomustina e carmustina são agentes ativos em tumores do SNC e que, após administração sistêmica, mantêm níveis terapêuticos no líquido. (LEVIN, et al. 2001). Outras drogas ativas com evidência de atividade em tumores do SNC incluem etoposídeo, vincristina, ciclofosfamida, metotrexato e cisplatina (PACKER, et al. 1993; COHEN e DUFFMAN 1994; SHAPIRO, et al. 1989; PRADOS, et al. 1998; CAMPBELL, et al. 1996).

A administração de drogas diretamente no espaço intratecal através de punção lombar ou através de um reservatório ventricular em teoria permitiria utilizar drogas eficazes com limitada penetração no SNC após administração sistêmica. Entretanto, esta estratégia, tem sido comprovadamente eficaz apenas como medida profilática, já que diversos mecanismos bioquímicos de afluxo de drogas limitam a obtenção de concentrações adequadas das drogas no líquido. Outro fator limitante ao uso desta

modalidade terapêutica é o risco aumentado de toxicidade ao SNC quando medicações são administradas diretamente no espaço subaracnóide.

Diferentemente de adultos, na infância os tumores do SNC representam uma grande diversidade histológica, de comportamento biológico, resposta terapêutica e prognóstico. Para alguns tumores como meduloblastoma e gliomas de alto grau não primários de tronco cerebral, a associação de quimioterapia (QT) a radioterapia (RT) tem melhorado o prognóstico. Para pacientes abaixo de três anos de idade, nos quais a radioterapia apresenta risco acentuado de toxicidade neurológica e para pacientes com gliomas de baixo grau irresssecáveis, o uso de quimioterapia permite postergar a administração de radioterapia para uma idade na qual os riscos de toxicidade podem ser aceitáveis (DUFFNER, et al. 1993).

O uso de quimioterapia neoadjuvante (pré-irradiação) tem sido utilizado de forma crescente no pós-operatório; neste período, o acesso das drogas ao SNC fica facilitado devido à ruptura temporária da barreira hemato-liquórica.

No presente, inúmeros estudos em desenvolvimento por grupos cooperativos, tentam identificar combinações de drogas quimioterápicas e subgrupos de pacientes para os quais o tratamento sistêmico possa ser usado com vantagem.

1.4.4 Uso de doses mieloablativas de quimioterapia e resgate com transplante de células tronco hematopoiéticas

Pacientes com tumores recorrentes tem um prognóstico sombrio. Embora algumas respostas tenham sido documentadas, a maioria das drogas permite apenas tratamento paliativo, e as respostas tendem a ser de curta duração. Um método que tem sido utilizado mais recentemente para otimizar a eficácia das drogas quimioterápicas é a utilização de megadoses ou doses mieloablativas de agentes antineoplásicos e resgate do sistema

hematopoiético com transplante autólogo de células tronco coletadas em sangue periférico. A maioria dos estudos, entretanto foram realizados em adultos e estão associados à toxicidade acentuada, principalmente mielossupressão severa, infecções, mucosite e diarreia (FINE e ANTMAN, 1992; COTTU, et al. 1994; CAIRNCROSS, et al. 2000; OZKAYNAK, et al. 2004; NAKAMIZO, et al. 2005).

1.4.5 Tratamento experimental

Tendo em vista a grande dificuldade em se obter resultados promissores no tratamento de tumores primários do SNC através de terapias convencionais, cresce cada vez mais o interesse em terapias experimentais. Tais terapias têm como foco principal o aprimoramento do tratamento utilizado atualmente e o desenvolvimento de novas modalidades que utilizem drogas que atuem diretamente em células alvo com o mínimo de dano às células normais.

Novos agentes citotóxicos vêm sendo utilizados em estudos clínicos com pacientes pediátricos, como por exemplo, a temozolomida, a idarrubicina, o fotemustin, o irinotecan, o topotecan e o tamoxifeno.

A temozolomida (TMZ), agente análogo da dacarbazina, quando avaliada em estudo de fase II em pacientes pediátricos com gliomas de alto grau não mostrou resultados satisfatórios. LASHFORD e colaboradores (2002) verificaram que a taxa de resposta objetiva (resposta completa ou resposta parcial) em pacientes pediátricos com gliomas que utilizaram TMZ são menores do que em adultos. Isso se deve a diferença de biodisponibilidade da droga entre adultos e crianças e a aquisição de resistência à droga. Em outro estudo de fase II com TMZ os resultados foram semelhantes, embora o estudo tenha apresentado como resultado final 28% de resposta parcial e 11% de resposta

completa para um total de 57 pacientes incluídos no estudo, apenas seis pacientes eram pediátricos (GILBERT, et al. 2002).

A idarrubicina é outro agente citotóxico que demonstrou limitada eficácia. A maioria dos pacientes apresentou progressão de doença, sendo que 6% apresentaram doença estável e um paciente com meduloblastoma obteve resposta parcial (ZOANN, 2003).

Um estudo pioneiro que utilizou um único agente derivado da nitrosuréia, o fotemustin, foi realizado por HARGRAVE e colaboradores (2002). Este agente citotóxico análogo da carmustina (BCNU) e da lomustina (CCNU) mostrou boa tolerabilidade e atividade antitumoral em pacientes pediátricos com tumores refratários do SNC.

Em estudo de fase II, o paclitaxel foi bem tolerado por pacientes pediátricos com tumores do SNC recidivados (HURWITZ, et al. 2001).

O irinotecan é um inibidor da topoisomerase I que quando utilizado em combinação com BCNU apresentou aumento do efeito antitumoral (FREDMAN, et al. 2003). Outro inibidor da topoisomerase I, o topotecan, também avaliado em pacientes pediátricos em estudo de fase II mostrou que, quando administrado em uma dose diária, 50% dos pacientes apresentaram doença estável e 14% obtiveram resposta parcial (WAGNER, et al. 2004).

Além da utilização de novas drogas citotóxicas, novas combinações de agentes têm sido propostas para estudos clínicos. Um exemplo é a combinação de procarbazona, tioguanina, CCNU e vincristina para o tratamento de gliomas de baixo grau em pacientes pediátricos, este regime apresentou resultado mais efetivo quando comparado com o esquema convencional que utiliza vincristina e carboplatina (LANCASTER, et al. 2003).

A proliferação vascular é um importante fator para o desenvolvimento de gliomas. Por esta razão agentes antiangiogênicos que reduzem o suprimento de sangue tem sido

sugeridos para estudos clínicos com pacientes pediátricos e incluem, talidomida, TNP-470, endostatina e angiostatina. A talidomida foi a primeira droga antiangiogênica a ser testada em tumores cerebrais, tanto a talidomida quanto a angiostatina não demonstraram resultados promissores (KLEINMAN e LIAU, 2001; KURJAK, 2003). BEN e colaboradores (2002), no entanto, concluíram que compostos antiangiogênicos podem ser incluídos na terapia de manutenção de pacientes com alto risco de recidiva ou em pacientes com evidência de doença sem interferir na qualidade de vida.

Outro método experimental para tratamento de tumores do SNC é a transferência do gene que codifica a enzima timidina quinase para dentro das células tumorais, utilizando o adenovírus herpes simplex (HSV-tk) como vetor (SMITH, et al. 1998). Quando o gene é incorporado ao genoma das células malignas, estas sintetizam a timidina quinase que catalisa a conversão de análogos de nucleotídeos subsequentemente administrados, tais como ganciclovir, em nucleotídeos citotóxicos, resultando em morte celular. Na prática, se observou que o efeito citotóxico foi ampliado, uma vez que os falsos nucleotídeos migraram das células mortas para células adjacentes, independentemente de terem sido transfectadas ou não (*bystander effect*). Em estudo de fase I, PACKER e colaboradores (2000) concluíram que a utilização da terapia com gene suicida *in vivo* apenas para um seleto grupo com tumores localizados na região supratentorial. Em outro estudo utilizando cultura de células de meningiomas, concluiu-se que a transferência gênica com adenovírus em tumores que expressam os receptores alvo é efetiva e, portanto, constitui um agente promissor para a terapia gênica de meningiomas (DIRVEN, et al. 2002). Em outro estudo mais recente, onde foi utilizada linhagem de células de neuroblastoma, observou-se efetividade com o tratamento que utiliza o sistema HSV-th/ganciclovir (GVC) (BI e ZHANG 2003).

Embora exista uma grande variedade de terapias experimentais para tratamento de pacientes pediátricos com tumores primários do SNC, os resultados dos estudos clínicos ainda são muito preliminares.

1.5 Alterações Moleculares nas Células Tumorais

A tumorigênese é um processo de múltiplas etapas envolvendo alterações genéticas que levam a transformação progressiva de células normais para formação de clones altamente malignos (HANAHAN e WEINBERG, 2000). Conforme proposto por HAHN e WEIMBERG (2002) uma célula normal necessita adquirir habilidades distintas para se transformar em uma célula maligna. Essas habilidades incluem a capacidade de gerar sinais mitogênicos próprios, a resistência aos sinais intrínsecos para interromper o seu crescimento, o escape da morte celular programada (apoptose), a proliferação sem limites, a formação de novos vasos (angiogênese) e em casos mais avançados, as células tumorais adquirem habilidades para invadirem novos tecidos e se espalharem para outros órgãos.

Os tumores malignos são caracterizados por uma desregulação no balanço entre as vias de proliferação, sobrevivência e morte causando proliferação aumentada e/ou morte celular diminuída e conseqüentemente crescimento descontrolado de células tumorais. As vias de proliferação e sobrevivência estão normalmente reguladas por fatores de crescimento e seus respectivos receptores. Em várias neoplasias, incluindo os gliomas malignos, uma ativação elevada do receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) contribui para o fenótipo maligno permitindo uma estimulação autócrina do crescimento tumoral. Na grande maioria dos glioblastomas multiformes está presente uma alteração na via do EGFR, incluindo hiperexpressão desse receptor ou expressão de moléculas mutadas

de EGFR com atividade constitutiva tirosina quinase (WONG, et al. 1992; FREDERICK, et al. 2000; MAHER, et al. 2001).

A proliferação das células normais depende da presença de fatores de crescimento ao seu redor. Em contraste, as células tumorais adquirem um estímulo intrínseco para iniciar a divisão celular, tornando-se independentes de fatores externos. Ao mesmo tempo em que as células aumentam sua capacidade proliferativa, os mecanismos que usualmente interrompem o crescimento celular são desativados (MCCORMICK, 1999). A quinase ciclina-dependente (CDK) fosforilada é um substrato importante envolvido na ativação do ciclo celular. Diferentes tipos de CDKs atuam em diferentes estágios do ciclo celular (MORGAN, 1995). A inibição da progressão do ciclo celular está sob influência das CDKs inibidoras (CKIs). A alteração da função das CDKs e CKIs pode resultar na progressão ou inibição do ciclo celular (PRADOS, et al.1998). RAFFEL e colaboradores (1999) em estudo com células de astrocitomas de pacientes pediátricos identificaram um aumento na atividade de CDK4 e CDKN2A em 17.6% dos astrocitomas grau 3 e 13.3% dos astrocitomas grau 4; nos tumores grau 2 não foram identificadas alterações significativas.

A resistência a apoptose é uma das principais habilidades adquiridas pelas células tumorais a qual garante o fenótipo maligno das lesões. A resistência é mediada frequentemente pela perda da regulação pro-apoptótica decorrente de mutações envolvendo o gene supressor tumoral p53. A proteína p53 é uma das principais reguladoras do *checkpoint* G1, que representa um ponto de controle estratégico onde a integridade do DNA é verificada (CANMAN, et al. 1994), apresentando uma função importante na apoptose, diferenciação celular e angiogênese (HOLLANDER, et al. 1993; OWEN-SCHAUB, et al. 1995). A perda funcional do p53 é crucial na progressão dos tumores cerebrais e é a mutação genética mais precoce detectável em gliomas (HOLLANDER, et al. 1993;

FUEYO, et al. 1999). As mutações no gene supressor p53 são observadas em cerca de 60% dos astrocitomas de todos os graus, sugerindo que a inativação deste gene é fundamental na origem de tumores de baixo grau, assim como na progressão até glioblastoma secundário (FULTS, et al. 1992; VAN MEIR, et al. 1994; SIDRANSKY, et al. 1992). Em estudo com gliomas malignos em pacientes pediátricos POLLACK e colaboradores (2001), concluíram que a ausência de mutação do gene p53 ou a ausência de expressão aumentada da proteína pode estar associada a um melhor prognóstico. Mutações do p53 ocorrem numa frequência similar nos astrocitomas de alto grau de pacientes adultos e pediátricos, 38% e 28% respectivamente (POLLACK, et al. 2001). No entanto, a frequência de mutações do p53 nos astrocitomas de alto grau em crianças menores de quatro anos de idade é significativamente menor (RAFFEL, et al. 1999) enquanto que nos tumores de baixo grau que evoluem para tumores mais agressivos como os glioblastomas, característico em pacientes adultos, a incidência de mutações do p53 é elevada com raras alterações no EGFR (WATANABE, et al. 1996; KLEIHUES e OHGAKI 1999, FUJISAWA, et al. 2000).

