Análise da expressão do EGFR em glioblastoma multiforme

Expression of the EGFR in patients with glioblastoma multiform

GISELE PEREIRA DE CARVALHO – Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Pediatria. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
SABRINA ESTEVES DE MATOS ALMEIDA, PhD – South American Office for Drug Development (SOAD).
ADRIANA BRONDANI DA ROCHA, PhD – Programa de Pós-Graduação em Diagnóstico Genético e Molecular da ULBRA.
JORGE WLADIMIR JUNQUEIRA BIZZI, PhD – Hospital da Criança Santo Antônio.
ALGEMIR LUNARDI BRUNETTO, PhD – Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

✉ Endereço para correspondência:
Dr. Algemir Lunardi Brunetto
Rua Ramiro Barcelos, 2350 – Terceiro andar ala: leste
Unidade de Oncologia Pediátrica
90035-903 – Porto Alegre, RS – Brasil
Fone (51) 2101-8267
(51) 3388-2877
abrunetto@hcpa.ufrgs.br

RESUMO

Introdução: O receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) é um oncogene que está freqüentemente hiperexpresso em células de glioblastoma multiforme (GM), sugerindo que este receptor possa estar envolvido na progressão maligna destes tumores. Existem evidências de que a determinação da expressão do EGFR possa servir como marcador de comportamento biológico em pacientes com gliomas de alto grau de malignidade. O presente relato representa uma análise preliminar de amostras de tumor de dois pacientes com GM, com o objetivo de demonstrar a factibilidade da determinação da expressão do EGFR em nosso meio.

Pacientes, métodos e resultados: Relato de dois casos de pacientes com GM submetidos a biópsia para coleta de tecido; os pacientes foram submetidos a tratamento seguindo protocolo terapêutico para esta neoplasia. Para determinação da expressão de EGFR foi feito extração de RNA total do tecido de biópsia, pela técnica de RT-PCR semiquantitativo. Um paciente apresentou hiperexpressão do gene e o outro foi considerado dentro dos limites da normalidade.

Discussão: Embora a análise isolada de apenas dois casos não nos permita fazer correlação entre a taxa de expressão do gene do EGFR e o prognóstico, os achados descritos neste relato permitem concluir que é factível no nosso meio determinar a expressão do EGFR em amostras de neoplasias malignas do SNC e nos encoraja à continuidade de investigações em um maior número de pacientes com a finalidade de avaliar o papel da expressão do EGFR como marcador prognóstico nesses pacientes.

UNITERMOS: Glioblastoma Multiforme, EGFR.

ABSTRACT

Introduction: *The epidermal growth factor receptor (EGFR) is an oncogene that is frequently overexpressed in patients with GM, suggesting that this receptor may play a role in the aggressive biologic behaviour of these tumors. There are suggestions that the determination of expression of EGFR may serve as a prognostic marker in patients with high grade gliomas.*

Patients, methods and results: *The authors report 2 patients with GM and the results of the expression of EGFR. Following biopsy the patients were treated according to a therapeutic protocol for this tumor. Expression of EGFR was determined in RNA samples using RT-PCR methodology. One patient showed overexpression of EGFR and the other showed normal level of expression.*

Discussion: *Although the determination of expression of EGFR in only two patients does not allow to assess the prognostic implication of this marker, it does show that the use of this method in feasible in biopsy specimens of SNC tumors. The results of this study encourage us to collect samples from future patients with high grade gliomas to further understand its role as a biologic marker of tumor progression.*

KEY WORDS: *Glioblastoma Multiform, EGFR.*

INTRODUÇÃO

Os tumores do Sistema Nervoso Central (SNC) constituem um grupo heterogêneo de doenças. Representam o tumor sólido mais freqüente na infância e adolescência, correspondendo a aproximadamente 17% de todos os casos de câncer nesta faixa etária (1). Os tumores do SNC podem ser classificados de acordo com o tipo histológico, localização e grau de malignidade. 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 de 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 supra-selar, 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, meningeoma e outros menos freqüentes (2).