A angiogênese tem um papel importante na sobrevivência das células neoplásicas, no local do crescimento tumoral e no desenvolvimento de metástases à distância (FOLKMAN, et al. 1995). A indução da angiogênese é mediada por múltiplas moléculas que são liberadas tanto pelas células tumorais quanto por células normais; incluindo as células endoteliais, epiteliais, mesoteliais e leucócitos. Entre as famílias de moléculas responsáveis pela angiogênese está a família do fator de crescimento fibroblástico (TGF), fator de crescimento endotelial derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformador- α (TGF- α), TGF- β , fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (FOLKMAN, et al.

1995; FOX, et al. 1996) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (STEPHAN e BROCK, 1996).

O VEGF é um mitógeno que regula a proliferação endotelial celular e a permeabilidade vascular (STEPHAN e BROCK, 1996). A expressão aumentada de VEGF e seus receptores são encontrados em vários tumores, incluindo os gliomas malignos, os quais são altamente vascularizados e com extensa hipóxia (CHENG, et al. 1996). Geralmente a necrose é ocasionada por suprimento insuficiente de sangue, o qual é necessário para o crescimento celular. No entanto, em células tumorais a necrose atua como um precursor para eventos moleculares angiogênicos (KLEIHUES e CAVENEE, 2000). A hipóxia é um modulador fisiológico importante para o VEGF, ativando níveis transcricionais e pós-transcricionais, tanto na angiogênese normal quanto na angiogênese tumoral (MACHEIN E PLATE, 2000). A expressão aumentada de VEGF em glioblastomas multiformes está consideravelmente restrita as áreas de células peri-necróticas. A hipóxia induz a transcrição de VEGF pela sinalização do fator de transcrição HIF- α , aumentando concomitantemente a estabilidade do RNAm VEGF (LEVY, et al. 1995). Em adição a regulação do VEGF, a expressão de receptores de VEGF também estará aumentada.

O gene PTEN (análogo tensina-fosfatase) é um gene supressor tumoral localizado na região cromossômica 10q23 que atua como um regulador de síntese protéica de um número de processos celulares, incluindo a angiogênese, através da inibição da síntese do VEGF (GU, et al. 1999). Sua ativação regula o crescimento e sobrevivência celular através da atividade fosfatase lipídica e a adesão e invasão através da atividade da proteína tirosina fosfatase (TAMURA, et al. 1999; WHANG, et al. 1998). O LOH (perda de heterozigossidade) do cromossomo 10q (inativação do PTEN), é um dos danos genéticos (mutações) mais comuns encontrados em glioblastomas multiformes de pacientes adultos;

ocorrendo em cerca de 70-90% desses tumores (BIGNER, et al. 1988; LI, et al. 1997; LI e SUN, 1998; DUERR, et al. 1998).

Outro importante fator de crescimento envolvido na patogênese dos gliomas é o PDGF e seus receptores (α e β). O PDGF também pode estimular a angiogênese pela indução do VEGF (ZADEH e GUHA, 2003). É classificado como um fator angiogênico não somente em gliomas como também em meningiomas, onde apresenta expressão aumentada, no entanto, sem uma correlação expressiva entre o grau de extensão da vascularização (UEBA, et al. 1994; SHAMAH, et al. 1997).

O mecanismo pelo qual estes receptores podem contribuir para tumorigênese inclui a hiperexpressão de receptores e seus ligantes e a presença de mutações em receptores que resulta numa atividade anormal mesmo na ausência do ligante (RAJKUMAR, 2001).

1.5.1 Receptor do fator de crescimento epidermal

O gene EGFR é o oncogene que está freqüentemente ampliado em tumores astrocíticos, em torno de 70% nos glioblastomas primários (WATANABE, et al. 1996; TOHMA, et al. 1998; FREDERICK, et al. 2000; MAHER, et al. 2001) e em poucos glioblastomas secundários (EKSTRAND, et al. 1991), e está associado a um pior prognóstico, especialmente em pacientes jovens (SIMMONS, et al. 2001; SHINOJIMA, et al. 2003). Tais tumores com amplificação do gene EGFR exibem superexpressão tanto ao nível protéico quanto no nível de RNA, sugerindo que a ativação dessa via de sinalização é fundamental para a progressão maligna dos glioblastomas (FREDERICK, et al. 2000).

O EGFR é uma glicoproteína de membrana com 170KDa, formada por 1.186 aminoácidos, membro da família de quatro receptores (EGFr/ErbB-1, HER-2/HerbB-2, HER-3/ErbB-3 e HER-4/ErbB-4). O fator de crescimento epidermal (EGF) é codificado

pelo gene EGFR localizado no cromossomo 7 (SRIVASTAVA, et al. 2001; ROCHA, 2002). O EGFR é um receptor transmembrana para o EGF e para o TGF- β , com atividade tirosinaquinase, atuando num sistema de sinalização fundamental na fisiologia normal da célula e na manutenção do estado tumorigênico (JORISSEN, et al. 2003). O receptor é formado por três domínios maiores: um domínio de ligação extracelular que confere um local de ligação específico, um segmento transmembrana lipofílico e um domínio citoplasmático tirosinaquinase (WOODBURN, 1999; ZWICK, et al. 1999; LEVITZKI, 1996).

A característica principal da porção citoplasmática do EGFR é a seqüência definida pelo domínio tirosina quinase. Próximo a terminação carboxila do receptor existe 4 locais de autofosforilação tirosina EGF-dependente. Dados sugerem que a terminação carboxila (COOH-) define uma região autoinibitória que pode ser exercida pela autofosforilação ou pelo receptor truncado (CARPENTER e COHEN, 1990). Os EGFRs e membros da família do receptor tornam-se ativados por dimerização. O mecanismo que promove a formação de dímeros receptores inclui a ligação de ligantes, hiperexpressão do receptor e transativação (heterodimerização). Após a dimerização, ocorre ativação da atividade intrínseca da proteína tirosina quinase resultando na autofosforilação da porção tirosina. Esses eventos resultam na seleção e fosforilação de vários substratos intracelulares conduzindo à sinalização mitogênica e outras atividades celulares, conforme ilustrado na figura 1 (MENDELSON E BASELGA 2003). A ativação do EGFR é acompanhada pela ativação de cascatas sinalizadoras intracelulares (MapKs) que resulta no aumento da divisão celular (RAO, et al. 2003).

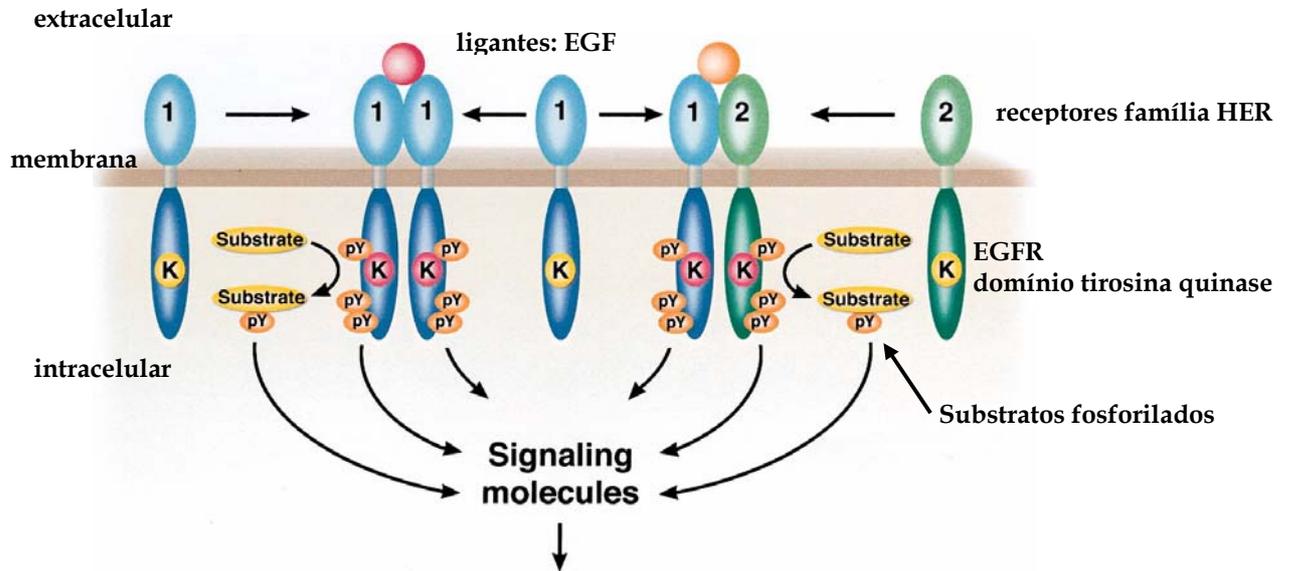


FIGURA 1: Mecanismos de ativação do receptor do fator de crescimento epidermal (MENDELSON e BASELGA, 2003).

Nas células malignas, vários mecanismos incluindo a hiperexpressão do receptor, o aumento da concentração dos ligantes e diminuição do *turnover* do receptor e a presença de mutações podem contribuir para a sinalização do EGFR (MUKOHARA, et al. 2003). Os autores MUKOHARA, et al (2003) e JORISSEM, et al (2003) destacam que a presença de fatores de crescimento associada a um aumento na expressão dos seus receptores pode ser interpretada como um elemento prognóstico desfavorável, particularmente nos casos de neoplasias.

Os efeitos da expressão do EGFR em células tumorais estão sumarizados na tabela5.

TABELA 5: Efeitos da expressão do EGFR em células tumorais:

Aumento da motilidade celular (WERBEEK, et al. 1998; WELLS, 2000)
Aumento da adesão celular (HAZAN e NORTON, 1998)
Alteração na regulação do ciclo celular (GIORDANO, et al. 1998; PERRY, et al. 1998) (aumento da proliferação)
Bloqueio da apoptose (GIBSON, 1999)
Promoção da angiogênese (KERBEL, et al. 1998)

1.5.1.1 EGFR na proliferação celular

Vários estudos demonstraram a importância dos fatores de crescimento na proliferação celular (COHEN, 1965; CARPENTER e COHEN, 1979; KERBEL, et al. 1998; GORLA, et al. 2001); uma vez que a ativação do EGFR gera sinais intracelulares que culminam na proliferação celular (WAKELING, et al. 2002).

O efeito do EGFR na proliferação celular é mediado por ativadores mitogênicos proteína quinases que são capazes de ativar as proteínas a partir da adição de grupamentos de fosfato, desencadeando cascatas sinalizadoras intracelulares (JOSEPH, et al. 2001; BRUGGEMAN, et al. 2002) que amplificam os sinais e estimulam células quiescentes a entrarem no ciclo celular (RAFFERTY, et al. 2001). Os fatores de crescimento ligam-se ao receptor (EGFR) nas células epiteliais estimulando a proteína tirosina quinase a promover a fosforilação do receptor com conseqüente produção de um sinal que altera a regulação genética resultando na proliferação destas células (MURRAY e LESSEY 1999, RAW e

HO, 2000; BALARAM, et al. 2001). Um dos mais importantes sinais traduzidos a partir da ativação do EGFR é o caminho regulado pelas proteínas da família Ras. As proteínas Ras são reguladoras da mitogênese e atuam como intermediárias entre o receptor tirosina quinase da membrana citoplasmática e a cascata serino/tirosina quinase intracelulares (JOSEPH, 2001; et al. CARPENTER, 2003) resultando na proliferação celular. Essa importante enzima mitogênica está elevada em várias neoplasias. Sua atividade está altamente regulada pela sinalização de receptores de fatores de crescimento como o EGFR e o PDGFR. Embora a atuação direta correspondendo a mutação do gene Ras ocorra em 30% de todas as neoplasias; essa mutação é rara em glioblastomas multiformes (RAO, et al. 2003).

O EGFRvIII é a mutação mais freqüente do gene EGFR (TOHMA, et al. 1998; LEARN, et al. 2004), com deleção dos aminoácidos 6-276 (WIKSTRAND, et al. 1997). Tal mutação resulta em aumento da proliferação celular e diminuição da morte celular (NAGANE, et al. 2001), motivo pelo qual os tumores com expressão positiva do EGFRvIII têm pior prognóstico (DIEDRICH, et al. 1995). LAL e colaboradores (2002) em estudo *in vitro* utilizando linhagens celulares de glioblastomas observaram que o EGFRvIII induz um modelo específico de gene que fornece maior motilidade à célula tornando-a mais invasiva, resultando na invasão tumoral.

A sinalização do EGFR não é importante somente na proliferação celular. Vários estudos têm demonstrado que sinais mediados por EGFR também contribuem para outros processos cruciais na progressão do câncer incluindo angiogênese, invasão e inibição da apoptose (WOODBURN, et al. 1999; WELLS, 2000; NOOMBERG e BENZ, 2000).

Neste sentido, o aumento na expressão do EGFR tem sido correlacionado com a progressão neoplásica, menor sobrevida, resposta limitada aos tratamentos (BRABENDER,

et al. 2001) e com a resistência adquirida aos agentes citotóxicos (MEYERS, et al. 1988; WOSIKOWSKI, et al. 1997). Níveis elevados de EGFR têm sido observados em uma variedade de tumores incluindo: tumores de próstata, mama, cólon, ovário e tumores cerebrais (BASELGA, 2000, WELLS, 2000, SALOMON, 1995). Cerca de 30-40% dos gliomas apresentam amplificação ou hiperexpressão de EGFR (COLLINS, 1993; OHGAKI, et al. 1995). Além da expressão aumentada e da amplificação do EGFR, mutações no gene deste receptor tornando-o constantemente ativo (ARTEAGA, 2002), bem como maior síntese e secreção do fator de crescimento epidérmico são observadas em tumores cerebrais (RAYMOND, et al. 2000).

1.5.1.2 EGFR na invasão tumoral

A transição de uma neoplasia em *in situ* para um tumor invasivo depende da habilidade de células tumorais invadirem tecidos adjacentes e atravessarem as barreiras destes (GOLDBRUNNER, et al. 1998).

Os eventos considerados críticos na invasão tumoral são, principalmente as alterações na adesão célula-célula e célula-matriz extracelular, a proteólise da matriz e a migração das células tumorais através da matriz. Esses eventos são fisiológicos e inerentes a células normais, podendo ocorrer, por exemplo, na morfogênese embrionária e no remodelamento dos tecidos (MURRAY e LESSEY, 1999; WERB E CHIN, 1998). O processo de invasão das células tumorais é, essencialmente, resultado do descontrole destas funções fisiológicas. As células tumorais invasivas apresentam desregulação na motilidade celular em resposta à sinalização extracelular de citocinas e fatores de crescimento. Alguns estudos sugerem que os receptores do fator de crescimento que estão envolvidos na

motilidade celular constituem uma das alterações mais comuns em células tumorais com fenótipo invasivo (WELLS, 2000).

A perda dos mecanismos de controle da adesão célula-célula e célula-matriz extracelular podem ocorrer devido a alterações na expressão de receptores de adesão de superfície celular (AKIYAMA, 1996; KEELY, et al. 1998; GOLDBRUNNER, et al. 1998). Tal evento pode levar à diminuição nas associações celulares entre si e com os componentes de matriz, promovendo dissociação das células tumorais primárias as quais estabelece novas interações á distância (FRIXEN, et al. 1991; CLEZARDIN, 1998; KEELY, et al. 1998; GOLDBRUNNER, et al. 1998).

Em adição ao principal papel de degradação da matriz extracelular e invasão celular, as MMPs exercem outras funções que podem mediar o crescimento tumoral. Em recentes estudos, SCHAFER e colaboradores (2004) concluíram que a transativação (heterodimerização) do EGFR mediado pelas metaloproteinases é um mecanismo chave para a sinalização celular que promove a ativação da MAPK bem como a migração e invasão celular em resposta a uma variedade de ligantes GPCR fisiologicamente relevantes. As MMPs podem ativar receptores que são membros da família de receptores de fatores de crescimento com atividade tirosinaquinase (DONG, et al. 1999). A MMP-3 é um exemplo, a qual pode clivar o fator de crescimento epidermal *heparin-binding* (HB-EGF); liberando-o da membrana celular (SUZUKI, et al. 1997). As MMPs estão envolvidas na clivagem de membros da família de receptores do EGF e do receptor do fator de crescimento de hepatócitos (VECCHI, 1998; NATH, et al. 2001), enquanto que a MMP-9 libera o fator de crescimento endotelial vascular durante a angiogênese (BERGERS, et al. 2000). A sinalização do EGFR promove a ativação da MMP-9 em linhagens celulares de neoplasias

humanas (COX, et al. 2000; ELLERBROEK, et al. 2001; ALPER, et al. 2001) e particularmente em células de glioblastomas primários (CHOE, et al. 2002).

Outra importante enzima que compõe a família das metaloproteinases e que está envolvida na invasão tumoral juntamente com o EGFR é a MMP tipo 1 (MMP-1). A ativação do EGFR resulta no aumento da migração celular, o qual é mediado pela regulação da MMP-1 (ANDL, et al. 2003). VAN METER e colaboradores (2004) em recente estudo concluíram que um dos mecanismos de invasividade mediado pelo EGFR em gliomas pode envolver a regulação das MMP-1.

NUTALL e colaboradores (2003), utilizaram 34 tipos diferentes de linhagem celulares humanas para estudar o envolvimento de MMP e TIMP através do RNA, sendo que neste estudo não foi identificado um aumento significativo na progressão dos gliomas. Por outro lado, o ErbB-2 apresentou uma correlação significativa com o grau de gliomas. Como a produção de MMP e TIMPs está associada a estimulação de VEGF (GOMEZ, et al. 1997), foi observado uma correlação positiva entre os níveis de ErbB-2 e EGFR com níveis de MMPs e TIMP.

1. 5.1.3 EGFR na resistência ao tratamento antineoplásico

A via de sinalização do EGFR parece contribuir para a resistência à radiação e à quimioterapia de vários tumores, incluindo os gliomas (SALOMON, et al. 1995; NICHOLSON, et al. 1999; AKIMOTO, et al. 1999; CHEN, et al. 2000). O EGFR tem sido identificado não somente nos casos de resistência aumentada a apoptose, mas também no aumento do potencial angiogênico, capacidade de reparação de DNA, invasão celular e imortalidade (CHAKRAVARTI, et al. 2002).

CHAKRAVARTI e colaboradores (2002) sugerem que tanto a quimioterapia quanto a quantidade de radiação podem ativar a sinalização do EGFR, conduzindo a um aumento na resistência cruzada entre a administração seqüenciada das duas modalidades terapêuticas. A ativação de PI3-K/AKT foi descrita como sendo crítica na resistência mediada pela apoptose e pela radioterapia.

Em recente estudo, McKENNA e MUSCHEL (2003) observaram que quando o oncogene ras está ativado pode resultar no aumento da radioresistência. Em adição ao EGFR e ras, o PTEN também pode regular a via PI3 quinase, identificar um sinal comum para o EGFR, ras e PTEN que resultem na resistência à radiação pode levar a descoberta de alvos para o desenvolvimento de radiosensibilização baseada no desenvolvimento de protocolos moleculares para tumores resistentes a radiação, o qual conduza á um melhor controle local da doença.

Os resultados descritos por CHAKRAVARTI e colaboradores (2002), sugerem que a sinalização mediada pelo receptor do fator de crescimento semelhante à insulina (IGFR-I) representa um dos mecanismos pelos quais as células tumorais podem se tornar resistentes á terapia anti-EGFR.

O IGF-I é o substrato de ligação para o receptor do fator de crescimento semelhante à insulina (IGFR-I), esse por sua vez, ativa a porção intrínseca tirosinaquinase resultando na autofosforilação do receptor e a apresentação de sítios de ligação para o substrato contendo homólogos Src2 ou contendo domínios de ligação fosfotirosina (BASELGA, 1997).

A ativação das vias SHC/Erb2/SOS/raf/MEK/MAPK e IRS/PI3-K/AKT/P70 é uma consequência do sinal de transdução mediado pelo IGFR-I, a qual conduz à proliferação, tumorigênese e inibição da apoptose. Em linhagens de células de glioblastomas

multiformes, a ativação do *phosphoinositide 3-kinase* (PI3-K) mediada pelo IGFR-I resulta num potente efeito antineoplásico e pró-invasivo. A sinalização do IGFR-I através do PI3-K representa um dos mecanismos de resistência ao tratamento com anti-EGFR (CHAKRAVARTI, et al. 2002).

2. Justificativa

A limitada eficácia das atuais modalidades de tratamento disponíveis para vários tipos de tumores primários do SNC, impõe a busca de novas estratégias terapêuticas. A melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na tumorigênese é fundamental na tentativa de encontrar alternativas mais eficazes no diagnóstico e manejo dessas neoplasias. Atualmente existem vários estudos em tumores do SNC em pacientes adultos examinando padrões de expressão gênica em células tumorais. Tais estudos têm permitido entender em parte os mecanismos moleculares regulados por fatores de crescimento celular e seus respectivos receptores. Existem evidências de que hiperexpressão do gene do EGFR em células de tumores do SNC parece estar associado a prognóstico desfavorável. Apenas mais recentemente esses estudos têm sido realizados em pacientes pediátricos e embora muitos mecanismos de tumorigênese sejam idênticos independentemente da faixa etária, é importante investigar o perfil de anormalidades na população pediátrica já que o comportamento clínico e a resposta ao tratamento são influenciados pela idade em várias neoplasias malignas.

3. Objetivos

1. Analisar a expressão do gene do EGFR em tumores do sistema nervoso central de crianças e adolescentes.
2. Contribuir para a compreensão do perfil demográfico dos pacientes pediátricos com tumores primários do SNC atendidos no HCPA e HCSA no período de 2002 a 2004.
3. Correlacionar a sobrevida dos pacientes de acordo com a expressão do gene do EGFR.

4. Pacientes e Métodos

4.1 Coleta das amostras de tumor

Para realização deste estudo foram utilizadas biópsias de tumores primários do SNC de pacientes pediátricos atendidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e Hospital da Criança Santo Antônio (HCSA), no período de 2002 a 2004. Foram considerados elegíveis para o estudo os pacientes com indicação cirúrgica de ressecção ou biópsia de tumor primário do SNC os quais não haviam sido submetidos a tratamento prévio com quimio e/ou radioterapia. As coletas foram realizadas após o liberação do responsável pelo paciente através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (anexo 1) aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa de ambos os hospitais (HCPA e HCSA).

O diagnóstico de neoplasia foi feito através do exame anatomo-patológico e confirmado por imunohistoquímica, de acordo com os critérios de classificação de tumores cerebrais da WHO (KLEIHUES, et al. 2002).

A coleta das amostras de tecido tumoral foi feita pelo investigador diretamente no bloco cirúrgico. Para evitar perda de material o cirurgião entrava em contato com investigador informando o horário da cirurgia.

A amostra de tumor era colocada imediatamente em solução fisiológica e entregue ao investigador que a transportava em nitrogênio líquido para o laboratório. O tempo entre a coleta da amostra e o congelamento em nitrogênio líquido não excedeu 60 minutos, para evitar degradação do RNA.

4.2 Coleta de dados clínicos

A coleta de dados clínicos foi obtida através de informações contidas nos prontuários dos pacientes. O instrumento utilizado para a coleta de dados está detalhado no anexo 2. Os dados demográficos incluem informações sobre diagnóstico, idade, sexo, raça e procedência dos pacientes. As informações relacionadas ao procedimento cirúrgico incluem grau de ressecabilidade tumoral onde a biópsia corresponde a uma ressecção de até 10% do volume tumoral, ressecção parcial de 10-50%, ressecção subtotal de 50-80%, ressecção subtotal radical quando há ressecção de até 99% e ressecção completa onde não há presença de lesão macroscópica detectável pelo cirurgião. As informações sobre resultados dos exames de anátomo-patológico e imunohistoquímica também foram incluídas. Os dados referentes aos exames de neuro-imagem realizados por tomografia computadorizada (TC) ou ressonância magnética (RM) no pré e pós-operatório foram utilizados para avaliar e confirmar o grau de ressecabilidade tumoral descrita pelo cirurgião. Como informação complementar ao tratamento cirúrgico foram incluídas informações referentes ao tratamento quimioterápico utilizado no pós-operatório e desfecho clínico que inclui a ocorrência de eventos como recidiva e óbito.

O follow-up dos pacientes variou de 4 a 14 meses, com mediana de 6 meses entre a data da coleta da amostra tumoral e a coleta de dados.

4.3 Técnicas Laboratoriais

4.3.1 Extração de RNA

Para a obtenção do RNA total, as amostras foram maceradas em nitrogênio líquido e posteriormente submetidas ao processo químico de extração do RNA total com isotiocinato de guanidina (CHOMCZYNSKI e SACCHI,1987).

A concentração de RNA foi estimada através de densidade óptica em 260nm e a qualidade avaliada em gel agarose 1% (figura 2).