Os gliomas de alto grau (astrocitoma anaplásico e glioblastoma multiforme) são tumores mais comuns em adultos do que em pacientes pediátricos, representando somente 10% dos tumores do SNC

Recebido: 10/01/2005 – Aprovado: 08/03/2006

na infância e ocorrem com maior freqüência durante a primeira década de vida (3). Estes tumores são altamente malignos, podendo desenvolver-se em qualquer parte do cérebro ou medula espinhal, entretanto apresentam maior incidência no lobo frontal, temporal e parietal. Os pacientes com gliomas de alto grau tendem a ter resposta insatisfatória ao tratamento e, ao contrário da maioria dos outros tumores do SNC, ocorre recidiva da doença na grande maioria dos pacientes, mesmo quando tratados com radioterapia pós-operatória. O prognóstico destes tumores depende do grau de ressecabilidade da lesão, das características histopatológicas, da localização da lesão e idade do paciente. Os pacientes possuem uma sobrevida baixa que varia de 5-10% em 5 anos (4, 5).

Em gliomas de alto grau, assim como em outras neoplasias malignas com resposta insatisfatória ao tratamento, a indicação de quimioterapia adjuvante deve ser sempre avaliada dentro de uma análise de custo-benefício, considerando o potencial de resposta em relação a sua toxicidade. Como o uso de quimioterapia agressiva está em geral associado a maior toxicidade e comprometimento da qualidade de vida, é importante definir critérios para inclusão de pacientes em protocolos de alta intensidade de dose. Habitualmente, utilizam-se como referência parâmetros histológicos e características clínicas como indicadores de resposta terapêutica. Esses parâmetros, em alguns pacientes, têm se mostrado insuficientes para permitir uma adequada estratificação terapêutica.

Em várias neoplasias malignas tem sido possível estimar o comportamento biológico do tumor através da identificação de marcadores moleculares e dessa forma utilizá-los como preditivos de evolução clínica da doença, podendo ser de utilidade na definição das decisões terapêuticas subseqüentes.

O receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) é uma proteína transmembrana com atividade tirosinaquinase, que atua no sistema de sinalização fundamental para a fisiologia normal da célula e para a manutenção do estado tumorigênico (6). O gene *EGFR* é o oncogene que está freqüentemente amplificado em torno de 70% dos glioblastomas primários (7-10), sugerindo que a ativação dessa via de sinalização é fundamental para a progressão maligna dos glioblastomas (11).

Alguns estudos recentes têm sugerido que a expressão aumentada de EGFR representa um dos principais fatores indicativos de evolução desfavorável em pacientes com gliomas de alto grau (12-15).

O objetivo do presente estudo foi avaliar prospectivamente o perfil de expressão do EGFR em tumores do SNC. O presente relato representa uma análise preliminar de amostras de tumor de dois pacientes com glioblastoma multiforme, demonstrando a factibilidade de determinação da expressão do EGFR em nosso meio.

PACIENTES, MÉTODOS E RESULTADOS

Coleta das amostras

Para realização deste estudo foram utilizadas biópsias de dois pacientes com glioblastoma multiforme (GM) atendidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e Hospital da Criança Santo Antônio (HCSA) no ano de 2003. As coletas foram realizadas após autorização pelo responsável pelo paciente através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa de ambos os hospitais. A identificação destes espécimes foi definida por exame anátomo-patológico e confirmado por imunohistoquímica, de acordo com os critérios de classificação de tumores cerebrais da Organização Mundial de Saúde (WHO). Após a ressecção, as amostras foram armazenadas em criotubo e mantidas em nitrogênio líquido, para posterior análise laboratorial.

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

Técnica de RT-PCR semiquantitativo

Para a síntese dos cDNAs (DNA complementar) foi empregada a técnica de RT-PCR (*Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction)*, utilizando 5 µg de RNA total e 25 pmol de *primers* anti-senso (*reverse*) para os genes GAPDH (gliceroldeído-3-fosfato dehidrogenase) e EGFR. Posteriormente, as amostras foram incubadas por uma hora a 37ºC com 20U de transcriptase reversa (MMLV – Amersham). A utilização do gene GAPDH tem dois propósitos: avaliar a integridade do material genético e auxiliar na quantificação da expressão do EGFR. O volume total da reação de RT-PCR (10µl) foi utilizado como molde para a amplificação dos fragmentos desejados através da técnica de PCR.

A quantificação dos produtos de PCR foi realizada através da técnica de eletroforese horizontal em gel de agarose 2%. 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 a do gene do receptor. A taxa de expressão do gene EGFR foi determinada através da razão entre os valores obtidos para GAPDH e EGFR.

RELATOS DE CASOS

Caso 1

Paciente do sexo masculino, com 5 anos de idade, de cor branca, com história de cefaléia importante há 2 meses e progressiva alteração do comportamento (irritabilidade). Realizou tomografia computadorizada (TC), com

diagnóstico de hidrocefalia e massa tumoral em cerebelo. Foi realizada derivação ventricular externa (DVE) em agosto/2003, apresentando crise convulsiva generalizada logo após o procedimento, sendo necessária a administração de fenobarbital e manitol. Apresentava diminuição de forças em membro inferior e superior esquerdos e oscilação do Glasgow de 8-14. A lesão expansiva era de origem infratentorial, predominantemente cística, com áreas sólidas vegetantes, a lesão media 4,8 cm no seu maior diâmetro, estando localizada na topografia do IV ventrículo, e determinava hidrocefalia. Foi submetido à ressecção cirúrgica total, sem sangramento importante no transoperatório. Exame anátomo-patológico revelou tratar-se de glioblastoma multiforme (GM) com perfil imuno-histoquímico Ki67 positivo em torno de 80%; GFAP (6F2) positivo; CD 31 (JC/70 A) e CD 34 (Q Bend 10) positivos nas áreas de angiogênese. Evoluiu no pós-operatório com hemiparesia à esquerda, pressão intracraniana com variação de 1-7mmHg. A TC pós-operatória identificou coleções hidroaéreas extra-axiais decorrentes do procedimento cirúrgico, e a ressonância magnética (RM) indicava presença de lesão residual de 0,5 cm no assoalho do IV ventrículo. Paciente teve alta em setembro/03, após colocação de derivação ventricular peritonial (DVP), em condições clínicas estáveis, com as alterações neurológicas descritas anteriormente. Após, recebeu 10 ciclos de quimioterapia e radioterapia (dose total de 5.400cGy). Uma RM de controle mostrou ausência de lesão expansiva e ao exame clínico o paciente apresentava melhora das seqüelas decorrentes da ressecção tumoral. A expressão de EGFR mostrou índice de 0,40 de RNAm em relação ao gene constitutivo gliceroldeído-3-fosfato dehidrogenase (GAPDH), conforme figura 1.

Caso 2:

Paciente do sexo feminino, com 7 anos de idade, de cor branca, previamente hígida, com história de cefaléia occipital há 30 dias e hemiparesia à direita, com assimetria de face. Apresentou piora dos sintomas, com vômitos em jato. Ao exame clínico mostrava-se em bom estado geral, deambulando com auxílio, pupilas isocóricas e fotorreagentes, fundo de olho normal, com sonolência e hemiparesia à direita grau II. Exame de imagem por RM apresentou volumoso processo expansivo, sem hidrocefalia. Duas semanas após TC de controle mostrava aumento significativo da lesão expansiva e áreas de sangramento intratumoral. Foi submetida a DVP, com melhora transitória, seguida de rápida progressão dos sintomas de cefaléia, vômitos e deteriorização do sensório. Paciente foi submetida a biópsia (ressecção de 10% do tumor), sendo que no pós-operatório encontrava-se com Glasgow de 7, sem abertura ocular espontânea e hipertonia espástica. Por ocasião da alta da Unidade de Terapia Intensiva, apresentava evidências de alterações neurológicas, incluindo hemiparesia à esquerda e afasia. TC de controle mostrava grande lesão expansiva, com 6,1 cm no seu maior diâmetro e situada junto ao tronco cerebral à esquerda estendendo-se cranial até acima do nível do 3º ventrículo, determinando moderado efeito de massa adjacente. Três semanas após, apresentou crise convulsiva, palidez, piora da sonolência, evoluindo com cianose e midríase, parada cardiorrespiratória, sem resposta à reanimação por 25 minutos. Realizada necropsia, com diagnóstico de GM, comprometendo núcleos da base à esquerda, sobretudo em região talâmica, ponte e cerebelo. A expressão de EGFR apresentou índice de 0,71 de RNAm em relação ao gene constitutivo GAPDH.