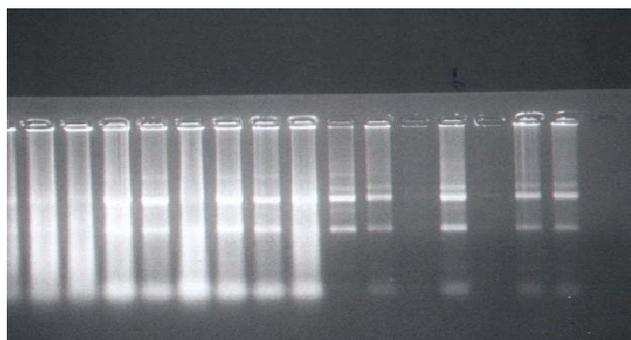


FIGURA 2: Amostras de RNA total em gel agarose 1% de 17 pacientes.

4.3.2 Técnica de RT-PCR semi-quantitativo

Para a síntese dos cDNAs (*DNA complementar*) foi empregada a técnica de RT-PCR (*Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction*). Esta metodologia possibilita avaliar os níveis relativos de expressão dos genes, uma vez que não é possível identificar o número exato de partículas de RNAm do tecido analisado. No entanto essa técnica é eficiente e permite a comparação da expressão gênica entre as amostras, gerando dados

quantitativos, bem como dados qualitativos por demonstrar a função dos genes investigados. Neste protocolo foi utilizado 5 µg de RNA total e 25 pmol de *primers* antisenso (*reverse*) para os genes GAPDH (gliceroldeído-3-fosfato desidrogenase) e EGFR (tabela 6). Posteriormente as amostras foram incubadas por uma hora a 37°C com 20U de transcriptase reversa (MMLV - Amersham).

A utilização do gene constitutivo GAPDH teve dois propósitos: avaliar a integridade do material genético e auxiliar na quantificação da expressão do EGFR. Em geral também são usadas amostras de tecidos normais como controle, entretanto no caso do SNC a obtenção deste material torna-se impraticável.

Para conferir maior confiabilidade aos resultados, o RT-PCR foi realizado de forma seriada, com diluições do RNAm que variaram de 1/5 até 1/5⁹. O número de diluições foi estabelecido quando a concentração de RNAm tornou-se tão baixa que o produto de PCR não era mais visível.

TABELA 6: Seqüência de *primers* utilizados para obtenção dos cDNAs e na amplificação dos fragmentos.

Genes	Seqüência de <i>Primers</i>
GAPDH	<i>Forward</i> 5' – ATCACTGCCACCCAGAAGACT – 3' <i>Reverse</i> 5' - CTGCTTCACCACCTTCTTGA – 3'
EGFR	<i>Forward</i> 5' - AGCCATGCCCCGATTAGC TC – 3' <i>Reverse</i> 5' - AAAGGAATGCAACTTCCCAA – 3'

4.3.3 Amplificação por PCR

O volume total da reação de RT-PCR (10µl) foi utilizada como molde para a amplificação dos fragmentos desejados através da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Na tabela 6 encontram-se as concentrações dos reagentes e as condições de amplificação.

TABELA 7: Condições de PCR

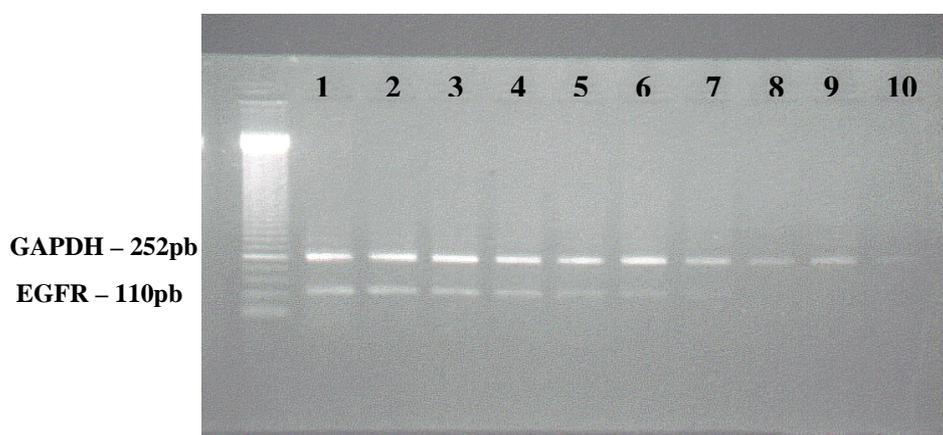
Reação de amplificação	Protocolo de Amplificação
1.0 mM MgCl ₂	35 ciclos 94° C – 3 min. 94° C – 1 min. 54° C – 1 min.
5.0 mM KCl	
8.5 mM dNTP	
25 pmol dos <i>primers forward</i>	72° C – 1 min.
1.5 U de Taq	72° C – 4 min. 4° C - continuamente

4.3.4 Quantificação dos produtos de PCR

A quantificação dos produtos de PCR foi realizada através da técnica de eletroforese horizontal em gel de agarose 2% (figura 3). Os fragmentos esperados para os genes EGFR e GAPDH foram 110pb e 250pb, respectivamente. O tamanho dos fragmentos foi confirmado através de um marcador de peso molecular (50pb a 500pb). Posteriormente, os géis foram fotografados e analisados por um software de imagem (Scion Image), com o objetivo de comparar a intensidade de bandas entre o gene constitutivo (GAPDH) com as do gene do

receptor. A taxa de expressão do gene EGFR foi determinada através da razão entre os valores obtidos para GAPDH e EGFR. Para determinar o status da expressão do gene do EGFR foi considerado o valor igual ou superior a 0.4 RNAm de EGFR indicativo de hiperexpressão e valores inferiores a 0.4 RNAm de EGFR como não hiperexpressos.

FIGURA 3: Gel representativo da expressão dos genes GAPDH e EGFR (amostra de craniofaringeoma).



Legenda: as canaletas de 1 a 9 indicam as seriações do RNAm e a canaleta 10 o controle negativo.

4.4 Análise Estatística

A sobrevida global foi analisada de acordo com o Método Kaplan Méier, sendo que o *log rank* foi usado para avaliar a diferença entre os grupos analisados.

5. Resultados

5.1. Caracterização da amostra

Dos pacientes que atenderam aos critérios de inclusão foram obtidas 18 espécimes de tumores primários do SNC, sendo 15 amostras oriundas do Hospital da Criança Santo Antônio e 03 amostras do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. As amostras de tumores foram histologicamente caracterizadas como: astrocitomas graus I, III e IV, ependimoma, carcinoma de plexo coróide, craniofaringeoma e PNET.

5.2 Dados demográficos

Foram incluídos no estudo 18 pacientes, dos quais 11 eram do sexo masculino, a mediana de idade foi de 3,5 anos (4 meses – 11 anos e 3 meses). Em relação à faixa etária dos pacientes com tumores do SNC nove pacientes (50%) eram menores de 5 anos de idade; 7 pacientes (39%) estão entre os 5 e 9 anos de idade e apenas 2 pacientes (11%) estavam na faixa etária entre 10 e 14 anos de idade. Dentre os pacientes com tumores de origem glial 86% eram crianças com faixa etária inferior aos 9 anos de idade (Tabela 8).

TABELA 8: Grupos histológicos de tumores do SNC de acordo com a faixa etária.

Tumores do SNC	Faixa Etária		
	< 5 anos	5-9 anos	10-14 anos
Tumores Astrocíticos	2	4	1
PNET	4	-	-
Ependimomas	-	2	1
Outros Tumores do SNC (craniofaringeoma e carcinoma de plexo coróide)	3	1	-
Total	9	7	2

Conforme os dados apresentados na tabela 9, na população estudada verificou-se uma distribuição de: 39% de tumores astrocíticos, 22% de PNET sendo incluído 1 pinealoblastoma e 3 meduloblastomas, 17% de ependimomas e os 22% restantes foram constituídos por outros tumores do SNC (1 craniofaringeoma e 3 carcinomas de plexo coróide) e 61% da amostra são tumores de fossa posterior.

TABELA 9: Frequência de grupos histológicos de tumores do SNC

Tumores do SNC	N	F	Sexo	
			Masc	Fem
Tumores Astrocíticos	7	39	5	2
PNET (meduloblastoma e pinealoblastoma)	4	22	3	1
Outros Gliomas	-	-	-	-
Ependimomas	3	17	1	2
Outros Tumores do SNC (craniofaringeoma e carcinoma de plexo coróide)	4	22	2	2
Total	18	100	11	7

Legenda: N: número de indivíduos; F: frequência absoluta

5.3 Procedimento cirúrgico

Dez pacientes (55%) apresentaram lesão residual no pós-operatório. Dos 10 pacientes que apresentaram lesão residual, 6 (60%) receberam tratamento com quimioterapia e radioterapia e somente um paciente recebeu exclusivamente quimioterapia pós-operatória. Os demais (3 pacientes) não receberam tratamento após ressecção cirúrgica devido a óbito decorrente de complicações pós-operatórias. Os protocolos de quimioterapia variaram de acordo com o tipo histológico da lesão. As drogas quimioterápicas utilizadas foram: carboplatina e etoposide, vincristina, carmustina, cisplatina e metotrexate.

Conforme observado anteriormente, por se tratar de uma população de crianças com baixa faixa etária, a radioterapia (RT) foi utilizada em 7 (39%) dos pacientes que receberam tratamento após ressecção cirúrgica.

Dos 18 pacientes que foram incluídos no estudo 3 apresentaram complicações pós-operatórias que culminaram em óbito, 7 estão vivos com doença e 8 vivos sem doença.

Dos três pacientes com diagnóstico de ependimoma, 2 obtiveram ressecção completa da lesão e estão vivos e sem doença e 1 paciente com lesão residual pós-operatória foi a óbito por complicações cirúrgicas.

Dos 3 pacientes com carcinoma de plexo coróide, 2 não apresentaram lesão residual no pós-operatório sendo que 1 destes apresentou recidiva após dois meses do diagnóstico e em vigência de tratamento quimioterápico com carboplatina e etoposide endovenosos.

Os 3 pacientes com diagnóstico de carcinoma de plexo coróide e faixa etária inferior aos 3 anos de idade, receberam somente quimioterapia como tratamento complementar a ressecção cirúrgica.

O tempo transcorrido entre a cirurgia e o exame de imagem com RM ou TC para confirmar grau de ressecabilidade cirúrgica e/ou avaliar evolução clínica pós-operatória não excedeu a 7 dias.

De acordo com a tabela 10, é possível constatar que todos os pacientes com diagnóstico de astrocitoma maligno (graus III e IV), num total de 6 pacientes, apresentaram lesão residual pós-operatória confirmada por TC ou RM e desfecho clínico de sobrevida com doença para 3 destes pacientes e 1 óbito.

O tratamento pós-operatório com QT foi utilizado em 10 pacientes (55%), sendo que 6 (60%) dos pacientes receberam RT adicional ao tratamento quimioterápico. Dos 4 pacientes que não receberam outro tratamento além da cirurgia, 1 apresentou ressecção completa da lesão e os demais apresentaram piora clínica pós-operatória evoluindo para óbito.

TABELA 10: Distribuição das amostras de tecido tumoral de acordo com diagnóstico histológico, exames de neuroimagem, tratamento pós-operatório e desfecho clínico.

Nº	Diagnóstico Histológico	TC/RM pós-operatório	Tratamento pós-operatório	Desfecho Clínico
01	Astrocitoma grau I	Sem lesão	N	Vivo sem doença
02	Astrocitoma grau III	Lesão residual	RT + QT	Vivo com doença
03	Astrocitoma grau III	Lesão residual	RT + QT	Vivo com doença
04	Astrocitoma grau III	Lesão residual	RT + QT	Vivo com doença
05	Astrocitoma grau IV	Lesão residual	RT + QT	Vivo com doença
06	Astrocitoma grau IV	Lesão residual	N	Óbito
07	Astrocitoma grau IV	Lesão residual	RT + QT	Vivo sem doença
08	Carcinoma de plexo coróide	Sem lesão	QT	Vivo com doença
09	Carcinoma de plexo coróide	Lesão residual	QT	Vivo com doença
10	Carcinoma de plexo coróide	Sem lesão	QT	Vivo sem doença
11	Craniofaringeoma	Sem lesão	RT	Vivo sem doença
12	Ependimoma	Lesão residual	N	Óbito
13	Ependimoma	Sem lesão	N	Vivo sem doença
14	Ependimoma	Sem lesão	N	Vivo sem doença
15	PNET	Lesão residual	RT + QT	Vivo com doença
16	Meduloblastoma	Lesão residual	Nenhum	Óbito
17	Meduloblastoma	Sem lesão	QT	Vivo sem doença
18	Meduloblastoma	Sem lesão	N	Vivo sem doença

Legenda: TC: tomografia computadorizada, RM: ressonância magnética,
RT: radioterapia, QT: quimioterapia, N: não

De acordo com a tabela 11, o desfecho clínico dos pacientes com tumores astrocíticos foi de 1 paciente com sobrevida livre de doença com diagnóstico de astrocitoma grau I e 4 pacientes com astrocitomas graus III e IV estão vivos com doença e 1 óbito para o paciente com diagnóstico de astrocitoma grau IV. É possível observar que na medida em que aumenta o grau da classificação histológica ocorre piora do prognóstico.

TABELA 11: Subclassificação dos tumores astrocíticos e desfecho clínico.

Tumores Astrocíticos	N	Desfecho Clínico		
		Vivo sem doença	Vivo com doença	Óbito
Astrocitoma Pilocítico grau I	1	1	-	-
Astrocitoma Anaplásico grau III	3	-	3	-
Astrocitoma grau IV	3	1	1	1
Total	7	2	4	1

5.4 Análise da Expressão do EGFR

Para a análise da expressão do EGFR foram excluídas 3 amostras, das quais não foi possível a extração de RNA, portanto, os valores representam a análise de 15 amostras. Os valores descritos na tabela 12 revelam a razão entre EGFR e o gene constitutivo nesta investigação. Em todos os tumores analisados o nível de expressão de EGFR foi inferior ao do gene constitutivo, uma vez que nenhum valor foi superior a um.

A menor expressão de EGFR foi verificada em um astrocitoma de grau I (0.05) e a maior em um astrocitoma grau IV (0.71). Ao analisar os tumores de origem glial foi identificado um aumento na expressão do EGFR nos astrocitomas de grau IV. Com exceção de uma amostra que mostrou um nível de expressão menor (0.13) equivalente aos astrocitomas de menor grau (graus I e III).

Alguns tumores que apresentam um fenótipo mais invasivo, apresentaram níveis de expressão de EGFR mais elevados, principalmente nos tumores de origem glial. Trinta e três por cento da amostra apresentou hiperexpressão do gene do EGFR, no entanto, não foi verificada uma correlação significativa entre o parâmetro invasão e uma expressão aumentada deste marcador. De acordo com a tabela 12, os tumores de origem de células parafaríngeais (carcinoma de plexo coróide) apresentaram maior expressão de EGFR (média de 0.41) quando comparados aos tumores originados de células germinativas (0.23) e de origem ectodérmica (meduloblastomas) com média de 0.25.

TABELA 12: Valores da expressão do gene do EGFR.

Nº	Diagnóstico Histológico	GAPDH	EGFR	Razão entre os genes GAPDH e EGFR
01	Astrocitoma grau I	1	20	0.05
02	Astrocitoma grau III	1	10.5	0.09
03	Astrocitoma grau III	1	5.8	0.17
05	Astrocitoma grau IV	1	7.8	0.13
06	Astrocitoma grau IV	1	1.4	0.71
07	Astrocitoma grau IV	1	2.6	0.40
08	Carcinoma de plexo coróide	1	3.9	0.26
09	Carcinoma de plexo coróide	1	2.2	0.46
10	Carcinoma de plexo coróide	1	2.0	0.51
11	Craniofaringeoma	1	3.2	0.31
12	Ependimoma	1	4.6	0.22
13	Ependimoma	1	6.0	0.16
15	PNET	1	3.6	0.28
16	Meduloblastoma	1	2.5	0.40
17	Meduloblastoma	1	11.2	0.09

Legenda: PNET: tumor neuroectodérmico primitivo; GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; EGFR: receptor do fator de crescimento epidermal.

5.5 Análise da sobrevida dos pacientes

A sobrevida geral (SG) dos 18 pacientes incluídos na análise foi de 83% (figura 4). Das 15 amostras analisadas foram observados hiperexpressão do gene do EGFR em 5 delas. A SG dos pacientes com hiperexpressão e com ausência de hiperexpressão foi de 80% e 78%, respectivamente, não houve, portanto, diferença estatisticamente significativa na SG dos 2 grupos ($p=0,953$) (figura 5).

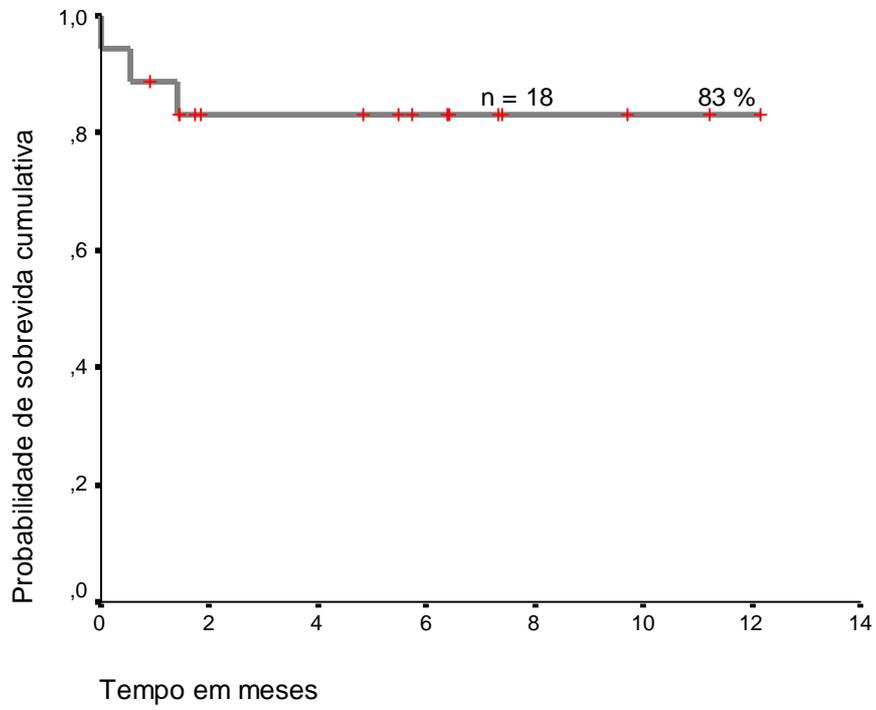


FIGURA 4: Sobrevida global dos pacientes.

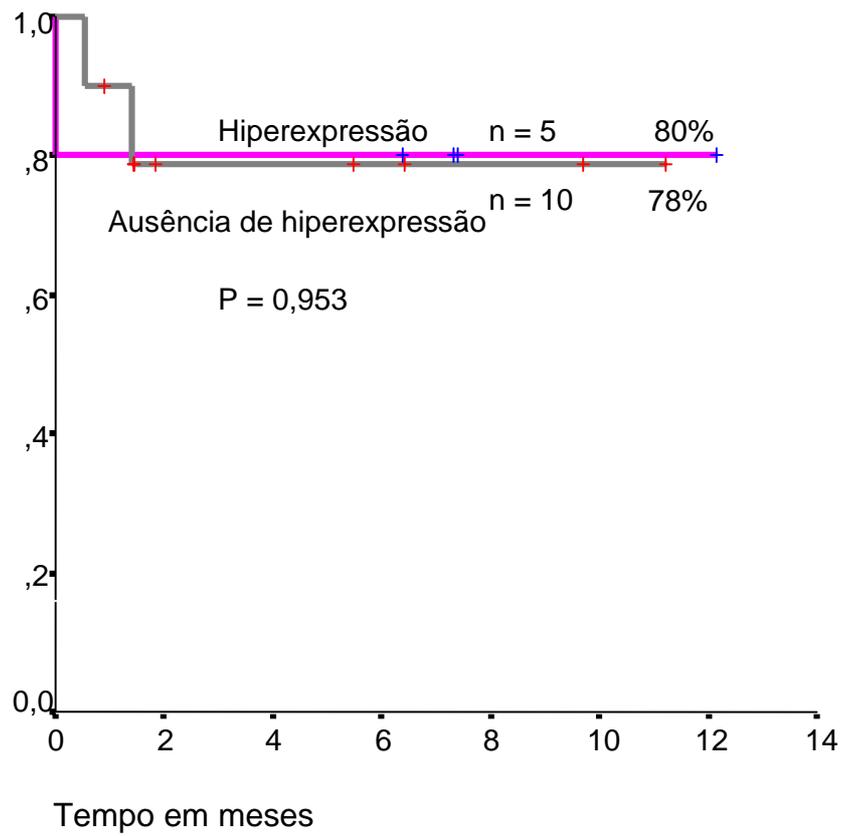


FIGURA 5: Comparação da sobrevida de pacientes com e sem hiperexpressão do gene EGFR.

6. Discussão

Este estudo representa a análise de uma amostra de 18 espécimes de tumores primários do SNC, no qual foi possível caracterizar o perfil da população pediátrica dos pacientes atendidos nos hospitais HCPA e HCSA no período de 2002–2004. Esta amostra é constituída de crianças de 2 a 14 anos de idade, caucasianas, predominantemente do sexo masculino, com o diagnóstico histológico mais comum de astrocitomas e localização em fossa posterior. Embora nossa amostra seja pequena os dados demográficos não diferem daqueles conhecidos literatura de acordo com RIES e colaboradores (1999). No futuro, com a centralização da assistência em centros de referência será possível incluir uma amostra mais expressiva de pacientes e assim ter informações demográficas mais precisas sobre os tumores do SNC da infância no nosso meio.

O grau de ressecabilidade tumoral foi definido considerando a descrição do cirurgião e de acordo com a presença de lesão residual nos exames de neuroimagem obtidos no pós-operatório.

Em mais da metade dos pacientes não foi possível realizar ressecção completa da lesão tumoral. Dos 10 pacientes com ressecção incompleta, 3 não receberam tratamento adicional pois evoluíram para óbito devido a complicações cirúrgicas no pós-operatório imediato; os demais tiveram indicação de tratamento adjuvante com quimioterapia e/ou radioterapia.

Neste estudo, todos os pacientes que obtiveram ressecção completa permanecem vivos sem evidência de doença, com exceção do paciente com diagnóstico de carcinoma de plexo coróide que apresentou recidiva dois meses após intervenção cirúrgica e em vigência

de tratamento quimioterápico. Estudos anteriores (ALBERT e colaboradores, 1994; LO e colaboradores, 2001) já haviam identificado que pacientes com lesão residual pós-operatória apresentam maior risco de recidiva e óbito quando comparados com os pacientes sem lesão residual. Infelizmente a ressecção cirúrgica extensa nem sempre é possível e depende da localização do tumor e das condições do paciente no momento da cirurgia (SHAPIRO e SHAPIRO, 1998).

Apesar do tempo de seguimento dos pacientes ser relativamente curto com mediana de 6 meses e por tratar-se de uma amostra com pequeno número de casos, os dados são muito sugestivos de que a ressecabilidade cirúrgica representou um importante fator prognóstico.

Em virtude de tratar-se de um grupo heterogêneo de neoplasias e de terem se submetido a combinações variadas de drogas antineoplásicas não consideramos oportuno realizar qualquer análise sobre o grau de resposta terapêutica. Dos 7 pacientes com lesão residual apenas um deles encontra-se sem evidência de doença após receber quimioterapia e radioterapia; os demais 6 pacientes encontram-se com evidência de doença mesmo tendo recebido tratamento adjuvante pós operatório.

A quimioterapia está desempenhando um papel progressivamente importante no tratamento de pacientes com tumores do SNC, embora restrita a agentes que atravessam a barreira hemato-liquórica para ganhar acesso ao tecido alvo. Os pacientes com doença residual após cirurgia, assim como os pacientes com recidiva tumoral após cirurgia, representam no presente um verdadeiro desafio terapêutico. Apesar da relativa inacessibilidade do SNC às drogas antineoplásicas convencionais, vários investigadores tem sugerido modelos de otimização da eficácia do tratamento quimioterápico; estes incluem o uso de regimens com megadoses de quimioterapia seguido de transplante

autólogo de células tronco hematopoiéticas ou através de estudos de Fase II com novas drogas (GILBERTSON, et al. 2003; MATAR, et al. 2004). Estas estratégias, entretanto, devem somente ser avaliadas dentro de estudos clínicos com rigorosos critérios de inclusão de pacientes, já que podem estar associados a toxicidades não aceitáveis para muitos pacientes. Torna-se imperativo, portanto, identificar critérios de elegibilidade, já que pacientes de melhor prognóstico são provavelmente candidatos a tratamentos mais convencionais. Como os parâmetros clínicos nem sempre permitem identificar candidatos a programas terapêuticos mais agressivos, considera-se de extrema importância identificar critérios biológicos, que, de forma isolada, ou associados aos parâmetros clínicos, permitam selecionar candidatos adequados para estudos de eficácia terapêutica. Por esta razão nos parece evidente que no futuro a busca de marcadores moleculares para tumores do SNC se torne motivo de grande interesse, assim como ocorreu mais recentemente com outras neoplasias.