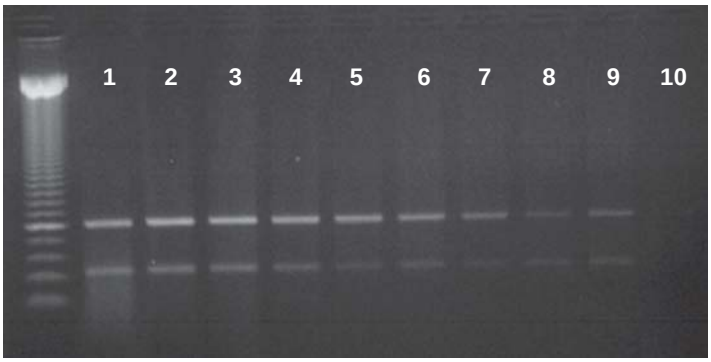


Figura 1 – Gel da amostra de glioblastoma multiforme (caso 1). As canaletas de 1 a 9 indicam as seriações do RNAm e a canaleta 10, o controle negativo.

DISCUSSÃO

A melhora acentuada nos índices de cura das neoplasias da infância nos últimos 20 anos se deve a progressos nas

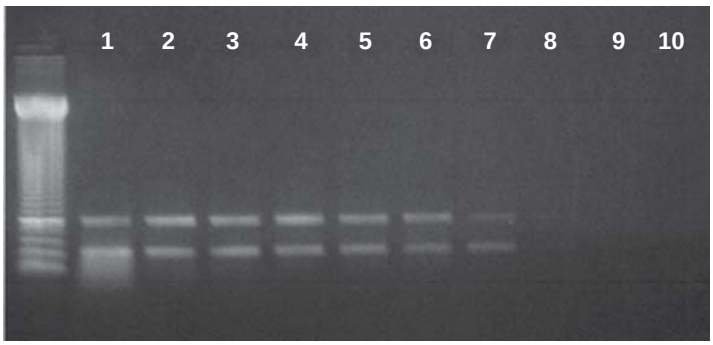


Figura 2 – Gel da amostra de glioblastoma multiforme, caso 2. As canaletas de 1 a 9 indicam as seriações do RNAm e a canaleta 10, o controle negativo.

técnicas de diagnóstico, avanços no tratamento de suporte, mas é resultante em grande parte de investigações conduzidas por grupos cooperativos, comparando o melhor tratamento existente com novas propostas terapêuticas, preferencialmente realizadas através de estudos clínicos randomizados.

Em tumores do SNC, a ressecção cirúrgica é a modalidade de tratamento mais importante, mas nos últimos anos a adoção de modelos de estudos clínicos multiinstitucionais em centros de referência no tratamento de tumores do SNC tem permitido conhecer melhor as características clínicas e biológicas desta neoplasia maligna.

A presença de fatores de crescimento associado a um aumento na expressão dos seus receptores, incluindo EGFR, pode ser interpretada como um elemento prognóstico desfavorável de um modo geral em todas as neoplasias (6, 16). A ativação do EGFR gera sinais intracelulares que culminam na proliferação celular, invasão, angiogênese e inibição da apoptose. Todos esses eventos são considerados críticos na progressão tumoral (17-19).

O GM é o tumor mais agressivo da linhagem dos tumores de origem glial e apresenta, mesmo com a utilização de terapias multimodais, prognóstico bastante desfavorável. Como os tumores do SNC representam um grupo heterogêneo de neoplasias, com comportamento clínico e resposta terapêutica nem sempre previsível, a identificação de marcadores moleculares pode ser útil tanto no entendimento do curso clínico da doença bem como na investigação de possíveis alvos terapêuticos.

A identificação de subtipos moleculares envolvidos na patogênese dos gliomas poderá no futuro ser usada para a estratificação de pacientes em grupos de risco de recaída, bem como potenciais alvos para terapia experimental (20).