A presença de hiperexpressão do gene do EGFR foi observada em 5 das 15 amostras, para as quais foi possível obter RNA. Das 5 consideradas hiperexpressas, duas apresentaram valores limítrofes, desta forma, apenas 3 amostras podem ser consideradas com conteúdo de EGFR hiperexpresso. Como um dos objetivos deste estudo era avaliar o impacto da expressão do gene do EGFR na sobrevivência dos pacientes, foi realizada a análise comparativa dos pacientes com e sem hiperexpressão. Embora não tenhamos identificado diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos, devido ao pequeno número de amostras, não foi possível concluir o valor prognóstico do gene do EGFR para tumores do sistema nervoso central. Por esta razão, pretendemos prosseguir as coletas de amostras para nova avaliação futura.

No presente trabalho, a partir de 18 amostras tumorais foi possível extrair RNA de 15 amostras. Um dos fatores que consideramos ter interferido na possibilidade de extração de RNA de 3 casos foi a quantidade insuficiente de material obtida pela biópsia (uma das amostras foi extraída por biópsia estereotáxica). Entretanto, em todas as amostras das quais o RNA pode ser extraído foi possível observar a expressão do gene do receptor do EGF. A expressão aumentada ficou evidente nos tumores de origem gliais e com maior grau de invasão e proliferação celular. Em análise complementar futura, será avaliado a expressão de metaloproteinases de matriz (MMP) tipo 2 e 9 com o intuito de acrescentar informações ao perfil molecular destes tumores.

Uma das dificuldades observadas neste estudo que deve ser destacada foi a dificuldade de obter amostra tumoral representativa com volume suficiente para ser encaminhado tanto para o laboratório de análise diagnóstica como para laboratórios de pesquisa básica, mesmo considerando-se que foi organizada uma estratégia de coleta bastante rigorosa. É provável que em uma situação de rotina um percentual ainda maior de amostras não seja coletada adequadamente. O trabalho em equipe multidisciplinar, contanto com o auxílio e participação do cirurgião torna-se fundamental para a realização de estudos que necessitam de amostras coletadas no trans-operatório, em especial aquelas que exigem técnica de congelamento de material fresco para futura extração de RNA, conferindo qualidade ao material coletado.

Em nosso estudo a metodologia utilizada para análise da expressão do gene do EGFR foi RT-PCR semi-quantitativo, que utiliza como alvo o RNAm. Embora não seja considerado um método quantitativo, nos permitiu identificar a expressão do EGFR no tecido tumoral. Tal técnica supera a metodologia de imunohistoquímica por ser isenta de subjetividade e por apresentar elevada especificidade. Além disso, fornece informações

adicionais quanto ao comportamento gênico do tumor em análise. Sendo assim, recomendável quando se deseja conhecer as bases moleculares associadas à proliferação tumoral.

Ainda que nossos resultados não nos forneçam observações conclusivas do papel do EGFR na progressão maligna dos tumores cerebrais da infância, a avaliação molecular nesta população deve ser encorajada, tendo em vista o reduzido número de estudos com esta abordagem. Portanto, a investigação da sinalização do gene EGFR na biologia dos tumores do SNC poderá contribuir para o desenvolvimento de novos parâmetros de critério prognóstico e evolução da doença, bem como, para o aprimoramento de modalidades terapêuticas. A avaliação dos elementos envolvidos nas vias de transdução desencadeadas pelo EGFR não é restrita ao fator de crescimento, uma vez que a sobreposição de vias alternativas termina identificando uma ampla diversidade de potenciais marcadores, representados por proteínas hiperexpressas nos tumores cerebrais. Neste sentido, num futuro próximo, a análise genética poderá fazer parte da rotina diagnóstica dos tumores cerebrais.

7. Conclusão

Todas as amostras apresentaram expressão de EGFR com níveis variados mostrando a factibilidade do uso desta técnica em nosso meio. Ainda que os resultados deste estudo não forneçam dados que possibilitem caracterizar o EGFR como fator prognóstico, evidencia o papel deste receptor em tumores cerebrais primários de pacientes pediátricos e encoraja a continuidade de investigações que elucidem a real aplicabilidade deste marcador.

O perfil demográfico dos pacientes pediátricos atendidos no HCSA e HCPA no período de 2002 a 2004 é semelhante aos dados descritos na literatura.

Os níveis de EGFR parecem estar mais elevados nas amostras de tumores de origem glial e em particular para aqueles com um fenótipo mais invasivo, no entanto não foi verificada nenhuma relação com a sobrevida dos pacientes.

8. Referências Bibliográficas

Akimoto T, Hunter NR, Buchmiller L, et al.. Iverse relationship between epidermal growth factor receptor expression and radiocurability of murine carcinomas. Clin Cancer Res 1999; 5:2884-2890.

Akiyama SK. Integrins in cell adhesion and signaling. Hum Cell 1996; 9:181-186.

Albright AL, Wisoff JH, Zeltzer P, et al. Prognostic factors in children with supratentorial (nonpineal) primitive neuroectodermal tumors. A neurosurgical perspective from the Children's Cancer Group. Pediatr Neurosurg 1995; 22:1-7.

Alper O, Bergmann-Leitner ES, Bennett TA, et al. Epidermal growth factor receptor signaling and the invasive phenotype of ovarian carcinoma cells. J Natl Cancer Inst 2001; 93:1375-1384.

Andl C, Nakagawa H, Mizushima T, et al. Epidermal growth factor receptor mediates increased cell proliferation, migration and aggregation in esophageal keratinocytes in vitro and in vivo. J Biol Chem 2003; 278:1824-1830.

Arteaga CL. Epidermal growth factor receptor dependence in human tumors: more than just expression? Oncologist 2002; 7:31-39.

Baselga R, Hougo A, Rubini M et al. The IGF-I receptor in cell growth, transformation and apoptosis. *Biochem Biophys. Acta* 1997; 1332:F105-F126.

Baselga J. New technologies in epidermal growth factor receptor - targeted cancer therapy. *Signal* 2000; 1:12-21.

Balaram P, John M, Enose S, et al. Demonstration of TGF alpha-EGFR and EGF-EGFR autocrine loops and their relation to proliferation in complete hydatidiform moles (CHM). *Int Gynecol Cancer* 2001; 11:397-402.

Bauman GS, Lote L, Larson D, et al. Pretreatment factors predict overall survival for patients with low-grade glioma: a recursive partitioning analysis. In *J Radiat Oncol Biol Phys* 1999; 45: 923-929.

Ben AMW, Postovsky S; Elhasid R, et al. Antiangiogenic therapy in pediatric malignancies: experience of the Northern Israel Pediatric Cancer Center. *ASCO Proceedings* 2002.

Berger C, Thiesse P, Lellouch-Tubiana A, et al. Choroid plexus carcinomas in childhood: clinical features and prognostic factors. *Neurosurgery* 1998; 42:470-475.

Bergers G, Brekken R, McMahon G, et al. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 2000; 2:737-744.

Bi X, Zhang JZ. Experimental study of thymidine kinase gene therapy of neuroblastoma in vitro and in vivo. *Pediatr Surg Int* 2003; 19:400-405.

Bigner SH, Mark J, Burger PC, et al. Specific chromosomal abnormalities in malignant human gliomas. *Cancer Res* 1988; 48:405-411.

Brabender J, Danenberg KD, Metzger R, et al. Epidermal growth factor receptor and HER2-neu mRNA expression in non-small cell lung cancer is correlated with survival. *Clin Cancer Res* 2001; 7:1850-1855.

Bruggeman FJ, Westerhoff HV, Hoek JB, et al. Modular response analysis of cellular regulatory networks. *J Theor Biol* 2002; 218:507-520.

Cairncross G, Swinnen L, Bayer R, Rosenfeld S, et al. Myeloblastic chemotherapy for recurrent aggressive oligodendroglioma. *Neurooncol.* 2000; 2:114-119.

Campbell JW, Pollack IF, Martinez AJ, et al. High-grade astrocytomas in children: radiologically complete resection is associated with an excellent long-term prognosis. *Neurosurgery* 1996; 38:258-264.

Canman CE, Wolff AC, Chen CY, et al. The p53-dependent G1 cell cycle checkpoint pathway and ataxia telangiectasia. *Cancer Res* 1994; 54:5054-5058.

Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *Ann Rev Biochem* 1979; 48: 193-216.

Carpenter G and Cohen S. Epidermal growth factor. *J Biol Chem* 1990; 265:7709-7712.

Carpenter G. Nuclear localization and possible function of receptor tyrosine kinase. *Curr Opin Cell Biol* 2003; 15:143-148.

Chakravarti A, Loeffler JS e Dyson NJ. Insulin-like growth factor receptor I mediates resistance to anti-epidermal growth factor receptor therapy in primary human glioblastoma cells through continued activation of phosphoinositide 3-kinase signaling. *Cancer Res* 2002; 62:200-207.

Chen Z, Ke LD, Yuan XH and Adler-Storthz K. Correlation of cisplatin sensitivity with differential alteration of EGFR expression in head and neck cancer cells. *Anticancer Res* 2000; 20: 899-902.

Cheng SY, Huang HJ, Nagane M, et al. Suppression of glioblastoma angiogenicity and tumorigenicity by inhibition of endogenous expression of vascular endothelial growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:8502-8507.

Choe G, Park JK, Jouben-Steele L, et al. Active matrix metalloproteinase 9 expression is associated with primary glioblastoma subtype. *Clin Cancer Res* 2002; 8:2894-901.

Chomczynski P and Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanidephenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162:156-159.

Clezardin P. Recent insights into the role of integrins in cancer metastasis. *Cell Mol Life Sci* 1998; 54:541-548.

Cohen S. The stimulation of epidermal proliferation by a specific protein (EGF). *Dev Biol* 1965; 12:394-407.

Cohen ME, Duffman PK. *Brain tumors in children: principles of diagnosis and treatment*. 2^a ed. New York: Raven Press, 1994.

Collins VP. Amplified genes in human gliomas. *Semin Cancer Biol* 1993; 4:27-32.

Costello A, Shallice T, Gullan R, Beaney R. The early effects of radiotherapy on intellectual and cognitive functioning in patients with frontal brain tumors: the use of a new neuropsychological methodology. *J Neurooncol* 2004; 67:351-359.

Cottu PH, Giacchetti S, Mignot L, et al. High dose chemotherapy with stem-cell transplantation in a metastatic medulloblastoma en an adult: a case report and review of the literature. *J Neurooncol*. 1994; 18:19-23.

Cox G, Jones JL, O'Byrne KJ. Matrix metalloproteinase 9 and the epidermal growth factor signal pathway in operable non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6:2349-2355.

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

DeAngelis LM. Brain Tumors. *N Engl J Med* 2001; 344: 114-123.

Deutsch M. Management of childhood brain tumors. Boston: Kluwer Academic Publishers 1990.

Diedrich U, Lucius J, Baron E, et al. Distribution of epidermal growth factor receptor gene amplification in brain tumors and correlation to prognosis. *J Neurol* 1995; 242:683-688.

Dirven CM, Grill J, Lamfers ML, et al. Gene therapy for meningioma: improved gene delivery with target adenoviruses. *J Neurosurg* 2002; 97:441-449.

Dobbing J, Smart JL. Vulnerability of developing brain and behaviour. *Br Med Bull* 1974; 30:164-168.

Dong J, Opresko LK, Dempsey PJ, et al. Metalloprotease-mediated ligand release regulates autocrine signaling through the epidermal growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:6235-6240.

Duerr EM, Rollbrocker B, Hayashi Y, et al. PTEN mutations in gliomas and glioneuronal tumors. *Oncogene* 1998; 16: 2259-2264.

Duffner PK, Horowitz ME, Krischer JP, et al. Postoperative chemotherapy and delayed radiation in children less than three years of age with malignant brain tumors. *N Engl J Med* 1993; 328:1725-1731.

Ekstrand AJ, James CD, Cavenee WK, et al. Genes of epidermal growth factor receptor, transforming growth factor alfa, and epidermal growth factor and their expression in human gliomas in vivo. *Cancer Res* 1991; 51:2164-2172.

Ellerbroek SM, Halbleib JM, Benavidez M, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase activity in epidermal growth factor-stimulated matrix metalloproteinase-9 production and cell surface association. *Cancer Res* 2001; 61:1855-1861.

Fine HA, Antman KH. High-dose chemotherapy with autologous bone marrow transplantation in the treatment of high grade astrocytomas in adults: therapeutic rationale and clinical experience. *Bone Marrow Transplantat.* 1992; 10:315-321.

Freeman CR, Farmer JP. Pediatric brain stem gliomas: a review. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998; 40:265-271.

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

Frixen UH, Behrens J, Sachs M, et al. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human colorectal carcinoma cells. *J Cell Biol* 1991; 113:173-185.

Folkman J. Tumor angiogenesis. In: Mendelsohn J, Howley P, Liotta LA and Israel M. *The molecular basis of cancer.* Philadelphia 1995; 206-232.

FOSP – Fundação Oncocentro de São Paulo.

http://www.fosp.saude.sp.gov.br/html/tabnet_inf.html

Fox SB, Gatter KC, Harris AI. Tumour angiogenesis. *J Pathol* 1996; 179:232-237.

Fueyo J, Gomez-Manzano C, Yung WK, Kyritsis AP. Targeting in gene therapy for gliomas. *Arch Neurol* 1999; 56:445-448.

Fujisawa H, Reis RM, Nakamura M, Colella S, et al. Loss of heterozygosity on chromosome 10 is more extensive in primary (de novo) than in secondary glioblastomas. *Lab Invest* 2000; 80:65-72.

Gilbert MR, Friedman HS, Kuttesch JF, et al. A phase II study of temozolomide in patients with newly diagnosed supratentorial malignant glioma before radiation therapy. *J Neuro-oncol* 2002; 4:261-267.

Gilbertson RJ, Hill DA, Herman R, et al. ErbB1 amplified and overexpressed in high-grade diffusely infiltrative pediatric brain stem glioma. *Clin Cancer Res* 2003; 9:3620-3624.

Giordano A, Rustum YM e Wenner CE. Cell cycle: molecular targets for diagnosis and therapy, tumor suppressor genes and cycle progression in cancer. *J Cell Biochem* 1998; 70:1-7.

Goldbrunner RH, Bernstein JJ, Tonn JC. ECM-mediated glioma cell invasion. *Microsc Res Tech* 1998; 43:250-257.

Gomez DE, Alonso DF, Yashiji H, et al. Tissue inhibitors of metalloprotenases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 1997; 74:111-122.

Gorla JJ, Fagundes JA, Parra DJ, et al. Fatores hepatotróficos e regeneração hepática. Parte I: o papel dos hormônios. *Acta Cir Bras* 2001; 16:179-184.

Gu J, Tamura M, Pankov R, et al. Shc and FAK differentially regulate cell motility and directionality modulated by PTEN. *J Cell Biol* 1999; 146:389-403.

Gurney JG, Smith MA, Bunin GR. CNS and miscellaneous intracranial and neoplasms. In: Ries LAG, Smith MA, Gurney JG et al; eds *Cancer Incidence And Survival Among Children And Adolescents: United States SEER Program 1975-1995*. NIH Pub n° 99-4649 Bethesda, MD: National Cancer Institute, SEER Program, 1999:51-63.

Hahn WC and Weinberg RA. Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med* 2002; 347:1593-1603.

Hanahan D, Weinberg R. The halmarks of cancer. *Cell* 2000; 100:57-70.

Hargrave DR, Bouffet E, Gammon J, et al. Phase I study of fotemustine in pediatric patient with refractory brain tumors. *Cancer* 2002; 95:1294-1301.

Hazan RB, Norton L. The epidermal growth factor receptor modulates the interaction of E-cadherin with the action cytoskeleton. *J Biol Chem* 1998; 273:9078-9084.

Hodgson DC, Goumnerova LC, Loeffler JS, et al. Radiosurgery in the management of pediatric brain tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001; 50:929-935.

Hollander MC, Alamo I, Jackman J, et al. Analysis of the mammalian gadd45 gene and its response to DNA damage. *J Biol Chem* 1993; 268:24385-24393.

Horn B, Heideman R, Geyer R, et al. A multi-institutional retrospective study of intracranial ependymoma in children: identification of risk factors. *J Pediatr Hematol Oncol* 1992; 21:203-211.

Hurwitz CA, Strauss LC, Kepner J, et al. Paclitaxel for the treatment of progressive or recurrent childhood brain tumors: a pediatric oncology phase II study. *J Pediatr Hematol Oncol* 2001; 23:277-281.

Jakacki RI, Zeltzer PM, Boyett JM, et al. Survival and prognostic factors following radiation and/or chemotherapy for primitive neuroectodermal tumors of the pineal region in infants and children: a report of the Childrens Cancer Group. *J Clin Oncol* 1995; 13:1377-1383.

Jenkin D, Greenberg M, Hoffman H, et al.. Brain tumors in children: long-term survival after radiation treatment. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995; 31:445-451.

Jonsohn DL, McCabe MA, Nicholson HS, et al. Quality of long-term survival in young children with medulloblastoma. *J Neurosurg* 1994; 80:1004-1010.

Jorissen R, et al. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res* 2003; 284:31-53.

Joseph T, Wooden R, Brejant A, et al. Transformation of cells overexpressing a tyrosine kinase by phospholipase D1 and D2. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 289:1019-1024.

Keely P, Parise L, Juliano R. Integrins and GTPases in tumour cell growth, motility and invasion. *Trends Cell Biol* 1998; 8:101-106.

Kerbek RS, Vitoria-Petit A, Okada F and Rak J. Establishing a link between oncogenes and tumor angiogenesis. *Mol Med* 1998; 4:286-295.

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

Kleihues P, Cavenee WK. Pathology and genetics of tumors of the nervous system. Lyon, France: International Agency of Research on Cancer 2000; 129-137

Kleihues P, Lous DN; Schethauer BW et al. The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002; 61:215-225.

Kleinman HK, Liao G. Gene therapy for antiangiogenesis J Natl Cancer Inst 2001; 93: 965–967.

Kurjak A. The story of angiostatin and how controversy is useful in science. Acta Med Croatica 2003; 57:145-148.

Lal A, Glazer CA, Martinson HM, et al. Mutant epidermal growth factor receptor up-regulates molecular effectors of tumor invasion. Cancer Res 2002; 62:3335-3339.

Lancaster DL, Hoddes JA, Michalski A. Tolerance of nitrosurea-based multiagent chemotherapy regime for low-grade pediatric gliomas. J Neurooncol 2003; 63:289-294.

Lashford LS, Thiesse P, Jouvett A, et al. Temozolomide in malignant gliomas of childhood: a United Kingdom Children's Cancer Study Group and French Society for Pediatric Oncology Intergroup Study. J Clin Oncol 2002; 20:4684-4691.

Learn CA, Hartzel TL, Wikstrand CJ, et al. Resistance of tyrosine kinase inhibition by mutant epidermal growth factor receptor variant III contributes to the neoplastic phenotype of glioblastoma multiforme. Clin Cancer Res 2004; 10:3216-3224.

Leibel SA, Pajak TF, Massullo V, et al. A comparison of misonidazole sensitized radiation therapy to radiation therapy alone for the palliation of hepatic metastases: results of a Radiation Therapy Oncology Group randomized prospective trial. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1987; 13:1057-1064.

Leibel SA, Sheline GE. Tolerance of the brain and spinae cord to conventinal irradiation. In: Irradiation injury to the nervous system. Edited by Gutin PH, Leibel SA, Sheline GE. New York. Raven Press 1991; 211.

Levin VA, Leibel SA, Gutin PH. Neoplasms of the Central Nervous System. In: Cancer: Principles and Practice of Oncology. Devita Jr VT, Hellman S, Rosenberg AS (eds). Philadelphia: Lippincott-Raven 2001; 2100-2160.

Levitzki A. Trageting signal transduction for disease therapy. Curr Opin Cell Biol 1996; 8:239-244.

Levy AP, Levy NS, Wegner S e Goldberg MA. Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. J Biol Chem 1995; 270:13333-133340.

Li DM, Sun H. PTEN/MMAC1/TEP1 suppresses the tumorigenicity and induces G1 cell cycle arrest in human glioblastoma cells. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95:15406-15411.

Li J, Yen C, Liaw D, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast and prostate cancer. Science 1997; 275:1943-1947.

Lo SS, Cho KH, Hall WA, et al. Does the extent of surgery have an impact on the survival of patients who receive postoperative radiation therapy for supratentorial low-grade gliomas? Int J Cancer 2001; 96:71-78.

Louis DN, Cavenee WK. Molecular biology of central nervous system neoplasms. In: Cancer: Principles and Practice of Oncology. By DeVita VT, Hellman S, Rosenberg AS. Philadelphia: Lippincott-Raven 2001; 2091-2099.

Machein MR, Plate KH. VEGF in brain tumors. J Neurooncol 2000; 50:109-120.

Maher EA, Furnari FB, Bachoo RM, et al. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. Genes Dev 2001; 15:1311-1333.

Matar P, Rojo F, Cassia R, et al. Combined Epidermal Growth factor receptor targeting with the tyrosine kinase inhibitor gefitinib (ZD1839) and the monoclonal antibody cetuximab (IMC-C225): superiority over single-agent receptor targeting. Clin Cancer Res 2004; 10:6487-6501.

McCormick F. Signalling networks that come cancer. Trends Cell Biol 1999; 9:M53-M56.

McKenna WG, Muschel RJ. Targeting tumors cells by enhancing radiation sensitivity. Genes Chromosomes Cancer 2003; 38:330-338.

Mendelsohn J e Baselga J. Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer. Clin Oncol 2003; 21:2787-2799.

Meyers MB, Shen WP, Spengler BA, et al. Increased epidermal growth factor receptor in multidrug-resistant human neuroblastoma cells. J Cell Biochem 1988; 38:87-97.

Morgan DO. Principles of CDK regulation. *Nature*. 1995; 374:131-134.

Mukohara T, Kudoh S, Yamauchi S, et al. Expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) and downstream-activated peptides in surgically excised non-small-cell lung cancer (NSCLC). *Lung Cancer* 2003; 41:123-130.

Murray MJ, Lessey BA. Embryo implantation and tumor metastasis: common pathways of invasion and angiogenesis. *Semin Reprod Endocrinol* 1999; 17: 275-290.

Nagane M, Marita Y, Mishima k, et al. Human glioblastoma xenografts overexpressing a tumor-specific mutant epidermal growth factor receptor sensitized to cisplatin by the AG1478 tyrosine kinase inhibitor. *J Neurosurg* 2001; 95:472-479.

Nakamizo A, Marini F, Amaro T, et al. Human bone marrow derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer*. 2005; 65:3307-3318.

Nath D, Williamson NJ, Jarvis R and Murphy G. Shedding of c-Met is regulated by crosstalk between a G-protein coupled receptor and the EGF receptor and is mediated by a TIMP-3 sensitive metalloproteinase. *J Cell Sci* 2001; 114:1213-1220.

Nazar GB, Hoffman HJ, Becker LE, et al. Infratentorial ependymomas in childhood: prognostic factors and treatment. *J Neurosurg* 1990; 72:408-417.

Nicholson KM, Quinn DM, Kellett GL, Warr JR. Preferential killing of multidrug-resistant KB cells by inhibitors of glucosylceramide synthase. *Br J Cancer* 1999; 81:423-430.

Noomberg SB, Benz CC. Tyrosine kinase inhibitors targeted to the epidermal growth factor receptor subfamily: role as anticancer agents. *Drugs* 2000; 59:753-767.

Nuttall RK, Pennington CJ, Taplin J, et al. Elevated membrane-type matrix metalloproteinases in gliomas revealed by profiling proteases and inhibitors in human cancer cells. *Mol Cancer Res* 2003; 1:333-345.

Ohgaki H, Schauble B, Zur Hausen A, et al. Genetic alterations associated with the evolution and progression of astrocytic brain tumours. *Virchows Arch* 1995; 427:113-118.

Ozkaynak MF, Sandoval C, Levendoglu-Tugal O, Jayabose S. A pilot trial of tandem autologous peripheral blood progenitor cell transplantation following high-dose thiotepa and carboplatin in children with poor-risk central nervous system tumors. *Pediatr Hematol Oncol*. 2004; 21:635-645.

Owen-Schaub LB, Zhang W, Cusack JC, et al. Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. *Mol Cell Biol* 1995; 15:3032-3040.

Packer RJ, Sutton LN, Rosenstock JG, et al. Pineal region tumors of childhood. *Pediatrics* 1984; 74:97-102.

Packer RJ, Sutton LN, Atkins TE, et al. A prospective study of cognitive function in children receiving whole-brain radiotherapy and chemotherapy: 2 year results. *J Neurosurg* 1989; 70:707-713.

Packer RJ, Nicholson HS, Vezina LG, et al. Brainstem gliomas. *Neurosurg Clin N Am* 1992; 3:863-879.

Packer RJ, Lange B, Ater J, et al. Carboplatin and vincristine for recurrent and newly diagnosed low-grade gliomas of childhood. *J Clin Oncol* 1993; 11:850-856.

Packer RJ, Raffael C, Villablanca JG, et al. Treatment of progressive or recurrent pediatric malignant supratentorial brain tumors with herpes simplex virus thymidine kinase gene vector-producer cells followed by intravenous ganciclovir administration. *J Neurosurg.* 2000; 92:249-254.