No presente estudo, descrevemos dois pacientes com a mesma doença que apresentaram desfechos clínicos bastante distintos. Embora pareça tentador valorizar a resposta clínica favorável apresentada pelo paciente que tinha níveis de expressão do EGFR dentro dos limites da normalidade, consideramos importante reconhecer que a análise isolada de apenas dois casos não nos permite fazer correlação entre a taxa de expressão do gene do EGFR e o prognóstico. Entretanto, os achados descritos neste relato permitem concluir que é factível no nosso meio determinar a expressão do EGFR em amostras de neoplasias malignas e nos encoraja à continuidade de investigações em um maior número de pacientes, com a finalidade de avaliar o papel da expressão do EGFR como marcador prognóstico em pacientes com tumores do SNC.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem ao Instituto do Câncer Infantil do RGS pelo apoio concedido ao autor GPC para a realização deste estudo, durante a realização de seu Curso de Pós-Graduação na UFRGS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. RIES L.A.G.; SMITH M.A.; GURNEY, J.G.; LINET, M.; TAMARA, T;. YOUNG, J.L.; BUMIN, G.R. Cancer Incidence and Survival among children and adolescents: United States SEER Program 1975 – 1995, National Center Institute, SEER Program. NIH Pub n:99: 4649. Bethesda MD, 1999.
2. POLLACK, I.F. Brain tumors in children. N Engl J Med 1994; 331:1500-1507.
3. PIZZO, P.A.; POPLACK, D.G. Principles and Practice of Pediatric Oncology. 2.ed. Filadélfia, JB Lippincott Cia, 1993.
4. WISOFF, J.H.; BOYETT, J.M.; BERGER, M.S., et al. Current neurosurgical management and the impact of the extent of resection in the treatment of malignant gliomas of childhood: a report of the Children's Cancer Group trial n: CCG-945. J Neurosurg 1998; 89:52-59.
5. FINLAY, J.L.; BOYETT, J.M.; YATES, A.J. et al. Randomized phase III trial in high grade astrocytoma comparing vincristine, lomustine and prednisolone with the eight drugs in 1 day regimen. Children's Cancer Group. J Clin Oncol 1995; 13:112-123.
6. JORISSEN, R.N. et al. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. Exp Cell Res 2003; 284: 31-53.
7. 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.
8. THOMA, Y.; GRATAS, C.; BIERNAT, E. et al. PTEN mutations are frequent in primary glioblastomas (de novo) but not in secondary glioblastomas. J Neuropathol Exp Neurol 1998; 57:684-689.
9. EKSTRAND, A.J.; JAMES, C.D.; CAVENEE, W.K. et al. Genes of epidermal growth factor receptor, transforming growth factor alpha, and epidermal growth factor and their expression in human gliomas in vivo. Cancer Res 1991; 51:2164-2172.
10. MAHER, E.A.; FURNARI, F.B.; BACHOO, R.M. et al. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. Genes Dev 2001; 15:1311-1333.
11. FREDERICK, L.; WANG, X.; ELEY, G.; JAMES, C.D. Diversity and Frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas. Cancer Res 2000; 60:1383-1387.
12. HUNCHAREK, M.; KUPELNICK, B. Epidermal growth factor receptor gene amplification as a prognostic marker in glioblastoma multiforme: results of a meta-analysis. Oncol Res 2000; 12:107-112.
13. SCHMIDT, M.C.; ANTWEILER, S.; URBAN, N. et al. Impact of genotype and morphology an the prognosis of glioblastoma. J Neuropathol Exp Neurol 2002; 61:321-328.
14. ANDERSSON, U.; GUO, D.; MALMER, B. et al. Epidermal growth factor receptor family (EGFR, ErbB2-4) in gliomas and meningiomas. Acta Neuropathol 2004; 108:135-142.
15. 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.
16. 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.
17. WOODBURN, J.R. The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy. Pharmacol Ther 1999; 82:241-250.
18. WELLS, A. Tumor invasion: role of growth factor-induced cell motility. Adv Cancer Res 2000; 78:31-101.
19. NOOMBERG, S.B.; BENZ, C.C. Tyrosine kinase inhibitors targeted to the epidermal growth factor receptor subfamily. Drugs 2000; 59:753-767.
20. SHAI, R.; SHI, T.; KREMEN, T.J. et al. Gene expression profiling identifies molecular subtypes of gliomas. Oncogene 2003; 22:4918-4923.