Packer RJ, Mehta M. Neurocognitive sequelae of cancer treatment. *Neurology* 2002; 59:8-10.

Pencalet P, Sainte-Rose C, Lellouch-Tubiana A, et al. Papillomas and carcinomas of the choroid plexus in children. *J Neurosurg* 1998; 88:521-528.

Perry JE, Grossmann ME, Tindall DJ. Epidermal growth factor induces cyclin D1 in a human prostate cancer cell line. *Prostate* 1998; 35:117-124.

Pollack IF. Brain tumors in children. *N Engl J Med* 1994; 331:1500-1507.

Pollack IF, Gerszten PC, Martinez AJ, et al. Intracranial ependymomas of childhood: long-term outcome and prognostic factors. *Neurosurgery* 1995a; 37:655-666.

Pollack IF, Classen D, Al-Shboul Q, et al. Low-grade gliomas of the cerebral hemisphere in children: an analysis of 71 cases. *J Neurosurg* 1995b; 82:536-547.

Pollack IF, Finkelstein SD, Burnham J, et al. Age and *TP53* mutation frequency in childhood malignant gliomas: results in a multi-institutional cohort. *Cancer Res* 2001; 61:7404-7407.

Prados MD, Berger MS, Wilson CB. Primary central nervous system tumors: advances in knowledge and treatment. *Cancer J Clin* 1998; 48:331-360.

Raffel C, Frederick L, O'Fallon JR et al. Analysis of oncogene and tumor suppressor gene alterations in pediatric malignant astrocytomas reveals reduced survival for patients with PTEN mutations. *Cancer Res* 1999; 5:4085-4090.

Rafferty MA, Fenton JE, Jones AS. An overview of the role and inter-relationship of epidermal growth factor receptor, cyclin D and retinoblastoma protein of the carcinogenesis of squamous cell carcinoma of the larynx. *Clin Otolaryngol* 2001; 26:317-320.

Rajkumar T. Growth factors and growth factor receptors in cancer. *Current Science* 2001; 81: 535-541.

Rao RD, Uhm JH, Krishnan S and James CD. Genetic and signaling pathway alterations in glioblastoma: relevance to novel targeted therapies. *Front Biosci* 2003; 8:270-280.

Raw I, HO P. Sinais dos fatores de crescimento celular. Em: *Interação e seus sinais*, ed. UNESP. São Paulo 2000, cap. 20.

Raymond E, Faivre S, Armand JP. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase as a target for anticancer therapy. *Drugs* 2000; 60:15-23.

Ries LAG, Smith MA, Gurney JG, Linet M, Tamara T, Young JL, Bumin GR. Cancer Incidence and survival among children and adolescents: United States SEER Program 1975 – 1995, National Cancer Institute, SEER Program. NIH Pub n°99 – 4649. Bethesda MD, 1999.

Rocha JCC. Câncer do Sistema Nervoso Central in: *Genética Molecular*, Iúri DL e colaboradores. 1ª ed. São Paulo 2002; 27:243-252.

Rousseau P, Habrand JL, Sarrazin D, et al. Treatment of Intracranial ependymomas of children: review of a 15-years experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994; 28:381-386.

Salomon, DS, Brandt R, Ciardiello F and Normanno N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 1995; 19: 183-232.

Schafer B, Gschwind A, Ullrich A. Multiple G-protein-coupled receptor signals converge on the epidermal growth factor receptor to promote migration and invasion. *Oncogene* 2004; 23:991-999.

Shamah SM, Alberta JA, Giannobile WV, et al. Detection of activated platelet-derived growth factor receptors in human meningioma. *Cancer Res* 1997; 57:4141-4147.

Shapiro WR, Green SB, Burger PC, et al. Randomized trial of three chemotherapy regimens and two radiotherapy regimens in postoperative treatment of malignant glioma: Brain Tumor Cooperative Group (BTCG) Trial 8001. *J Neurosurg* 1989; 71:1-9.

Shapiro WR, Shapiro JR. Biology and treatment of malignant glioma. *Oncology* 1998; 12:233-240.

Shinojima N, Tada K, Shiraishi S, et al. Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer Res* 2003; 63:6962-6970.

Sidransky D, Mikkelsen T, Schwechheimer K, et al. Clonal expansion of p53 mutant cells is associated with brain tumour progression. *Nature* 1992; 355:846-847.

Simmons ML, Lamborn KR, Takaharhi M, et al. Analysis of complex relationships between age, p53, epidermal growth factor receptor and survival in glioblastoma patients. *Cancer Res* 2001; 61:1122-1128.

Smith S, Schechter A, Papke O, et al. Quantitation of the extracellular domain of epidermal growth factor receptor in the plasma of dioxin-exposed individuals. *Am J Ind Med* 1998; 34:1-5.

Srivastava A, Alexander J, Lomakin I, et al. Immunohistochemical expression of transforming growth factor alfa and epidermal growth factor receptor in pancreatic endocrine tumors. *Human Pathol* 2001; 32:1184-1189.

Stephan CC, Brock TA. Vascular endothelial growth factor, a multifunctional polypeptide. *P R Health Sci J* 1996; 15:169-178.

Strother DR, Pollack IF, Fischer PG et al. Tumors of the Central Nervous System. In: Pizzo PA, Poplack DG. *Principles and Practice of Pediatric Oncology*. Philadelphia: Lippincott-Raven 2002; 751-814.

Suzuki M, Raab G, Moses MA, et al. Matrix metalloproteinase-3 releases active heparin-binding EGF-like growth factor by cleavage at a specific juxtamembrane site. *J Biol Chem* 1997; 272:3170-3173.

Tamura M, Gu J, Takino T e Yamada KM. Tumor suppressor PTEN inhibition of cell invasion, migration and growth: differential involvement of focal adhesion kinase and p130^{cas}. *Cancer Res* 1999; 59:442-449.

Tohma Y, Gratas C, Biernat E, et al. PTEN (MMAC1) mutations are frequent in primary glioblastomas (de novo) but not in secondary glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998; 57:684-689.

Ueba T, Takahashi JA, Fukumoto M, et al. Expression of fibroblast growth factor receptor-1 in human glioma and meningioma tissues. *Neurosurgery* 1994; 34:221-226.

Van Meir EG, Kikuchi T, Tada M, et al. Analysis of the p53 gene and its expression in human glioblastoma cells. *Cancer Res* 1994; 54:649-652.

Van Meter TE, Broaddus WC, Rooprai HK, et al. Induction of membrane-type-1 matrix metalloprotease by epidermal growth factor-mediated signaling in gliomas. *J Neuro-oncol* 2004; 6:188-199.

Vecchi M, Rudolph-Owen LA, Brown CL, et al. Tyrosine phosphorylation and proteolysis. Pervanadate induced, metalloprotease-dependent cleavage of the ErbB-4 receptor and amphiregulin. *J Biol Chem* 1998; 273:20589-20595.

Wagner S, Erdlenbruch B, Langler A, et al. Oral topotecan in children with recurrent or progressive high-grade glioma: a Phase I/II study by the German Society for Pediatric Oncology and Hematology. *Cancer*. 2004; 100:1750-1757.

Wakeling AE, Guy SP, Woodburn JR, et al. ZD 1839 (Iressa) an orally active inhibitor of epidermal growth factor signaling with potential for cancer therapy. *Cancer Res* 2002; 62:5749-5754.

Watanabe K, Tachibana O, Sata K, et al. Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol* 1996; 6:217-223.

Wells A. Tumor invasion: role of growth factor-induced cell motility. *Adv Cancer Res* 2000; 78:31-101.

Werb Z, Chin JR. Extracellular matrix remodeling during morphogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 857:110-118.

Werbeek BS, Adriaansen-Slot SS, Vroom TM, et al. Overexpression of EGFR and c-erbB2 causes enhanced cell migration in human breast cancer cells and NIH3T3 fibroblasts. *FEBS Lett* 1998; 425:145-150.

Whang YE, Wu X, Suzuki H, et al. Inactivation of the tumor suppressor PTEN/MMAC1 in advanced human prostate cancer through loss of expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:5246-5250.

Wikstrand CJ, McLendon RE, Friedman AH e Bigner DD. Cell surface localization and density of the tumor associated variant of the epidermal growth factor receptor EGFRvIII. *Cancer Res* 1997; 57:4130-4140.

Wong AJ, Ruppert JM, Bigner SH, et al. Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:2965-2969.

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

Wosikowski K, Schuurhuis D, Johnson K, et al. Identification of epidermal growth factor receptor and c-erbB2 pathway inhibitors by correlation with gene expression patterns. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89:1505-1515.

Zadeh G e Guha A . Neoangiogenesis in human astrocytomas: expression and functional role of angioproteins and their cognate receptors. *Front Biosci* 2003; 8:E128-E137.

Zwick E, Hackel PO, Prenzel N, Ullrich A. The EGFR receptor as central transducer of heterologous signalling systems. *Trends Pharmacol Sci* 1999; 20:408-412.

Anexo 1:**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

A limitada eficácia das modalidades atuais de tratamento para os tumores de sistema nervoso, conduzem à avaliação de novas estratégias terapêuticas. Alterações em elementos-chave de vias de sinalização são reconhecidas como as principais determinantes das diferenças entre célula cerebral normal e maligna. Assim, a interferência sobre tais componentes pode levar ao desenvolvimento de formas mais efetivas no manejo destes tumores.

Em virtude disso, estamos realizando um estudo onde avaliaremos as alterações de algumas enzimas que poderão auxiliar no diagnóstico precoce e no monitoramento dos tumores do sistema nervoso central. Essas enzimas serão medidas no tecido tumoral removido durante a cirurgia.

Os pacientes serão acompanhados durante dois anos na consulta médica.

Fica assegurado ao paciente o direito de não participar ou de retirar-se desta pesquisa a qualquer momento sem que isso represente prejuízo ao seu atendimento médico hospitalar. Também asseguramos total sigilo das informações obtidas.

Eu,abaixo assinado ou responsável pelo paciente.....declaro ter pleno conhecimento:

- do objetivo desta pesquisa que visa identificar precocemente os processos de invasão tecidual;
- que receberei respostas ou esclarecimentos a qualquer dúvida a cerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa e meu tratamento individual;
- da liberdade de retirar o consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem que isso traga prejuízo à continuação do meu tratamento;
- que autorizo a utilização dos dados obtidos para pesquisa sem que eu seja identificado;
- que obterei informações atualizadas durante o estudo ainda que isto possa afetar a minha vontade em continuar colaborando;
- que este termo é assinado em duas vias.

De acordo,

Assinatura do paciente ou responsável

Assinatura do oncologista ou neurocirurgião assistente

Anexo 2:**FICHA CLÍNICA**

Nome:
Prontuário: n° inscrição:
Data de Nascimento: Idade:
Sexo: Cor:
Procedência: (cidade/local de origem):

Hospital de Referência:

TRATAMENTO PRÉVIO (anterior à coleta - cirurgia)

Cirurgia Prévia: () não () sim
Data:
Cirurgia: _____
Anátomo: _____

Quimioterapia Prévia: () não () sim
Início:
Término:
Protocolo/esquema QT: _____

Radioterapia Prévia: () não () sim
Início:
Término:

ANAMNESE/EXAME FÍSICO

- Data do início dos sinais e sintomas:
- Detalhar os dados de maior relevância do exame físico neurológico antes do procedimento cirúrgico:

EXAMES DE IMAGEM (pré-operatório):

() RM
Data:
Laudo:
Localização do tumor:

() TC
Data:
Laudo:
Localização do tumor:

() OUTROS: _____
Data:

Laudo:

Localização do tumor:

PROCEDIMENTO CIRÚRGICO (coleta da amostra)

Data:

Grau de ressecabilidade do tumor: ()

1. biópsia (0-10%)
2. ressecção parcial (10-50%)
3. ressecção subtotal (50-95%)
4. ressecção subtotal radical
5. ressecção completa

DIAGNÓSTICO

Anátomo-patológico:

Imunohistoquímica: () não realizado () realizado

Metástases: () não () sim () desconhecido

EXAMES DE IMAGEM (pós-operatório):

() RM

Data:

Laudo:

Localização do tumor:

() TC

Data:

Laudo:

Localização do tumor:

() OUTROS: _____

Data:

Laudo:

TRATAMENTO

Quimioterápico: () não () sim

Início:

Término:

Protocolo/esquema QT: _____

Radioterápico: () não () sim

Início:

Término:

ACOMPANHAMENTO AMBULATORIAL (Follow-up)

Data/Evolução/Exames:

Resposta:

- () Remissão Completa Data: _____
- () Vivo com doença Data: _____
- () Progressão Data: _____
- () Óbito Data: _____